

**„Phyto“-Ceramide aus pflanzlichen Ressourcen
zur Nutzung in der Dermatotherapie**

DISSERTATION

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Dipl.-Pharm. Mathias Reisberg
geb. am 21. September 1986 in Kyritz

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Dr. h. c. Reinhard Neubert
3. Prof. Dr. Marc Stadler

Tag der Verteidigung: 18. Dezember 2017

Carpe Diem.

Horaz

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS VI

TABELLENVERZEICHNIS..... VIII

ABBILDUNGEN UND TABELLEN IM ANHANG X

KURZFASSUNG XII

SUMMARY XIV

1 EINLEITUNG 1

 1.1 Sphingolipide und Glycosylceramide 1

 1.1.1 Strukturvielfalt und Nomenklatur.....1

 1.1.2 Funktion und Bedeutung von Sphingolipiden4

 1.1.3 Vorkommen von Glycosylceramiden in Pflanzen.....7

 1.1.3.1 Apfeltrester.....9

 1.1.3.2 Weizenkeime.....10

 1.1.3.3 Kaffeesatz.....12

 1.1.3.4 Fabaceae-Arten13

 1.1.4 Produktion von Ceramiden für die medizinische und kosmetische Anwendung15

 1.2 Die menschliche Haut..... 16

 1.2.1 Aufbau und Funktionen.....16

 1.2.2 Ceramide als Hauptkomponenten des *Stratum corneums*19

 1.2.3 Die Organisation der *Stratum corneum*-Lipide21

 1.2.4 Ceramidprofil-bedingte Hauterkrankungen.....23

2 ZIELSTELLUNG 25

3 MATERIAL UND METHODEN 27

 3.1 Material..... 27

 3.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....27

 3.1.2 Referenzen.....28

 3.1.3 Halbfeste Formulierung.....28

 3.1.4 Enzyme28

 3.1.5 Pflanzenmaterial28

 3.1.6 Geräte und Hilfsmittel30

 3.1.7 Verbrauchsmaterialien.....32

 3.1.8 Software.....32

 3.2 Methoden 33

 3.2.1 Isolierungsschema33

 3.2.1.1 Extraktion der Gesamtlipide33

 3.2.1.2 Fraktionierung der Gesamtlipide mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion34

 3.2.1.3 Fraktionierung der Lipidklassen mittels Säulenchromatographie.....35

 3.2.1.4 Präparative HPLC-MS zur Isolierung von Glycosylceramiden36

3.2.1.5	Auftrennung der Fraktion A1 mittels Säulenchromatographie	38
3.2.1.6	Enzymatische Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®)	38
3.2.1.7	Aufreinigung der „Phyto“-Ceramide nach enzymatischer Hydrolyse.....	41
3.2.2	Detektion und Identifizierung von Glycosylceramiden.....	41
3.2.2.1	Dünnschichtchromatographie (TLC).....	41
3.2.2.2	Automatische Mehrfachentwicklung-Hochleistungsdünnschichtchromatographie (AMD-HPTLC)	42
3.2.2.3	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	44
3.2.2.4	HPLC-MS zur Trennung der neuartigen Glycosylceramide des Apfeltresters	45
3.2.3	Strukturaufklärung von Glycosylceramiden	45
3.2.3.1	Hochauflösende Massenspektrometrie (ESI-HRMS).....	45
3.2.3.2	Ionenfallen-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)	45
3.2.3.3	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	46
3.2.3.4	Identifizierung der Fettsäuredoppelbindungen mittels DMDS-Methode..	47
3.2.3.5	Zuckernachweis nach Dünnschichtchromatographie	48
3.2.4	Quantifizierung von Glycosylceramiden mit AMD-HPTLC-Densitometrie.....	48
3.2.4.1	Validierung der analytischen Methode.....	48
3.2.4.2	Quantifizierung des Pflanzenmaterials.....	50
3.2.4.3	Präparative TLC und MS-Identifizierung der Glycosylceramide der quantifizierten Banden.....	50
3.2.5	Hydrolyse pflanzlicher Glycosylceramide.....	51
3.2.5.1	Chemische Hydrolyse mit methanolischer Salzsäure.....	51
3.2.5.2	Oxidative Reduktionshydrolyse mit methanolischer Salzsäure	51
3.2.5.3	Enzymatische Hydrolyse mit β -Glucosidase (aus Mandeln).....	52
3.2.5.4	Enzymatische Hydrolyse mit Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®)	52
3.2.6	Penetration von „Phyto“-Ceramiden in menschliche Haut.....	53
4	ERGEBNISSE.....	54
4.1	Extraktion und Isolierung der Glycosylceramide aus Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz.....	54
4.2	Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Glycosylceramide.....	58
4.2.1	TLC zur Detektion von Glycosylceramiden in Lipidgemischen	58
4.2.2	ESI-HRMS zur Bestimmung der Summenformel	58
4.2.3	ESI-MS/MS zur Aufklärung der Sphingobase- und Fettsäureeinheit.....	60
4.2.4	NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Glycosylceramiden	64
4.2.5	1D-TOCSY zur Strukturaufklärung von Glycosylceramiden.....	71
4.2.6	¹ H-NMR-Fingerprinting von Glycosylceramiden	72
4.2.7	Doppelbindungsnachweis der Fettsäureeinheit.....	75
4.2.8	Neuartige Glycosylceramide des Apfeltresters.....	76
4.2.9	HPLC-MS zur Identifizierung von Glycosylceramiden	83

4.2.10 Überblick über identifizierte Glycosylceramide.....	86
4.3 Hydrolyse pflanzlicher Glycosylceramide.....	86
4.3.1 Entwicklung unterschiedlicher Hydrolysemethoden.....	86
4.3.2 Umsetzung der Glycosylceramide in „Phyto“-Ceramide mit Imiglucerase	92
4.3.3 Strukturnachweis der „Phyto“-Ceramide	94
4.4 Hautpenetrationsversuche mit „Phyto“-Ceramiden.....	99
4.5 Quantifizierung von Glycosylceramiden in Pflanzenmaterial	101
4.5.1 Probenaufbereitung.....	101
4.5.2 Validierung der AMD-HPTLC-Densitometrie-Methode	101
4.5.3 Glycosylceramid-Gehalte unterschiedlicher Pflanzenmaterialien.....	105
4.5.4 Massenspektrometrischer Glycosylceramid-Nachweis nach präparativer TLC....	105
5 DISKUSSION.....	107
5.1 Gewinnung von Glycosylceramiden aus pflanzlichem Material	107
5.1.1 Optimierung der Extraktion der Gesamtlipide und Aufarbeitung des Extraktes...107	
5.1.2 Isolierung der Glycosylceramide durch Kopplung säulenchromatographischer Methoden.....	109
5.1.3 Glycosylceramid-Gehalte des Apfeltresters, der Weizenkeime und des Kaffeesatzes.....	111
5.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Glycosylceramide	113
5.2.1 TLC-Identifizierung der Lipidklasse und MS-Strukturaufklärung der enthaltenen Glycosylceramide	113
5.2.2 NMR-Strukturaufklärung und ¹ H-NMR-Fingerprinting als Screening-Methode..	116
5.2.3 Identifizierte Glycosylceramide in Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz .	119
5.2.4 Funktion der Glycosylceramide in Pflanzen.....	124
5.2.5 Neuartige Glycosylceramide des Apfeltresters	125
5.3 Die Hydrolyse von Glycosylceramiden als limitierender Faktor.....	128
5.3.1 Mangelnde Effizienz der chemischen Hydrolyse.....	128
5.3.2 Enzymatische Hydrolyse zur Spaltung von Glycosylceramiden.....	130
5.4 Die Bedeutung von „Phyto“-Ceramiden im <i>Stratum corneum</i> und in der Dermatotherapie	132
5.5 Screening und Quantifizierung von Glycosylceramiden mittels AMD-HPTLC	137
5.6 „Phyto“-Ceramid-Gewinnung durch <i>Upcycling</i> industrieller Abfallprodukte	141
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	142
7 LITERATURVERZEICHNIS	146
8 ANHANG	173
PUBLIKATIONEN UND WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE.....	229
CURRICULUM VITAE.....	230
DANKSAGUNG.....	231
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	233

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AE	<i>Acacia etbaica</i>
AGr	<i>Albizia grandibracteata</i>
AGu	<i>Albizia gummifera</i>
AL	<i>Albizia lebbeck</i>
AMD	<i>Automated multiple development</i> (Automatische Mehrfachentwicklung)
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> (Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
AS	<i>Albizia schimperiana</i>
ATS	<i>Automatic TLC sampler</i> (Gerät zur automatischen TLC Probenauftragung)
βS	β-Sitosterol
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Cer	Ceramid
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> (Kollisionsinduzierte Dissoziation)
CMC	<i>Critical micelle concentration</i> (Kritische Mizellbildungskonzentration)
CO	Cholesteroleat
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> (NMR)
DART	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
DBE	<i>Double bond equivalents</i> (Doppelbindungsäquivalente)
DCM	Dichlormethan
DESI	<i>Desorption Electrospray Ionisation</i>
DMDS	Dimethyldisulfid
EC	<i>Enzyme commission (number)</i>
ELS	<i>Evaporative light scattering</i> (Evaporative Lichtstreuung)
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Elektrosprayionisation)
FA	<i>Formic acid</i> (Ameisensäure)
FAB	<i>Fast atom bombardment</i>
FS	Fettsäure
FRC	Forestry Research Center Addis Ababa (Addis Abeba, Äthiopien)
GC	Gaschromatographie
GlyCer	Glycosylceramid
GlySter	Sterolglycosid
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation</i> (NMR)
(HP)LC	<i>(High performance) liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPTLC	<i>High performance thin-layer chromatography</i> (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
HR	<i>High resolution</i> (Hochauflösung)
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum coherence</i> (NMR)
ID	Innerer Durchmesser
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemists
LCB	<i>Long chain base</i> (Sphingobase)
LOD	<i>Limit of detection</i> (Nachweisgrenze)
LOQ	<i>Limit of quantification</i> (Bestimmungsgrenze)
LS	Linolsäure

M	Molare Masse
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MS	Massenspektrometrie (MS ¹)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie (MS ²)
n.a.	Nicht angegeben
n.d.	Nicht detektiert
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NP-	<i>Normal phase-</i> (Normalphasen-, z.B. NP-HPLC)
P	Positivkontrolle
Ph. Eur.	<i>Pharmacopoea Europaea</i> (Europäisches Arzneibuch)
Pfl.	Pflanzen
p.a.	<i>Pro analysi</i> (Zur Analyse)
R1	Referenzlösung 1 (Diverse Lipide)
R2	Referenzlösung 2 (Ceramide)
R3	Referenzlösung 3 (Hydrolyse)
R_f	Retentionsfaktor
RP-	<i>Reversed phase-</i> (Umkehrphase-, z.B. RP-HPLC)
RP	<i>Robinia pseudoacacia</i>
ROESY	<i>Rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> (NMR)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RSD	<i>Relative standard deviation</i> (relative Standardabweichung)
Säu.	Säugetiere
SC	Säulenchromatographie
S/N	<i>Signal/noise ratio</i> (Signal/Rausch-Verhältnis)
SQ	Squalen
SL	Stammlösung
SV	Säulenvolumen
t	Zeit
TEWL	<i>Trans epidermal water loss</i> (Transepidermaler Wasserverlust)
TG	Triglycerid
TIC	<i>Total ion current</i> (Totalionenstrom)
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i> (Dünnschichtchromatographie)
TLE	Totallipidextrakt
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i> (NMR)
ULC	<i>Ultra liquid chromatography</i> (Ultraflüssigkeitschromatographie)
UV/Vis	<i>Ultraviolet/visible</i> (Lichtdetektion im ultravioletten oder sichtbaren Bereich)
V	Volumenteile
w	Massenteile
WFR	Wiederfindungsrate

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Repräsentative Strukturen von Ceramiden und Glycosylceramiden	1
Abb. 2:	Nomenklatur pflanzlicher Glycosylceramide (A) und Hautceramide (B)	2
Abb. 3:	Aufbau eines Weizenkorns (mod. nach Hoffman, 1925).....	11
Abb. 4:	<i>Coffea arabica</i> -Plantage in Westäthiopien	14
Abb. 5:	Aufbau der menschlichen Haut (mod. nach Barry, 1987)	17
Abb. 6:	Ceramidklassen der menschlichen Haut	21
Abb. 7:	<i>Armature reinforcement</i> -Modell der <i>Stratum corneum</i> -Lipide (Kiselev, 2007).....	22
Abb. 8:	Screening, Isolierung und Anwendung von „Phyto“-Ceramiden	26
Abb. 9:	Gewinnung von „Phyto“-Ceramiden aus Pflanzenmaterial	33
Abb. 10:	AMD-Technik.....	42
Abb. 11:	Gradientenelution der AMD-HPTLC-Methode.....	43
Abb. 12:	Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses nach Ph. Eur. 8.8 (2.2.46).....	49
Abb. 13:	Lipidextraktions- und Isolierungsverlauf des Apfeltresters.....	54
Abb. 14:	Übersicht der Glycosylceramid-angereicherten Fraktionen.....	56
Abb. 15:	MS/MS-Spektren und Fragmentierungsmuster von Glc-d18:2 ^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (7)	60
Abb. 16:	MS/MS-Spektren und Fragmentierungsmuster von Glc-t18:1 ^{Δ8E/Z} h22:0 (28)	62
Abb. 17:	2D-NMR-Korrelationen von Glc-d18:2 ^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (7).....	66
Abb. 18:	2D-NMR-Korrelationen von Glc-d18:1 ^{Δ8Z} h16:0 (9).....	67
Abb. 19:	2D-NMR-Korrelationen von Glc-t18:1 ^{Δ8E/Z} h22:0 (28)	69
Abb. 20:	1D-TOCSY-NMR-Spektren der Glycosylceramid-Leitstrukturen	71
Abb. 21:	1D-TOCSY-Korrelationen der Glycosylceramid-Leitstrukturen	72
Abb. 22:	Wichtige ¹ H-Signale für ein ¹ H-NMR-Struktur-Fingerprinting.....	73
Abb. 23:	Doppelbindungsnachweis der Fettsäure mittels NMR.....	76
Abb. 24:	Doppelbindungsnachweis der Fettsäure mittels ESI-MS/MS (DMDS-Derivate)	76
Abb. 25:	LC-MS der Fraktion A1 mit unterschiedlicher LC-Trennung	77
Abb. 26:	2D-Korrelationen von Glc-8-keto-d18:2 ^{Δ4E,9E} h16:0 (4).....	78
Abb. 27:	1D-TOCSY-Korrelationen von Glc-8-keto-d18:2 ^{Δ4E,9E} h16:0 (4)	78
Abb. 28:	2D- und 1D-TOCSY-Korrelationen von Glc-8-OH-d18:2 ^{Δ4E,9E} h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2 ^{Δ4E,7E} h16:0 (2)	80
Abb. 29:	HPLC-MS der Glycosylceramide des Apfeltresters (A), der Weizenkeime (B) und des Kaffeesatzes (C)	84
Abb. 30:	Identifizierte Glycosylceramide aus Apfeltrester (A), Weizenkeimen (W) und Kaffeesatz (C).....	85
Abb. 31:	TLC der sauren (HCl) Hydrolyse	87
Abb. 32:	AMD-HPTLC der sauren (HCl) Hydrolyse.....	88
Abb. 33:	TLC der chemischen Hydrolyse nach Iga <i>et al.</i> , 2011	89
Abb. 34:	ESI-MS-gestützter Reaktionsverlauf der oxidativen Reduktionshydrolyse	90
Abb. 35:	TLC der enzymatischen Hydrolyse mit β-Glucosidase (Mandeln).....	91
Abb. 36:	TLC der enzymatischen Hydrolyse mit Imiglucrase (Cerezyme®).....	91
Abb. 37:	Vergleich der ¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektren von Glc-d18:2 ^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (7) und d18:2 ^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47, Pyridin-d ₅)	93
Abb. 38:	Zuckernachweis der hydrolysierten Glycosylceramide	94
Abb. 39:	MS/MS-Spektren und Fragmentierungsmuster von d18:2 ^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47, A, B) und t18:1 ^{Δ8E/Z} h22:0 (48, C, D)	96

Abb. 40:	<i>E/Z</i> -Isomerenverhältnisse von d18:2 ^{Δ^{4E,8E/Z}} h16:0 (47), t18:1 ^{Δ^{8E/Z}} h22:0 (48) und t18:1 ^{Δ^{8E/Z}} h24:0 (49 , Pyridin- <i>d</i> ₅)	97
Abb. 41:	„Phyto“-Ceramide, gewonnen aus Apfeltrester nach enzymatischer Hydrolyse.....	99
Abb. 42:	LC-MS-Identifizierung der „Phyto“-Ceramide nach Hautpenetration.....	99
Abb. 43:	5-Punkt-Kalibrierung (n=1) der „Phyto“-Ceramide	100
Abb. 44:	TLC (A), AMD-HPTLC (B) und Densitogramme (C, D) der angereicherten Extrakte.....	102
Abb. 45:	Kalibrierkurve für 25-1000 ng/Bande Glc-d18:2 h16:0 (7 , Sojabohnen).....	103
Abb. 46:	Trennung von Glycosylceramiden und Sterolglycosiden an Sephadex LH-20.....	110
Abb. 47:	Sterische Effekte bewirken Ab- und Entschirmung von benachbarten ¹³ C-Kernen	117
Abb. 48:	Identifizierbare Molekülteile (grau) von Glycosylceramiden (R = H oder OH) mit 1D-TOCSY-Experimenten	118
Abb. 49:	Identifizierbare Molekülteile von Glycosylceramiden (R = H oder OH) mittels ¹ H-NMR-Fingerprinting	118
Abb. 50:	Aufwand und Strukturinformationen der verwendeten NMR-Experimente	119
Abb. 51:	Neue Glycosylceramide (Maluside I-III, 4 , 1 , 2) und bekannte Pilz-Glycosylceramide	126
Abb. 52:	Angriffspunkte für die enzymatische Hydrolyse von Glycosylceramiden.....	131
Abb. 53:	Isolierte „Phyto“-Ceramide im Vergleich zu menschlichen Hautceramiden	134

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Repräsentative Sphingobasen in Pflanzen (Pfl.) und Säugetieren (Säu.).....	3
Tab. 2:	Auswahl von Pflanzen, in denen Glycosylceramide nachgewiesen wurden	8
Tab. 3:	Glycosylceramid-Gehalte in Lebensmitteln.....	9
Tab. 4:	Sphingobasen und Fettsäuren des Weizens nach hydrolytischer Spaltung.....	11
Tab. 5:	Identifizierte intakte Glycosylceramide des Weizens	12
Tab. 6:	Ceramid- und Glycosylceramid-Gehalte von Weizenkörnern.....	12
Tab. 7:	Ceramid-Klassen der menschlichen Haut.....	20
Tab. 8:	Ausgewählte Ceramid-haltige Präparate.....	24
Tab. 9:	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....	27
Tab. 10:	Verwendete Referenzen.....	28
Tab. 11:	Halbfeste Formulierung für Hautpenetrationsversuche	28
Tab. 12:	Verwendete Enzyme	28
Tab. 13:	Deutsches Pflanzenmaterial	29
Tab. 14:	Äthiopisches Pflanzenmaterial.....	30
Tab. 15:	Verwendete Geräte und Hilfsmittel	30
Tab. 16:	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	32
Tab. 17:	Verwendete Software.....	32
Tab. 18:	Verhältnisse der Pflanzenmaterialien zum Extraktionsmittel	34
Tab. 19:	Elutionsgradient der Säulenchromatographie an Kieselgel 60	35
Tab. 20:	Verhältnis der aufgetragenen Proben zur stationären Phase.....	36
Tab. 21:	Gradient der HPLC-MS-Methode.....	37
Tab. 22:	Glycosylceramid-angereicherte Fraktionen zur Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS	37
Tab. 23:	Glycosylceramide für die enzymatische Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®) 40	
Tab. 24:	Parameter der halbautomatischen Probenauftragung für TLC und präparativer TLC41	
Tab. 25:	Aufgetragene Referenzlösungen.....	42
Tab. 26:	Parameter der automatischen Probenauftragung für AMD-HPTLC.....	43
Tab. 27:	Parameter der MS/MS-Experimente mit der Ionenfalle	46
Tab. 28:	Verwendete NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Glycosylceramiden und Ceramiden.....	47
Tab. 29:	Isolierte Glycosylceramid-Fraktionen	56
Tab. 30:	Fraktionsmassenrückstände der Glycosylceramid-Extraktion und -Isolierung	57
Tab. 31:	ESI-HRMS der Glycosylceramide.....	59
Tab. 32:	LC-MS- und ESI-MS/MS-Identifizierung der Glycosylceramide.....	63
Tab. 33:	¹ H-, ¹³ C-chemische Verschiebungen von Glc-d18:2 ^{Δ4E,8EZ} h16:0 (7 , Pyridin- <i>d</i> ₅).....	65
Tab. 34:	¹ H-, ¹³ C-chemische Verschiebungen von Glc-d18:1 ^{Δ8Z} h16:0 (9 , Pyridin- <i>d</i> ₅)	68
Tab. 35:	¹ H-, ¹³ C-chemische Verschiebungen von Glc-t18:1 ^{Δ8EZ} h22:0 (28 , Pyridin- <i>d</i> ₅).....	70
Tab. 36:	¹ H-NMR-Fingerprinting der Glycosylceramid-angereicherten Fraktionen	74
Tab. 37:	¹ H-, ¹³ C-chemische Verschiebungen von Glc-8-keto-d18:2 ^{Δ4E,9E} h16:0 (4 , Pyridin- <i>d</i> ₅)	79
Tab. 38:	¹ H-, ¹³ C-chemische Verschiebungen von Glc-8-OH-d18:2 ^{Δ4E,9E} h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2 ^{Δ4E,7E} h16:0 (2 , Pyridin- <i>d</i> ₅).....	81
Tab. 39:	Gesamt mengen der „Phyto“-Ceramide nach zwei Durchgängen der enzymatischer Hydrolyse.....	92
Tab. 40:	ESI-HRMS der hydrolysierten „Phyto“-Ceramide.....	95

Tab. 41:	LC-MS- und ESI-MS/MS-Identifizierung der hydrolysierten „Phyto“-Ceramide....	95
Tab. 42:	¹ H-, ¹³ C-chemische Verschiebungen von d18:2 ^{Δ^{4E,8E/Z}} h16:0 (47), t18:1 ^{Δ^{8E/Z}} h22:0 (48) und t18:1 ^{Δ^{8E/Z}} h24:0 (49 , Pyridin- <i>d</i> ₅).....	98
Tab. 43:	Anteil der penetrierten „Phyto“-Ceramide und Wiederfindungsraten.....	101
Tab. 44:	Fraktionsmassenrückstände der Probenaufbereitung von sechs Fabaceae	101
Tab. 45:	Richtigkeit der AMD-HPTLC-Quantifizierung	104
Tab. 46:	Präzision der AMD-HPTLC-Quantifizierung	104
Tab. 47:	Glycosylceramid-Gehalte des pflanzlichen Materials nach AMD-HPTLC-Densitometrie.....	105
Tab. 48:	LC-MS-Identifizierung der Glycosylceramide nach präparativer TLC.....	106
Tab. 49:	Anteile der Totallipidextrakte und der angereicherten Extrakte vom Ausgangsmaterial	108
Tab. 50:	MS-Identifizierung von Glycosylceramiden mit ähnlichen Molekülmassen	115
Tab. 51:	Haupt- und Spurenkomponenten in Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz..	120
Tab. 52:	Validierung der AMD-HPTLC-Methode	138
Tab. 53:	Glycosylceramid-Gehalte nach Aufreinigung und nach Quantifizierung mit AMD-HPTLC-Densitometrie.....	138

ABBILDUNGEN UND TABELLEN IM ANHANG

Abb. A1: TLC der Referenzlösung 1 (A), 2 (B) und 3 (C).....	173
Abb. A2: AMD-HPTLC der Referenzlösung 1 (A), 2 (B) und 3 (C).....	174
Abb. A3: Lipidextraktions- und Isolierungsverlauf der Weizenkeime.....	175
Abb. A4: Lipidextraktions- und Isolierungsverlauf des Kaffeesatzes.....	176
Abb. A5: Lipidextraktion der Fabaceae-Samen	177
Abb. A6: TLC der angereicherten Extrakte von Apfeltrester und -kernen.....	178
Abb. A7: TLC der Apfeltresterfraktionen (A1-12)	179
Abb. A8: TLC der Weizenkeimfraktionen (W1-12)	179
Abb. A9: TLC der Kaffeesatzfraktionen (C1-5).....	180
Abb. A10: HPLC-MS der Apfeltresterfraktionen (A1-12).....	180
Abb. A11: HPLC-MS der Weizenkeimfraktionen (W1-12).....	181
Abb. A12: HPLC-MS der Kaffeesatzfraktionen (C1-5).....	181
Abb. A13: TIC und extrahierte Ionen ($[M+H]^+$) der Apfeltresterfraktionen (A1-12)	182
Abb. A14: TIC und extrahierte Ionen ($[M+H]^+$) der Weizenkeimfraktionen (W1-12)	183
Abb. A15: TIC und extrahierte Ionen ($[M+H]^+$) der Kaffeesatzfraktionen (C1-5)	184
Abb. A16: MS/MS-Spektren von Glc-d18:1 h16:0 (9) und Glc-d18:3 h20:0 (14).....	185
Abb. A17: MS/MS-Spektren von Glc-d18:2 h20:1 (12), Glc-t18:1 h24:1 (29) und Glc-t18:1 h24:2 (20)	186
Abb. A18: MS/MS-Spektren von Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (4), Glc-8/9-OH-d18:2 h16:0 (1/2), Glc-2OH-d18:2 h24:0 (25) und Glc-OH-t18:1 h24:0 (18)	187
Abb. A19: MS/MS-Spektren zum Doppelbindungsnachweis der Fettsäure (FS, DMDS- Derivate)	189
Abb. A20: MS/MS-Spektren von t18:1 h24:0 (49)	189
Abb. A21: Proteinsequenz von Imiglucerase (DB00053)	191
Abb. A22: Kalibriergerade mit BSA (Bradford-Test).....	191
Abb. A23: HPTLC-Densitogramm der Kalibrierung (25-1000 ng/Bande Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)	192
Abb. A24: LC-MS-Identifizierung der Glycosylceramide nach präparativer TLC.....	195
Abb. A25: AMD-HPTLC zur Quantifizierung von „Phyto“-Ceramide	195
Abb. A26: ^1H -NMR-Spektrum von Glc-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},8\text{E}/\text{Z}}$ h16:0 (7, Pyridin- d_5).....	196
Abb. A27: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},8\text{E}/\text{Z}}$ h16:0 (7, Pyridin- d_5).....	197
Abb. A28: ^1H -NMR-Spektrum von Glc-t18:1 $^{\Delta 8\text{E}/\text{Z}}$ h22:0 (28, Pyridin- d_5)	199
Abb. A29: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-t18:1 $^{\Delta 8\text{E}/\text{Z}}$ h22:0 (28, Pyridin- d_5)	200
Abb. A30: ^1H -NMR-Spektrum von Glc-d18:1 $^{\Delta 8\text{Z}}$ h16:0 (9, Pyridin- d_5).....	202
Abb. A31: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-d18:1 $^{\Delta 8\text{Z}}$ h16:0 (9, Pyridin- d_5).....	203
Abb. A32: ^1H -NMR-Spektrum von Glc-8-keto-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},9\text{E}}$ h16:0 (4, Pyridin- d_5)	205
Abb. A33: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-8-keto-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},9\text{E}}$ h16:0 (4, Pyridin- d_5)	206
Abb. A34: ^1H -NMR-Spektrum von Glc-8-OH-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},9\text{E}}$ h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},7\text{E}}$ h16:0 (2, Pyridin- d_5).....	208
Abb. A35: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-8-OH-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},9\text{E}}$ h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},7\text{E}}$ h16:0 (2, Pyridin- d_5).....	209
Abb. A36: 1D-TOCSY-NMR-Spektren ausgewählter Glycosylceramide (Pyridin- d_5)	212
Abb. A37: 1D-TOCSY-NMR-Spektren der neuartigen Glycosylceramide (Pyridin- d_5)	213
Abb. A38: ^1H -NMR-Spektrum von d18:2 $^{\Delta 4\text{E},8\text{E}/\text{Z}}$ h16:0 (47, Pyridin- d_5).....	214
Abb. A39: ^{13}C -NMR-Spektrum von d18:2 $^{\Delta 4\text{E},8\text{E}/\text{Z}}$ h16:0 (47, Pyridin- d_5).....	215

Abb. A40: ^1H -NMR-Spektrum von t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (48 , Pyridin- d_5).....	217
Abb. A41: ^{13}C -NMR-Spektrum von t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (48 , Pyridin- d_5).....	218
Abb. A42: ^1H -NMR-Spektrum von t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h24:0 (49 , Pyridin- d_5).....	219
Abb. A43: ^{13}C -NMR-Spektrum von t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h24:0 (49 , Pyridin- d_5).....	220
Abb. A44: Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von Glc-t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (28) und t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (48 , Pyridin- d_5).....	222
Abb. A45: ^1H -NMR-Fingerprinting der Apfeltresterfraktionen (A1-12, Pyridin- d_5).....	223
Abb. A46: ^1H -NMR-Fingerprinting der Weizenkeimfraktionen (W1-12, Pyridin- d_5).....	224
Abb. A47: ^1H -NMR-Fingerprinting der Kaffeesatzfraktionen (C1-5, Pyridin- d_5).....	225
Abb. A48: Schematische Darstellung der Glycosylceramid-Synthese in Pflanzen.....	228
Tab. A1: ESI-MS/MS von Glycosylceramiden.....	188
Tab. A2: ESI-MS/MS von Ceramiden.....	190
Tab. A3: BSA-Verdünnungsreihe (Bradford-Test).....	191
Tab. A4: Ergebnisse der Bradford- und der photometrischen (280 nm) Proteinbestimmung	191
Tab. A5: Elutionsgradient der AMD-HPTLC (AMD 2).....	192
Tab. A6: Reproduzierbarkeit der Laufstrecke der eingesetzten Lipidreferenzen.....	192
Tab. A7: Kalibrierfunktion von Glc-d18:2 h16:0 (7 , Sojabohnen, AMD-HPTLC-Densitometrie).....	193
Tab. A8: Wiederholpräzision des LOQ (n=6) einer HPTLC-Platte.....	193
Tab. A9: Quantifizierung des pflanzlichen Materials mit AMD-HPTLC-Densitometrie.....	193
Tab. A10: Richtigkeit und Präzision der AMD-HPTLC-Quantifizierung.....	194
Tab. A11: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-d18:2 $^{\Delta 4E,8E/Z}$ h16:0 (7).....	198
Tab. A12: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (28).....	201
Tab. A13: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-d18:1 $^{\Delta 8Z}$ h16:0 (9).....	204
Tab. A14: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-8-keto-d18:2 $^{\Delta 4E,9E}$ h16:0 (4)... 207	
Tab. A15: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-8-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,9E}$ h16:0 (1)... 210	
Tab. A16: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-9-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,7E}$ h16:0 (2)... 211	
Tab. A17: 2D-NMR-Korrelationen von d18:2 $^{\Delta 4E,8E/Z}$ h16:0 (47).....	216
Tab. A18: 2D-NMR-Korrelationen von t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (48) und t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h24:0 (49).....	221
Tab. A19: <i>E/Z</i> -Isomerenverhältnisse der hydrolysierten „Phyto“-Ceramide.....	221
Tab. A20: Identifizierung von „Phyto“-Ceramiden.....	226
Tab. A21: Identifizierung von neuartigen Glycosylceramiden: Malusid I-III (4 , 1 , 2).....	227

KURZFASSUNG

Ceramide sind Sphingolipide, die aus einer Sphingobase und einer amidartig verknüpften Fettsäure aufgebaut sind. Sie machen ca. 50 % der Lipide des *Stratum corneums*, der äußersten Schicht der menschlichen Haut, aus und sind daher als entscheidender Teil der Hautbarriere am Schutz vor äußeren Einflüssen und an der Sicherung des Wasserhaushaltes des Menschen beteiligt. Bisher sind 18 Ceramidklassen in der menschlichen Haut nachgewiesen worden, von denen einige für die Stabilität des *Stratum corneums* als besonders wichtig angesehen werden. Langkettige Ceramide ([EOP] und [EOS]) verbinden die multilamellaren Lipidschichten innerhalb des *Stratum corneums*. Hydroxygruppen-reiche Ceramide ([AP] und [NP]) stabilisieren darüber hinaus die Lipidmatrix durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und sind wasserbindend.

Die Gehalte der Hautceramide sind bei Hauterkrankungen wie Psoriasis oder Neurodermitis verringert, ihre Zusammensetzung ist verändert. Eine Substitution hautidentischer Ceramide in halbfesten Formulierungen soll das Gleichgewicht wiederherstellen. Dafür sind Kosmetik- und Medizinprodukte meist mit halbsynthetischen Ceramiden ([NP], [AP], [NS] und [EOS]) auf dem Markt. Die halbsynthetische Herstellung durch enzymatische Produktion und anschließender Acylierung einer Fettsäure zu Ceramiden ist jedoch kostspielig. Daher wird nach alternativen Ceramidquellen gesucht. Ceramide kommen in geringen Mengen natürlich vor. Glycosylceramide dagegen findet man in größeren Mengen in Pflanzengeweben. Durch eine hydrolytische Spaltung der Glycosylceramide könnten Ceramide gewonnen werden. Strukturen von menschlichen und pflanzlichen Ceramiden weisen Unterschiede auf und bedürfen eines funktionellen Vergleichs.

Für ein Screening unterschiedlicher Pflanzenmaterialien wurde eine validierte AMD-HPTLC-Methode zur Quantifizierung von Glycosylceramiden nach einfacher Probenaufbereitung entwickelt. Außerdem sind Methoden zur Extraktion, Isolierung (Flüssig-Flüssig-Extraktion, Säulenchromatographie, präparativer HPLC-MS) und zur vollständigen Strukturaufklärung (TLC, HPLC-MS, MS/MS, HRMS, NMR) etabliert worden.

Es wurden drei Industrieabfallgüter (Apfeltrester, Weizenkeime, Kaffeesatz) auf Glycosylceramide untersucht. Apfeltrester (*Malus domestica*) und Weizenkeime (*Triticum aestivum*) stellen mit Glycosylceramid-Gehalten von 28,9 mg und 33,7 mg je 100 g Ausgangsmaterial industriell interessante Quellen dar, um „Phyto“-Ceramide zu produzieren. Für Kaffeesatz (*Coffea arabica*) wurden erstmals Glycosylceramide nachgewiesen, sogar nach intensiven Röstprozessen. Mit Gehalten von 4,4 mg je 100 g Ausgangsmaterial war das Material jedoch nicht zur „Phyto“-Ceramid-Gewinnung geeignet. Sechs weitere Pflanzenmaterialien (Samen von *Albizia grandibracteata*, *Albizia gummifera*, *Albizia lebbeck*, *Albizia schimperiana*, *Acacia etbaica* und *Robinia pseudoacacia*) wurden auf Glycosylceramide untersucht und wiesen Glycosylceramid-Gehalte von 9,4 bis 23,1 mg je 100 g Ausgangsmaterial auf.

Glycosylceramide sind in *A. grandibracteata*, *A. gummifera*, *A. schimperiana* und *A. etbaica* erstmals nachgewiesen worden.

Insgesamt wurden 46 Glycosylceramide (**1-46**) identifiziert. Sie sind hauptsächlich aus drei Sphingobasen (d18:1, d18:2, t18:1) sowie gesättigten und einfach ungesättigten α -hydroxylierten Fettsäuren (C15-28) aufgebaut. Einfach ungesättigte Fettsäuren wurden nur in Weizenkeimen nachgewiesen und waren *Z*-konfiguriert. Doppelbindungen der Sphingobasen waren an Position C-4,5 ausschließlich *E*- und an Position C-8,9 *E*- oder *Z*-konfiguriert. Dihydroxy (d)-Basen waren eher an kurzkettenige (C16-20), Trihydroxy (t)-Basen an langkettenige Fettsäuren (C22-26) gebunden. Glycosylceramide mit einer Sphingatrienin (d18:3)-Base (Glc-d18:3 h20:0, (**14**)) und einer zweifach ungesättigten Fettsäure (Glc-t18:1 h24:2 (**20**)) wurden erstmals in Weizenkeimen nachgewiesen. Alle Ceramidverbindungen hatten β -Glucose als polare Kopfgruppe.

Es wurden weiterhin fünf neuartige Glycosylceramid-Klassen im Apfeltrester nachgewiesen. Drei Derivate des Sphingadienin (d18:2)-Typs wurden mit einer zusätzlichen Hydroxygruppe (Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (**1**), Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (**2**)) und einer ungewöhnlichen Ketogruppe (Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**)) bestimmt. Ähnliche Verbindungen sind bisher nur in Pilzen identifiziert worden. Weitere Glycosylceramid-Klassen auf Basis des Sphingadienin (d18:2)-Typs mit zwei zusätzlichen Hydroxygruppen (Glc-2OH-d18:2 h16/22/24:0 (**3/13/25**)) und des Phytosphingenin (t18:1)-Typs mit einer weiteren Hydroxygruppe (Glc-OH-t18:1 h22/24:0 (**10/18**)) sind massenspektrometrisch nachgewiesen worden.

Drei Glycosylceramide, die in allen Pflanzen als Hauptkomponenten vorkamen (Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**), Glc-t18:1 h24:0 (**36**)), wurden mithilfe einer rekombinanten humanen Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®) zu „Phyto“-Ceramiden (**47-49**) hydrolysiert. Für die „Phyto“-Ceramide (d18:2 h16:0 (**47**), t18:1 h22:0 (**48**), t18:1 h24:0 (**49**)) wurden ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen angegeben. Darüber hinaus ist in ersten Versuchen die Penetration von „Phyto“-Ceramiden in menschliche Haut (10,3-16,5 %) nachgewiesen worden.

Ein weites Screening von Glycosylceramiden in Pflanzenmaterialien und die effiziente Gewinnung von „Phyto“-Ceramiden aus industriellem Abfallmaterial sollte für eine alternative Ceramid-Gewinnung zukünftig in Betracht gezogen werden. Auch müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob „Phyto“-Ceramide den Haut-Ceramiden soweit funktionell ähneln, dass sie in der menschlichen Dermatotherapie eingesetzt werden können.

SUMMARY

Ceramides belong to the class of sphingolipids and consist of a sphingoid base and an amide-linked fatty acid. They play a crucial role in the skin barrier function by providing a major lipid class (approx. 50 %) of the outermost layer of the skin – the stratum corneum. To this day 18 different ceramide classes have been detected in human skin. Long chain ceramides ([EOP] and [EOS]) are considered to be a linkage between different lipid layers, whereas ceramide [AP] und [NP] shall have stabilizing and water-binding properties because of their number of hydroxy groups.

Levels and composition of skin ceramides are altered in skin diseases such as psoriasis and atopic dermatitis. Skin-identical ceramides in the form of semisolid formulations are intended to improve this imbalance. Various pharmaceuticals and cosmetics are on the market that contain ceramides (e.g. [NP], [AP], [NS] and [EOS]). Semisynthetical ceramides are commercially available, however, very expensive. Thus there is a need for cheap alternatives. Glycosylceramides occur in plants and may serve for ceramide production. However, there are slight structural differences between human and plant ceramides. A comparison of functional behavior is therefore necessary.

An AMD-HPTLC method for plant screening and glycosylceramide quantification was validated. Extraction, isolation (liquid-liquid-extraction, column chromatography, preparative HPLC-MS) and structure elucidation (TLC, HPLC-MS, MS/MS, HRMS, NMR) methods were established.

Three industrial waste materials (apple pomace, wheat germs, coffee grounds) were investigated for glycosylceramide contents and species. Apple pomace (*Malus domestica*) and wheat germs (*Triticum aestivum*) contained glycosylceramides with 28.9 mg and 33.7 mg per 100 g dry weight. Glycosylceramides were detected in coffee grounds (*Coffea arabica*) for the first time. However, amounts of 4.4 mg per 100 g dry weight were not sufficient for “phyto”-ceramide production. Different Ethiopian and German plant materials (seeds of *Albizia grandibracteata*, *Albizia gummifera*, *Albizia lebbeck*, *Albizia schimperiana*, *Acacia etbaica* and *Robinia pseudoacacia*) were also investigated. Glycosylceramides were identified in *A. grandibracteata*, *A. gummifera*, *A. schimperiana* and *A. etbaica* for the first time. Contents between 9.4 and 23.1 mg/100 g dry weight were less than in apple pomace or wheat germs.

Altogether, 46 glycosylceramides (**1-46**) were identified. They consisted of three sphingoid bases (d18:1, d18:2, t18:1) and saturated as well as monounsaturated α -hydroxy fatty acids (C15-28). Monounsaturated fatty acids were detected in wheat germs only and were *Z* configured. Double bonds of the sphingoid bases were *E* configured at position C-4,5 and either *E* or *Z* configured at position C-8,9. Dihydroxy (d)-sphingoid bases were rather associated with short chain (C16-20) and trihydroxy (t)-sphingoid bases with long chain fatty acids (C22-26). Glycosylceramides with a sphingatrienine (d18:3)-sphingoid base (Glc-d18:3

h20:0 (**14**)) and a polyunsaturated fatty acid (Glc-t18:1 h24:2 (**20**)) were identified in wheat germs for the first time. All ceramides were linked to a β -glucose as polar head group.

In addition five new glycosylceramide classes were identified in apple pomace. Three derivatives of sphingadienine (d18:2) were elucidated with additional hydroxy groups (Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (**1**), Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (**2**)) and one additional oxo group (Glc-8-oxo-d18:2 h16:0 (**4**)). Similar compounds were only reported in fungi so far. A sphingadienine (d18:2) glycosylceramide class with two additional hydroxy groups (Glc-2OH-d18:2 h16/22/24:0 (**3/13/25**)) as well as a phytosphingenine (t18:1) glycosylceramide class with one additional hydroxy group (Glc-OH-t18:1 h22/24:0 (**10/18**)) were identified by means of mass spectrometry.

Three main glycosylceramides (Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**), Glc-t18:1 h24:0 (**36**)) were hydrolysed by a recombinant human glucocerebrosidase (imiglucerase, Cerezyme®) to yield “phyto”-ceramides (**47-49**). ^1H and ^{13}C chemical shifts of these “phyto”-ceramides (d18:2 h16:0 (**47**), t18:1 h22:0 (**48**), 18:1 h24:0 (**49**)) were reported. Their penetration behavior into human skin was investigated and amounts of 10.3-16.9 % were measured.

As consequence a wide screening of glycosylceramides in plants and the efficient production of “phyto”-ceramides from industrial waste plant material is necessary and should be taken into account for alternative production of ceramides. Future studies must show the benefit of “phyto”-ceramides in human dermal therapy.

1 EINLEITUNG

1.1 Sphingolipide und Glycosylceramide

1.1.1 Strukturvielfalt und Nomenklatur

Der Begriff „Sphingosin“ wurde von J. L. W. Thudichum (1829-1901) bereits 1884 in seiner Schrift „*A treatise on the chemical constitution of brain*“ geprägt. Er extrahierte Stoffe mit den Eigenschaften einer organischen Base sowie Zucker- und Fettsäureresten aus dem menschlichen Gehirn. Aufgrund der rätselhaften Erscheinungen benannte er das Hydrolyseprodukt nach dem mythologischen Fabelwesen Sphinx als „Sphingosin“ (Thudichum, 1884). Dieses Sphingosin wurde schließlich als (2*S*,3*R*,4*E*)-2-Aminooctadec-4-en-1,3-diol (d18:1^{Δ4*E*}) identifiziert (Carter *et al.*, 1947) und synthetisiert (Shapiro *et al.*, 1958) und war namensgebend für von Sphingosin (d18:1) abgeleitete Lipide, die Sphingolipide (Carter *et al.*, 1947; Pruett *et al.*, 2008). Sphingolipide gehören zu den polaren Membranlipiden mit amphiphilen Moleküleigenschaften. Sie werden in **1) Sphingobasen** und **einfache Derivate**, **2) Ceramide** (Cer) und **3) komplexe Sphingolipide** (inklusive Glycosylceramide, GlyCer) unterteilt (Hirabayashi *et al.*, 2006). Cer sind aus einer Sphingobase und einer amidartig verknüpften Fettsäure aufgebaut. GlyCer enthalten zusätzlich als Kopfgruppe einen Zucker (z.B. Glucose) (Abb. 1).

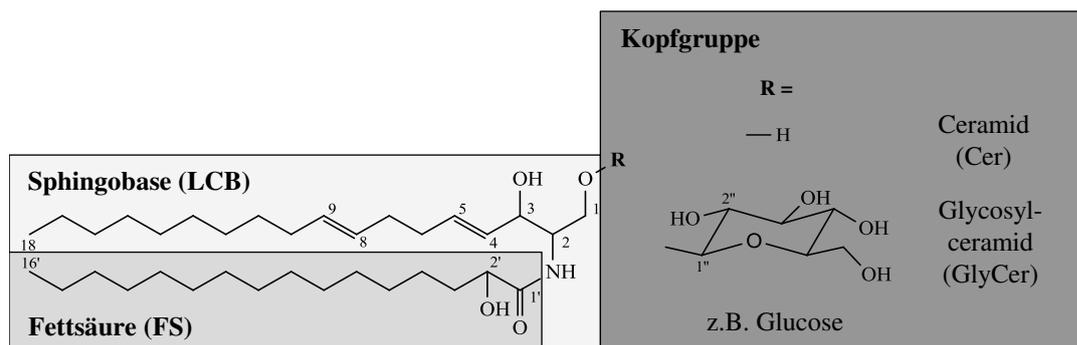


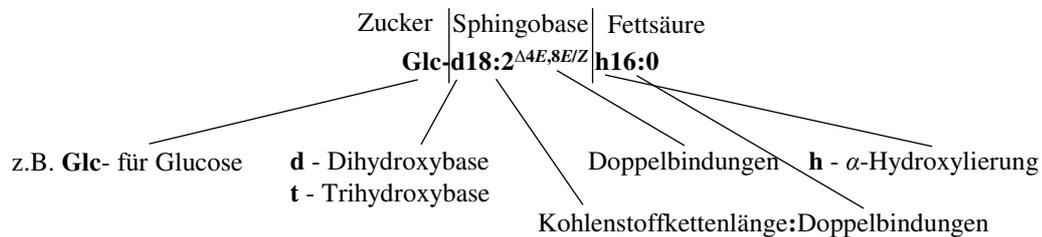
Abb. 1: Repräsentative Strukturen von Ceramiden und Glycosylceramiden

Dargestellt ist die Sphingobase d18:2^{Δ4*E*,8*E*} und die Fettsäure h16:0.

Es gibt unterschiedliche Nomenklatorsysteme für Sphingolipide. Pflanzliche GlyCer werden beispielsweise über die Kurzbeschreibung der Sphingolipidstruktur nach Karlsson, 1970b, auf Basis der allgemeinen Abkürzung für Lipide und Glycolipide nach IUPAC (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, 1997) beschrieben (Abb. 2). Cer der menschlichen Haut werden mit einer alternativen Kurzschreibweise bezeichnet, wenngleich die Beschreibung nach IUPAC ebenfalls angewendet werden kann. Cer wurden früher aufgrund ihrer Polarität bei der TLC-Trennung nach einem Nummerierungssystem benannt (z.B. Cer 1-8). Eine höhere Polarität bzw. niedriger R_f -Wert ergab eine höhere Nummer (Wertz und Downing, 1983). Später wurden sie mit ihrer Veröffentlichung durchnummeriert (z.B. Cer 9-12) (Breiden und Sandhoff, 2014). Aufgrund zunehmender Anzahl neuer Cer wurde ein Nomenklatorsystem entwickelt, das Abkürzungen der enthaltenen Strukturelemente vorsah

(Motta *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1994) (Abb. 2). Neue Verbindungen (z.B. Cer [NT]) wurden in Anlehnung an dieses Buchstabensystem benannt (t'Kindt *et al.*, 2012; Rabionet *et al.*, 2013).

A) Pflanzliche Glycosylceramide (Karlsson 1870b, IUPAC-IUB 1978 und 1997):



B) Hautceramide (Motta *et al.* 1993, Robson *et al.* 1994, t'Kindt *et al.* 2012):

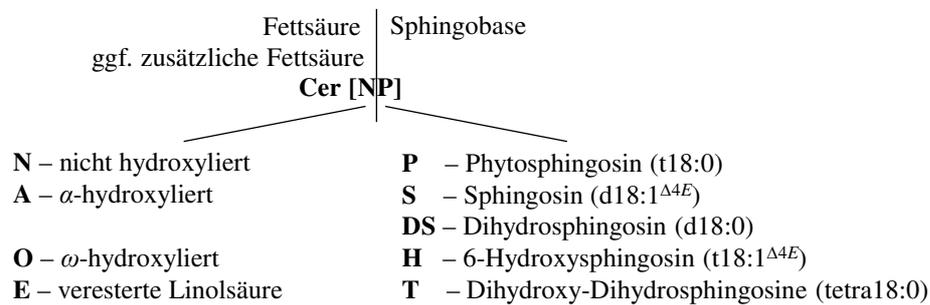
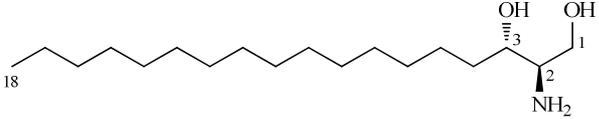
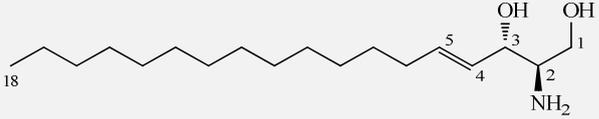
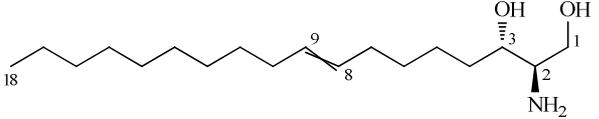
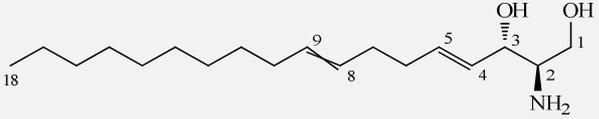
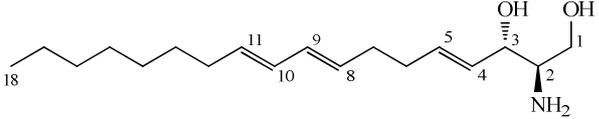
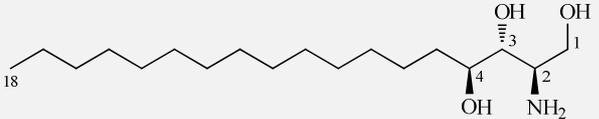
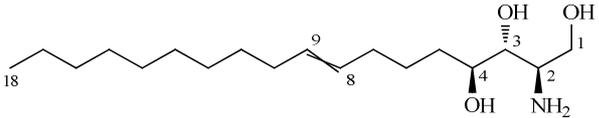


Abb. 2: Nomenklatur pflanzlicher Glycosylceramide (A) und Hautceramide (B)

Die Sphingobase (*Long chain base*, LCB) bildet das Rückgrat aller Cer und komplexen Sphingolipide, kann aber auch als freie Sphingobase oder Sphingoid-1-Phosphat vorliegen (Ng *et al.*, 2001; Pata *et al.*, 2010). Tab. 1 zeigt eine Auswahl der in Säugetieren (Säu.) und Pflanzen (Pfl.) vorkommenden Sphingobasen. Die Sphingobasen Sphinganin (d18:0), Sphingosin (4-Sphingenin, d18:1^{Δ4E}) und Phytosphingosin/4-Hydroxysphinganin (t18:0) kommen in Tieren und Pflanzen vor, stellen jedoch nur einen geringen Anteil der Sphingolipide in Pflanzen dar (Sperling *et al.*, 2004). In Pflanzen dominieren dagegen 8-Sphingenin (d18:1^{Δ8E/Z}), 4,8-Sphingadienin (d18:2^{Δ4E,8E/Z}) und Phytosphingenin (t18:1^{Δ8E/Z}) (Warnecke und Heinz, 2003). Das Sphinga-4,8,10-trienin (d18:3^{Δ4E,8E,10E}) wurde bisher u.a. in Spuren in Tabakblättern (Sperling *et al.*, 2005), Reis und Mais (Sugawara *et al.*, 2010) detektiert. Typischerweise haben die Sphingobasen C18-Kettenlängen (Imai *et al.*, 1997; Lynch und Dunn, 2004), obwohl auch andere Kettenlängen bestimmt worden sind. So wurden zum Beispiel Kettenlängen von C12-C22 in Haut-Cer (Farwanah *et al.*, 2007) oder C17-Sphingobasen in *Sagina japonica* (Jia *et al.*, 2010) nachgewiesen. Ähnlich der menschlichen Sphingobasen weisen die Hauptvertreter pflanzlicher Sphingolipide entweder eine Doppelbindung (*E*) oder Hydroxylierung an Position C-4 auf und tragen zusätzlich eine Doppelbindung (*E/Z*) an Position C-8. Aufgrund der nicht stereoselektiven $\Delta 8$ -Desaturase kommen sie als Konfigurationsisomere (8*E* und 8*Z*) in variablen Verhältnissen vor (Sperling *et al.*, 2004).

Tab. 1: Repräsentative Sphingobasen in Pflanzen (Pfl.) und Säugetieren (Säu.)

Modifiziert nach Sperling und Heinz, 2003, und Pata *et al.*, 2010.

Trivialname	Kurzform (Vorkommen)	Struktur und systematischer Name (in Übereinstimmung mit IUPAC-IUB 1978, 1997)
Sphinganin, Dihydrosphingosin	d18:0 (Säu., Pfl.)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2-Aminooctadecan-1,3-diol 
Sphingosin, Sphing-4-enin	d18:1 ^{Δ<i>4E</i>} (Säu., Pfl.)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-Aminooctadec-4-en-1,3-diol 
Sphing-8-enin	d18:1 ^{Δ<i>8E/Z</i>} (Pfl.)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,8 <i>E/Z</i>)-2-Aminooctadec-8-en-1,3-diol 
Sphinga-4,8-dienin	d18:2 ^{Δ<i>4E,8E/Z</i>} (Pfl.)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E/Z</i>)-2-Aminooctadeca-4,8-dien-1,3-diol 
Sphinga-4,8,10-trienin	d18:3 ^{Δ<i>4E,8E,10E</i>} (Pfl.)	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i>)-D-Aminooctadeca-4,8,10-trien-1,3-diol 
Phytosphingosin, 4-Hydroxysphinganin	t18:0 (Säu., Pfl.)	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-D-Aminooctadecan-1,3,4-triol 
Phytosphing-8-enin, 4-Hydroxysphing-8-enin	t18:1 ^{Δ<i>8E/Z</i>} (Pfl.)	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,8 <i>E/Z</i>)-2-Aminooctadec-8-en-1,3,4-triol 

Ceramide bestehen aus einer Sphingobase und einer amidartig verknüpften Fettsäure (Abb. 1). Die Sphingobasenrückgrate entsprechen den oben beschriebenen Partialstrukturen (Tab. 1). Die Fettsäuren menschlicher Ceramide liegen sowohl α -hydroxyliert als auch nicht hydroxyliert vor und haben Kettenlängen von C16-C26. Außerdem gibt es zusätzlich an der ω -Position veresterte Fettsäuren mit weitaus längeren Kettenlängen (Robson *et al.*, 1994; Fahy *et al.*, 2005; t'Kindt *et al.*, 2012). Die Fettsäurekettenlängen pflanzlicher GlyCer können C14-C26 umfassen (Sperling *et al.*, 2004), wobei ca. 90-95 % α -hydroxyliert vorliegen (Spassieva und Hille, 2003; Sperling *et al.*, 2004). Die gesättigten Kettenlängen C16, C20, C22 und C24 stellen hierbei die häufigsten Vertreter dar (Sperling und Heinz, 2003). Langkettige Fettsäuren können außerdem eine ω -9-Doppelbindung (*Z*) aufweisen (Sperling und Heinz, 2003).

Cer können zusätzliche Moleküle als Kopfgruppe an Position C-1 tragen und komplexe Sphingolipide bilden (Abb. 1). Anhand der Kopfgruppen können neutrale und saure

Sphingolipide unterschieden werden. Saure Sphingolipide besitzen ionisierte funktionelle Gruppen (z.B. eine Phosphocholingroupe in Sphingomyelinen), neutrale Sphingolipide ungeladene Zuckerreste (z.B. GlyCer) (Hirabayashi *et al.*, 2006). Die Kopfgruppen der häufigsten Sphingolipide unterscheiden sich bei Tieren und Pflanzen. Während bei menschlichen Sphingolipiden hauptsächlich Galactose, Fructose, Phosphatidylcholin, N-Acetylgalactosamin oder N-Acetylneuraminsäure auftreten, zeigen pflanzliche Sphingolipide überwiegend Glucose, Mannose oder Inositol (Hirabayashi *et al.*, 2006). Die häufigste Zucker-Kopfgruppe in pflanzlichen GlyCer ist β -Glucose (Sperling *et al.*, 2004), wobei auch β -Mannose in Spuren nachgewiesen wurde (Fujino und Ohnishi, 1982). Allein durch verschiedene kombinierte Zuckerreste sind in Tieren mehr als 500 Glycosphingolipide bekannt (Futerman und Hannun, 2004). In Pflanzen finden sich dagegen nur β -Mannose-elongierte Zuckerserien von GlyCer, die endständig eine β -Glucosylgruppe tragen (Sperling *et al.*, 2004). Aufgrund der variablen Strukturen von Cer ergibt sich eine sehr große Kombinationsvielfalt, allein schon durch die verschiedenen Kettenlängen, Doppelbindungen oder Hydroxylierungen der Sphingobasen. Hinzu kommen veränderte Fettsäuren (Kettenlänge, Hydroxylierung und Doppelbindungen) oder Kopfgruppen (Glyco- oder Phospho-Kopfgruppen). Damit ergeben sich zehntausende Verbindungsmöglichkeiten, die mit funktionellen Unterschieden einhergehen (Merrill *et al.*, 2009).

1.1.2 Funktion und Bedeutung von Sphingolipiden

Die biochemischen Funktionen der Sphingolipide sind aufgrund ihrer großen Strukturvielfalt bis zum heutigen Tag nicht vollständig geklärt. Dennoch wurde ihre zum Teil außerordentliche Bedeutung in vielen Organismen nachgewiesen.

Sphingolipide im Menschen sind intra- und interzelluläre Messenger und Regulierungsmoleküle (Gangoiti *et al.*, 2010). Cer übernehmen Funktionen der Signaltransduktion und der Zell-Zell-Erkennung (Hannun und Obeid, 2002). Sie vermitteln Apoptose (Huang *et al.*, 2011; Mullen und Obeid, 2012) oder Autophagie (Pattinre *et al.*, 2009). Intrazelluläre Cer-Konzentrationen erhöhen sich durch Signale wie z.B. Hitzeschock oder TNF- α und induzieren Apoptose entweder als *Second messenger* oder als Signallipid (Lahiri und Futerman, 2007). Cer induzieren anti-proliferative Antworten und gelten als Tumor-Suppressoren (Dany und Ogretmen, 2015). Dagegen soll Sphingosin (d18:1)-1-Phosphat durch Zellproliferation das Tumorstadium fördern (Spiegel und Milstien, 2003, Pyne *et al.*, 2014). Dass der Sphingolipidmetabolismus jedoch weitaus komplexer als bisher angenommen ist, präsentierte eine aktuelle Studie von Carpinteiro *et al.*, 2015. Nach der gängigen Meinung führen erhöhte Cer-Konzentrationen zu Apoptose und Wachstumshemmung (Ponnusamy *et al.*, 2010; Hannun und Newcomb, 2015). Carpinteiro *et al.*, 2015, zeigten jedoch, dass die Freisetzung der sauren Sphingomyelinase (katalysiert die Hydrolyse von Sphingomyelin zu

Cer) die Cer-Konzentration erhöht und damit Tumormetastasen induziert. Die Inhibition der sauren Sphingomyelinase konnte dagegen Tumormetastasen vorbeugen (Carpinteiro *et al.*, 2015).

Ceramide wurden als Mediatoren von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Haughey *et al.*, 2010; Filippov *et al.*, 2012) oder Morbus Parkinson (Abbott *et al.*, 2014) nachgewiesen. Mukoviszidose (Grassme *et al.*, 2014), Sepsis (Claus *et al.*, 2005), Diabetes mellitus (Summers, 2006; Holland und Summers, 2008) oder auch das Auftreten von Lungenemphysemen (Petrache *et al.*, 2005; Petrache *et al.*, 2006) sind mit Veränderungen des Sphingolipidmetabolismus verbunden und gehen z.B. mit erhöhten Sphingomyelinase-Aktivitäten einher. Auch bei Herzkreislauferkrankungen sollen Cer als ROS (*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies)-Trigger den oxidativen Stress in Zellen erhöhen (Li *et al.*, 2010). Als ein Hauptbestandteil des *Stratum corneums*, der äußersten Schicht der menschlichen Haut, sind Cer an der Membranstabilität und dem Schutz vor äußeren Schäden und Austrocknung beteiligt (Elias *et al.*, 1977a; Breiden und Sandhoff, 2014). Weiterführende Informationen sind in Kapitel 1.2 beschrieben.

Sphingolipide in Pflanzen sind im Gegensatz zu Sphingolipiden im Menschen weitaus seltener untersucht worden und ihre Funktionen nur zum Teil bekannt. Sie stellen jedoch eine Hauptkomponente von Plasmamembranen und Tonoplasten dar (Markham *et al.*, 2013).

Cer in Pflanzen (hier *Arabidopsis thaliana*) sind wie in menschlichen Geweben in der Lage Apoptose auszulösen (Liang *et al.*, 2003; Michaelson *et al.*, 2016). Dagegen kann Cer-1-Phosphat eine Cer-vermittelte Apoptose abmildern (Liang *et al.*, 2003). Townley *et al.*, 2005, zeigten ebenfalls, dass kurzkettige (C2)-Cer Apoptose in *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen induzieren, wogegen längerkettige (C6)-Cer nicht dazu in der Lage waren. Erhöhte Konzentrationen freier Sphingobasen in Pflanzen führten zum Zelltod (Lynch und Dunn, 2004). In *Arabidopsis thaliana* aktivierte der Knockout des ACD11-Gens (ACD11 kodiert ein putatives Sphingosin-Transferprotein) den programmierten Zelltod (Brodersen *et al.*, 2002; Simanshu *et al.*, 2014). Die Fütterung von *Arabidopsis thaliana*-Kulturzellen mit Sphingosin (d18:1)-, Sphinganin (d18:0)- und Phytosphingosin (t18:0)-Konzentrationen führte zur Produktion von ROS und nachfolgendem Zelltod (Shi *et al.*, 2007). Das phosphorylierte Sphinganin (d18:0-1-P) schwächte konzentrationsabhängig eine d18:0-induzierte ROS-Produktion ab (Shi *et al.*, 2007).

Sphingosin-1-Phosphat (d18:1-1-P) ist konzentrationsabhängig an der Regulation von Spaltöffnungen in *Commelina communis* beteiligt (Ng *et al.*, 2001; Coursol *et al.*, 2003). Dagegen kann d18:0-1-P keine Veränderung hervorrufen, was für die Bedeutung der 4E-Doppelbindung spricht (Ng *et al.*, 2001). Sphingolipide dienen der morphologischen Entwicklung einer Pflanze. In *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass Sphingolipide mit Dihydroxybasen (z.B. d18:2) das Pflanzenwachstum nicht unterstützen, jene mit

Trihydroxybasen (z.B. t18:1) dagegen eine zentrale Rolle im Pflanzenwachstum spielen (Chen *et al.*, 2008).

GlyCer sind zusammen mit Sterolen am Aufbau von sogenannten *lipid rafts* (Membran-Mikrodomänen) beteiligt (Simons und Ikonen, 1997; Mongrand *et al.*, 2004). *Lipid rafts* sind sehr dynamische Gebilde von 10-200 nm Größe, was ihren Nachweis *in vivo* schwierig macht (Pike, 2006). Dennoch wurden Hinweise zur Existenz der Mikrodomänen in Höheren Pflanzen (Peskan *et al.*, 2000), z.B. *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al.*, 2005) und Tabak-Blättern (Mongrand *et al.*, 2004), erbracht. Es handelt sich um Sterol- und Sphingolipid-angereicherte Membranregionen, in denen bevorzugt GPI-verankerte Proteine vorliegen (Mayor und Riezman, 2004). Damit sind Sphingolipide wahrscheinlich an der Membranfluidität (Lingwood und Simons, 2010), Signaltransduktion (Simons und Toomre, 2000; Foster *et al.*, 2003) und der Proteineselektion (Brown und London, 2000) entscheidend beteiligt. GlyCer erhöhen die Membranstabilität und verringern die Membranpermeabilität aufgrund ihrer sehr langkettigen Fettsäuren und der Wasserstoffbrückenbindungen der Amid- und Hydroxygruppen (Lynch und Dunn, 2004). Die Zunahme der Hydroxygruppenanzahl führt zu erhöhter Membranstabilität und erniedrigter -Permeabilität (Lynch *et al.*, 1992; Lynch und Dunn, 2004).

GlyCer sind für die Zelldifferenzierung und Organogenese der Pflanze, wahrscheinlich als ein Hauptbestandteil der Pflanzenmembranen, essentiell (Msanne *et al.*, 2015). Die Lipidzusammensetzung und vor allem die GlyCer-Konzentration in der Pflanzenmembran verändert sich infolge von Trocken-, Kälte- oder Toxischem (Metallionen-) Stress (Sperling *et al.*, 2004; Michaelson *et al.*, 2016). Norberg und Liljenberg, 1991, wiesen eine Gehaltsabnahme der GlyCer in Plasmamembranen von Hafer-Wurzelzellen durch Trockenstress nach. *Ramonda serbica*, die an trockene Standorte adaptiert ist, enthielt höhere GlyCer-Konzentrationen bei trockenem als bei wasserreichem Wachstum (Quartacci *et al.*, 2001). Eine Aluminiumempfindlichkeit der Pflanzen wirkt sich auch auf deren GlyCer-Gehalt aus. Während in Aluminium-toleranten Weizenkulturen der GlyCer-Gehalt nach Aluminium-Exposition leicht anstieg, nahm der Gehalt in Aluminium-sensitiven Kulturen ab (Zhang *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite wurde eine erhöhte Aluminium-Toleranz durch die Überexpression einer Z-präferierenden $\Delta 8$ -Desaturase (aus *Stylosanthes hamata*) in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen (Ryan *et al.*, 2007). GlyCer sind an der Kryostabilität von pflanzlichen Membranen beteiligt (Pata *et al.*, 2010). Der Gehalt und die Zusammensetzung der GlyCer-Klassen haben eine entscheidende Bedeutung bei Kältestress. Der GlyCer-Gehalt der Plasmamembran in kältetoleranten Pflanzen ist geringer als der in kältesensitiven Pflanzen (Warnecke und Heinz, 2003). Zusätzlich erniedrigten sich bei der Anpassung der Pflanzen an kaltes Klima die GlyCer-Konzentrationen (Lynch und Steponkus, 1987; Uemura und Steponkus, 1994; Minami *et al.*, 2010). Durch Dehydration infolge von Gefrierschäden kommt es in Pflanzen zur Destabilisierung der Plasmamembran (Yoshida und Uemura, 1990). Niedrige

Gehalte an GlyCer könnten für eine Kryostabilität der Membran während Kältestress von Vorteil sein (Warnecke und Heinz, 2003), da sie als Induktoren der Phasenseparation in Membranen bei niedrigen Temperaturen angesehen werden (Spassieva und Hille, 2003). Hohe GlyCer-Konzentrationen werden mit einer verringerten Membranfluidität in Verbindung gebracht, sie erhöhen die molekulare Ordnung innerhalb der Membran (Varela *et al.*, 2013). Auch die einzelnen Cer-Bestandteile (Sphingobase und Fettsäure) scheinen sich auf die Kältesensitivität und -resistenz auszuwirken. In kälteresistenten Pflanzen (z.B. Weizen) wurden hohe Konzentrationen von langkettigen, einfach ungesättigten α -OH-Fettsäuren (z.B. h24:1 ^{ω -9}) gefunden (Lynch und Steponkus, 1987; Cahoon und Lynch, 1991; Uemura und Steponkus, 1994; Imai *et al.*, 1995). Dagegen wiesen kältesensitive Pflanzen (z.B. Reis, Mais) eher gesättigte Fettsäuren auf (Imai *et al.*, 1995). In kälteresistenten Pflanzen wurden darüber hinaus überwiegend das *Z*-Isomer der Phytosphingenin (t18:1)-Sphingobase gegenüber dem *E*-Isomer bestimmt (Imai *et al.*, 1997; Kawaguchi *et al.*, 2000), obwohl die Δ 8-Desaturase unspezifisch ist (Sperling *et al.*, 2004). *Arabidopsis thaliana* mit Sphingobasen ohne Δ 8-Doppelbindung war sensitiver gegenüber niedrigen Temperaturen (Chen *et al.*, 2012).

1.1.3 Vorkommen von Glycosylceramiden in Pflanzen

In Pflanzen sind GlyCer in Plasmamembranen, Tonoplastenmembranen, im Golgi-Apparat und auch dem Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Warnecke und Heinz, 2003; Lynch und Dunn, 2004). Sie befinden sich an der äußeren (apoplastischen) Schicht der Plasmamembran und damit auf der extrazellulären Seite (Lynch und Phinney, 1995). GlyCer wurden bereits in vielen Pflanzen und unterschiedlichsten Pflanzenteilen detektiert (Tab. 2). Die GlyCer-Zusammensetzung der einzelnen Teile einer Pflanze kann sich stark unterscheiden. Die Blätter von *Triticum aestivum* besitzen andere GlyCer als die Frucht. In Blättern machten vornehmlich Trihydroxy-Basen (t18:1, 80 %) die Sphingobasen aus (Imai *et al.*, 1997). Dagegen sind in Weizenkeimen oder Weizenmehl hauptsächlich Dihydroxybasen (d18:2 und d18:1, 89 %) identifiziert worden (Ohnishi *et al.*, 1985; Sullards *et al.*, 2000). Imai *et al.*, 1995, berichteten weiterhin, dass sich die GlyCer-Zusammensetzung in Blättern und Karyopsen nach der taxonomischen Zugehörigkeit stark unterscheidet. So kommen ungesättigte FS ausschließlich in Compositae, Brassicaceae und Graminae vor.

Tab. 2: Auswahl von Pflanzen, in denen Glycosylceramide nachgewiesen wurden

¹ – Angaben in mol/g, berechnet für Glc-d18:2 h16:0 (7) mit 714,0 g/mol;
n.a. – nicht angegeben

Pflanze	Pflanzenteil	Gehalt _{GlyCer} [mg/100 g]	Literatur
Spinat (<i>Spinacia oleracea</i>)		n.a. 4,8 13,9	Poincelot, 1973 Vesper <i>et al.</i> , 1999 Sugawara und Miyazawa, 1999
Wein (<i>Vitis vinifera</i>)	Blätter	n.a.	Kawaguchi <i>et al.</i> , 2000
Roggen (<i>Secale cereale</i>)		n.a.	Cahoon und Lynch, 1991
Acker-Schmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		11,1 ¹ 12,0 ¹	Markham und Jaworski, 2007 Tellier <i>et al.</i> , 2014
Seidenbaum (<i>Albizia julibrissin</i>)	Blüten	n.a.	Kang <i>et al.</i> , 2007
Raps (<i>Brassica napus</i>)	Pollen	n.a.	Pei <i>et al.</i> , 2010
Feuerbohne (<i>Phaseolus coccineus</i>)		16	Kojima <i>et al.</i> , 1991b
Gartenbohne (<i>Phaseolus vulgaris</i>)		17	Kojima <i>et al.</i> , 1991b
Adzukibohne (<i>Vigna angularis</i>)		2,4 30,3	Ohnishi und Fujino, 1981 Sugawara und Miyazawa, 1999
Stinkbaum (<i>Sterculia lychnophora</i>)		n.a.	Wang <i>et al.</i> , 2013
Erbsen (<i>Pisum sativum</i>)		n.a.	Miyazawa <i>et al.</i> , 1974
Mandeln (<i>Prunus dulcis</i>)		6,8	Fang <i>et al.</i> , 2005
Cashewkerne (<i>Anacardium occidentale</i>)	Samen	3,9	Fang <i>et al.</i> , 2005
Haselnüsse (<i>Corylus avellana</i>)		2,1	Fang <i>et al.</i> , 2005
Erdnüsse (<i>Arachis hypogaea</i>)		2,6	Fang <i>et al.</i> , 2005
Pinienkerne (<i>Pinus pinea</i>)		4,2	Fang <i>et al.</i> , 2005
Kürbiskerne (<i>Cucurbita pepo</i>)		3,1	Fang <i>et al.</i> , 2005
Walnüsse (<i>Juglans regia</i>)		2,5	Fang <i>et al.</i> , 2005
Sonnenblume (<i>Helianthus annuus</i>)		16	Salas <i>et al.</i> , 2011
Birkenfeige (<i>Ficus mucoso</i>)	Rinde	n.a.	Bankeu <i>et al.</i> , 2010
Feuerkolben (<i>Arisaema amurense</i>)	Rhizom	n.a.	Rozema <i>et al.</i> , 2012
Dreizählige Pinellie (<i>Pinellia ternata</i>)		n.a.	Rozema <i>et al.</i> , 2012
Elefantenrohr (<i>Alocasia macrorrhiza</i>)	Wurzel	n.a.	Tien <i>et al.</i> , 2004
<i>Typhonium giganteum</i>		n.a.	Chen <i>et al.</i> , 2002
<i>Ziziphus jujuba</i> var. <i>spinosa</i>	Frucht	n.a.	Guo <i>et al.</i> , 2014
Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>)	Sprossknolle	1	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005

Lebensmittel sind bereits auf ihre GlyCer-Mengen untersucht worden (Sugawara und Miyazawa, 1999; Vesper *et al.*, 1999). Tab. 3 gibt eine ausgewählte Übersicht über das Vorkommen von GlyCer in Lebensmitteln wieder. Zusammenfassend wurden bereits GlyCer-Mengen zwischen 1 und 100 mg je 100 g Pflanzenmaterial berichtet (Tab. 3). Die Auswahl der Pflanze und des Pflanzenteils ist von entscheidender Bedeutung für die Menge und Art der zu extrahierbaren GlyCer. Die Anteile der Sphingolipidklassen am Gesamtsphingolipidgehalt wurden bisher selten untersucht (Sperling *et al.*, 2004; Markham und Jaworski, 2007; Hannun und Obeid, 2008). Zauner *et al.*, 2010, postulierten den Anteil komplexer Sphingolipide (z.B. GlyCer) als zehnmal höher und dagegen einfache Sphingobasen (z.B. LCB) zehnmal geringer gegenüber Cer.

Tab. 3: Glycosylceramid-Gehalte in Lebensmitteln

¹ – Angaben in mol/g, berechnet für Glc-d18:2 h16:0 (7) mit 714,0 g/mol;
² – Frischmasse; ³ – Trockenmasse; ⁴ – Summe aus Sphingomyelin und Glycosphingolipiden

Pflanze	Pflanzenteil oder Produkt	Gehalt _{GlyCer} [mg/100 g]	Literatur
Früchte			
Apfel (<i>Malus domestica</i>)	Frucht	7,1 ³	Sugawara und Miyazawa, 1999
	Frucht	4,9 ^{2,4}	Vesper <i>et al.</i> , 1999
	Fruchtfleisch	94,0 ³	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
	Schale	49,0 ³	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
	Trester	17,0-100,0 ³	Ogawa <i>et al.</i> , 2014
Banane (<i>Musa sp.</i>)	Frucht	8,9	Sugawara und Miyazawa, 1999
Gemüse			
Broccoli (<i>Brassica oleracea</i>)	Blütenstand	27,9	Sugawara und Miyazawa, 1999
Kartoffeln (<i>Solanum tuberosum</i>)	Sprossknolle	0,02	Bartke <i>et al.</i> , 2006
	Sprossknolle	1	Sugawara und Miyazawa, 1999
	Sprossknolle	3,1	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
	Schale	22	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
	Süßkartoffel (<i>Ipomoea batatas</i>)	Wurzel	0,06
Perilla (<i>Perilla frutescens</i>)	Wurzel	14,1	Sugawara und Miyazawa, 1999
	Blätter	40,9	Sugawara und Miyazawa, 1999
Hülsenfrüchte			
Sojabohne (<i>Glycine max</i>)	Samen	5,3 ²	Fang <i>et al.</i> , 2005
	Samen	6,5 ³	Ohnishi und Fujino, 1982
	Samen	8,0 ³	Sugawara und Miyazawa, 1999
	Samen	6,0-28,4 ^{1,3}	Wang <i>et al.</i> , 2006b
	Samen	10,1-35,1 ^{1,3}	Gutierrez <i>et al.</i> , 2004
	Kotyledonen	20,0 ³	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
	Wurzel	39,0 ³	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
Adzukibohne (<i>Vigna angularis</i>)	Samen	30,3	Sugawara und Miyazawa, 1999
Getreide			
Weizen (<i>Triticum aestivum</i>)	Frucht	19,3 ¹	Fujino und Ohnishi, 1983
	Kleie	25,9 ³	Zhu <i>et al.</i> , 2013
	Endosperm	21,0 ³	Sugawara und Miyazawa, 1999
	Endosperm	41,1 ³	Vesper <i>et al.</i> , 1999
	Endosperm	8,5 ²	Ohnishi <i>et al.</i> , 1985
	Wurzel	21,0 ³	Takakuwa <i>et al.</i> , 2005
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>)	Frucht	14,4	Sugawara und Miyazawa, 1999
Reis (<i>Oryza sativa</i>)	Frucht	12,7	Fujino und Ohnishi, 1976
	Frucht	2,5	Sugawara und Miyazawa, 1999

1.1.3.1 Apfeltrester

Der Apfelbaum ist eine bekannte Kulturpflanze, die der Familie Rosaceae angehört. Beim Pressen liefern Äpfel ca. 75 % Saft, der Pressrückstand wird als Trester bezeichnet (Shalini und Gupta, 2010). Apfeltrester enthält Schalen, Fruchtfleischreste, Kerne und Stiele (Vendruscolo *et al.*, 2008). Er besteht hauptsächlich aus Kohlenhydraten (Cellulose, Hemicellulose und Lignin), Proteinen, Mineralien und Antioxidantien (Flavanoide: Flavanole, Procyanidine) (Bhushan *et al.*, 2008). Der Lipidgehalt des Apfeltresters beträgt ca. 4 % (Vendruscolo *et al.*, 2008). Er dient der Gewinnung von Pektin, ein Polysaccharid, das z.B. in der Lebensmittelindustrie als Gelier- und Verdickungsmittel oder in der Pharmaindustrie als Stabilisierungsmittel Anwendung findet (Leroux *et al.*, 2003; Kumar und Chauhan, 2010). Weiterhin wird er für die Gewinnung von

Enzymen und Proteinen (Bhushan *et al.*, 2008; Vendruscolo *et al.*, 2008) und als Tierfutter (Ajila *et al.*, 2015) verwendet.

Die weltweite Apfelproduktion betrug im Jahr 2015 ungefähr 76,5 Mio Tonnen, wovon fast 85 % frisch konsumiert und ca. 15 % (10,9 Mio Tonnen) weiter verarbeitet wurden (Foreign Agricultural Service, 2016b). Dadurch ergibt sich eine mögliche Apfeltrestermenge (ca. 25 % des Apfels, Shalini und Gupta, 2010) von ca. 2,7 Mio Tonnen.

Bereits Whitaker, 1997, hat GlyCer im Apfel analysiert. Er identifizierte ein GlyCer vom Sphingadienin (d18:2)-Typ und kurzkettiger α -hydroxylierter Fettsäure (Glc-d18:2 h16:0) sowie weitere GlyCer vom Phytosphingenin (t18:1)-Typ mit α -hydroxylierten Fettsäuren längerer Acylketten (Glc-t18:1 h22/23/24:0) (Whitaker, 1997). Dieselben Sphingobasen (zusätzlich Phytosphingosin t18:0 und Sphingenin d18:1) und Fettsäuren (C16 bis C26) wurden von Takakuwa *et al.*, 2005, und Ogawa *et al.*, 2014, nach Hydrolyse der GlyCer aus Apfeltrester nachgewiesen. Takakuwa *et al.*, 2005, berichteten einen hohen GlyCer-Gehalt im Apfelfruchtfleisch mit 94 mg/ 100 g Trockenmasse im Gegensatz zur Apfelschale mit 49 mg/ 100 g Trockenmasse. Ogawa *et al.*, 2014, haben die Trester von 10 Apfelsorten auf ihre GlyCer-Gehalte untersucht und wiesen große Unterschiede der GlyCer-Mengen einzelner Apfelsorten (17 bis 100 mg/100 g Trockenmasse) nach. Es bestehen Patente, die die Cer-Gewinnung aus Apfeltrester und Apfelfrüchten beschreiben (Ishikawa und Yoshikawa, 2005; Sakai *et al.*, 2015). Diese werden mit einer Ethanolextraktion ohne genauere Beschreibung über die Isolierung der Cer aus dem Extrakt gewonnen.

1.1.3.2 Weizenkeime

Die Gattung *Triticum* gehört zur Familie Poaceae. Der Saatweizen (*Triticum aestivum*) wird weltweit kultiviert. Das Weizenkorn ist aus der Samen- und Fruchtschale (Kleie), dem Mehlkörper (Endosperm) und dem Keimling (Keim) aufgebaut (Abb. 3) (Blaschek, 2010). Im Verarbeitungsprozess der Mehlherstellung werden bei der Ernte die Weizenkörner vereinzelt, entspelzt und vorgereinigt. Es folgen Mahl- und Siebvorgänge zur Ablösung und Abtrennung des Keims. Das Endosperm macht ungefähr 84 %, die Frucht- und Samenschale ca. 14 % und der Keimling ca. 2 % des Weizenkorns aus (Hänsel, 2010). Die beim Mahlprozess aus dem Weizenkorn gelösten Weizenkeime werden hauptsächlich für die Produktion von Weizenkeimöl und als Tierfutter verwendet (Knowles *et al.*, 2014).

Im Jahr 2015 wurden ungefähr 735,4 Mio Tonnen Weizen weltweit produziert (Foreign Agricultural Service, 2016c). Bei einem Anteil des Keims von ca. 2 % am Weizenkorn (Hänsel, 2010) ergibt sich eine mögliche Gesamtproduktion von 14,7 Mio Tonnen Weizenkeimen pro Jahr. Ungefähr 10 % des Weizenkeims sind Lipide (Barnes, 1982; de Vasconcelos *et al.*, 2013).

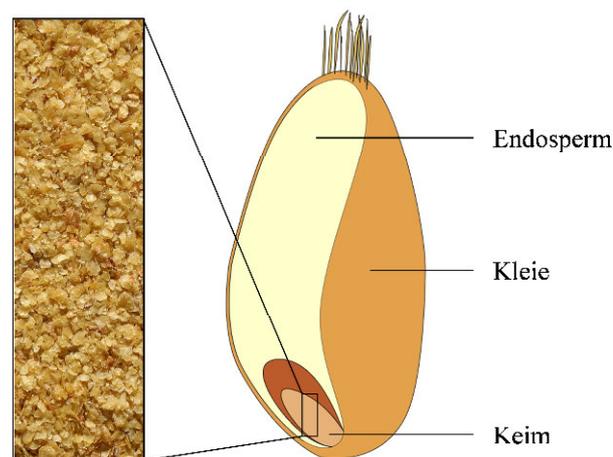


Abb. 3: Aufbau eines Weizenkorns (mod. nach Hoffman, 1925)

Die Sphingolipide von *Triticum aestivum* sind gut untersucht. Häufig wurden die Sphingobasen und Fettsäuren nach hydrolytischer Spaltung separat identifiziert (Tab. 4). Intakte GlyCer-Verbindungen wurden seltener aufgeklärt. Dihydroxybasen (d18:1 und d18:2) sind hauptsächlich mit C16- und C20-Fettsäuren, Trihydroxybasen (t18:1) überwiegend mit Fettsäuren höherer Kettenlängen (\geq C22) verbunden (Fujino *et al.*, 1985) (Tab. 5). In Weizen-GlyCer sind einfach ungesättigte, α -hydroxylierte Fettsäuren nachgewiesen worden (Tab. 4).

Tab. 4: Sphingobasen und Fettsäuren des Weizens nach hydrolytischer Spaltung

¹ – Fujino und Ohnishi, 1983; ² – Ohnishi *et al.*, 1985; ³ – Macmurray und Morrison, 1970; ⁴ – Carter *et al.*, 1961a; ⁵ – Imai *et al.*, 1995

Sphingobase	Weizenmaterial	Fettsäure	Weizenmaterial
d18:0	Körner ¹ , Mehl ^{2,3,4}	h14:0	Körner ¹ , Mehl ^{2,3}
d18:1	Körner ¹ , Mehl ^{2,3,4}	h16:0	Körner ¹ , Mehl ^{2,3} , Blätter ⁵
d18:2	Körner ¹ , Mehl ²	h18:0	Mehl ^{2,3,4} , Blätter ⁵
t18:0	Mehl ^{2,3,4}	h19:0	Mehl ³
t18:1	Mehl ^{2,3,4} , Blätter ⁵	h20:0	Körner ¹ , Mehl ^{2,3} , Blätter ⁵
		h21:0	Mehl ^{2,3}
		h22:0	Körner ¹ , Mehl ^{2,3} , Blätter ⁵
		h22:1	Blätter ⁵
		h23:0	Körner ¹ , Mehl ² , Blätter ⁵
		h24:0	Körner ¹ , Mehl ² , Blätter ⁵
		h24:1	Körner ¹ , Blätter ⁵
		h25:0	Körner ¹ , Mehl ² , Blätter ⁵
		h25:1	Blätter ⁵
		h26:0	Körner ¹ , Mehl ² , Blätter ⁵
		h26:1	Blätter ⁵

Auch zweifach ungesättigte, nicht hydroxylierte Fettsäuren (18:2) wurden in Weizenkörnern identifiziert (Bizot-Foulon *et al.*, 1995). GlyCer mit ungesättigten Fettsäuren treten überwiegend in kälteresistenten Pflanzen wie Weizen auf (Imai *et al.*, 1995). Als Erklärung wird das Herabsetzen der Phasenübergangstemperatur durch ungesättigte Verbindungen in einem Micellsystem angesehen (Yoshida *et al.*, 1988; Sperling *et al.*, 2004).

Tab. 5: Identifizierte intakte Glycosylceramide des Weizens

n.a. – nicht angegeben, ¹ – Zhu *et al.*, 2013; ² – Sullards *et al.*, 2000;
³ – Imai *et al.*, 1995

GlyCer	Weizenmaterial	Gehalt _{GlyCer} [mg/100 g]
Glc-d18:1 h16:0	Kleie ¹ , Keime ²	2,6 ¹
Glc-d18:1 h18:0	Kleie ¹	1,0 ¹
Glc-d18:1 h20:0	Kleie ¹	3,2 ¹
Glc-d18:1 h24:0	Kleie ¹	n.a.
Glc-d18:2 h16:0	Kleie ¹ , Keime ²	n.a.
Glc-d18:2 h18:0	Kleie ¹	1,3 ¹
Glc-d18:2 h20:0	Kleie ¹ , Keime ²	6,4 ¹
Glc-d18:2 h24:0	Kleie ¹	1,6 ¹
Glc-d18:2 h24:1	Kleie ¹	n.a.
Glc-t18:1 h24:0	Kleie ¹	1,6 ¹
Glc-t18:1 h26:0	Kleie ¹	n.a.
Glc-t18:1 h22:1	Blätter ³	n.a.
Glc-t18:1 h24:1	Kleie ¹ , Blätter ³	1,6 ¹
Glc-t18:1 h25:1	Blätter ³	n.a.
Glc-t18:1 h26:1	Blätter ³	n.a.

Monohexoside machen den größten Anteil der GlyCer aus (Tab. 6). Glucose ist die häufigste Zuckerkopfgruppe (97,4 %; Mannose 2,6 %) (Fujino und Ohnishi, 1983). Mehrfach glycosylierte Cer wurden erstmals von Laine und Renkonen, 1974, identifiziert. Sie bestimmten die Monohexoside (55 %), Dihexoside (5 %) und Trihexoside (7 %), wobei die Di- und Trihexoside nur 0,2 und 0,3 % der Totallipide ausmachten (Laine und Renkonen, 1974). Fujino und Ohnishi, 1983, isolierten außerdem Tetrahexosid-GlyCer aus Weizenkörnern.

Tab. 6: Ceramid- und Glycosylceramid-Gehalte von Weizenkörnern

Ausgangsmaterial: 3 kg (Fujino und Ohnishi, 1983)

Sphingolipid	Menge [mg]	Anteil [%]
Ceramide	100	0,0033
Monoglycosylceramide	580	0,0193
Diglycosylceramide	17	0,0006
Triglycosylceramide	38	0,0013
Tetraglycosylceramide	4	0,0001

1.1.3.3 Kaffeesatz

Coffea ist eine Pflanzengattung der Familie Rubiaceae. *C. arabica* und *C. canephora* sind die bekanntesten und verbreitetsten Arten und werden derzeit fast ausschließlich für die Kaffeeproduktion (75 % und 25 %) verwendet (Hänsel und Pertz, 2010). *Coffea arabica* ist in Äthiopien einheimisch und war früher endemisch (Puff, 2003). *Coffea canephora* wird in Äthiopien mittlerweile ebenfalls angepflanzt (Hänsel und Pertz, 2010).

Im Jahr 2015 wurden weltweit 9,2 Mio Tonnen Kaffee produziert und 8,9 Mio Tonnen Kaffee konsumiert (Foreign Agricultural Service, 2016a). Äthiopien steht in der weltweiten Kaffeeproduktion an fünfter Stelle (Foreign Agricultural Service, 2016a). Der Kaffeekonsum steigt jährlich um ca. 2,5 % (International Coffee Organization, 2016). Der wichtigste

Inhaltsstoff ist das Purinalkaloid Koffein (*C. arabica* 1,0-1,7 %, *C. canephora* 2,0-4,3 %), weshalb Kaffee als stimulierendes Getränk Anwendung findet (Hänsel und Pertz, 2010).

Außerdem sind fettreiche Verbindungen in den Kaffeebohnen vorhanden. Das sogenannte Kaffeeöl ist im Endosperm und Kaffeewachs in den äußeren Schichten der Kaffeebohne lokalisiert (Folstar, 1985). Der Lipidgehalt gerösteter Kaffeebohnen liegt ungefähr bei 11 % für *C. canephora* und bei 17 % für *C. arabica* (Belitz *et al.*, 2009). Während des Röstungsprozesses mit Temperaturen von 200-230 °C kommt es zu chemischen Reaktionen innerhalb der Bohne (Belitz *et al.*, 2009). Jedoch wird die Lipidfraktion durch den Röstprozess kaum verändert (Hänsel und Pertz, 2010). Sie besteht hauptsächlich aus Triacylglycerolen und Diterpenestern (zusammen ca. 94 %) (Belitz *et al.*, 2009). Der Lipidgehalt in gebrühtem Kaffee ändert sich mit der Zubereitungsart. Bei dem Filtrationsverfahren (Perkolation) finden sich die wenigsten Lipide im Kaffee, der größte Teil bleibt im Filter zurück (Ratnayake *et al.*, 1993). Bisher sind noch keine Studien zum GlyCer-Gehalt in Kaffee veröffentlicht worden.

1.1.3.4 Fabaceae-Arten

Die Familie der Fabaceae umfasst 917 Gattungen und ca. 24500 Pflanzenarten (The Plant List, 2013). Der Lipidanteil von Fabaceae-Samen kann zwischen 0,8 und 20,9 % liegen (Wolff und Kwolek, 1971). Bei der Untersuchung von fünf Fabaceae-Samen (Feuerbohne (*Phaseolus coccineus*), Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*), Adzukibohne (*Vigna angularis*), Erbsen (*Pisum sativum*), Ackerbohne (*Vicia faba*)) wurden Totallipidgehalte zwischen 1,6 und 2,7 % festgestellt, für die Sojabohne (*Glycine max*) wurde mit 16,4 % ein hoher Totallipidgehalt nachgewiesen (Kojima *et al.*, 1991a). Die GlyCer-Gehalte dieser Fabaceae-Samen (*P. coccineus*, *P. vulgaris*, *V. angularis*, *P. sativum*, *V. faba*, *G. max*) lagen zwischen 0,1 und 2,5 % der Totallipide (Kojima *et al.*, 1991a). GlyCer-Gehalte von 6 bis 35 mg/100 g Sojabohnen sind gemessen worden (Tab. 3). GlyCer-Gehalte zwischen 2,1 und 6,8 mg/100 g Pflanzenmaterial wurden ebenso in anderen lipidreichen Samen nachgewiesen (Fang *et al.*, 2005).

Die GlyCer diverser Fabaceae-Samen sind hauptsächlich aus den Fettsäurekomponenten h16:0, h22:0 und h24:0 sowie den Sphingobasen Sphingenin (d18:1^{8EZ}), Sphingadienin (d18:2^{4E,8EZ}) und Phytosphingenin (t18:1^{8EZ}) aufgebaut (Kojima *et al.*, 1991a). Zum Tribus Fabeae (Familie: Fabaceae, Unterfamilie: Faboideae) wurden bereits ausführliche Studien zur Sphingobasen-Komposition durchgeführt (Minamioka und Imai, 2009). Sie identifizierten den Phytosphingenin-Typ (t18:1^{8Z} und t18:1^{8E}) als häufigste Sphingobase. Sie wiesen auch auf einen phylogenetischen Zusammenhang innerhalb der Fabeae in der Sphingobasen-Zusammensetzung hin (Minamioka und Imai, 2009).

Die Gattung *Albizia* gehört zur Familie Fabaceae (Unterfamilie: Mimosoideae) und umfasst 137 Arten (The Plant List, 2013). In Äthiopien sind 11 Arten (*A. amara*, *A. anthelmintica*, *A. chinensis*, *A. coriaria*, *A. grandibracteata*, *A. gummifera*, *A. isenbergiana*, *A. lebbeck*,

A. lophantha, *A. malacophylla*, *A. schimperiana*) heimisch (Thulin, 1989). Sie sind Nahrungsmittel (Nektar, Pollen) und Schattenspender für Kaffeepflanzen (Abb. 4, Thulin, 1989).

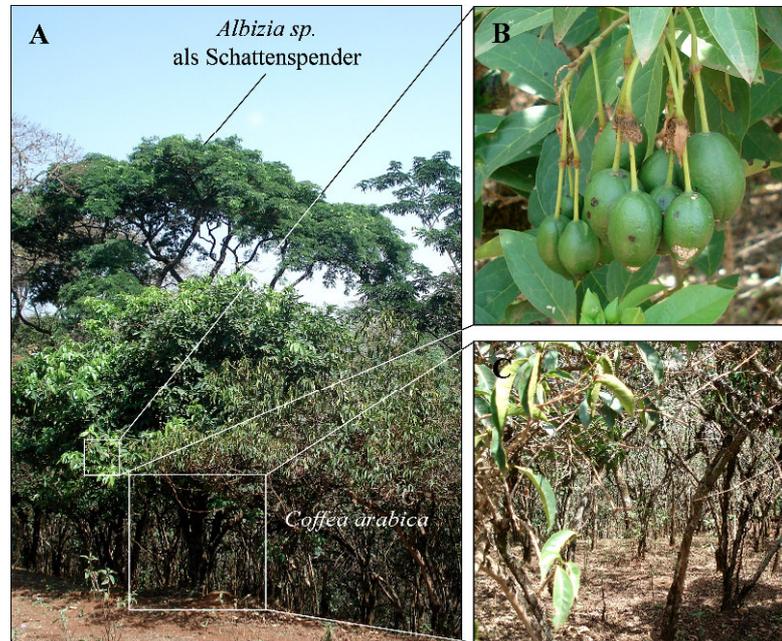


Abb. 4: *Coffea arabica*-Plantage in Westäthiopien

Albizia-Arten als Schattenspender (A), unreife Kaffee Früchte (B) und Kaffeepflanzen (C). Fotos: Mathias Reisberg, Äthiopien, April 2013

Der Ölgehalt von *Albizia julibrissin*-Samen beträgt 10,5 % (Nehdi, 2011). Sphingolipide wurden bereits in *Albizia*-Arten detektiert. So fanden Kang *et al.*, 2007, das Cer t24:1 h16:0 und das zugehörige glycosylierte Cer Glc-t24:1 h16:0 in Blüten von *Albizia julibrissin* in geringen Mengen (0,9 mg und 0,3 mg/100 g Pflanzenmaterial). Auch in den Blüten von *Albizia lebbeck* ist dieses GlyCer detektiert worden (El-Gamal *et al.*, 2015). Jung *et al.*, 2004, isolierten das GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (0,7 mg/100 g Pflanzenmaterial) aus der Rinde von *Albizia julibrissin*. In den Blättern derselben Pflanze machten Minamioka und Imai, 2009, den Phytosphingenin (t18:1)- und den Sphingadienin (d18:2)-Typ als Hauptsphingobasen aus.

Die 1393 Arten der Gattung *Acacia* (The Plant List, 2013) kommen hauptsächlich in tropischen und subtropischen Ebenen vor, davon ca. 58 in Äthiopien (Thulin, 1989). Sie dienen unter anderem als Nahrungsmittel (Nektar, Pollen), Schattenspender, Tierfutter (Blätter, Schoten) oder werden für die Produktion von Kohle und Werkzeugen oder dem Hausbau genutzt (Thulin, 1989). Auch von einem medizinischen Einsatz des Harzes wurde berichtet (Tadesse *et al.*, 2007). Samen der *Acaciae* besitzen einen Lipidanteil von 8,8 % (Wolff und Kwolek, 1971). In *Acacia baileyana* (Blätter) haben Minamioka und Imai, 2009, ebenfalls die LCB-Hauptkomponenten der GlyCer als d18:2 und t18:1 bestimmt.

Die Gattung *Robinia* umfasst 8 Arten (The Plant List, 2013), von der *Robinia pseudoacacia* auch in Deutschland vorzufinden ist. Ursprünglich in Nordamerika heimisch, wurde der Baum in Europa eingeführt und breitet sich in gemäßigten Klimazonen weiterhin aus (Cierjacks *et al.*, 2013). *R. pseudoacacia* wird z.B. in China in Form der Blüten volksmedizinisch genutzt (Ji *et al.*, 2012). Eine antibakterielle und antifungale Wirkung wurde bereits nachgewiesen (Veitch *et al.*, 2010; Rosu *et al.*, 2012; Calina *et al.*, 2013; Patra *et al.*, 2015), ebenso jedoch auch Vergiftungserscheinungen aufgrund der Inhaltsstoffe Robin und Phasin (Hui *et al.*, 2004). Die Samen unterschiedlicher *Robiniae* weisen einen mittleren Lipidgehalt von 3,7 % auf (Wolff und Kwolek, 1971). Für Blätter der Gewöhnlichen Robinie (*Robinia pseudoacacia*) wurden bereits der Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin-Typ (t18:1) als Sphingobasen der GlyCer identifiziert (Minamioka und Imai, 2009).

1.1.4 Produktion von Ceramiden für die medizinische und kosmetische Anwendung

Komplexe Sphingolipide können in größeren Mengen aus Rinderhirn, Schweinehaut oder Hühnereiern gewonnen werden (Avanti Polar Lipids, 2016). Mit der Gewinnung von Naturstoffen aus Tierquellen sind gewisse Risiken und Vorurteile verbunden. Rinderhirne beispielsweise stellen seit dem Auftreten der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) bei Rindern nur noch eine bedingt nutzbare Quelle für Cer dar.

Die Sphingobasen-Rückgrate können auf unterschiedliche Weise synthetisch hergestellt werden. So sind Synthesen von Sphingosin (d18:1, Shapiro, 1965; Rochlin, 2004; Yang und Liebeskind, 2007) und Phytosphingosin (t18:0, Lombardo *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Calder *et al.*, 2013;) ausreichend beschrieben worden, jedoch zugleich aufwendig und teuer.

Deshalb werden Cer in großem Maßstab bisher halbsynthetisch gewonnen, indem die Sphingobase biotechnologisch von Hefen exprimiert und anschließend die Acylierung mit der jeweiligen Fettsäure chemisch-synthetisch angeschlossen wird. Mit *Wickerhamomyces ciferrii* (*Pichia ciferrii*) ist in den 60er Jahren eine Hefe gefunden worden, die das Sphingolipid Tetraacetylphytosphingosin in größeren Mengen sekretiert (Wickerham und Stodola, 1960; Maister *et al.*, 1962). Das deacylierte Phytosphingosin (t18:0) entspricht einer Sphingobase (Konfiguration 2*S*, 3*S*, 4*R*) menschlicher Haut-Cer (Wollenweber und Farwick, 2006). Neben der Stereochemie der Cer (Wollenweber und Farwick, 2006; Schneider *et al.*, 2012) sind auch die Kettenlängen (Janssens *et al.*, 2012) und die allgemeine Sphingobasenstruktur (Desaturierung, Hydroxygruppen) der Cer (Takagi *et al.*, 2003) für eine effektive Hautbarriere von Bedeutung.

Biotechnologische Modifikationen verbessern die Effizienz der Sphingolipidproduktion in Hefen. Ausbeuten des Tetraacetylphytosphingosins von bis zu 19,9 g/100 g wurden erzielt (Schorsch *et al.*, 2012). Da auch Cer mit Sphinganin (d18:0) und Sphingosin (d18:1) für eine

Verbesserung der Hautbarriere untersucht werden, ist die Exprimierung von Triacetyl sphingosin in *Wickerhamomyces ciferrii* (89 mg/100 g) entwickelt worden (Borgel *et al.*, 2012).

Die Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* kann Sphinganin (d18:0) und Phytosphingosin (t18:1), aber kein Sphingosin (d18:1) exprimieren (Dickson und Lester, 2002). Durch molekulargenetische Veränderungen von *Saccharomyces cerevisiae* ist das Cer [NS] (d18:1 24/26:0) produziert worden (Murakami *et al.*, 2015). Mittels Hitzeschock kann die Produktion von Cer in *Saccharomyces cerevisiae* darüber hinaus um das 6-fache erhöht werden (Wells *et al.*, 1998; Kwun *et al.*, 2006). Kälte beeinflusst dagegen die Zusammensetzung und den Gehalt der von Hefe (*Kluyveromyces lactis*) produzierten Lipide (Tanji *et al.*, 2004). Kim *et al.*, 2010, wiesen nach molekulargenetischem Eingriff Gehaltssteigerungen von Cer in Hefen auf bis zu 980 mg/100 g Zellen nach.

Die Cer-Gewinnung aus Pflanzen könnte eine Alternative zur üblichen Cer-Produktion darstellen. Cer kommen in Pflanzen nur in geringen Mengen vor und machen rund 1/10 des GlyCer-Anteils aus (Zauner *et al.*, 2010). Daher könnten pflanzliche GlyCer als Quelle für Cer dienen. Intakte GlyCer wie Sojacerebrosoid I (Glc-d18:2^{4E,8E} h16:0) und Sojacerebrosoid II (Glc-d18:2^{4E,8Z} h16:0) werden unter anderem aus Sojabohnen (*Glycine max*) oder Reis (*Oryza sativa*) gewonnen (Shibuya *et al.*, 1990; Avanti Polar Lipids, 2016, Oryza, 2016). In unterschiedlichen Pflanzen wurden GlyCer-Gehalte zwischen 1 und 100 mg GlyCer je 100 g Pflanzenmaterial nachgewiesen (Sugawara und Miyazawa, 1999; Takakuwa *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006b; Ogawa *et al.*, 2014). Die bisher berichteten höchsten GlyCer-Gehalte von bis zu 100 mg je 100 g sind in Apfeltrester (Takakuwa *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2014) nachgewiesen worden und ähneln denen von Hefen ohne molekulargenetisch hervorgerufene Produktionssteigerung. GlyCer gelten daher als eine mögliche natürliche Quelle für die Cer-Gewinnung.

1.2 Die menschliche Haut

1.2.1 Aufbau und Funktionen

Die Haut ist mit einer Oberfläche von ca. 1,5-2 m² und einer Dicke von 1-2 mm das größte Organ des Menschen. Sie dient der Reizaufnahme aus der Umwelt und reguliert über die Durchblutung und Schweißverdunstung den Wärmehaushalt des Körpers (Kerscher, 2009). Die Haut schützt den Körper vor äußeren (physikalischen, chemischen, mechanischen oder mikrobiologischen) Einflüssen (Kerscher, 2009), beugt körpereigenen transepidermalen Wasserverlust (*trans epidermal water loss*, TEWL) vor und ist damit für die Homöostase des Körpers verantwortlich (Golden *et al.*, 1987a). Die menschliche Haut besteht aus drei Schichten – der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und dem Unterhautfettgewebe (Subcutis) (Abb. 5, Kerscher, 2009).

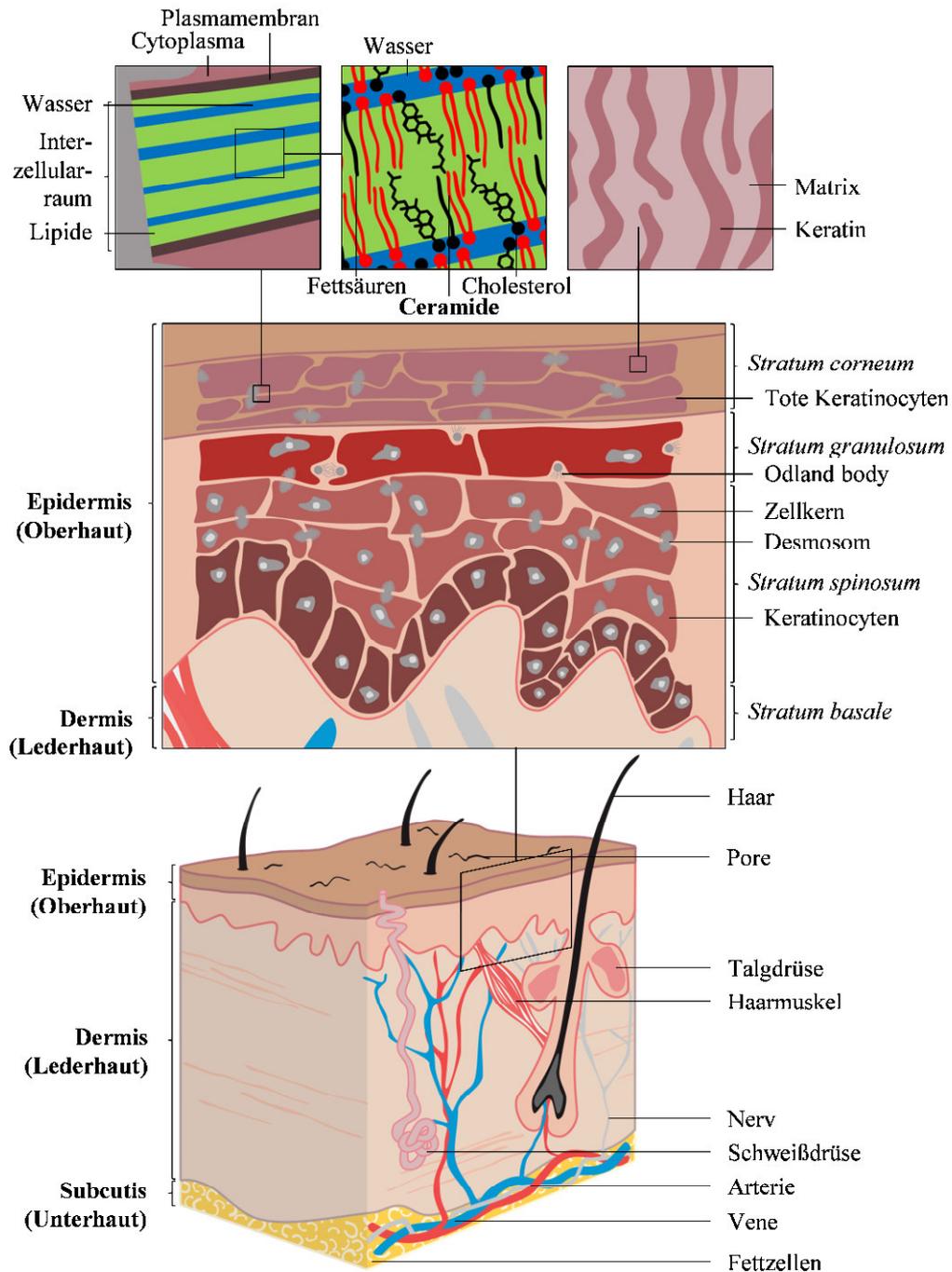


Abb. 5: Aufbau der menschlichen Haut (mod. nach Barry, 1987)

Die Subcutis enthält Fett- und Bindegewebe und dient als Fettspeicherdepot sowie dem Schutz bei mechanischer Beanspruchung von außen. Die Dermis ist mit einer Dicke von 1-2 mm als Bindegewebsstruktur für die Festigkeit verantwortlich und beherbergt neben den Haarwurzeln die Talg- und Schweißdrüsen sowie Nerven- und Muskelfasern (Bouwstra *et al.*, 2003). Sie besteht zu großen Teilen aus Strukturproteinen wie Kollagen oder Elastin, welche der Haut gleichermaßen Stabilität und Elastizität verleihen. Die Epidermis mit einer Dicke von ca. 50-100 µm gliedert sich von innen nach außen gesehen in mehrere Schichten – dem *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (Bouwstra *et al.*, 2003).

Die Epidermis ist ein sich immer wieder erneuerndes Gewebe (ungefähr alle 28 Tage) und hauptsächlich aus Keratinozyten aufgebaut, die im *Stratum basale* gebildet werden und sich auf dem Weg zum *Stratum corneum* weiter in tote, flache und verhornte Zellen, die Keratin (Faserproteine) enthalten, differenzieren (Reifenberger und Ruzicka, 2010). Sie werden dann auch Korneozyten genannt und sind untereinander über Desmosomen verbunden, die den Zellverband zusätzlich stabilisieren (Garrod und Chidgey, 2008). Korneozyten werden von einem membranartigen *Cornified envelope* umgeben, das aus unlöslichen Proteinen besteht (Candi *et al.*, 2005) und über kovalent gebundene Cer eine Verbindung zur Lipidmatrix herstellt, in die sie eingebettet vorliegen (Swartzendruber *et al.*, 1987; Wertz *et al.*, 1989). Dieser Aufbau des *Stratum corneums* wird mit dem sogenannten Ziegelstein-Mörtel-Modell beschrieben. Bei diesem sind die Korneozyten die Ziegelsteine, die von einer interzellularen Lipidmatrix, dem Mörtel, umgeben sind (Elias, 1983).

Die Lipidmatrix des *Stratum corneums* besteht hauptsächlich aus Cer (50 %), Cholesterol (25 %) und freien Fettsäuren (15 %) (Feingold, 2007) und ist einer multilamellaren Organisation und lateralen Packung unterworfen (Elias *et al.*, 1977b; Bouwstra und Gooris, 2010). Cer dienen in Verbindung mit anderen Hautlipiden der Integrität und Stabilität der Hautbarriere (Bouwstra und Gooris, 2010). Sogenannte *Odland bodies* (membrangrenzte Vesikel) enthalten lamellare Strukturen (aus Lipiden und Enzymen), die an den interzellularen Raum abgegeben werden (Schmitz und Muller, 1991). Das *Stratum corneum* besteht aus ca. 15 bis 30 Zellschichten (Loomans und Hannon, 1970; Holbrook und Odland, 1974), wobei die Anzahl auch von den Körperregionen und dem Alter abhängig ist (5-50 Schichten) (Ya-Xian *et al.*, 1999). Das *Stratum corneum* stellt mit diesem Aufbau die Hauptbarriere der menschlichen Haut dar, obwohl sie nur 10-20 µm dick ist (Holbrook und Odland, 1974; Bouwstra *et al.*, 2003).

Die Penetration von Verbindungen in die Haut kann auf unterschiedliche Weise verlaufen. Die transglandulären (über Drüsen) und transfollikulären (über Haarfollikel) Wege nehmen nur eine untergeordnete Rolle ein, da ihre Oberfläche gegenüber der gesamten Epidermisoberfläche zu gering ist (Meidan *et al.*, 2005). Weitere Transportrouten sind der transzelluläre und der interzelluläre Weg (Barry, 1987). Während die transzelluläre Route physiologisch als unwahrscheinlich gilt, ist der interzelluläre Weg für lipophile Stoffe der übliche Weg (Neubert und Wepf, 2007). In den interzellularen Schichten des *Stratum corneums* befindet sich nur wenig Wasser (Blank, 1952). Daher ist auch eine schlechte Diffusion hydrophiler Stoffe zu erklären (Neubert und Wepf, 2007). Für eine Penetrationsverbesserung durch das *Stratum corneum* kommen Enhancer oder galenische Formulierungen wie Mikroemulsionen in Frage (Trommer und Neubert, 2006). Eine typische Eigenschaft von Enhancermolekülen ist die Fluidisierung der *Stratum corneum*-Lipide (Ibrahim und Li, 2010). Enhancer dringen in die Membran ein und erniedrigen die lamellare Ordnung. So können beispielsweise ungesättigte

Fettsäuren (z.B. Ölsäure) die Penetration durch das „Aufspannen“ der *Stratum corneum*-Schichten erhöhen (Engelbrecht *et al.*, 2011).

1.2.2 Ceramide als Hauptkomponenten des *Stratum corneums*

Neben Cer, Cholesterol und Fettsäuren enthält die Lipidmatrix des *Stratum corneums* geringe Mengen Cholesterolester, Cholesterolsulfat und GlyCer, jedoch keine Phospholipide (Wertz und van den Bergh, 1998). Die Lipidzusammensetzung des *Stratum corneums* ist sowohl vom Alter und Geschlecht (Denda *et al.*, 1993) als auch von der untersuchten Hautstelle (Lampe *et al.*, 1983) abhängig. Die Lipide bilden Doppelschichten von 4-5 nm (Forslind, 1994).

Cholesterol hat einen Anteil von ca. 25 % am *Stratum corneum* (Wertz und van den Bergh, 1998; Feingold, 2007), wobei auch Gehalte zwischen 13-37,5 % je nach Körperregion möglich sind (Lampe *et al.*, 1983; Weerheim und Ponec, 2001). Cholesterol hat zum einen kondensierende Effekte auf Acylketten in Lipid-Doppelschichten und damit auf eine stabile Lipidanordnung (McIntosh, 1978; Hung *et al.*, 2007). Zum anderen kann es in entsprechenden Konzentrationen Membranen auch fluider machen (Wertz, 2000).

Freie Fettsäuren machen ca. 15 % der *Stratum corneum*-Lipide aus (Feingold, 2007). Jedoch wurden auch Gehalte zwischen 17 und 64 % ermittelt (Weerheim und Ponec, 2001). Der Gehalt freier Fettsäuren in kranker Haut unterscheidet sich von dem in gesunder Haut (Macheleidt *et al.*, 2002; van Smeden *et al.*, 2014). Freie Fettsäuren haben Kettenlängen zwischen C16-36 (van Smeden *et al.*, 2014), wobei Kettenlängen mit C22 und C24 überwiegen (Wertz, 2013). Freie Fettsäuren sind entscheidend am Aufbau der Haut und der damit einhergehenden Barrierefunktion beteiligt (Oguri *et al.*, 2014; van Smeden *et al.*, 2014).

Man geht von einem **Ceramid**-Anteil von ca. 50 % im *Stratum corneum* aus (Feingold, 2007), wobei auch Anteile von ca. 16-70 % nachgewiesen wurden (Weerheim und Ponec, 2001). Untersuchungen am *Stratum corneum* des Unterarms zeigten insgesamt 342 Cer aus verschiedenen Subklassen (Masukawa *et al.*, 2008). Bis zum heutigen Tag wird von 19 Cer-Subklassen in der Haut ausgegangen, von denen bisher 18 detektiert werden konnten (Tab. 7) (Wertz und Downing, 1983; Motta *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1994; Masukawa *et al.*, 2008; van Smeden *et al.*, 2011; t'Kindt *et al.*, 2012; Rabionet *et al.*, 2013). Die Sphingobasen haben typischerweise Kettenlängen von C18-22 (Wertz *et al.*, 1987). Jedoch wurden auch längere (C14-28) und kürzere (C12-17, Masukawa *et al.*, 2008; t'Kindt *et al.*, 2012) sowie ungerade (Farwanah *et al.*, 2007) Kettenlängen der Sphingobasen detektiert. Die Fettsäuren haben Kettenlängen von C16-30 (Masukawa *et al.*, 2008; t'Kindt *et al.*, 2012), wobei C22-26 die häufigsten sind (Bouwstra *et al.*, 2003). Sphingosin (d18:1) ist eher mit kurzkettingen, Phytosphingosin (t18:0) mit langkettigen Fettsäuren assoziiert (Wertz *et al.*, 1987).

Tab. 7: Ceramid-Klassen der menschlichen Haut

Modifiziert nach Masukawa *et al.*, 2008; Breiden und Sandhoff, 2014; Rabionet *et al.*, 2014, n.d. – nicht detektiert, ^a – *Cornified envelope*-gebundene Cer, ^b – Existenz angenommen, bisher nicht detektiert

Fettsäure	Nicht-hydroxyliert [N]	α -hydroxyliert [A]	ω -hydroxyliert [O] ^a	ω -hydroxyliert und verestert [EO]	Nicht-hydroxyliert und 1-O-acyliert [1-O-EN]	α -hydroxyliert und 1-O-acyliert [1-O-EA]
Sphingobase						
Sphingosin [S] 	Cer [NS]	Cer [AS]	Cer [OS]	Cer [EOS]	Cer [1-O-ENS]	Cer [1-O-EAS]
Phytosphingosin [P] 	Cer [NP]	Cer [AP]	Cer [OP]	Cer [EOP]	n.d.	n.d.
6-Hydroxysphingosin [H] 	Cer [NH]	Cer [AH]	Cer [OH]	Cer [EOH]	n.d.	n.d.
Dihydrosphingosin [DS] 	Cer [NDS]	Cer [ADS]	(Cer [ODS]) ^b	Cer [EODS]	n.d.	n.d.
Dihydroxy-Dihydrosphingosin [T] 	Cer [NT]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Für Cer [NS] wurde nachgewiesen, dass die Kettenlänge von entscheidender Bedeutung für die Hautbarriere ist. Unterschiedliche Fettsäurekettenlängen (C2-12) in Verbindung mit einer C12-Sphingobase ergaben für Arzneistoffe differierende Penetrationseigenschaften in die Haut (Novotny *et al.*, 2009).

Besonders ultralangkettige Cer (z.B. EOS) und Cer mit hoher Anzahl von Hydroxygruppen (z.B. Cer [AP] und Cer [NP]) scheinen für die Stabilität des *Stratum corneums* wichtig zu sein. So können jene Cer-Spezies mit ω -Hydroxy-Fettsäuren (an C30 und C32, Wertz *et al.*, 1985) und zusätzlich veresterter Linolsäure (Cer [EOS] und [EOP]) Lipidschichten der Lipidmatrix miteinander verbinden, weil sie über die normalen Schichten hinausragen (Kessner *et al.*, 2008a; Kessner *et al.*, 2008b). Cer-Klassen mit Phytosphingosin (Cer [AP] und [NP]) machen zusammen ungefähr 31 % der Gesamt-Cer des *Stratum corneums* aus (Abb. 6, t'Kindt *et al.*, 2012) und sind entscheidend an der Integrität der Lipid-Bilayer des *Stratum corneums* beteiligt.

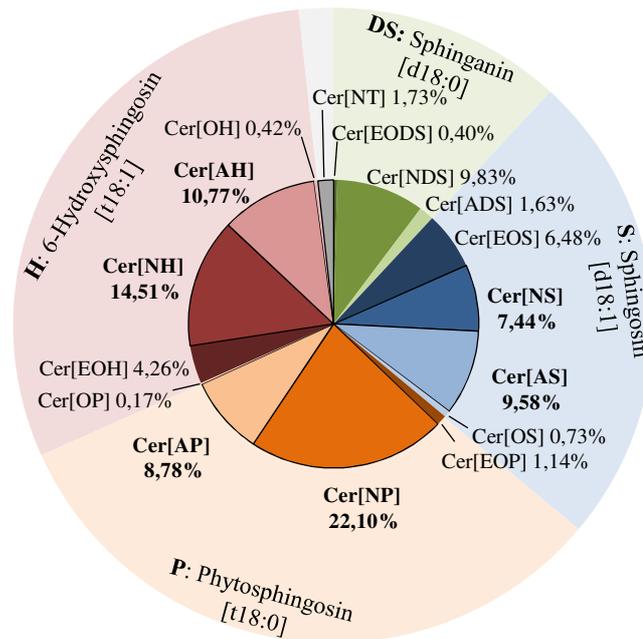


Abb. 6: Ceramidklassen der menschlichen Haut

Mod. nach t'Kindt *et al.*, 2012; Quantifizierung per LC-MS ohne Einbeziehung der unterschiedlichen Ionisationseigenschaften der Ceramide.

1.2.3 Die Organisation der *Stratum corneum*-Lipide

Die Lipide des *Stratum corneums* sind lamellar angeordnet (Madison *et al.*, 1987). Obwohl mithilfe von Kleinwinkel- und Weitwinkelröntgenstreuung (Bouwstra *et al.*, 1995) sowie Neutronenstreuung (Kiselev *et al.*, 2005) neue Einblicke zur Organisation der *Stratum corneum*-Lipide gewonnen werden konnten, ist der Aufbau der *Stratum corneum*-Matrix bisher nicht eindeutig geklärt. Unterschiedliche Modelle bestehen zum Aufbau der Lipidmatrix. Dabei spielt die Konformation der Cer eine entscheidende Rolle. Sie können in der *fully extended* (voll gestreckten)- und in der *Hairpin*-Konformation (Abb. 7) vorliegen. Eine Änderung der Konformation erfolgt über einen sogenannten „*chain-flip*“ und ist vom Wassergehalt in der Lipidphase abhängig (Kiselev, 2007). Ein erstes Modell für die Organisation der *Stratum corneum*-Lipide wurde von Swartzendruber *et al.*, 1989, entwickelt. Das **Gestapelte Monolayer (Stacked Monolayer)-Modell** nahm eine *fully extended*-Konfiguration der Cer an,

wobei sie in unterschiedliche Bilayers hineinragen und diese so miteinander verbinden (Swartzendruber *et al.*, 1989). Das **Domänen-Mosaik (Domain Mosaic)-Modell** von Forslind, 1994, beschrieb ein multilamellares Zweiphasensystem aus kristallinen Domänen und einer flüssig-kristallinen Matrix. So war eine Mosaik-ähnliche Anordnung der Gel-Domänen in jeder gestapelten Bilayer-Schicht namensgebend (Forslind, 1994). Im **Sandwich-Modell** wurde von einer Anordnung der *Stratum corneum*-Lipide in einem Drei-Schichten-System ausgegangen (Bouwstra *et al.*, 2000; Bouwstra *et al.*, 2001). Eine flüssige Phase in der zentralen Bilayer-Region ist von zwei kristallinen Phasen umgeben. Das **Einzelne Gelphase (Single Gel Phase)-Modell** schlug eine einzige gelartige Membranstruktur ohne Phasenseparation vor und sollte die Impermeabilität der Haut erklären (Norlén, 2001). Die bisher genannten Modelle erklärten jedoch nicht das Verhalten der *Stratum corneum*-Lipidmatrix unter Wassereinfluss. Daher führten Kiselev *et al.*, 2005, das **Ankerverstärkungs (Armature Reinforcement)-Modell** ein (Abb. 7). Sie wiesen der *fully-extended*-Konformation der Cer eine größere Bedeutung zu, da diese unterschiedliche Lipidschichten verbinden können. Bei Wasserzusatz kann es dann über eine Konformationsänderung (*Chain-flip-transition*) der Cer in die *Hairpin*-Struktur zur Hydratisierung zwischen den Phasen (ca. 1 Å) kommen, da die Konformation energetisch günstiger ist (Kiselev *et al.*, 2005; Kiselev, 2007).

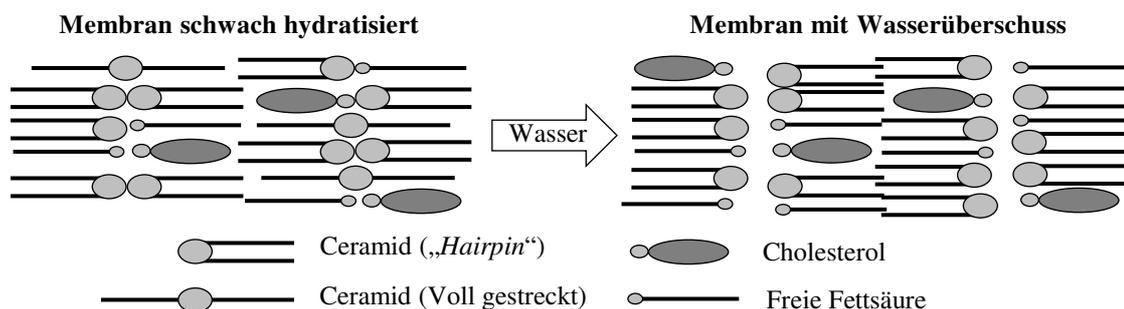


Abb. 7: *Armature reinforcement-Modell der Stratum corneum-Lipide (Kiselev, 2007)*

Das **Asymmetrie (Asymmetry)-Modell** von Norlén erklärt die geringe Permeabilität und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Hydratation und äußeren Einflüssen mit einer anderen Anordnung der *Stratum corneum*-Lipide. Cer liegen hier in der *fully-extended*-Konformation vor. Cholesterol ist mit der LCB und freie Fettsäuren mit dem Fettsäureteil der Cer assoziiert (Iwai *et al.*, 2012).

Die *Stratum corneum*-Lipide unterliegen neben der lamellaren Organisation auch einer **lateralen Packung**, was entscheidend zur Barrierefunktion der Haut beiträgt (Bouwstra *et al.*, 2003). *Stratum corneum*-Lipide können eine hexagonal oder orthorhombische laterale Packung ausbilden (Pilgram *et al.*, 1999; Hatta *et al.*, 2006). Dabei stellt die orthorhombische Phase die am häufigsten vorkommende dar (Groen *et al.*, 2011). Die Kopfgruppen der Cer beeinflussen die Anordnung der Lipide. Cer [AP] und [NP] haben von allen Cer-Klassen die meisten

Hydroxygruppen, mit denen Wasserstoffbrückenbindungen ausgebaut werden können. Aufgrund ihrer Anwesenheit wird die Stabilität der orthorhombischen Phase erhöht (Corbe *et al.*, 2007; Caussin *et al.*, 2008). Jedoch kann das Vorhandensein einer α -Hydroxygruppe die Wasserstoffbrückenbindungsinteraktion verringern (Corbe *et al.*, 2007) und zu einer geringeren lamellaren Ordnung des Systems führen (Engelbrecht *et al.*, 2012).

1.2.4 Ceramidprofil-bedingte Hauterkrankungen

Die Cer-Zusammensetzung ist wichtig für die lamellare und laterale Packung der *Stratum corneum*-Lipide. Ein Ungleichgewicht führt zu einer fehlerhaften Packung und damit eingeschränkter Barrierefähigkeit der Haut (Pilgram *et al.*, 2001). Hauterkrankungen wie Neurodermitis oder Psoriasis sind mit veränderten Cer-Profilen und -Mengen innerhalb des *Stratum corneums* verbunden (Motta *et al.*, 1993; Motta *et al.*, 1994; Di Nardo *et al.*, 1998).

Neurodermitis (Atopische Dermatitis) ist eine rezidivierende, chronisch entzündliche Hauterkrankung (Bieber, 2010), die durch trockene und rissige Haut geprägt ist (Leung *et al.*, 2004). Mit steigenden Prävalenzen (Kinder: 15-30 %, Erwachsene: 2-10 %) und Inzidenzen besonders in industrialisierten Ländern stellt die atopische Dermatitis eine Krankheit von besonderem allgemeinen Interesse dar (Bieber, 2010). Die Therapie sieht die Bekämpfung der Entzündungen und die Wiederherstellung der Hautbarriere vor (Bieber, 2010).

Studien zeigten, dass sich die Cer-Gehalte der Hautstellen gesunder und erkrankter Probanden unterscheiden (Imokawa *et al.*, 1991a; Di Nardo *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 1999; Pilgram *et al.*, 2001). Neben der Erniedrigung des gesamten Cer-Gehaltes im *Stratum corneum* (Ishikawa *et al.*, 2010) wurden auch schwankende Gehalte der Cer untereinander im Vergleich von gesunden und erkrankten Hautpartien bestimmt. Für Cer [NH], [NP], [EOH], [EOP] und [EOS] wurden erniedrigte, für Cer [AS] dagegen erhöhte Gehalte detektiert (Ishikawa *et al.*, 2010). Vor allem der Erniedrigung des ultralangkettigen Cer [EOS] wird eine große Bedeutung für das Krankheitsbild zugewiesen (Di Nardo *et al.*, 1998). Als möglicher Grund für das Cer-Missverhältnis werden Defekte im Sphingolipid-Metabolismus der Cer-Produktion angesehen (Hara *et al.*, 2000; Alessandrini *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2014).

Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine rezidivierende, chronisch entzündliche (Nestle *et al.*, 2009) und genetisch bedingte (Krueger und Ellis, 2005) Hauterkrankung. Ihr liegt eine Überproduktion von Keratinocyten (bis zu 10fach erhöht) zugrunde (Prinz Vavricka und Guitart, 2005), die an die Oberfläche der Haut transportiert und als Hautschuppen abgestoßen werden (Weinstein *et al.*, 1985). Die weltweite Prävalenz variiert bei Kindern zwischen 0,0-2,1 % und bei Erwachsenen zwischen 0,91-8,5 % in starker regionaler Abhängigkeit (Parisi *et al.*, 2013). Die Inzidenz bei Kindern liegt bei 40,8/100.000, bei Erwachsenen bei 78,9-230/100.000 (Parisi *et al.*, 2013).

Verringerte Cer-Konzentrationen und ein verändertes Cer-Profil wurden für psoriatische Haut nachgewiesen (Motta *et al.*, 1993; Lew *et al.*, 2006). Die ultralangkettige Cer-Klasse Cer [EOS] und die Phytosphingosin (t18:0)-basierten Cer [NP] und [AP] wurden in verminderten, die Sphingosin (d18:1)-basierten Cer [NS] und [AS] dagegen in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen (Motta *et al.*, 1993). Damit verbunden ist eine beeinträchtigte Barrierefunktion der Haut (Alessandrini *et al.*, 2001). Die Psoriasis-involvierte Haut zeigt einen erhöhten TEWL und damit erniedrigte Hydratationswerte infolge einer schlechten Barriere (Berardesca *et al.*, 1990; Imokawa *et al.*, 1991b). Eine Erklärung, warum Hydroxygruppen der Cer [AP] und [NP] für die *Stratum corneum*-Struktur von Bedeutung sind, wurde mit dem *Armature reinforcement*-Modell geschaffen (vgl. 1.2.3; Kiselev *et al.*, 2005; Kiselev, 2007). Cer bilden mit ihren Hydroxygruppen Wasserstoffbrückenbindungen aus und beeinflussen so über wasserbindende Eigenschaften den TEWL (Imokawa *et al.*, 1986; Imokawa und Ishida, 2014).

Behandlungskonzepte für Hauterkrankungen wie Psoriasis (Luger *et al.*, 2014) oder Neurodermitis (Chamlin *et al.*, 2002; Kircik *et al.*, 2011; Kircik und Del Rosso, 2011; Lynde und Andriessen, 2014) schätzen Cer für deren Akutbehandlung oder als Basispflege als positiv ein. Cer werden in unterschiedlichen **Marktpräparaten** angeboten (Tab. 8).

Tab. 8: Ausgewählte Ceramid-haltige Präparate

Präparat	Hersteller	Ceramid	Verbindung
Neuroderm® Repair Creme	InfectoPharm Arzneimittel	Cer [NS], Cer [NP]	d18:1 18:0 t18:0 18:0
Alfason® Repair	Astellas Pharma	Cer [NP]	t18:0 18:0
Physiogel ® Daily Moisture Ther.	GSK Consumer Healthcare	Cer [NP]	t18:0 18:0
Bepanthol® Körperlotion Plus	Bayer Vital	Cer [NP]	t18:0 18:0
Pliazon® Creme	Merck Serono	Cer [EOP], Cer [NP], Cer [AP]	t18:0 ωOH-30:0 18:2 t18:0 18:0 t18:0 h18:1

Nicht-verzweigte, kurzkettige und gesättigte Cer sind mit hohen Wasserretentionskapazitäten assoziiert (Imokawa *et al.*, 1991b). Daher sind sie für Hauterkrankungen, die mit trockener Haut einhergehen, und die kosmetische Pflege trockener Haut interessant. Die Cer [EOS] und [NP] wirken sich in applizierten Emulsionen positiv auf die Hydratation der Haut und die Eindämmung des TEWL aus (Huang und Chang, 2008). Für die halbfesten Zubereitungen ist eine mangelhafte Penetration der Cer in die tieferen Schichten des *Stratum corneums* nachgewiesen. Wahrscheinlich können Cer aufgrund ihrer starren und großen Strukturen nicht optimal in das *Stratum corneum* penetrieren. Mikroemulsionen stellen eine galenische Formulierung dar um die *Stratum corneum*-Penetration zu verbessern (Heuschkel *et al.*, 2008). Sie bestehen aus einer Öl- und Wasserphase sowie Tensid und Co-Tensid und sind optisch isotrope, thermodynamisch stabile und hoch dynamische Gebilde (Heuschkel *et al.*, 2008; Kalb, 2010). Mikroemulsionen sind kolloidale Formulierungen, weisen Tröpfchengrößen von ca. 10-100 nm auf (Heuschkel *et al.*, 2008) und transportieren Cer in tiefere Hautschichten (Sahle *et al.*, 2012; Sahle *et al.*, 2013; Sahle *et al.*, 2014).

2 ZIELSTELLUNG

Ceramide (Cer) sind Sphingolipide, die aus einer Sphingobase und einer amidartig verknüpften Fettsäure zusammengesetzt sind. Sie kommen ubiquitär vor und stellen mit ca. 50 % einen großen Teil der Lipide des *Stratum corneums*, der äußersten Schicht der menschlichen Haut, dar (Feingold, 2007). Sie bilden zusammen mit Cholesterol und Fettsäuren einen großen Anteil der Hautbarriere. Das *Stratum corneum* dient dem Schutz vor äußeren Einflüssen und der Sicherung des Wasserhaushaltes. 18 Cer-Klassen sind bisher in der menschlichen Haut nachgewiesen worden [t'Kindt *et al.*, 2012; Rabionet *et al.*, 2014]. Die sehr langkettigen Cer [EOP] und [EOS] sowie die Hydroxygruppen-reichen Cer [AP] und [NP] werden für die Integrität der Hautbarriere als besonders wichtig angesehen. Cer [EOP] und [EOS] verankern die multilamellaren Lipidschichten aufgrund ihrer Moleküllängen miteinander (Bouwstra *et al.*, 1998; Kessner *et al.*, 2008a). Cer [AP] und [NP] sind durch ihre Wasserstoffbrücken-bildenden Hydroxygruppen für die Stabilität der Hautlipidmatrix und für eine hohe Wasserbindungskapazität verantwortlich (Pascher, 1976; Imokawa und Ishida, 2014).

Hauterkrankungen wie Psoriasis oder Neurodermitis, aber auch gealterte Haut gehen mit einem verringerten Cer-Gehalt (Motta *et al.*, 1993; Ghadially *et al.*, 1995; Ishikawa *et al.*, 2010) und einem veränderten Cer-Verhältnis (Motta *et al.*, 1993; Ishikawa *et al.*, 2010) einher. Daher wird versucht, das Cer-Gleichgewicht der menschlichen Haut mit extern applizierten, halbfesten Cer-Formulierungen wiederherzustellen. Cer-haltige Kosmetika und Medizinprodukte wurden erfolgreich bei Ekzemen, Psoriasis oder Neurodermitis angewendet (Draelos, 2008; Kircik *et al.*, 2011; Luger *et al.*, 2014). Die Produktion von Cer für eine dermatologische Verwendung in Cremes ist jedoch kostspielig. Sie werden halbsynthetisch gewonnen. Beispielsweise kann die Sphingobase Phytosphingosin des Cer [NP] mithilfe einer Hefe biotechnologisch hergestellt werden (Wollenweber und Farwick, 2006). Nachfolgend wird eine Fettsäure chemosynthetisch acetyliert. Deswegen sind die Hersteller auf der Suche nach neuen und kosteneffizienten Produktionsmöglichkeiten.

Sphingolipide machen als Membrankomponente bis zu 10 % der pflanzlichen Gesamtlipide aus (Dunn *et al.*, 2004). Davon bilden freie Cer jedoch nur einen geringen Teil. Sie liegen vorwiegend in Form komplexer Verbindungen als Glycosylceramide (GlyCer) oder (Glycosyl-) Phosphorylinositol-Ceramide vor. Letztere sind aufgrund ihrer schwierigen Extrahierbarkeit (Sperling *et al.*, 2005; Markham *et al.*, 2006) keine geeignete Cer-Ressource. Dagegen sind GlyCer aufgrund einfacher Extraktion (Cahoon und Lynch, 1991; Fang *et al.*, 2005) und mit Gehalten zwischen 1 und 100 mg je 100 g Pflanzenmaterial (Sugawara und Miyazawa, 1999; Takakuwa *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2014) für eine Cer-Gewinnung geeignet.

Täglich fallen bei vielen industriellen, aber auch haushaltsüblichen Prozessen große Mengen pflanzlicher Überreste an. In der Wertschöpfungskette enden sie oft als Tierfutter (z.B. Apfeltrester, Weizenkeime) oder im Müll (Kaffeersatz). Dieses pflanzliche Material stellt einen

interessanten Angriffspunkt für einen *Upcycling*-Prozess (Kay, 1994; Braungart und McDonough, 2002) für teure und seltene Naturstoffe wie Cer dar, die für eine Anwendung in der Dermatotherapie in Frage kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Methoden etabliert werden, die eine Cer-Gewinnung aus pflanzlichem Abfallmaterial ermöglichen. Dafür müssen Aufreinigungs- und analytische Methoden entwickelt werden. Das Zusammenspiel aus **Screening** unterschiedlicher Pflanzenmaterialien (Detektion und Quantifizierung) und **Isolierung** sowie Identifizierung von Cer aus pflanzlichen Ressourcen soll eine **Anwendung** von „Phyto“-Cer in der Dermatotherapie ermöglichen (Abb. 8).

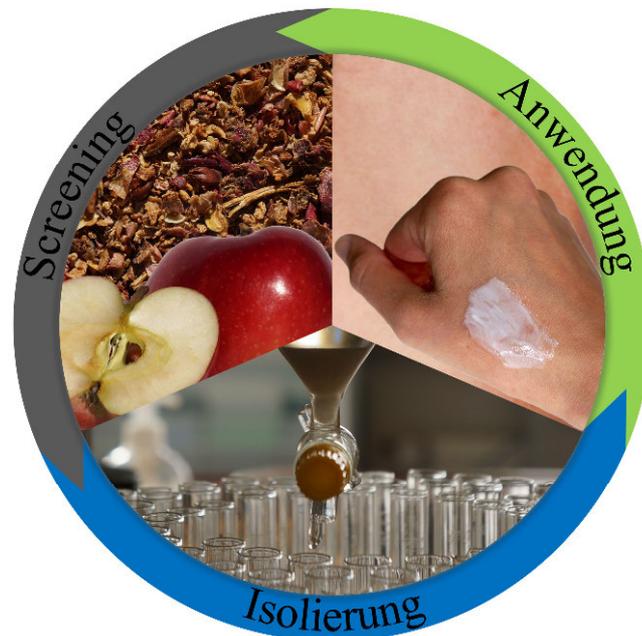


Abb. 8: Screening, Isolierung und Anwendung von „Phyto“-Ceramiden

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Tab. 9: Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Substanz/Lösungsmittel	Qualität	Hersteller/Lieferant
Aceton	≥99,5 % (HPLC grade)	LGC Standards
Acetonitril	≥99,9 % (HPLC grade)	VWR
Albumin Fraktion V aus Rinderserum (pH 7,0; BSA)	≥98 %	AppliChem
Ameisensäure	≥98 % (p.a.)	Sigma
Ascorbinsäure	≥99 %	Roth
Chloroform	≥98 % (p.a.)	VWR
Citronensäure-Monohydrat	≥99,9 % (HPLC grade)	LGC Standards, Roth
Coomassie Brilliant Blue G-250	≥99,5 % (HPLC grade)	AppliChem
Dichlormethan	≥91 %	SERVA Electrophoresis
Diphenylamin	≥99 % (p.a.)	VWR
Dithiothreitol	≥99 %	Sigma
Essigsäure	≥97 %	Sigma
Essigsäureethylester, Ethylacetat	≥99,7 % (p.a.)	AppliChem
Ethanol, vergoren	99,5 % (p.a.)	Grüssing
Ethylenglykol	≥99,5 % (HPLC grade)	LGC Standards; Roth
Glycerol, wasserfrei	96 % (p.a.)	Brüggemann Chemica
<i>n</i> -Hexan	≥99,0 %	Merck
Isopropanol, 2-Propanol	≥98 %	Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	95 % (p.a.)	Grüssing
Methanol	≥95 % (HPLC grade)	J.T. Baker
	≥99,5 % (p.a.)	Grüssing; Roth
	≥99,8 % (HPLC grade)	VWR; Merck
Natriumborhydrid	99 %	Sigma
Natriumchlorid	99,5 % (reinst)	Grüssing; Merck
(Tri-)Natriumcitrat-Dihydrat	≥99,8 % (HPLC grade)	VWR; Carl Roth
Natriumhydroxid	99,98 % (absolute ULC/MS)	Biosolve
Natriumperiodat	≥98 %	Arcos Organics
Natriumsulfat, wasserfrei	≥99,9 %	Roth
Natriumtaurocholathydrat	≥99 %	Roth
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	98,0-100,5 %	Merck
Phosphorsäure	≥99,8 %	Sigma
Pyridin- <i>d</i> ₅	≥99 %	Roth
Pyridin	≥97 %	Sigma
Salzsäure	≥99,5 %	Sigma
Toluol	85 % (p.a.)	VEB Laborchemie Apolda
Wasser, demineralisiert	99,5 %	Deutero
	99,8 %	Sigma
	37 %	Roth
	≥99,9 %	Roth
	σ = 0,055 μS/cm	TKA Wasseraufbereitung

3.1.2 Referenzen

Tab. 10: Verwendete Referenzen

Cer-Referenzen wurden entsprechend der Herstellerangaben (4-8 °C oder -20 °C) gelagert. Nach dem Lösen wurden die Referenzen im Kühlschrank bei 4-8 °C aufbewahrt, n.a. – nicht angegeben.

Substanz	Qualität	Hersteller/Lieferant
Cer [AP], C18 (t18:0 h18:0)	n.a.	Evonik
Cer [AS], C18 (d18:1 h18:0)	n.a.	Evonik
Cer [NP], C18 (t18:0 18:0)	n.a.	Evonik
Cer [NS], C18 (d18:1 18:0)	n.a.	Evonik
Cholesteryloleat	≥98 %	Sigma
D-Fructose	≥99 %	Roth
D-Galactose	≥99 %	Acros Organics
D-Glucose	≥99,5 %	Sigma
GlyCer (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)	≥98 %	Avanti Polar Lipids
Linolsäure	≥98 %	AppliChem
D-Mannose	≥98 %	Merck
D-Salicin	≥98,5%	Roth
β-Sitosterol	≥80 %	Roth
β-Sitosterolglucosid	≥98 %	Inhouse-Bibliothek: Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, Halle (Saale), aufgereinigt aus <i>Urtica dioica</i> L.
L-Rhamnose-Monohydrat	≥99 %	Roth
Sphingosin (d18:1)	n.a.	Inhouse-Bibliothek: Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
Squalen	≥97 %	Fluka Feinchemikalien
Triolein (Glyceroltrioleat)	≥99 %	Sigma

3.1.3 Halbfeste Formulierung

Tab. 11: Halbfeste Formulierung für Hautpenetrationsversuche

Formulierung			
Basiscreme DAC (Fagron)			
Glycerolmonostearat	4,0 %	Mittelkettige Triglyceride	7,5 %
Cetylalkohol	6,0 %	Weißes Vaseline	25,5 %
Macrogol-20-glycerolmonostearat	7,0 %	Gereinigtes Wasser	40,0 %
Propylenglycol	10,0 %		

3.1.4 Enzyme

Tab. 12: Verwendete Enzyme

Enzym	Qualität	Hersteller
β-Glucosidase (aus Mandeln) (EC 3.2.1.21)	7,0 U/mg Protein (1 Unit Protein setzt 1,0 μmol Glucose aus Salicin frei, pro min, pH 5,0 und 37 °C)	Sigma
Imiglucerase (Cerezyme®) (CAS 154248-97-2, DB00053), eine Glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45)	40 U/ml (~40 U/mg, 1 Unit Protein setzt 1,0 μmol para-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid um, pro min, 37 °C) (Sonstige Bestandteile: Mannitol, Natriumcitrat, Citronensäure-Monohydrat, Polysorbat 80)	Genzyme

3.1.5 Pflanzenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurde Pflanzenmaterial aus Deutschland und Äthiopien verwendet. Für die Isolierung und Strukturaufklärung sowie hydrolytische Experimente wurden drei

deutsche Industrieabfallprodukte genutzt – Apfeltrester, Weizenkeime und Kaffeesatz (Tab. 13). Der Apfeltrester wurde von Becker - Eislebener Fruchtsaft (Eisleben, Deutschland) bezogen und bestand unter anderem aus den Sorten Remo, Rewena, Relinda, Reglindis, Retina und Greensleaves (Becker - Eislebener Fruchtsaft, 2016). Als Weizenkeime dienten „Vollgran Weizenkeime“ (*Triticum aestivum*) von Dr. Grandel (Augsburg, Deutschland). Als Untersuchungsmaterial für *Coffea arabica* wurde der Kaffee Jacobs Krönung (Jacobs Douwe Egberts, 2016, Bremen, Deutschland) verwendet, der als getrockneter Rest nach Aufbrühen des Kaffees mit einer handelsüblichen Filtermaschine verblieb.

Tab. 13: Deutsches Pflanzenmaterial

Ausgangsmaterial für die Isolierung und Strukturaufklärung von GlyCer. *Robinia pseudoacacia* wurde mit dem „Rothmaler - Exkursionsflora von Deutschland“ (Jäger, 2011) bestimmt und die Samen im Oktober 2013 gesammelt.

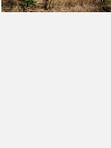
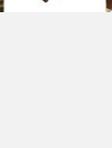
Pflanzenmaterial (Abk.)	Pflanze (lat.)	Familie	Herkunft/Produzent	Abbildung des Pflanzenmaterials
Apfeltrester (A)	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	Becker - Eislebener Fruchtsaft (Eisleben, Deutschland)	
Weizenkeime (W)	<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	Vollgran Weizenkeime, Dr. Grandel (Augsburg, Deutschland)	
Kaffeesatz (C)	<i>Coffea Arabica</i> , <i>Coffea canephora</i>	Rubiaceae	Jacobs Krönung, Jacobs Douwe Egberts (Bremen, Deutschland)	
Gewöhnliche Robinie (RP)	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Fabaceae	Halle (Saale), Deutschland	

Als Untersuchungsmaterial für die Entwicklung einer Quantifizierungsmethode von GlyCer wurden äthiopische Pflanzen herangezogen (Tab. 14). Im Rahmen des DAAD-geförderten Projektes „Welcome to Africa“ sollte Pflanzenmaterial detektiert werden, das eine große Menge an GlyCer enthält, um es zukünftigen Wertschöpfungsprozessen zugänglich zu machen. Die verwendeten Samen wurden unter Abwägung der Verfügbarkeit und des Nutzens innerhalb der äthiopischen Gesellschaft ausgewählt. Das äthiopische Pflanzenmaterial (Samen, siehe Tab. 14) wurde in Kooperation mit der Addis Ababa University (Addis Abeba, Äthiopien) und dem Forestry Research Center (FRC) Addis Ababa (Addis Abeba, Äthiopien) im April 2013 botanisch bestimmt und gesammelt. Für einen Vergleich mit deutschem Pflanzenmaterial wurde die Fabaceae-Art *Robinia pseudoacacia* herangezogen (Tab. 13). Die Artenbestimmung erfolgte

durch Mathias Reisberg (Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)). Proben aller Pflanzenmaterialien sind im IPB (Halle/Saale) hinterlegt.

Tab. 14: Äthiopisches Pflanzenmaterial

Äthiopisches Pflanzenmaterial für Screening-Versuche mit AMD-HPTLC-Densitometrie. Das Pflanzenmaterial wurde im April 2013 in Zusammenarbeit mit dem FRC Addis Ababa gesammelt und bestimmt, ^a – exotisch nach Thulin, 1989

Pflanze (lat.) (Abk.)	Familie	Herkunft	Abbildungen des Pflanzenmaterials			
			Pflanze	Hülsenfrucht	Samen	Gemahlene Samen
<i>Albizia grandibracteata</i> (AGr)	Fabaceae	Bedele, Oromia-Region, Westäthiopien				
<i>Albizia gummifera</i> (AGu)	Fabaceae	Arjo, Oromia-Region, Westäthiopien				
<i>Albizia lebbeck</i> ^d (AL)	Fabaceae	Dedessa, Oromia-Region, Westäthiopien				
<i>Albizia schimperiana</i> (AS)	Fabaceae	Bedele, Oromia-Region, Westäthiopien				
<i>Acacia etbaica</i> (AE)	Fabaceae	Bedele, Oromia-Region, Westäthiopien				

3.1.6 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 15: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
<u>TLC/HPTLC</u>		
▪Flachboden-TLC-Entwicklungskammer	Nano-Trennkammer 100 x 100 mm	Desaga
▪Halbautomat für bandenförmiges Probenauftragen	Linomat IV mit Kompr. TROLL, Compressor Minor	Camag
▪Autosampler	Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4)	Camag
▪Automatisierte Mehrfachentwicklung	Automated Multiple Development 2 (AMD 2) mit Kompressor RV 3	Camag
▪Scanner (Densitometrie)	TLC Scanner 3	Edwards
▪Trockenschrank I	HST 5020	Camag
▪Trockenschrank II	UNB 400	MLW
		Memmert
<u>Extraktion und Aufreinigung von Glycosylceramiden</u>		
▪Fraktionssammler der SC	CYGNET Fraction Collector	Teledyne Isco
▪Vakuum-Destillation I		
- Rotationsverdampfer	Laborota 4000	Heidolph
- Vakuum-Pumpe	MZ 2C	Vacuubrand
- Vakuum-Kontrolle	CVC 211	Vacuubrand

- Kühler	RM 6 T	Lauda
•Vakuum-Destillation II		
- Rotationsverdampfer	VV 2000	Heidolph
- Vakuum-Pumpe	PC 520 NT	Vacuubrand
- Vakuum-Kontrolle	CVC 3000	Vacuubrand
- Kühler	F 10 – C	Biometra
•Standmixer	32BLB0	Waring Commercial
<u>Enzymatische Hydrolyse</u>		
•Autoklav, Dampfsterilisator	Varioklav classic 500	HP Medizintechnik
•Inkubationsschrank mit Schüttler	GFL 3032	GFL
•Sterilbank	LaminAir HB 2472 K GS	Heraeus
•Zweistrahlphotometer	BioSpectrometer basic	Eppendorf
<u>Strukturaufklärung der Glycosylceramide</u>		
•Ionenfallen-Massenspektrometer	Thermo Finnigan LCQ Classic (mit ESI-Ionisationseinheit)	Thermo Fisher Sci.
•Ionenfallen-Orbitrap Massenspektrometer	Orbitrap Elite™ (mit ESI-Ionisationseinheit)	Thermo Fisher Sci.
•NMR	Varian VNMRs 600 MHz NMR	Agilent
<u>Analytische und präparative HPLC-APCI/MS (Quadrupol)</u>		
•HPLC	1260 Infinity LC System	Agilent
- Präparativer Autosampler	1290 Preparative Autosampler	
- Thermostat	1290 Thermostat	
- Präparative Pumpe	1290 Preparative Pump	
- Quarternäre Pumpe	1260 Quaternary Pump	
- Säulenofen	1290 Thermostat. Column Comp.	
- Fraktionsammler	1290 Fraction Collector (Prep. scale)	
- Detektor	1260 Multiple Wavelength Detector	
- Aktiver Splitter	Active Splitter	
•Massenspektrometer	Agilent 6120 B Quadrupole LC/MS (mit APCI-Ionisationseinheit)	Agilent
•Säule	Zorbax Extend-C18 (5µm; 4,6 x 150 mm, 80 Å, 180 m ² /g, Endcapped doppelt, C-Gehalt 12,5 %)	Agilent
•Vorsäule	Zorbax Extend-C18 Analytical Guard Column (5 µm; 4,6 x 12,5 mm)	Agilent
<u>Allgemeine Vorgänge der guten Laborpraxis</u>		
•Kühlkammer, 5 °C	TE1200/1950/100ESL	Viessmann
•Kühlschrank, 4 bis 8 °C	Alaska CBC 371	Alaska
•Gefrierschrank, -20 °C	Bosch kke 3401	Bosch
•Gefrierschrank, -80 °C	Herafreeze HFU586STD-V14	Heraeus
•Schüttler/Vortexer	MS 2 Minishaker	IKA
•Mikroliterspritze für die Applikation/Injektion	25 µl, 100 µl, 250 µl, 500 µl Hamilton Mikroliterspritze	Hamilton
•Thermoschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
•Ultraschallbad	RK 100	Bandelin
•Vakuum-Konzentrator	RVC 2-25 mit Christ Alpha1-4 Gefriertr.r Laboport N 840.3 FT.18	Christ KNF Neuberger
•Präzisionswaage (d 0,1 g)	OL 1500-P	Omnilab
•Analysenwaage (d 0,01/0,1 mg)	R 200 D	Mettler-Toledo
•Analysenwaage (d 0,01/0,1 mg)	XA 105 Dual Range	Sartorius
•Zentrifuge für Reaktionsgefäße	Centrifuge 5415D	Eppendorf
•Zentrifuge für Reaktionsgefäße	Centrifuge 5810R	Eppendorf
•Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße	3K15	Sigma Laborzentr.
•Wasseraufbereitungssystem I	Milli-Q® Advantage A10 mit Millipak-40 Filtereinheit, 0,22 µm	Merck
•Wasseraufbereitungssystem II	TKA GenPure	TKA Wasseraufber.

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tab. 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
<u>Dünnschichtchromatographie</u>	
•HPTLC-Platten (Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Glas, Schichtd. 0,2 mm, 100×200 mm)	Merck
•TLC-Platten (Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Aluminium, Schichtd. 0,2 mm, 100×100 mm)	Merck
•Einmal-Mikropipetten (5 µl)	Brand
<u>Filterpapier</u>	
•Filtrak Rundfilter, 388 (weitporig, schnell filtrierend, grobe Niederschläge)	Spezialpapierfabrik Niederschlag
•Filtrak Rundfilter, 389 (mittel weitporig, mittelschnell filtr., kristalline NS)	
•Filtrak Rundfilter, 390 (dicht, engporig, langsam filtrierend, feinste NS)	Whatman Munktell & Filtrak
•Glasfaserfilter rund (Grad 6, Durchmesser 150 mm, Dicke 0,35 mm)	
•Rundfilter (qualitativ, Grad 1288)	
<u>Hydrolyse-Experimente</u>	
•Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Sarstedt
•Spießampullen (neoLab 2,0 ml Fiolax bernsteinfarben, Standard Line)	neoLab
•Sterile Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
<u>Küvetten</u>	
•UV-Einmal-Küvetten Plastibrand (Schichtdicke 10 mm)	Brand
•UV-Einmal-Küvetten UVette (Schichtdicke 10 mm)	Eppendorf
<u>MS Tunig Mix</u>	
•APCI/APPI tuning mix	Agilent
•Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution	Thermo Fisher Sci.
•ESI Tuning Solution: Caffeine, MRFA, Ultramark 1621 (Operator's Manual)	Thermo Fisher Sci.
<u>Probenvorbereitung</u>	
•Chromabond C18 ec (1 ml/100 mg)	Macherey-Nagel
•Gewinde-Schraubglas (Klarglas, 20 ml)	Diagonal
•Probenflaschen (Braunglas; Klarglas; 1,5 ml) mit Schraubkappen (PP)	VWR
•Pipettenspitzen (200 µl; 1000µl; 5000 µl)	Greiner Bio-One
<u>Säulenchromatographie-Zubehör</u>	
•Kieselgel 60 (0,063 - 0,200 mm)	AppliChem
•Quarzsand, Seesand	Laborchemie Apolda
•Reagenzgläser (dickwandig, 20 ml)	Duran
•Sephadex LH-20 (sphaerisch, porös; Partikelgröße 18-111 µm (trocken))	GE Healthcare
•Pasteurpipetten (Länge 150 mm)	Roth
•Watte (100 % Viskose, chlorfrei gebleicht)	Lilbe Cosmetics

3.1.8 Software

Tab. 17: Verwendete Software

Gerät/Einsatz	Software (Version)	Hersteller/Literatur
ATS 4, AMD 2, TLC Scanner	winCATS (V1.4.2.8121)	Camag
Diagramme, Grafiken	Excel/Powerpoint 2010 (V 14.0)	Microsoft
HRMS (Orbitrap Elite)	Xcalibur (V 2.2 SP1)	Thermo Fisher Sci.
HRMS (Auswertung)	ChemCalc (http://www.chemcalc.org/mf_finder/ , Stand: 26.11.2015)	Patiny und Borel, 2013
LC-MS (1260 Infinity Systems)	Agilent ChemStation (B.04.03/ B.03.02)	Agilent
MS/MS (Thermo Fin. LCQ Classic)	Xcalibur (V 2.0)	Thermo Fisher Sci.
NMR (Steuerung)	Varian VNMRJ 4.0A (CHEMPACK 6.2) Varian VNMRJ 4.2A (CHEMPACK 7.1)	Agilent
NMR (Auswertung)	MestReNova (8.0.0)	Mestrelab
Physikochemische Eigenschaften von Proteinen	ProtParam-Tool (http://web.expasy.org/protparam/ , Stand: 26.11.2015)	Gasteiger <i>et al.</i> , 2005
Zweistrahlphotometer	BioSpectrometer basic (V 3.5.1.0)	Eppendorf
Summenformeln/Massenberechnung	ChemBioDraw (12.0)	PerkinElmer

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierungsschema

In Abb. 9 ist die Vorgehensweise zur Gewinnung von „Phyto“-Cer aus Pflanzenmaterial mit der dazugehörigen Analytik dargestellt. Auf die einzelnen Methoden wird in den folgenden Punkten genauer eingegangen. Für die Aufreinigung wurden destillierte Lösungsmittel (analytischer Grad, Ausnahmen angegeben) und demineralisiertes Wasser verwendet.

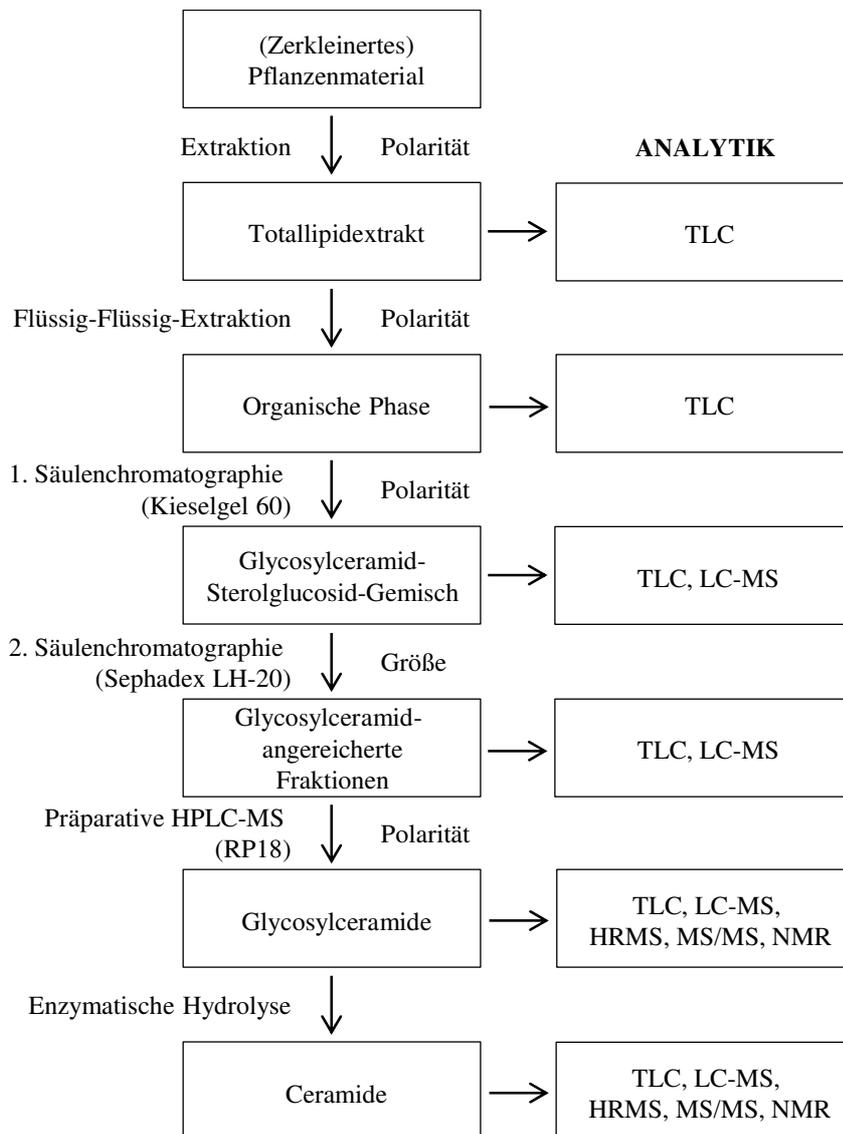


Abb. 9: Gewinnung von „Phyto“-Ceramiden aus Pflanzenmaterial

TLC – Dünnschichtchromatographie, LC-MS – Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie, HRMS – Hochauflösung-Massenspektrometrie, MS/MS – Tandem-Massenspektrometrie, NMR – Kernspinresonanzspektroskopie

3.2.1.1 Extraktion der Gesamtlipide

Die Gesamtlipide wurden dreimal mit einem Gemisch aus Isopropanol-*n*-Hexan-Wasser (55:20:25 V/V/V, Markham und Jaworski, 2007) im Ultraschallbad für 15 Minuten bei

gelegentlichem Schütteln extrahiert. Im Gegensatz zu Markham und Jaworski, 2007, die nur die untere gesättigte Phase verwendeten, wurde in der vorliegenden Arbeit das gesamte Gemisch zur Extraktion genutzt. Das Gesamtvolumen des Extraktionsmittels wurde an die Menge des Pflanzenmaterials (100,0-750,0 g) angepasst (Tab. 18). Die Extrakte wurden filtriert und vereint. Es wurde eine 500 µl Probe für die Überprüfung mittels TLC (3.2.2) abgenommen. Der Gesamtlipidextrakt wurde nach Einengen mithilfe eines Vakuum-Rotationsverdampfers bei maximal 65°C ausgewogen.

Tab. 18: Verhältnisse der Pflanzenmaterialien zum Extraktionsmittel

Pflanzenmaterial	Einwaage [g]	Extraktionsmittel [l]		
		Isopropanol 55 %	n-Hexan 20 %	Wasser 25 %
Apfeltrester	750,0	1,65	0,60	0,75
Weizenkeime, Kaffeesatz	300,0	0,66	0,24	0,30
<i>Albizia grandibracteata</i> , <i>Albizia gummifera</i> , <i>Albizia lebbeck</i> , <i>Albizia schimperiana</i> , <i>Acacia etbaica</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i>	100,0	0,22	0,08	0,10

3.2.1.2 Fraktionierung der Gesamtlipide mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion

Eine Separation in polare und unpolare Verbindungen erfolgte mit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion durch Ausschütteln im Scheidetrichter in Anlehnung an die Methode von Folch *et al.*, 1957, auch bekannt als „Folch's partition“. Der Rückstand des Gesamtlipidextraktes wurde in einem Gemisch aus Chloroform-Methanol-Wasser (1:1:1 V/V/V) gelöst und in einen Scheidetrichter überführt. Je nach Menge des Gesamtlipidextraktes wurde ein Gesamtvolumen von 600 ml (Apfeltrester, 99,2 g; Weizenkeime, 110,4 g) oder 300 ml (Kaffeesatz, 34,4 g; Fabaceae-Arten, 14,0-45,9 g) zur Separation genutzt. Nach ausreichendem Schütteln wurden die Phasen getrennt. Bei einer schlechten Phasentrennung (Ausbildung einer Zwischenphase) wurde 0,5-1,0 % (w/V Wasserphase) NaCl hinzugegeben und erneut geschüttelt, was in der Ausbildung einer klaren organischen (unteren) und einer wässrigen (oberen) Phase resultierte.

Eine Nachextraktion der Phasen erfolgte mit der Zugabe einer Mischung von Chloroform-Methanol (1:1 V/V) zur wässrigen und einer Mischung von Methanol-Wasser (1:1 V/V) zur organischen Phase (Apfeltrester und Weizenkeime: 200 ml; Kaffeesatz und Fabaceae-Arten: 100 ml). Die Phasenseparation wurde mit der Zugabe von 0,5-1,0 % (w/V Wasserphase) NaCl unterstützt. Beide Phasen wurden getrennt und mittels TLC (3.2.2) auf das Vorkommen von GlyCer untersucht. Die wässrige (obere) Phase wurde verworfen, die organische Phase mittels Vakuum-Destillation bei maximal 40 °C eingengt und ausgewogen. Die organische Phase wird nachfolgend als angereicherter Extrakt bezeichnet. Für die AMD-HPTLC-Quantifizierung wurde eine 2 mg/ml Lösung des angereicherten Extraktes hergestellt.

3.2.1.3 Fraktionierung der Lipidklassen mittels Säulenchromatographie

Die Verbindungen der angereicherten Extrakte wurden mithilfe der Säulenchromatographie an unterschiedlichen stationären Phasen fraktioniert. Während mit einer ersten Adsorptionschromatographie an Kieselgel 60 eine „grobe“ Auftrennung anhand der Polarität erfolgte, wurden GlyCer aufgrund ihrer Molekülgröße mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 isoliert.

Säulenchromatographie an Kieselgel 60 – Trennung anhand der Polarität

Der angereicherte Extrakt wurde mit möglichst wenig Laufmittel (Chloroform-Methanol 9:1 V/V) aufgenommen (25-50 ml). Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (250,0 g), welches nach Aufschlänmen im Ultraschallbad in einem Säulenvolumen (SV, ca. 500 ml) mobiler Phase als sogenannter „slurry“ auf die Säule (3,8 x 60 cm) aufgegeben wurde. Die Säule wurde mit 2 SV mobiler Phase (Chloroform) equilibriert. Zum Vergleich der Pflanzenmaterialien wurden je 20,0 g des angereicherten Extraktes aufgetragen, was einem Verhältnis von Probe-stationärer Phase von 1:12,5 entspricht. Wenn eine Probe die Säule beim Auftragen verstopft hat, z.B. aufgrund erhöhter Viskosität (Apfeltrester), wurde ein sogenannter „Säulenkopf“ hergestellt. Die organische Phase wurde zusammen mit Kieselgel 60 am Vakuum-Rotationsverdampfer eingengt und so die Verbindungen an das Kieselgel adsorbiert. Dieses Kieselgel-Extrakt-Gemisch wurde dann trocken auf die Säule gegeben und analog der anderen Extrakte eluiert. Die Säule wurde nach folgendem Schema (Tab. 19) eluiert (Elutionsgeschwindigkeit 1,5-2,5 ml/min).

Tab. 19: Elutionsgradient der Säulenchromatographie an Kieselgel 60

	Chloroform	Methanol	Säulenvolumen
1. Elution	100	0	2 (1 l)
2. Elution	90	10	2 (1 l)
3. Elution	80	20	2 (1 l)

Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler in Reagenzgläsern zu 10 oder 20 ml aufgefangen, anschließend auf ihre Lipidzusammensetzung mittels TLC (3.2.2) untersucht und entsprechend gepoolt. Es schloss sich ein Trocknungsschritt mittels Vakuum-Destillation und Auswiegen der einzelnen Fraktionen an. Die Fraktionen wurden in 0,5 ml CHCl₃-MeOH 2:1 (V/V) je 20 ml Fraktion gelöst.

Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 – Trennung anhand der Größe

Diese Säulenchromatographie sollte der Auftrennung von GlyCer und Glycosylsterolen dienen, die aufgrund ihrer Polarität nicht an Kieselgel 60 getrennt werden konnten. Sephadex LH-20 kann zur Gelfiltration von Lipiden mit organischen Lösungsmitteln genutzt werden und führt zur Auftrennung nach der Molekülgröße und in untergeordnetem Maße auch nach der Polarität

der Verbindungen. Sephadex LH-20 wird durch Hydroxypropylierung von Sephadex G-25 hergestellt: es ist ein Polysaccharidnetzwerk (Dextrangerüst), das durch Crosslinking ausgebildet wird (GE Healthcare, 2016).

Die Gelfiltration erfolgte auf Grundlage der Herstellerangaben (GE Healthcare, 2016). Es wurden 100,0 g Sephadex LH-20 für die Herstellung des Säulenbetts verwendet. Das entspricht einem Säulenvolumen von ca. 400 ml (bei 3,9-4,3 ml/g (Methanol) und 3,6-3,9 mg/g (Dichlormethan)). Die stationäre Phase wurde 3 h in der mobilen Phase (500 ml Dichlormethan-Methanol 1:1 V/V) unter gelegentlichem leichtem Rühren quellen gelassen. Die Säule (3,0 x 60 cm) wurde mit Watte verschlossen, mit der stationären Phase befüllt und mit 2 SV (Fluss: 10 cm/h und 1,18 ml/min nach Formel (1)) equilibriert.

$$\text{Lineare Flussrate} \left(\frac{\text{cm}}{\text{h}} \right) = \frac{\text{Volumetrische Flussrate} \left(\frac{\text{cm}^3}{\text{h}} \right)}{\text{Fläche} (\text{cm}^2)} \quad (1)$$

Für eine ausreichende Trennung sollte der Anteil der Probe zur stationären Phase maximal 1-2 % betragen. Das wurde für alle Proben eingehalten (Tab. 20). Die Säule wurde mit einem Fluss von 300 cm/h und 35,35 ml/min (nach Formel (1)) beladen. Der lineare Fluss entsprach mit 1cm/h und 0,12 ml/min (nach Formel (1)) den Herstellerangaben (1-10 cm/h, GE Healthcare, 2016).

Tab. 20: Verhältnis der aufgetragenen Proben zur stationären Phase

Pflanzenmaterial	Kieselgel 60-Fraktion [g]	Anteil Probe zu stationärer Phase [%]
Apfeltrester	0,666	0,67
Weizenkeime	0,278	0,28
Kaffeesatz	0,279	0,28

Die Elution erfolgte mit 1 SV (400 ml) Dichlormethan-Methanol 1:1 (V/V). Das Totvolumen der Säule entsprach ungefähr einem Drittel des Bettvolumens (ca. 130 ml). Es wurden 2,5 ml Fraktionen mit dem Fraktionssammler aufgefangen, die anschließend mittels TLC (3.2.2) untersucht und gepoolt wurden. Nach dem Einengen der GlyCer-Fractionen an einem Vakuum-Rotationsverdampfer (40 °C) und dem Auswiegen der getrockneten Fraktionen, wurden die Proben in 0,5 ml DCM-MeOH 1:1 (V/V) je 2,5 ml Fraktion gelöst. Es schloss sich die Probenvorbereitung für die Untersuchung mit LC-MS (3.2.2.3) an.

3.2.1.4 Präparative HPLC-MS zur Isolierung von Glycosylceramiden

Die GlyCer-angereicherten Fraktionen wurden mithilfe einer präparativen HPLC-MS-Methode weiter in einzelne GlyCer-Fractionen aufgetrennt. Als LC-MS diente das Agilent 1260 Infinity LC System, als stationäre Phase eine präparative Säule Zorbax Extend-C18 (5 µm, 21,2 x 150 mm, 80 Å, Agilent, Santa Clara, USA). Mithilfe der Formel (2) wurde der lineare

Skalierfaktor berechnet, der die Hochskalierung des Flusses einer analytischen (mit ID = 4,6 mm) auf eine präparative (mit ID = 21,2 mm) Säule ermöglichte.

$$\text{Skalierfaktor} = \frac{(\text{ID der präparativen Säule [cm]})^2}{(\text{ID der analytischen Säule [cm]})^2} \quad (2)$$

mit ID – Innerer Durchmesser

Der Skalierfaktor betrug 21,24 und der Fluss für die präparative Säule 25,49 ml/min (bei einem Fluss von 1,2 ml/min für die analytische Säule, 3.2.2.3). Für die Separation der GlyCer wurde der Gradient aus Tab. 21 und ein Fluss von 25 ml/min verwendet.

Tab. 21: Gradient der HPLC-MS-Methode

FA – Ameisensäure, Laufmittel vor Verwendung mit Helium entgast

Zeit [min]	A [%]	B [%]
	Methanol (+ 0,1 % FA)	Wasser (+ 0,1 % FA)
0	97	3
20	100	0
30	100	0
35 (Equ.)	97	3

Das Splitverhältnis Fraktionssammler:Massenspektrometer lag bei 500:1. Die Injektionsvolumina variierten zwischen 300 und 900 µl. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur (25 °C), da kein Säulenofen für die präparative Säule verfügbar war. Die massenspektrometrische Detektion ist in Kapitel 3.2.2.3 beschrieben.

Die Probenvorbereitung bestand im Lösen der Fraktionen in 2 ml MeOH (ULC-MS) unter Einwirkung von Wärme und der Behandlung im Ultraschallbad. Anschließend wurde bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand injiziert.

Tab. 22: Glycosylceramid-angereicherte Fraktionen zur Aufreinigung mittels präparativer HPLC-MS

Pflanzenmaterial	Sephadex LH-20-Fraktion [g]	Gesamtmenge [g]
Apfeltrester	0,1332 (Fr. 65-72)	0,222
	0,0884 (Fr. 73-78)	
Weizenkeime	0,0715 (Fr. 58-67)	0,084
	0,0122 (Fr. 68-72)	
Kaffeesatz	0,0260 (Fr. 22-28)	0,050
	0,0241 (Fr. 29-35)	

Die Fraktionssammlung erfolgte mit der Agilent ChemStation Software (Agilent, Santa Clara, USA) und ergab nach Poolen für den Apfeltrester 12 Fraktionen (Fraktion A1 (10,2 mg): **1-4**; A2 (10,1 mg): **5-6**; A3 (55,6 mg): **7**; A4 (1,1 mg): **10**; A5 (1,1 mg): **13**; A6 (2,0 mg): **17-18**; A7 (3,1 mg): **22-23**, **25**; A8 (19,5 mg): **28**; A9 (10,7 mg): **31-32**; A10 (24,8 mg): **35-36**; A11 (3,4 mg): **39**, **41**; A12 (0,9 mg): **43-44**), für Weizenkeime 12 Fraktionen (Fraktion W1 (6,6 mg): **7-8**; W2 (4,0 mg): **9**; W3 (3,7 mg): **11-12**; W4 (3,8 mg): **14-17**, **19-20**; W5 (16,7 mg): **21-22**, **24**; W6 (2,5 mg): **26**; W7 (13,8 mg): **27-29**; W8 (6,3 mg): **30-33**; W9 (5,1 mg): **34-38**;

W10 (2,3 mg): **39-41**; W11 (1,0 mg): **42-45**; W12 (0,8 mg): **46**) und für Kaffeesatz 5 Fraktionen (Fraktion C1 (1,0 mg): **7**; C2 (3,0 mg): **28**; C3 (1,8 mg): **31-32**; C4 (2,0 mg): **36**; C5 (0,8 mg): **39, 41**). Retentionszeiten sind in Tab. 32 angegeben. Für die Strukturuntersuchungen wurden 100 µg/ml Stammlösungen (in MeOH, ULC-MS) hergestellt.

3.2.1.5 Auftrennung der Fraktion A1 mittels Säulenchromatographie

Fraktion A1 des Apfeltresters wurde zusätzlich säulenchromatographisch aufgetrennt. 10,2 mg der Fraktion A1 wurden in 200 µl Chloroform-Methanol 9:1 (V/V) gelöst und auf eine Kieselgelsäule (Glassäule: 1,5 x 38 cm; stationäre Phase: 30,0 g Kieselgel 60; Säulenvolumen: ca. 60 ml) aufgetragen (vgl. 3.2.1.3). Es folgte die Elution mit 3 SV Laufmittel bei einem Fluss von 0,25 ml/min. 2,5 ml Fraktionen (Fraktionssammler) wurden mittels Online-TLC-Analyse (siehe 3.2.2) gepoolt und die Fraktionen im Vakuum-Rotationsverdampfer (40 °C) zur Trockne eingengt (A1-1 (**1**: 2,5 mg) und A1-2 (**2, 3**: 2,7 mg)).

3.2.1.6 Enzymatische Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®)

Das Enzym Glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45) katalysiert die hydrolytische Reaktion von einem GlyCer zum Cer. Es wird als rekombinant hergestelltes Enzym therapeutisch Gaucher-Kranken substituiert. Morbus Gaucher ist eine lysosomale Speichererkrankung, bei deren Mangel an körpereigener Glucocerebrosidase es zur Abbaustörung von Glucocerebrosiden (GlyCer) kommt. Eine humane, rekombinant hergestellte Glucocerebrosidase ist die Imiglucerase (DB00053, Cerezyme® 400 U, Genzyme Corporation, Cambridge, USA). Das Enzym wurde von Prof. Dr. Christoph Baerwald (Sektion Rheumatologie der Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Leipzig) zur Verfügung gestellt. Cerezyme® (Imiglucerase) lag in Wasser gelöst vor. Am gleichen Tag wurde eine 10 %ige Glycerinkultur zur Lagerung hergestellt. Dafür wurden anteilige Proben (125 µl) der Arzneimittellösung unter einer Sterilbank in sterile Reaktionsgefäße überführt, 12,5 µl Glycerol (10 %ig) hinzugefügt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Glycerinkultur (0,91 mg/ml SL) erfolgte bei -80 °C bis zur Verwendung. Obwohl es Herstellerangaben zur Enzymaktivität des Arzneimittels (400 U) gibt, ist eine Umrechnung auf die tatsächlich enthaltene Konzentration (mg/ml) an Imiglucerase aufgrund chargenspezifischer Unterschiede nicht möglich. Die Produktinformationen geben eine ungefähre Konzentration von 1 mg/ml für 40 Units an (European Medicines Agency, 2016). Aus diesem Grund musste die genaue Konzentration des Enzyms bestimmt werden. Dies wurde zum einen mit dem Bradford-Test (Bradford, 1976) vollzogen, bei der ein Protein mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 ein farbiges Produkt bildet, welches Licht der Wellenlänge 595 nm absorbiert. Zum anderen wurde eine photometrische Proteinbestimmung bei 280 nm genutzt.

Konzentrationsbestimmung mit Bradford-Test

Die Konzentrationsbestimmung des Enzyms erfolgte mit dem Bradford-Test (Bradford, 1976). Dafür wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) als Protein die Kalibrierung im Bereich von 0 bis 250 µg/ml durchgeführt. Die BSA-Stammlösung (SL: Albumin Fraktion V, pH 7,0) wurde mit 20 mg/ml hergestellt und nachfolgend eine Verdünnungsreihe erstellt (Tab. A3), die photometrisch gemessen wurde. Für die Messung wurde das Bradford-Reagenz (400 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 400 mL Phosphorsäure 85 % (m/m), 200 mL Ethanol 96 % (V/V), 400 mL entionisiertes Wasser) im Verhältnis 1:4 (V/V) mit entionisiertem Wasser verdünnt. Als Referenzlösung für die Messung diente eine Mischung aus 1 ml Bradford-Reagenzverdünnung mit 50 µl Wasser. Die Probe (50 µl) einer 1:20-Proteinverdünnung (Verdünnung mit Na-Citratpuffer, pH 4,5) wurde ebenfalls mit 1 ml Bradford-Reagenzverdünnung versetzt. Es folgte die Messung am Zweistrahlphotometer (BioSpectrometer basic, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in einer UV-Einmal-Küvette Plastibrand bei einer Wellenlänge von 595 nm. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden standen 6 Konzentrationen (0, 50, 100, 150, 200 und 250 µg/ml) in je 3 Replikaten zur Verfügung. Der lineare Bereich der Absorption erstreckte sich von 0 bis 250 µg/ml. Die Konzentration der Glucocerebrosidase wurde mit Formel (3) der Kalibriergeraden berechnet (Abb. A22):

$$c_{\text{Protein}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = 532,36 \cdot A \pm 6,8302 \quad (3)$$

mit c – Konzentration, A – Absorption,
 $R^2 = 0,9932$

Konzentrationsbestimmung mit photometrischer Proteinbestimmung (280 nm)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde auch die photometrische Proteinbestimmung bei 280 nm angewendet. Die Methode beruht auf der Absorption funktioneller Gruppen von aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin) im Protein bei 280 nm.

Über die Proteinsequenz der Imiglucerase (DB00053, Abb. A21) wurde mit dem ProtParam-Tool (Gasteiger *et al.*, 2005) der Extinktionskoeffizient (ϵ , 94685 M⁻¹cm⁻¹, gemessen bei 280 nm in Wasser) und das Molekulargewicht (55597,4 g/mol, C₂₅₃₂H₃₈₅₄N₆₇₂O₇₁₁S₁₆) des Enzyms ermittelt. Für die Bestimmung der Absorption bei 280 nm wurde ein Zweistrahlphotometer (BioSpectrometer basic, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verwendet. Es folgte eine Dreifachbestimmung einer 1:20 Verdünnung der Imiglucerase in einer 1 cm dicken UV-Einmal-Küvette UVette. Mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz nach Formel (4) wurde die Konzentration auf Grundlage der Absorption errechnet:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (4)$$

mit A – Absorption bei der Wellenlänge λ , ϵ – Extinktionskoeffizient, c – Proteinkonzentration, d – Schichtdicke

Durchführung der enzymatischen Hydrolyse

Der angewendete Assay basierte auf einer laborinternen Vorschrift eines „Micellaren GCCase-Aktivitätsassays“ von Dr. Bernadette Breiden und Prof. Konrad Sandhoff (Life & Medical Sciences Institute (LIMES) des Kekulé-Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn). Dieser micellare Assay benötigt nicht das Aktivatorpeptid der Glucocerebrosidase Saposin C. Es wurden drei GlyCer-Fractionen für die enzymatische Hydrolyse ausgewählt (Tab. 23).

Tab. 23: Glycosylceramide für die enzymatische Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®)

A – Apfeltrester, Glc – Glucose. Im 2. Durchgang wurden nicht umgesetzte GlyCer des 1. Durchgangs mit GlyCer des gleichen Typs gemischt.

Fraktion	Glycosylceramid	1. Durchgang [mg]	2. Durchgang [mg]	Insgesamt eingesetzte Menge [mg]
A3	Glc-d18:2 h16:0 (47)	25,0	20,0	40,0
A8	Glc-t18:1 h22:0 (48)	10,0	11,4	17,5
A10	Glc-t18:1 h24:0 (49)	10,0	15,5	20,0

Jedes GlyCer (Pulver) wurde in einem sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben (autoklaviert) eingewogen und in 50 mM Na-Citratpuffer (pH 4,5, Endvolumen 50 ml) und 20,65 ml einer 5 mg/ml Na-Taurocholat-Lösung (3,8 mM in 50 mM Na-Citratpuffer; CMC 3-11 mM bei 20-25 °C) gelöst. Zusätzlich wurden 2 mM Dithiothreitol (100 µl bei 1 M SL) und 1 mM Ascorbinsäure (50 µl bei 1 M SL) zum Schutz des Enzyms vor Oxidation hinzugefügt. Die Gemische wurden geschüttelt und sonifiziert bis eine milchig-trübe Lösung entstand. Nach der Zugabe von 100 µg Imiglucerase (110 µl einer 0,91 mg/ml SL (glycerolhaltig 10 %)) wurde das Reaktionsgemisch bei 37 °C für 14 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ml CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) gestoppt und die Phasen getrennt. Zwei Nachextraktionen der wässrigen Phase mit 20 ml CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) schlossen sich an. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mittels Vakuum-Rotationsverdampfer (40 °C) bis zur Trockne eingengt. Es folgte die Aufnahme in CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) und die säulenchromatographische Trennung (vgl. 3.2.1.7) in nicht umgesetzte GlyCer (**7**, **28**, **36**) und Cer (**47**, **48**, **49**). Die enzymatische Hydrolyse wurde je GlyCer (**7**, **28**, **36**) zweimal durchgeführt, da bei den gewählten Bedingungen keine quantitative Umsetzung vorlag. Nach Säulenchromatographie zurückgewonnene, nicht umgesetzte GlyCer wurden in einem zweiten Durchgang mit GlyCer desselben Typs erneut der enzymatischen Hydrolyse unterzogen (Tab. 23). Nach zwei Durchgängen wurden 25,5 mg d18:2 h16:0 (**47**), 11,3 mg t18:1 h22:0 (**48**) und 11,8 mg t18:1 h24:0 (**49**) gewonnen. Die wässrige Phase wurde weiter untersucht (vgl. 3.2.3.5).

3.2.1.7 Aufreinigung der „Phyto“-Ceramide nach enzymatischer Hydrolyse

Da unter den verwendeten Bedingungen keine quantitative Umsetzung durch das Enzym stattgefunden hat, wurden die GlyCer mittels Säulenchromatographie abgetrennt. Hierfür wurde eine Glassäule (1,5 x 38 cm) analog zu 3.2.1.3 präpariert (stationäre Phase: 30,0 g Kieselgel 60; Säulenvolumen: ca. 60 ml). Die Säule wurde mit 2 SV der mobilen Phase (CHCl₃/MeOH 9:1 (V/V)) equilibriert. Das Probengemisch wurde in 200-400 µl mobiler Phase gelöst und aufgegeben (Verhältnis Probe:stationäre Phase 1:1000). Die Elution mit 3 SV Laufmittel und einem Fluss von 1 ml/min führte zu 2,5 ml Fraktionen (Fraktionssammler), die entsprechend der Online-TLC-Analyse (3.2.2) gepoolt und im Vakuum-Rotationsverdampfer (40 °C) zur Trockne eingengt und ausgewogen wurden.

3.2.2 Detektion und Identifizierung von Glycosylceramiden

3.2.2.1 Dünnschichtchromatographie (TLC)

Als stationäre Phase wurde eine mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Aluminiumfolie (Schichtdicke 0,2 mm) verwendet. Obwohl GlyCer keine fluoreszenzmindernden Zonen zeigen, wurden Platten mit Fluoreszenzindikator verwendet, da sich diese bei der folgenden aggressiven Visualisierung (u.a. Kupfersulfat, Phosphorsäure) als stabiler erwiesen. Die TLC-Platten hatten eine Größe von 10 x 10 cm. Die Proben wurden entweder manuell mit Einmal-Mikropipetten (5 µl) oder mit einer Hamilton 100 µl Mikroliterspritze und einem Gerät zur halbautomatischen Probenauftragung (Linomat IV, Camag, Muttenz, Schweiz) mit folgenden Parametern (Tab. 24) aufgetragen:

Tab. 24: Parameter der halbautomatischen Probenauftragung für TLC und präparativer TLC

Parameter	TLC	präparative TLC
Plattenbreite	100 mm	100 mm
Entfernung vom unteren Plattenrand	8 mm	8 mm
Startposition	12 mm	22 mm
Bandbreite (Band)	6 mm	65 mm
Freifläche (Space)	4 mm	-
Auftragsgeschwindigkeit (sec/µl)	8 sec/µl	8 sec/µl
Auftragvolumen (Volumen)	10 µl	50 µl
Anzahl applizierbarer Proben	8	1

Die TLC-Platte wurde in einer Flachboden-TLC-Entwicklungskammer mit Kammersättigung bis 5 mm unterhalb des oberen Plattenrandes entwickelt. Als Laufmittel diente 20 ml Chloroform-Methanol 85:15 (V/V) (Ternes *et al.*, 2011). Die Platten wurden nach Trocknung für 10 s in eine Kupfersulfat/Phosphorsäure-Reagenzlösung (Kupfersulfat 10 % (m/V), Phosphorsäure 8 % (V/V), Methanol 5 % (V/V), in Wasser gelöst) getaucht und erneut angetrocknet. Die Detektion erfolgte bei 150 °C im Trockenschrank für 10 min. Diese Art der Detektion wird auch Lipid-Veraschung genannt (Fewster *et al.*, 1969).

Für die qualitativen Aussagen wurden unterschiedliche Referenzlösungen hergestellt. Diese sind in Tab. 25 dargestellt. Alle Substanzen hatten eine Konzentration von 100 µg/ml CHCl₃-MeOH 2:1 (V/V) und wurden mit 5 µl (manuell) oder mit 10 µl (halbautomatisch) aufgetragen, was einer jeweiligen Substanzmenge von 500 ng und 1000 ng je 6 mm Bande entsprach.

Tab. 25: Aufgetragene Referenzlösungen

Referenzlösung	Zusammensetzung	Relevante Abkürzung
Lipide (R1)	Triolein (Glyceroltrioleat)	
	Cholesteroleat	
	Squalen	
	β-Sitosterol (Sojabohnen)	
	Linolsäure	18:2
	β-Sitosterolglucosid (Inhouse-Bibliothek)	
Ceramide (R2)	GlyCer (7, Sojabohnen)	Glc-d18:2 h16:0
	Cer [NS], C18	d18:1 18:0
	Cer [AS], C18	d18:1 h18:0
	Cer [NP], C18	t18:0 18:0
	Cer [AP], C18	t18:0 h18:0
Hydrolyse (R3)	Linolsäure	18:2
	Cer (47) (nach Hydrolyse von Glc-d18:2 h16:0 (7), isoliert aus Apfeltrester)	d18:2 h16:0
	GlyCer (7, Sojabohnen)	Glc-d18:2 h16:0
	Sphingosin (Inhouse-Bibliothek)	d18:1

3.2.2.2 Automatische Mehrfachentwicklung-Hochleistungsdünnschichtchromatographie (AMD-HPTLC)

Die AMD-HPTLC ist eine chromatographische Methode, die zur Auftrennung komplexer Pflanzenmatrices geeignet ist. In Abb. 10 ist die Funktionsweise der AMD 2 (Camag, Muttenz, Schweiz) dargestellt. Die AMD 2 (Camag, Muttenz, Schweiz) entwickelt die HPTLC-Platte vollautomatisch in n Entwicklungsschritten. Für jeden Schritt ist die Laufmittelzusammensetzung und eine Laufhöhe vorgegeben. So kann eine Gradientenelution die unterschiedlichsten Verbindungsklassen, aber auch Einzelverbindungen innerhalb der Klassen auftrennen.

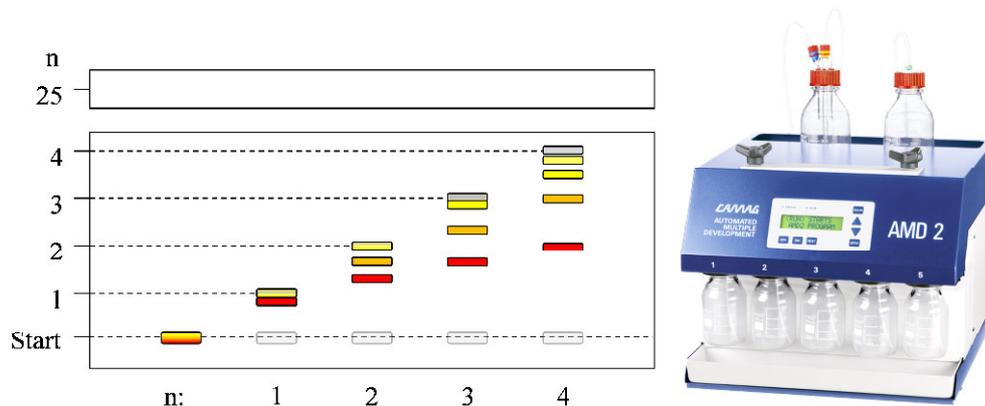


Abb. 10: AMD-Technik

Automatische Mehrfachentwicklung mit der AMD 2 von Camag (mod. nach Burger, 1992). n – Entwicklungsschritte, --- – Laufmittelfront

Laserodierte (GLP)-HPTLC-Platten mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (Glas, Schichtdicke 0,2 mm, 10 x 20 cm) wurden als stationäre Phase verwendet. Sie wurden mindestens für 2 h in Isopropanol in einen Glastank getaucht und bei 130 °C im Trockenschrank für 30 min kurz vor Gebrauch getrocknet (Opitz *et al.*, 2011). Die Probenvorbereitung erfolgte nach 3.2.1.1 und 3.2.1.2. Die Referenzlösungen (R1, R2 und R3) sind in Tab. 25 beschrieben. Die Proben wurden bandenweise mit dem Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4, Camag, Muttenz, Schweiz) gemäß den Parametern in Tab. 26 appliziert. Die Lösungen wurden mit einer 25 µl Hamilton Mikroliterspritze vollautomatisch aufgetragen.

Tab. 26: Parameter der automatischen Probenauftragung für AMD-HPTLC

Parameter	AMD-HPTLC
Plattenbreite	200 mm
Entfernung vom unteren Plattenrand	8 mm
Startposition	15 mm
Bandbreite (Band)	6 mm
Abstand zwischen Banden	4 mm
Auftragsvolumen (Volumen)	10 µl
Anzahl applizierbarer Proben	18

Eine 17-Schritt-AMD-HPTLC-Methode wurde bereits von Farwanah *et al.*, 2002, für die Detektion von Cer in der menschlichen Haut entwickelt. Opitz *et al.*, 2011, hatten diese weiterentwickelt und verbessert. Diese Methoden wurden als Ausgangspunkt für die neu entwickelte AMD-HPTLC-Methode verwendet. Kurz, Methanol ersetzte Ethanol und wurde im Anteil erhöht, Aceton wurde entfernt und der Gradient mit Chloroform ergänzt (Tab. A5).

Die HPTLC-Platte wurde mit der AMD 2 mit vier organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Methanol, *n*-Hexan und Ethylacetat, alle HPLC-grade) als Gradientenelution in 18 Schritten nach folgendem Schema (Abb. 11) entwickelt.

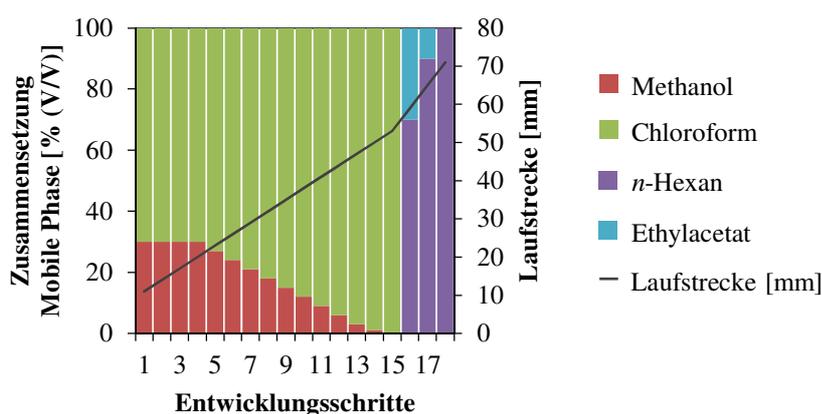


Abb. 11: Gradientenelution der AMD-HPTLC-Methode

Vor jedem Schritt erfolgte eine Vorkonditionierung der Dampfphase in der Entwicklungskammer mit 4 M Essigsäure und eine Trocknungsphase von 1,5 min. Die maximale Laufstrecke betrug 71 mm, die Entwicklungszeit ca. 2 h 40 min und der Lösungsmittelverbrauch 187 ml. Nach der Entwicklung der Platte folgte das Tauchen für 10 s in

eine Kupfersulfat/Phosphorsäure-Reagenzlösung (siehe 3.2.2). Die anschließende Trocknung im Trockenschrank (150 °C, 10 min) führte zur Visualisierung der Lipide als graubraune Banden. Mithilfe des TLC Scanners 3 (Camag, Muttenz, Schweiz) wurde eine densitometrische Analyse vorgenommen. Die Absorptionsmessung wurde bei 546 nm, einem Messspalt von 4 x 0,2 mm, einer Scangeschwindigkeit von 20 mm/s und mit einer Auflösung von 25 µm/Schritt durchgeführt. Die Geräte wurden mit der winCATS Software (V1.4, Camag, Muttenz, Schweiz) gesteuert.

3.2.2.3 Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Für LC-MS-Untersuchungen aus den aufgereinigten Fraktionen wurden jeweils 100 µl der Originalfraktion abgenommen, mit einem Vakuum-Konzentrator (40 °C) eingengt und mit 1 ml MeOH im Ultraschallbad gelöst. Nach der Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min ist der gesättigte Überstand abgenommen worden. Es folgte eine Elution über eine RP18-Kartusche (Chromabond C18 ec, 100 mg, 1 ml) mit 3 x 1 ml MeOH. Nach erneutem Einengen mit einem Vakuum-Konzentrator (40 °C) wurden die Proben in 500 µl MeOH (ULC-MS) rückgelöst und auf Klarheit überprüft. Die Fraktionen der präparativen HPLC-MS und die „Phyto“-Cer wurden auf Konzentrationen von 100 µg/ml (in MeOH, ULC-MS) eingestellt. Dafür wurden entsprechende Mengen mit einem Vakuum-Konzentrator (40 °C) eingengt und in MeOH resuspendiert. Die Klarheit der Lösungen wurde nach Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min überprüft. Für die HPLC-MS diente ein Agilent 1260 Infinity LC System, welches mit einem Agilent 6120 B Quadrupole LC/MS (Agilent, Santa Clara, USA) gekoppelt war. Das System wurde mit der Agilent ChemStation (B.04.03) Software (Agilent, Santa Clara, USA) gesteuert. Als stationäre Phase wurde eine Zorbax Extend-C18-Säule (5 µm, 4,6 x 150 mm, 80 Å) mit einer Vorsäule (Zorbax Extend-C18 Analytical Guard Column, 5 µm, 4,6 x 12,5 mm, beide Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Die Verbindungen wurden mit dem in Tab. 21 genannten Gradienten bei einem Fluss von 1,2 ml/min und einer Säulentemperatur von 30 °C aufgetrennt.

GlyCer wurden im Positiv-Modus (APCI) mit einem Quadrupol-Massenspektrometer detektiert, welches über ein APCI-Interface mit dem HPLC-System gekoppelt war. Die Parameter des Quadrupols wurden mit einer GlyCer-Referenzsubstanz Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen), 100 µg/ml gelöst in Methanol (ULC-MS), optimiert. Die Spannung der Koronanadel betrug +4,5 kV (Stromstärke 5 µA). Die Gastemperatur wurde auf 200 °C, die Verdampfungstemperatur des Heizers auf 450 °C eingestellt. Das Verneblergas (Stickstoff) hatte einen Druck von 35 psig (ca. 2,4 bar) und das Trocknungsgas (Stickstoff) wurde mit 12 l/min betrieben. Zusätzlich wurde eine kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) von 150 V für die Unterstützung der Fragmentierung zugeschaltet. Die Spektren sind im Full-Scan-Modus (TIC) mit m/z -Verhältnissen zwischen 150 bis 1000 (Schrittgröße 0,1 m/z) gemessen worden.

3.2.2.4 HPLC-MS zur Trennung der neuartigen Glycosylceramide des Apfeltresters

Da die GlyCer **1** und **2** (Fraktion A1-2) unter Verwendung der herkömmlichen LC-MS-Methode (vgl. 3.2.2.3) co-eluierten, ist eine alternative LC-Methode mit derselben Säule und demselben Gerät etabliert worden. Dafür wurde der Fluss auf 0,8 ml/min verringert und ein Methanol-Wasser (jeweils +0,1 % FA)-Gradient (65:35 % → 100:0 % in 20 min, 100:0 % für weitere 10 min) zur Trennung verwendet. Die massenspektrometrische Detektion ist nicht verändert worden (3.2.2.3). Das Chromatogramm und die zugehörigen Spektren wurden über 30 min aufgenommen.

3.2.3 Strukturaufklärung von Glycosylceramiden

3.2.3.1 Hochauflösende Massenspektrometrie (ESI-HRMS)

Die hochaufgelösten ESI-Massenspektren wurden mit einem Orbitrap Elite Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) im positiven Ionenmodus aufgenommen. Die Elektrospray-Ionenquelle (ESI) wurde mit einer Spray-Spannung von +4,0 kV und einer Kapillartemperatur von 275 °C betrieben. Als Vernebelungsgas diente Stickstoff. Die Quellenheiztemperatur betrug 45 °C und die FTMS-Auflösung 30.000. Die Probenlösungen (1 µg/ml Methanol (ULC-MS)) wurden kontinuierlich mittels einer 500 µl Hamilton Mikroliterspritze und mit einer Flussrate von 5 µl/min injiziert. Das Massenspektrometer wurde extern (Pierce® LTQ Velos ESI positive ion calibration solution, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) kalibriert. Die Spektren wurden mit der Software XCalibur (V 2.2 SP1, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) ausgewertet.

3.2.3.2 Ionenfallen-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)

Informationen über die Struktur und Fragmentierung von GlyCer und Cer wurden mithilfe des Ionenfallen-Massenspektrometers Thermo Finnigan LCQ Classic (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland), welches mit einer Elektrospray-Ionenquelle (ESI) versehen war, erhalten. Die Massenspektren wurden im positiven und negativen Ionenmodus aufgenommen. Stickstoff diente als Sprühgas. Für die größtmögliche Intensität wurde ein halbautomatisches Tuning für eine GlyCer-Referenzsubstanz (1 µg/ml Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Sojabohnen), durchgeführt. Die Parameter sind in Tab. 27 aufgeführt.

Alle Proben hatten eine Konzentration von 1 µg/ml in MeOH (ULC-MS) und wurden kontinuierlich mit einer 250 µl Hamilton Mikroliterspritze und mit einer Flussrate von 5 µl/min injiziert. Die Spektren wurden im Full-Scan-Modus mit Masse-Ladungs-Verhältnissen zwischen 200 bis 1000 (Schrittgröße 0,1 m/z) aufgenommen. Für weitere Strukturinformationen wurden MS/MS-Scans durchgeführt, indem die Vorläuferionen ausgewählt wurden (Isolierungsbreite 1,0-2,0). Es wurden Kollisionsenergien zwischen 35 und 40 % gewählt, um die Produktionen zu erhalten. Als Kollisionsgas diente Helium. Die Steuerung des Ionenfallen-MS und die

Auswertung der Spektren wurde mithilfe der Software Xcalibur (V 2.0) (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) realisiert.

Tab. 27: Parameter der MS/MS-Experimente mit der Ionenfalle

AU – Arbitrary Units

Parameter	Positiver ESI-Modus	Negativer ESI-Modus
<i>ESI-Quelle</i>		
Sprayspannung [kV]	+4,5	-4,5
Sheathgas [AU]	80	80
Hilfsgas [AU]	0	0
Kapillarspannung [V]	-20	8,5
Kapillartemperatur [°C]	220	220
Tube Lens Offset [V]	-20	35
<i>Ionenoptik</i>		
Multipole 1 Offset [V]	4	-4
Multipole 2 Offset [V]	6	-5,5
InterMultipole Lens Voltage [V]	15	-20
Trap DC Offset Voltage [V]	8,5	-12
<i>Fragmentierung</i>		
Source CID [V]	0	0
Kollisionsenergie [%]	35-40	35-40

3.2.3.3 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Probenvorbereitung wurden die GlyCer-Fractionen neben der Trocknung im Vakuum-Konzentrator (40 °C) zusätzlich im Exsikkator über konzentrierter KOH für mindestens 48 h getrocknet. Als Solvent wurde 0,65 ml Pyridin-*d*₅ (inklusive TMS als interner Standard) genutzt.

Die 1D- (¹H, ¹³C, 1D-TOCSY) und 2D-NMR-Spektren (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, ROESY) wurden mit einem Varian VNMRS 600 MHz NMR Spektrometer (Agilent, Santa Clara, USA) aufgenommen (Tab. 28).

¹H- und ¹³C-Spektren wurden mit der standardisierten Pulssequenz s2pul (*standard 2 pulse sequence*) aufgenommen. Die Protonen- und Kohlenstoff-NMR-Frequenzen betragen 599,828 und 150,840 MHz. Chemische Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben und auf den internen Standard Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0,000$ ppm) referenziert. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hz, Multiplizitäten mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett) und m (Multipllett) angegeben. Alle Spektren wurden bei 25 °C gemessen. Als Software diente Varian VNMRJ 4.0A (CHEMPACK 6.2) und später Varian VNMRJ 4.2A (CHEMPACK 7.1, Agilent, Santa Clara, USA). Die NMR-Spektren wurden mit MestReNova (8.0.0) (Mestrelab Resarch, Escondido, USA) ausgewertet und mit Microsoft Excel 2010 (V 14.0, Microsoft, Redmond, USA) dargestellt.

Die Probennachbereitung sah die Wiedergewinnung der Proben nach erfolgreicher Spektrenmessung vor. Dafür wurde die Lösung in ein Reagenzgefäß überführt und das NMR-Röhrchen mit Pyridin gespült. Daraufhin wurde Pyridin abgedampft und der Rückstand noch dreimal mit Toluol aufgenommen und mittels Vakuum-Konzentrator (40 °C) eingengt.

Tab. 28: Verwendete NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Glycosylceramiden und Ceramiden

Experiment	Erklärung	Information
1D ^1H	H – Proton	^1H -chemische Verschiebungen, Spin-Spin-Kopplungen, Protonenverhältnisse
^{13}C	C – Carbon (Kohlenstoff)	^{13}C -chemische Verschiebungen
1D-TOCSY (zTOCSY1D)	zero-quantum filtering Total Correlation Spectroscopy- 1D	^1H -chemische Verschiebungen von Protonen im gleichen Spin-System
2D COSY (gDQCOSY)	gradient-enhanced Double-Quantum filtered COrrelation Spectroscopy	Korrelation skalar gekoppelter Kerne aufgrund ^1H - ^1H -Kopplung
TOCSY (zTOCSY)	zero-quantum filtering Total Correlation Spectroscopy	Korrelation skalar gekoppelter Kerne aufgrund ^1H - ^1H -Kopplung innerhalb eines Spinsystems
HSQC (gHSQCAD)	gradient-enhanced Heteronuclear Single Quantum Coherence with ADiabatic pulses	Korrelation skalar gekoppelter Kerne über eine Bindung aufgrund ^1H - ^{13}C -Kopplung
HMBC (gHMBCAD)	gradient-enhanced Heteronuclear Multiple Bond Correlation with ADiabatic pulses	Korrelation skalar gekoppelter Kerne über mehrere Bindungen aufgrund ^1H - ^{13}C -Kopplung
ROESY	Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Korrelation räumlich benachbarter skalarer Kerne (^1H - ^1H) (bis ca. 5 Å)

3.2.3.4 Identifizierung der Fettsäuredoppelbindungen mittels DMDS-Methode

Um die Lage der Doppelbindungen in den ungesättigten Fettsäuren der GlyCer zu identifizieren, wurden die GlyCer nach Dimethyldisulfid-Derivatisierung massenspektrometrisch gemessen. Entwickelt für Methylester freier Fettsäuren (Scribe *et al.*, 1988) und adaptiert für Fettsäuremethylester und Sphingobasen nach chemischer Hydrolyse von GlyCer (Cateni *et al.*, 2003), wurde die bestehende Methode für isolierte, in der Fettsäureeinheit einfach ungesättigte GlyCer aus Weizenkeimen angewendet.

Da einige der Verbindungen nur in Spuren in den Fraktionen auftraten, wurden Hauptkomponenten als Leitsubstanzen untersucht (Glc-t18:1 h22:1 (**19**), Glc-t18:1 h24:1 (**29**), Glc-d18:2 h24:1 (**30**)). Es wurden jeweils 10 µg der GlyCer in 100 µl Kohlenstoffdisulfid (CS₂) gelöst. Nach der Zugabe von 100 µl Dimethyldisulfid (DMDS) und 0,5 mg Iod (I₂) wurde der Ansatz bei 60 °C (Wasserbad) für 48 h in einem verschlossenen Reaktionsgefäß inkubiert. Durch Zugabe einer 5 %igen wässrigen Natriumthiosulfat-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt. Es folgte die Extraktion mit je 0,5 ml *n*-Hexan dreimal. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, der Überstand abgenommen und das Natriumsulfat ein weiteres Mal mit 0,5 ml *n*-Hexan erschöpfend extrahiert. Dem Einengen der organischen Phase im Vakuum-Konzentrator (40 °C) folgte die Wiederaufnahme in 100 µl Methanol (HPLC) und die bereits beschriebene MS/MS-Analyse (siehe 3.2.3.2). Im negativen ESI-Ionenmodus wurden die DMDS-Fettsäurederivate detektiert und im MS/MS-Modus (CID 40 %) weiter fragmentiert. Die Doppelbindungsposition wurde über ein Fragment des Fettsäurerestes nach Spaltung innerhalb der Doppelbindung nachgewiesen.

3.2.3.5 Zuckernachweis nach Dünnschichtchromatographie

1 ml der wässrigen Lösung, die den Zucker nach der Hydrolyse des GlyCer mit Imiglucerase (Cerezyme®, vgl. 3.2.1.6) enthielt, wurde zur Trockne mit einem Vakuum-Konzentrator eingengt und in 100 µl Wasser gelöst. Als Referenzsubstanzen dienten die Zucker D-Glucose, D-Galactose, D-Fructose, D-Mannose und L-Rhamnose in Konzentrationen von 100 µg/ml Wasser. Die Parameter zur Auftragung mit dem Linomat IV (Camag, Muttenz, Schweiz) waren die gleichen wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Es wurden Kieselgel 60 F₂₅₄-TLC-Platten mit einer Schichtdicke von 0,2 mm zur Trennung verwendet. Die TLC-Platte wurde in einer Flachboden-TLC-Entwicklungskammer mit Kammersättigung bis 5 mm unterhalb des oberen Plattenrandes mit dem Laufmittel Acetonitril-Wasser 85:15 (V/V) entwickelt (Franz und Koehler, 1992). Nach dem Trocknen und anschließenden Tauchen (10 s) in Anilin-Diphenylamin-RL (2 % (V/V) Anilin, 2 % (m/V) Diphenylamin, in Aceton) und 1 ml konzentrierte H₃PO₄, die kurz vor der Verwendung frisch gemischt wurden, folgte die Visualisierung bei 120 °C im Trockenschrank in Form von farbigen Banden (z.B. Glucose: graublau, Fructose: braunorange) (Jork *et al.*, 1989).

3.2.4 Quantifizierung von Glycosylceramiden mit AMD-HPTLC-Densitometrie

Die AMD-HPTLC-Methode wurde bereits unter 3.2.2.2 beschrieben. Sie diene neben der Identifizierung einzelner Lipidklassen auch der Quantifizierung der GlyCer in einem angereicherten Extrakt. Dafür wurde die Methode validiert.

3.2.4.1 Validierung der analytischen Methode

Die Methode der Quantifizierung wurde auf Selektivität, analytische *Response* (Kalibrierfunktion), Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ), Richtigkeit (als Wiederfindungsrate nach Additionsverfahren), Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision), Präzision innerhalb einer Analyse, Präzision zwischen Analysen und Reproduzierbarkeit der Laufstrecke geprüft.

Die Selektivität einer analytischen Methode ist die Fähigkeit einen Analyten in der Gegenwart von störenden Komponenten, wie der Pflanzenmatrix, fehlerfrei zubestimmen. Die Selektivität der Methode wurde über den Vergleich der Chromatogramme der Pflanzenextrakte (*R_f*-Werte) gegenüber Referenzsubstanzen, die alle relevanten Lipidklassen darstellten (Tab. A6), nachgewiesen. Darüberhinaus wurde ein GlyCer-Standard (Glc-d18:2 h16:0 (7)) zum angereicherten Extrakt von *A. gummifera* hinzugefügt, um die Selektivität der Methode anhand der Chromatogramme nachzuweisen.

Die analytische *Response* (Kalibrierfunktion) wurde nach ICH-Standardmethoden (International Conference on Harmonisation, 2005, Q2 (R1)) bestimmt. Dafür wurden sechs Konzentrationen einer Standardlösung (25, 50, 200, 400, 600, 1000 ng/Bande Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen,

in CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V)) in einer Dreifachbestimmung auf verschiedenen HPTLC-Platten aufgetragen. Auf Grundlage der densitometrischen Bestimmung wurde eine polynomiale Regressionskurve (Konzentration vs. Fläche) erstellt und die Kalibrierfunktion sowie der Korrelationskoeffizient (R²) angegeben.

Die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) wurden in Übereinstimmung mit den ICH-Standardmethoden (International Conference on Harmonisation, 2005. Q2 (R1)) über das Signal-Rausch-Verhältnis (Ph. Eur. 8.8, 2.2.46 Chromatographic separation techniques, Council Of Europe, 2016) ermittelt. Das Ph. Eur. gibt das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N, Abb. 12) mit folgender Formel (5) an.

$$S/N = \frac{2H}{h} \quad (5)$$

mit S/N – Signal-Rausch-Verhältnis,
H – Peakhöhe, h – Rauschhöhe

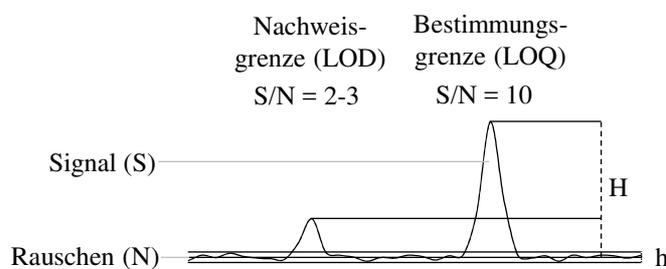


Abb. 12: Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses nach Ph. Eur. 8.8 (2.2.46)

Es wurden Verdünnungsreihen einer Referenzsubstanz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen) hergestellt und diese gemessen. Der LOD wurde bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei, der LOQ bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von zehn bestimmt.

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung des Messwertes mit dem „wahren“ Wert. Sie ist daher zugleich auch ein Maß für die Abweichung aufgrund eines systematischen Fehlers und wurde als Wiederfindungsrate ausgedrückt. Die Wiederfindungsrate der AMD-HPTLC-Methode wurde mit dem „Standard-Additionsverfahren“ ermittelt. Es wurden vier identische Proben (hier: angereicherter Extrakt von *Albizia gummifera*, 3.2.1.1 und 3.2.1.2) mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Standards (0, 25, 100, 400 ng/Bande Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen) versehen und in fünf Wiederholungen (an fünf Tagen) bestimmt. Die Wiederfindungsrate WFR [%] wurde mit (6) berechnet und die relative Standardabweichung als RSD [%] angegeben.

$$WFR [\%] = \frac{c_{\text{Probe+Standard}} - c_{\text{Probe}}}{c_{\text{Standard}}} \cdot 100 \% \quad (6)$$

mit WFR – Wiederfindungsrate,
c – Konzentration [ng/Bande]

Die Präzision ist ein Maß für die Übereinstimmung unabhängig voneinander ermittelter Messwerte und beschreibt somit die zufällige Streuung von Messwerten. Die Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision) wurde mit der Mehrfachbestimmung (n=6) des LOQ, ausgedrückt als RSD [%], bestimmt. Die Präzision innerhalb einer Analyse wurde mit drei Replikaten von drei Konzentrationslevels (25, 400 und 1000 ng/Bande Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen) als LOQ, mittlere und hohe Konzentration) ermittelt. Die Präzision zwischen Analysen wurde mit je drei Replikaten der oben genannten Konzentrationen an fünf Tagen gemessen und als Wiederfindungsrate WFR [%] und relative Standardabweichung RSD [%] angegeben.

3.2.4.2 Quantifizierung des Pflanzenmaterials

Für die GlyCer-Gehaltsbestimmung in neun Pflanzenmaterialien (Apfeltrester, Weizenkeime, Kaffeesatz, *Albizia gummifera*, *Albizia grandibracteata*, *Albizia lebbeck*, *Albizia schimperiana*, *Acacia etbaica* und *Robinia pseudoacacia*) wurden die jeweiligen angereicherten Extrakte verwendet (3.2.1.1 und 3.2.1.2). Die Lipidklassen der angereicherten Extrakte wurden mit der bereits unter Kapitel 3.2.2.2 beschriebenen AMD-HPTLC-Methode chromatographisch aufgetrennt. Die Konzentration (n=3) der GlyCer wurde mit der anhand des Standards Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen) bestimmten Kalibrierfunktion (polynomiale Regression, Konzentration vs. Peakfläche, siehe 3.2.4.1) nach densitometrischer Detektion bestimmt.

3.2.4.3 Präparative TLC und MS-Identifizierung der Glycosylceramide der quantifizierten Banden

Für die Identifizierung der GlyCer innerhalb der quantifizierten Banden wurde eine präparative TLC auf Basis der bereits beschriebenen TLC-Methode (siehe Kapitel 3.2.2) durchgeführt. Die Applikation erfolgte halbautomatisch mittels Linomat IV (Camag, Muttenz, Schweiz) nach den Parametern in Tab. 24. Neben einer 6 mm breiten Bande der Lipid-Referenzlösung (R1, siehe Tab. 25) wurden 100 µl jedes angereicherten Extraktes in einer 65 mm breiten Bande aufgetragen. Nach der Entwicklung der Platte wurde die 6 mm-Bande mittels Lipid-Veraschung (3.2.2.1) visualisiert und die Lage der GlyCer-Banden abgeschätzt. Anhand dieser Ergebnisse wurde der Teil der TLC-Platte (65 mm Bande) mit den GlyCer mithilfe eines Skalpell abgekratzt und in ein Probengefäß überführt. Dort wurden die Lipide mit 5 ml CHCl₃/MeOH 9:1 (V/V) unter Schütteln und Behandlung im Ultraschallbad extrahiert. Die Suspension wurde schließlich durch eine wattegestopfte Pasteurpipette in ein neues Probengefäß filtriert, um Kieselgel abzutrennen. Das Probengefäß und die Pasteurpipette wurden noch zwei weitere Male mit 5 ml CHCl₃/MeOH 9:1 (V/V) nachgespült und die Lösungen vereinigt. Es folgte die Trocknung der Lösung mit einem Vakuum-Konzentrator bei 40 °C und eine Elution über eine

RP18-Kartusche (Chromabond C18 ec, 100 mg, 1 ml) mit 3 x 1 ml MeOH. Nach dem Trocknen im Vakuum-Konzentrator bei 40 °C wurden die Proben in 100 µl MeOH (ULC-MS) gelöst. Zur Identifizierung der Verbindungen diente die bereits beschriebene LC-MS-Methode (3.2.2.3).

3.2.5 Hydrolyse pflanzlicher Glycosylceramide

Für die Hydrolyse der aus Pflanzen gewonnenen GlyCer in Cer wurden unterschiedliche Hydrolysemethoden getestet. Die GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-d18:1 h16:0 (**9**) und Glc-t18:1 h22:0 (**28**) waren die Leitsubstanzen, anhand derer die Funktionalität der Methode abgeschätzt werden sollte. Die enzymatische Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®) erfolgte für alle gewonnenen GlyCer-angereicherten Fraktionen (A1-12, W1-12, C1-5). Die Effizienz der Hydrolysemethoden wurde mit der unter 3.2.2 erläuterten TLC-Methode überprüft. Für uneindeutige TLC-Ergebnisse aufgrund mangelhafter Intensitäten wurden Resultate einer AMD-HPTLC (siehe 3.2.2.2) herangezogen. Proben, bei denen Cer nachgewiesen werden konnten, wurden weiter massenspektrometrischen Experimenten (3.2.3.2) unterzogen, um die enthaltenen Verbindungen zu identifizieren. Die Durchführung und Probenvorbereitung sind in den folgenden Kapiteln erläutert.

3.2.5.1 Chemische Hydrolyse mit methanolischer Salzsäure

100 µl Probe (10 µg) wurde in einer Braunglasampulle mit einem Vakuum-Konzentrator (40 °C) eingengt. Nach der Zugabe von 1 ml einer 1 M methanolischen HCl wurde das Gefäß sonifiziert und geschüttelt. Es folgte die Inkubation der Probe bei drei Temperaturen (35, 60, 95 °C) über drei Zeiträume (1, 6, 12 h). Danach wurde mit NaOH neutralisiert und die Lösung per Vakuum-Konzentrator (40 °C) zur Trockne eingengt. Die Lipide wurden mit 300 µl Ethylacetat und 300 µl Wasser, welches noch zweimal mit je 300 µl Ethylacetat ausgeschüttelt wurde, extrahiert. Nach der Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat zur vereinigten Ethylacetatphase wurde der Überstand abgenommen und der Natriumsulfat-Rückstand erneut mit 300 µl Ethylacetat nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum-Konzentrator (40 °C) eingengt und der Rückstand mit 100 µl CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) aufgenommen.

3.2.5.2 Oxidative Reduktionshydrolyse mit methanolischer Salzsäure

Die oxidative Reduktionshydrolyse mit methanolischer Salzsäure erfolgte nach Carter *et al.*, 1961b, und Iga *et al.*, 2011. 100 µl Probe (10 µg) wurden in Braunglasampullen eingengt (Vakuum-Konzentrator, 40 °C). Nach der Zugabe von 100 µl CHCl₃, 350 µl EtOH und 200 µl 0,5 M NaIO₄ wurde die Lösung für 22 h unter Lichtausschluss inkubiert. Die Zugabe von 600 µl Wasser-Ethylenglycol 1:1 (V/V) führte zur Zerstörung des Periodatüberschusses durch Ethylenglycol und zur Phasenseparation nach anschließendem Schütteln. Die obere Phase

wurde verworfen. Anschließend wurden 0,35 mg NaBH₄ in 600 µl MeOH und 200 µl 0,1 M NaOH hinzugegeben und bei Raumtemperatur über 22 h inkubiert. Die Zugabe von 0,05 ml 6 M HCl führte bei Raumtemperatur über Nacht zur partiellen Hydrolyse. Die Lipide wurden mit 1 ml CHCl₃ und 0,5 ml Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit 0,5 ml CHCl₃ extrahiert und anschließend verworfen. Die vereinigten organischen Phasen wurden eingeeengt (Vakuumpkonzentrator, 40 °C) und in 100 µl CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) rückgelöst.

3.2.5.3 Enzymatische Hydrolyse mit β -Glucosidase (aus Mandeln)

Das Enzym β -Glucosidase (aus Mandeln) wurde entsprechend den Herstellerangaben bei 4-8 °C gelagert und vor der Verwendung frisch hergestellt. Als Positivkontrolle diente Salicin als Edukt. 100 µl Salicin-SL (1000 µg bei 10 mg/ml SL) und je 100 µl Probe (10 µg) wurden in Braunglasampullen im Vakuum-Konzentrator (40 °C) getrocknet und in 50 mM Na-Citratpuffer (pH 4,5; Endvolumen 1000 µl) und 413,4 µl einer 5 mg/ml Na-Taurocholat-Lösung (3,8 mM in 50 mM Na-Citratpuffer; CMC 3-11 mM bei 20-25 °C) gelöst. Zusätzlich wurden 2 mM Dithiothreitol (20 µl bei 0,1 M SL) und 1 mM Ascorbinsäure (10 µl bei 0,1 M SL) hinzugefügt. Mit dem Zusatz von 6,425 µg β -Glucosidase (25 µl der SL; 0,257 mg/ml H₂O für das Reaktionsoptimum bei 1,8 U/ml, Enzymaktivität 7 U/mg) wurde für 14 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 3 x 400 µl CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) gestoppt, die Lipide ausgeschüttelt und die organische Phase jeweils abgenommen. Die vereinigten Phasen wurden mit einem Vakuum-Konzentrator (40 °C) zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mit 100 µl CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) wieder aufgenommen.

3.2.5.4 Enzymatische Hydrolyse mit Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®)

Die enzymatische Hydrolyse erfolgte mit einer spezifischen Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®). Die angewendete Methode wurde bereits in Kapitel 3.2.1.6 beschrieben. Die veränderten Bedingungen werden folgend angegeben. 100 µl Probe (je 10 µg Fraktion A1-12, W1-12 und C1-5) wurden in Braunglasampullen mithilfe eines Vakuum-Konzentrators bei 40 °C eingeeengt. Die GlyCer wurden in 50 mM Na-Citratpuffer (pH 4,5; Endvolumen 1000 µl) und 413,4 µl einer 5 mg/ml Na-Taurocholat-Lösung (3,8 mM in 50 mM Na-Citratpuffer; CMC 3-11 mM bei 20-25 °C) gelöst. Zusätzlich wurden 2 mM Dithiothreitol (20 µl bei 0,1 M SL) und 1 mM Ascorbinsäure (10 µl bei 0,1 M SL) hinzugefügt. Es folgte die Zugabe von 5 µg Imiglucerase (55 µl einer 1:10-Verdünnung der 0,91 mg/ml SL). Es wurde bei 37 °C für 14 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 3 x 400 µl CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) gestoppt und die Lipide in der organischen Phase ausgeschüttelt. Nach Vereinigung dieser Phasen wurde mittels Vakuum-Konzentrator (40 °C) eingeeengt und in 100 µl CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) gelöst.

3.2.6 Penetration von „Phyto“-Ceramiden in menschliche Haut

Das Penetrationsverhalten zweier nach enzymatischer Hydrolyse gewonnener „Phyto“-Cer (d18:2 h16:0 (**46**) und t18:1 h22:0 (**47**)) wurde an exzidiierter menschlicher Rückenhaut (Dicke der Epidermis: 28,29 μm) überprüft. Hierfür wurden die „Phyto“-Cer (Endkonzentration 0,3 %) in eine in der Dermatotherapie etablierte Formulierung (Basiscreme DAC) mithilfe von Fantaschale und Pistill eingearbeitet. Die Zusammensetzung der Formulierung ist in Tab. 11 aufgeführt.

Die subcutane Fettschicht der Spenderhaut wurde entfernt und eine Fläche von ca. 0,45 cm^2 ausgeschnitten. Es wurden je 3 mg der Cer-haltigen Formulierung (bei 0,3 %: 9 μg Cer) und die reine Formulierung (Kontrolle) aufgetragen. Die Penetration erfolgte innerhalb einer Petrischale bei einer Umgebungstemperatur von 32 $^{\circ}\text{C}$ für 100 min. Anschließend wurde der Rest der Formulierung mit Watte abgestreift und für weitere Untersuchungen aufbewahrt. Die Lipide wurden aus den Hautstücken (Haut nach Penetration) und den Formulierungsüberresten (Creme-Überreste (nicht penetriert)) mit 1 ml Methanol (ULC-MS) bei 50 $^{\circ}\text{C}$ für 2 h im Wasserbad unter Ultraschallbehandlung extrahiert. Die Lösungen wurden abgenommen, mit einem Vakuum-Konzentrator (40 $^{\circ}\text{C}$) eingengt und die Rückstände mit 100 μl Methanol (ULC-MS) wieder aufgenommen. Ein Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 10 min) sollte sicherstellen, dass nicht gelöste Bestandteile abgetrennt werden. Die qualitative und eine vorläufige quantitative Auswertung erfolgten als massenspektrometrisch gestützte Chromatogramme der LC-MS-Methode (3.2.2.3) und nach Erstellung von Kalibriergeraden (analytische *Response*, n=1) mit den eingesetzten „Phyto“-Cer (**47**, **48**) als Referenzsubstanzen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Extraktion und Isolierung der Glycosylceramide aus Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Pflanzenmaterialien, Abfallprodukte der Nahrungsmittelindustrie (Apfeltrester, Weizenkeime, Kaffeesatz) und auch von privaten Haushalten (Kaffeesatz), zur Gewinnung von GlyCer verwendet. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 13 der Isolierungsverlauf von GlyCer am Beispiel des Apfeltresters nach Dünnschichtchromatographie und Lipidveraschung (siehe 3.2.2) dargestellt. Die Aufarbeitungsschemata der Weizenkeime und des Kaffeesatzes befinden sich im Anhang (Abb. A3-A4).

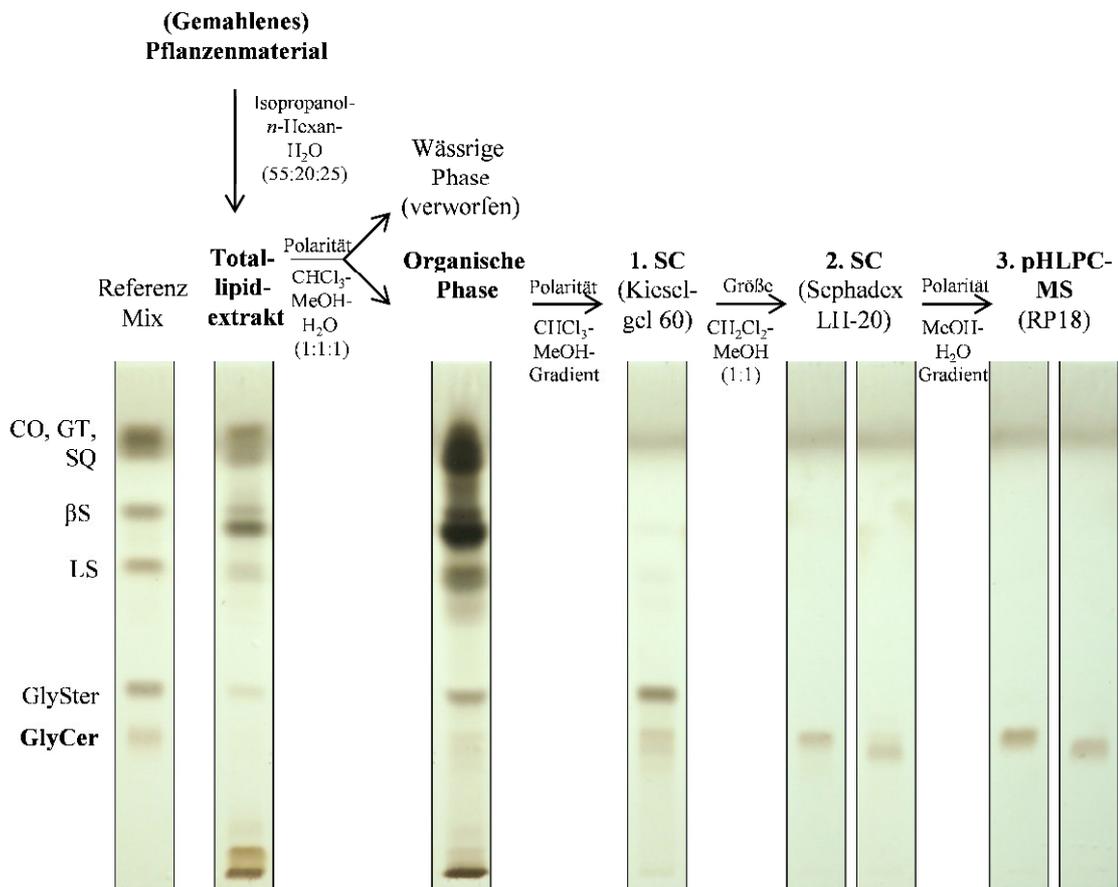


Abb. 13: Lipidextraktions- und Isolierungsverlauf des Apfeltresters

SC – Säulenchromatographie, CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, βS – β-Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β-Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)

Die Referenzlösung enthielt Lipidklassenvertreter, die den Lipidfraktionen der Extrakte zugeordnet wurden. Sie waren aufgrund der polaren stationären Phase (Kieselgel 60) und dem unpolaren Laufmittel (Chloroform-Methanol 85:15 V/V) entsprechend aufgetrennt worden. Während unpolare Lipidklassen (Sterolester, als Cholesterololeat), Triglyceride (als Glyceroltrioleat), Squalen, Sterole (als β-Sitosterol) und Fettsäuren (als Linolsäure) höhere

R_f -Werte aufwiesen, fanden sich die glycosylierten Formen (Glycosylsterole und GlyCer) bei niedrigeren R_f -Werten.

In einem ersten Schritt wurden die Gesamtlipide mit einem Gemisch aus Isopropanol-*n*-Hexan-Wasser nach Markham *et al.*, 2006, extrahiert (Totallipidextrakt). Während Markham *et al.*, 2006, nur die untere gesättigte Phase (*n*-Hexan gesättigtes Isopropanol-Wasser-Gemisch) verwendeten, wurde in dieser Arbeit das gesamte Lösungsmittelgemisch für die Extraktion genutzt, da die Ergebnisse vergleichbar waren. Die Lipidklassen der Referenzlösung sind entsprechend zugeordnet worden und ließen auf eine heterogene Lipidzusammensetzung schließen.

Da das Extraktionsgemisch aufgrund des hohen Anteils an Isopropanol und Wasser (zusammen 80 %) auch polare Verbindungen und Nicht-Lipide extrahiert hat, wurde der Totallipidextrakt einer ersten Separation in eine wässrige und eine organische Phase (angereicherter Extrakt) unterzogen, von der die wässrige Phase verworfen wurde. Dieser Waschschritt des Lipidextraktes ähnlich der Handhabung nach Folch *et al.*, 1957 (Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform-Methanol-Wasser), führte zu einer effektiven Abtrennung großer Mengen polarer Verbindungen und Nicht-Lipide. Die Zugabe von NaCl zur Wasserphase (0,5-1 % w/V NaCl/Wasserphase) diente dabei der verbesserten Phasentrennung. NaCl löst sich vorwiegend in der wässrigen Phase und stellt damit keine Verunreinigung oder Verfälschung des angereicherten Extraktes dar. Der Apfeltresterextrakt bedurfte zur Phasentrennung keiner NaCl-Zugabe.

Mittels säulenchromatographischer Methoden wurde der angereicherte Extrakt anhand der Polarität (Kieselgel 60) und Molekülgröße (Sephadex LH-20) weiter fraktioniert. Die Trennung an polarem Kieselgel 60 mit einem Chloroform-Methanol-Gradienten (100:0, 90:10, 80:10 V/V) reicherte Sterolglucoside und GlyCer in einer Fraktion an. Eine Trennung dieser Substanzklassen war mit den angewendeten Methoden nicht möglich, da sie co-eluierten (TLC- R_f -Werte Sitosterolglucosid: $0,36 \pm 0,02$ und GlyCer: $0,25 \pm 0,02$ ($n=3$)). Die Isolierung der GlyCer wurde schließlich mit einer molekülgrößenabhängigen Chromatographie an Sephadex LH-20 (Laufmittel: DCM-Methanol 1:1 V/V) erreicht.

Die GlyCer-angereicherten Fraktionen wurden mittels präparativer HPLC-MS (RP18, Methanol-Wasser-Gradient) aufgetrennt. Für den Apfeltrester und Weizenkeime wurden 12 (A1-12 und W1-12), für Kaffeesatz 5 (C1-5) Fraktionen erhalten (Tab. 29).

Tab. 29: Isolierte Glycosylceramid-Fractionen

Apfeltrester (A)		Weizenkeime (W)		Kaffeesatz (C)	
Fraktion	Menge [mg]	Fraktion	Menge [mg]	Fraktion	Menge [mg]
A1	10,2	W1	6,6	C1	1,0
A2	10,1	W2	4,0	C2	3,0
A3	55,6	W3	3,7	C3	1,8
A4	1,1	W4	3,8	C4	2,0
A5	1,1	W5	16,7	C5	0,8
A6	2,0	W6	2,5		
A7	3,1	W7	13,8		
A8	19,5	W8	6,3		
A9	10,7	W9	5,1		
A10	24,8	W10	2,3		
A11	3,4	W11	1,0		
A12	0,9	W12	0,8		
142,5		66,6		8,6	

Die Ergebnisse der analytischen LC-MS-Läufe aller Pflanzenmaterialien sind in Abb. 14 (A-C) dargestellt. Die Peaks waren nicht basisliniengetreunt. Leichte Schultern einzelner Peaks (z.B. A9, A10 und A11) waren auf mehrere GlyCer innerhalb eines Peaks zurückzuführen.

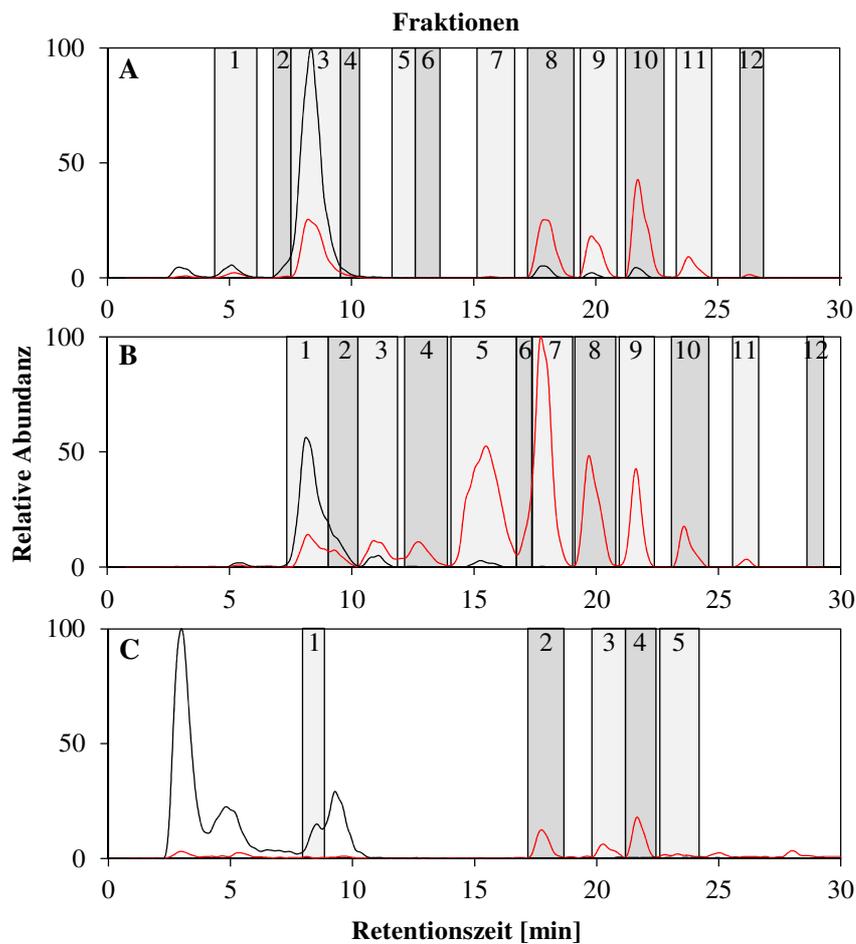


Abb. 14: Übersicht der Glycosylceramid-angereicherten Fraktionen

Dargestellt sind die Sephadex LH-20-Fractionen des Apfeltresters (A), der Weizenkeime (B) und des Kaffeesatzes (C)

Alle Pflanzenmaterialien wiesen fünf Peaks derselben Retentionszeiten auf (Apfeltrester Peak 3, 8, 9, 10, 11; Weizenkeime Peak 1, 7, 8, 9, 10 und Kaffeesatz Peak 1, 2, 3, 4, 5). Ferner traf dies auch für einen Peak des Apfeltresters (Peak 12) und der Weizenkeime (Peak 11) zu. Die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurde mittels TLC (vgl. 3.2.2.1; Abb. A7-A9) und LC-MS (vgl. 3.2.2.3; Abb. A10-A12) überprüft. Tab. 29 führt die Mengen der aufgereinigten Fraktionen aus Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz auf. Einige Fraktionen stellten bei den Materialien einen großen Anteil der Gesamtmenge an GlyCer dar (Apfeltrester: 70 % A3, A8 und A10; Weizenkeime: 45 % W5 und W7; Kaffeesatz: 35 % C2).

In Tab. 30 sind die Isolierungsverläufe als Massenrückstände der einzelnen Extrakte und Fraktionen dargestellt.

Tab. 30: Fraktionsmassenrückstände der Glycosylceramid-Extraktion und -Isolierung

^a – Aufgetragen: 20,0 g angereicherter Extrakt, Die folgenden Fraktionen wurden für den gesamten angereicherten Extrakt berechnet.; präp. HPLC – präparative HPLC, GlyCer – Glycosylceramid, A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, C – Kaffeesatz

Pflanzenmaterial	Ausgangsmasse [g]	Totallipidextrakt [g]	Angereicherter Extrakt [g]	Kieselgel-Fraktion [g] ^a	Sephadex-Fraktion [g]	präp. HPLC-Fraktion [mg]	GlyCer/100 g [mg]
A	750,0	99,2	30,42	1,012	0,337	216,6	28,9
GlyCer w/w	0,029 %	0,218 %	0,712 %	-	-	-	-
W	300,0	110,4	30,37	0,423	0,128	101,2	33,7
GlyCer w/w	0,034 %	0,092 %	0,333 %	-	-	-	-
C	300,0	34,4	30,44	0,424	0,076	13,1	4,4
GlyCer w/w	0,004 %	0,038 %	0,043 %	-	-	-	-

Während der Totallipidextrakt der Weizenkeime 36,8 % der Ausgangsmenge ausmachte, lag der des Apfeltresters und des Kaffeesatzes bei nur 13,2 % und 11,5 %. Nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion waren die Rückstandsgewichte der angereicherten Extrakte aller Pflanzenmaterialien ähnlich (30,37-30,44 g). Der Anteil des angereicherten Extraktes am Totallipidextrakt des Kaffeesatzes war mit 88,4 % im Vergleich am größten. Apfeltrester und Weizenkeime zeigten eine ähnliche Ausbeute von 30,7 % und 27,5 %. Im weiteren Verlauf wurden 20,0 g der angereicherten Extrakte weiter aufgetrennt und GlyCer-angereicherte Fraktionen erhalten, die zusammen GlyCer-Gesamtmengen von 142,5 mg (Apfeltrester), 66,6 mg (Weizenkeime) und 8,6 mg (Kaffeesatz) enthielten. Berechnet auf 100 g Ausgangsmaterial zeigten Apfeltrester und Weizenkeime ähnliche GlyCer-Gehalte von 28,9 mg und 33,7 mg. Eine sehr geringe Ausbeute dagegen wurde für Kaffeesatz mit 4,4 mg je 100 g Ausgangsmaterial nachgewiesen. Berechnet für die Ausgangsmenge der verwendeten Pflanzenmaterialien ergab sich ein GlyCer-Anteil von 0,029 % und 0,034 % für Apfeltrester und Weizenkeime. Der Anteil der GlyCer am Totallipidextrakt und am angereicherten Extrakt war dagegen beim Apfeltrester (0,218 % und 0,713 %) mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu dem von Weizenkeimen (0,092 % und

0,333 %). Kaffeesatz zeigte weitaus geringere Mengenanteile der GlyCer an der Ausgangsmenge (0,004 %), dafür änderte sich der GlyCer-Anteil vom Totallipidextrakt (0,038 %) zum angereicherten Extrakt (0,043 %) nur unwesentlich.

4.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Glycosylceramide

Für die Identifizierung der GlyCer wurden unterschiedliche analytische Methoden entwickelt. Mit der TLC (4.2.1) wurde eine einfache Identifizierung von GlyCer und anderen Lipiden nebeneinander in Stoffgemischen etabliert. Außerdem sind hochauflösende Massenspektren zur Bestimmung der Summenformel (4.2.2) und MS/MS-Spektren zur Aufklärung der Sphingobasen- und Fettsäureeinheit (4.2.3) gemessen worden. Mittels NMR-Experimenten (4.2.4) wurde die Strukturaufklärung der GlyCer-Leitsubstanzen und der hydrolysierten „Phyto“-Ceramide durchgeführt (4.2.5). Schließlich wurde eine HPLC-MS-Methode entwickelt, um GlyCer unfragmentiert massenspektrometrisch nachzuweisen und in Abhängigkeit von der Retentionszeit zu identifizieren (4.2.9).

4.2.1 TLC zur Detektion von Glycosylceramiden in Lipidgemischen

Die dünnschichtchromatographische Analyseverfahren wurde bereits ausführlich in der Diplomarbeit „Extraktion und Identifizierung von Glycosylceramiden aus Weizenkeimen“ (Reisberg, 2012) beschrieben. Sie wurde in Anlehnung an eine Methode von Ternes *et al.*, 2011, etabliert. Kurz, alle Lipidklassen wurden gegenüber einer Referenzlösung für eine visuelle Beurteilung an polarem Kieselgel 60 mit einem Chloroform-Methanol 85:15 (V/V)-Gemisch aufgetrennt. Die Ergebnisse dienen unter anderem der Verfolgung des Extraktions- und Isolierungsverlaufes (Abb. 13, Abb. A3-A4) und der Überprüfung der Fraktionsreinheit nach präparativer HPLC-MS (Abb. A7-A9). Weitere Aussagen aufgrund der Verwendung der TLC-Ergebnisse sind an den entsprechenden Textstellen angegeben. Die verwendeten Referenzlösungen wiesen je nach Einsatz (Lipide, Ceramide, Hydrolyse) unterschiedliche Lipid-Zusammensetzungen auf (siehe Tab. 25). Die TLC-Chromatogramme der aufgetrennten Referenzlösungen können im Anhang eingesehen werden (Abb. A1).

4.2.2 ESI-HRMS zur Bestimmung der Summenformel

Die Summenformel der GlyCer wurde mittels ESI-HRMS bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 31 für das Pflanzenmaterial des Apfeltresters, der Weizenkeime und des Kaffeesatzes aufgeführt. Alle GlyCer wurden im positiven Ionenmodus als $[M+Na]^+$ -Ionen detektiert. Die Fehler lagen zwischen 0,0000 und 3,9342 ppm. Die meisten Verbindungen wurden mit einem Fehler unter 2 ppm detektiert und als annehmbar akzeptiert. Mit geringerer Konzentration eines GlyCer in der Fraktion wurde auch die Abweichung der berechneten von der detektierten m/z größer (z.B. Glc-d18:2 h19:0 (**16**), Glc-d18:2 h18:1 (**8**), Glc-t18:1 h28:1 (**45**)). **1** und **2** konnten

nicht getrennt werden. Für sie wurden dieselben m/z detektiert und entsprechend dieselbe Summenformel benannt. Eine Unterscheidung erfolgte mittels NMR (4.2.4) und LC-MS (4.2.8).

Tab. 31: ESI-HRMS der Glycosylceramide

A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, C – Kaffeesatz, DBE – Doppelbindungsäquivalente, ¹ – berechnet mit ChemCalc (Patiny und Borel, 2013); Nomenklatur (Glc-Sphingobase Fettsäure, z.B. Glc-d18:2 h16:0 (7)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, OH – Hydroxygruppe, keto – Ketogruppe, h – α -hydroxy, ^a – Strukturvorschläge

Glycosylceramid	m/z	m/z	Summenformel	Fehler	DBE
	(det.)	(ber.) ¹			
	[M+Na] ⁺	[M+Na] ⁺	[M]	[ppm]	
Glc-d18:1 h16:0 (9)	738,5496	738,5496	C ₄₀ H ₇₇ NO ₉	0,0000	3
Glc-d18:1 h18:0 (15)	766,5805	766,5809	C ₄₂ H ₈₁ NO ₉	0,5218	3
Glc-d18:1 h20:0 (26)	794,6127	794,6120	C ₄₄ H ₈₅ NO ₉	0,8809	3
Glc-d18:1 h22:0 (34)	822,6459	822,6435	C ₄₆ H ₈₉ NO ₉	2,9174	3
Glc-d18:1 h24:0 (42)	850,6772	850,6748	C ₄₈ H ₉₃ NO ₉	2,8213	3
Glc-d18:2 h15:0 (5)	722,5198	722,5183	C ₃₉ H ₇₃ NO ₉	2,0761	4
Glc-d18:2 h16:0 (7)	736,5346	736,5340	C ₄₀ H ₇₅ NO ₉	0,8146	4
Glc-d18:2 h18:0 (11)	764,5661	764,5653	C ₄₂ H ₇₉ NO ₉	1,0463	4
Glc-d18:2 h19:0 (16)	778,5836	778,5809	C ₄₃ H ₈₁ NO ₉	3,4678	4
Glc-d18:2 h20:0 (22)	792,5967	792,5966	C ₄₄ H ₈₃ NO ₉	0,1262	4
Glc-d18:2 h21:0 (27)	806,6135	806,6122	C ₄₅ H ₈₅ NO ₉	1,6117	4
Glc-d18:2 h22:0 (31)	820,6277	820,6279	C ₄₆ H ₈₇ NO ₉	0,2437	4
Glc-d18:2 h23:0 (35)	834,6432	834,6435	C ₄₇ H ₈₉ NO ₉	0,3594	4
Glc-d18:2 h24:0 (39)	848,6604	848,6592	C ₄₈ H ₉₁ NO ₉	1,4140	4
Glc-d18:2 h25:0 (43)	862,6759	862,6748	C ₄₉ H ₉₃ NO ₉	1,2751	4
Glc-d18:2 h26:0 (46)	876,6927	876,6905	C ₅₀ H ₉₅ NO ₉	2,5094	4
Glc-d18:2 h18:1 (8)	762,5526	762,5496	C ₄₂ H ₇₇ NO ₉	3,9342	5
Glc-d18:2 h20:1 (12)	790,5822	790,5809	C ₄₄ H ₈₁ NO ₉	1,6444	5
Glc-d18:2 h22:1 (24)	818,6113	818,6122	C ₄₆ H ₈₅ NO ₉	1,0994	5
Glc-d18:2 h24:1 (30)	846,6441	846,6435	C ₄₈ H ₈₉ NO ₉	0,7087	5
Glc-d18:2 h25:1 (37)	860,6609	860,6592	C ₄₉ H ₉₁ NO ₉	1,9752	5
Glc-d18:2 h26:1 (40)	874,6749	874,6748	C ₅₀ H ₉₃ NO ₉	0,1143	5
Glc-d18:3 h20:0 (14)	790,5811	790,5809	C ₄₄ H ₈₁ NO ₉	0,2530	5
Glc-t18:1 h16:0 (6)	754,5463	754,5445	C ₄₀ H ₇₇ NO ₁₀	2,3855	3
Glc-t18:1 h20:0 (17)	810,6072	810,6071	C ₄₄ H ₈₅ NO ₁₀	0,1234	3
Glc-t18:1 h21:0 (23)	824,6237	824,6228	C ₄₅ H ₈₇ NO ₁₀	1,0914	3
Glc-t18:1 h22:0 (28)	838,6401	838,6384	C ₄₆ H ₈₉ NO ₁₀	2,0271	3
Glc-t18:1 h23:0 (32)	852,6540	852,6541	C ₄₇ H ₉₁ NO ₁₀	0,1173	3
Glc-t18:1 h24:0 (36)	866,6706	866,6697	C ₄₈ H ₉₃ NO ₁₀	1,0385	3
Glc-t18:1 h25:0 (41)	880,6863	880,6854	C ₄₉ H ₉₅ NO ₁₀	1,0219	3
Glc-t18:1 h26:0 (44)	894,7024	894,7010	C ₅₀ H ₉₇ NO ₁₀	1,5648	3
Glc-t18:1 h22:1 (19)	836,6228	836,6228	C ₄₆ H ₈₇ NO ₁₀	0,0000	4
Glc-t18:1 h23:1 (21)	850,6364	850,6384	C ₄₇ H ₈₉ NO ₁₀	2,3512	4
Glc-t18:1 h24:1 (29)	864,6549	864,6541	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₀	0,9252	4
Glc-t18:1 h25:1 (33)	878,6714	878,6697	C ₄₉ H ₉₃ NO ₁₀	1,9347	4
Glc-t18:1 h26:1 (38)	892,6862	892,6854	C ₅₀ H ₉₅ NO ₁₀	0,8962	4
Glc-t18:1 h28:1 (45)	920,7188	920,7167	C ₅₂ H ₉₉ NO ₁₀	2,2808	4
Glc-t18:1 h24:2 (20)	862,6389	862,6384	C ₄₈ H ₈₉ NO ₁₀	0,5796	5
Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (1)	752,5273	752,5283	C ₄₀ H ₇₅ NO ₁₀	1,3289	4
Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (2)					
Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (4)	750,5116	750,5127	C ₄₀ H ₇₃ NO ₁₀	1,4657	5
Glc-OH-t18:1 h22:0 ^a (10)	854,6351	854,6333	C ₄₆ H ₈₉ NO ₁₁	2,1062	3
Glc-OH-t18:1 h24:0 ^a (18)	882,6660	882,6646	C ₄₈ H ₉₃ NO ₁₁	1,5861	3
Glc-2OH-d18:2 h16:0 ^a (3)	768,5236	768,5238	C ₄₀ H ₇₅ NO ₁₁	0,2602	4
Glc-2OH-d18:2 h22:0 ^a (13)	852,6189	852,6177	C ₄₆ H ₈₇ NO ₁₁	1,4074	4
Glc-2OH-d18:2 h24:0 ^a (25)	880,6498	880,6490	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₁	0,9084	4

4.2.3 ESI-MS/MS zur Aufklärung der Sphingobase- und Fettsäureeinheit

Um die Sphingobasen und Fettsäuren der GlyCer zu bestimmen, wurde eine Ionenfallen-ESI-MS/MS-Methode etabliert. Für die optimalen Ionisierungs- und Ionenfallenparameter wurde eine Referenzsubstanz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen, 1 µg/ml) injiziert. Im positiven Ionenmodus traten GlyCer ausschließlich als Natriumaddukte $[M+Na]^+$, im negativen hauptsächlich als $[M-H]^-$ auf. Es wurden Massenspektren im positiven und negativen Modus sowie MS/MS-Spektren der Vorläuferionen nach Fragmentierung aufgenommen. Die positiven und negativen Spektren wiesen nach Kollision mit Helium (35-40 %) abweichende Fragmentierungen der GlyCer auf. Positive Massenspektren waren komplexer als negative (vgl. Abb. 15-16). Die MS/MS-Fragmentierungsmuster werden anhand von Leitsubstanzen vorgestellt. In Abb. 15 sind die MS/MS-Spektren und -fragmentierungsmuster von Glc-d18:2 h16:0 (7) dargestellt.

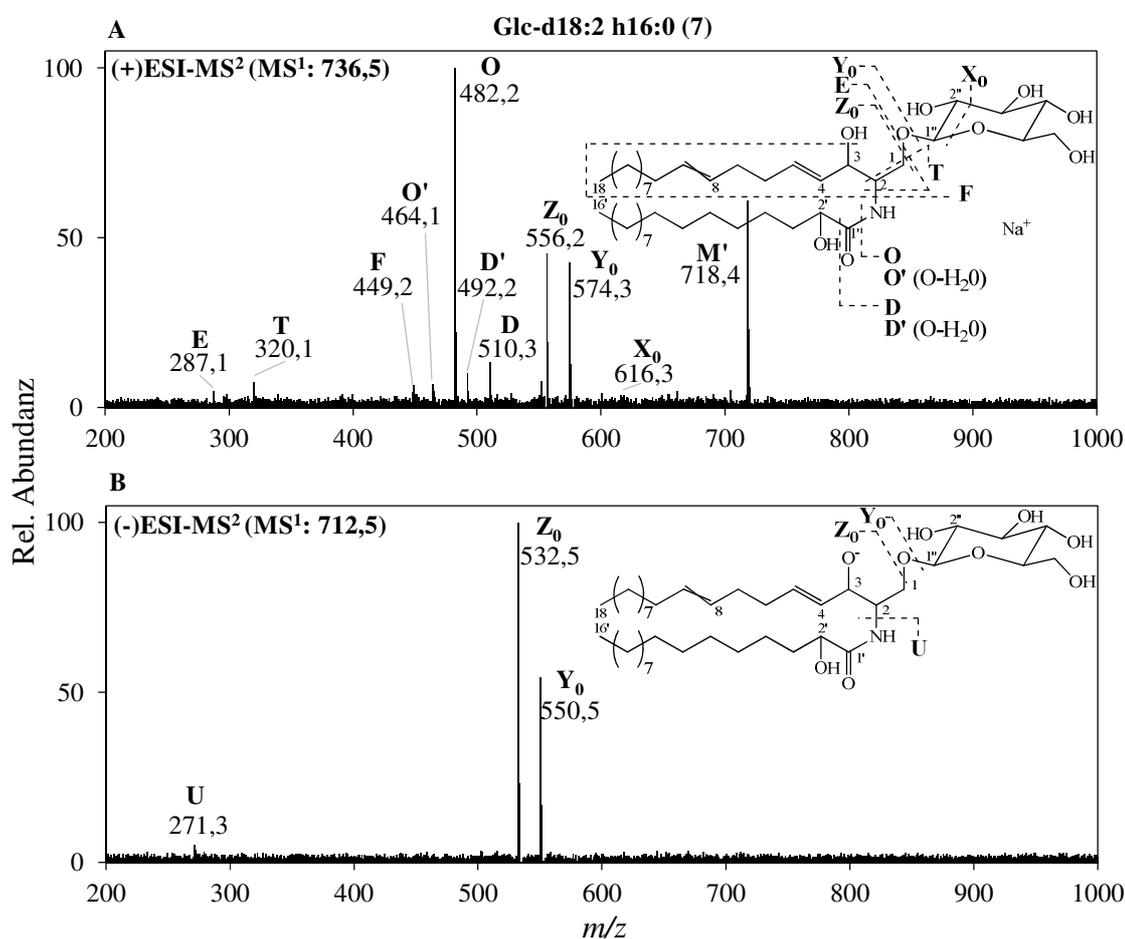


Abb. 15: MS/MS-Spektren und Fragmentierungsmuster von Glc-d18:2^{ΔAE,8E/Z} h16:0 (7)

Positiver (A) und negativer (B) Ionenmodus. Vorläuferionen sind in Klammern angegeben, Fragmente in Anlehnung an die Nomenklatur von Ann und Adams, 1993, basierend auf den Vorschlägen von Domon und Costello, 1988, und Costello, 1993.

Ausgehend vom MS¹-Molekülion M (m/z 736,5; $[M+Na]^+$) trat im positiven MS/MS-Modus ein Fragment M' (m/z 718,4; $[M-H_2O+Na]^+$) auf, bei dem die Hydroxygruppe der Sphingobase als

Wasser abgetrennt wurde. Mit den Ionen Y_0 (m/z 574,3; $[M-C_6H_{10}O_5+Na]^+$) und Z_0 (m/z 556,2; $[M-C_6H_{10}O_5-H_2O+Na]^+$) waren Aglycone detektierbar.

Dem X_0 -Ion (m/z 616,3; $[M-C_4H_8O_4+Na]^+$) ging eine zuckerinterne Spaltung zwischen den Positionen C1''-C5'' und C2''-C3'' voran. Das detektierte Hauptfragment O (m/z 482,2; $[M-C_{16}H_{30}O_2+Na]^+$) war ein Indikator für die vorhandene Sphingobase, dem Sphingadienin (d18:2), indem nur die Acylgruppe des Moleküls abgespalten wurde. Mit schwächerer Intensität wurden die Fragmente O' (m/z 464,1; $[M-C_{16}H_{30}O_2-H_2O+Na]^+$), D (m/z 510,3; $[M-C_{15}H_{30}O+Na]^+$) und D' (m/z 492,2; $[M-C_{15}H_{30}O-H_2O+Na]$) identifiziert. Ein weiterer Beweis für den Sphingadienin (d18:2)-Typ wurde mit F (m/z 449,2; $[M-C_{16}H_{31}O_2N-H_2O+Na]^+$) und E (m/z 287,1; $[M-C_6H_{12}O_6-C_{16}H_{31}O_2N-H_2O+Na]^+$) gefunden, die mit der Abspaltung der Fettsäure und des Zuckers einhergingen. Im negativen Modus dagegen wurden weniger Fragmente aufgezeichnet. Mit Y_0 (m/z 550,5; $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$) und Z_0 (m/z 532,5; $[M-C_6H_{10}O_5-H_2O-H]^-$) wurde die Verbindung ohne Zuckerkopfgruppe detektiert. Fragment U (m/z 271,3; $[M-C_6H_{10}O_5-C_{18}H_{31}O_2-H]^-$) stellte die α -hydroxylierte Fettsäure (h16:0) dar.

Die Ionen M', X_0 , Y_0 , Z_0 , O, U und T sind von Ann and Adams, 1993, basierend auf den Vorschlägen von Domon and Costello, 1988, und Costello, 1993, bezeichnet worden. Fragmente, die nicht dieser Nomenklatur entsprachen, wurden neu bezeichnet (D, E, F, W, vgl. Abb. 15-16). Das GlyCer Glc-t18:1 h22:0 (**28**) zeigte grundsätzlich ein ähnliches MS/MS-Fragmentierungsmuster wie GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**) (Abb. 16). Die Fragmente M', Y_0 , Z_0 , X_0 , O, O', D, D', E und F waren ebenso im positiven Modus nachweisbar. Die Sphingobase vom Phytosphingenin (t18:1)-Typ wurde über das Fragment O (m/z 500,3; $[M-C_{22}H_{42}O_2+Na]^+$) im positiven Modus bestimmt. Das Fragment O ließ auf eine zusätzliche Hydroxygruppe in der Sphingobase und die damit fehlende Doppelbindung als eine m/z -Erhöhung von +18 amu im Gegensatz zum Sphingadienin (d18:2)-Typ (O: m/z 482,2; $[M-acyl+Na]^+$) schließen. Im negativen Modus konnten die Fragmente Y_0 , Z_0 und U bestimmt werden, von dem Fragment U zur Identifizierung der Fettsäure verwendet wurde. Im Gegensatz zum Dihydroxy-Sphingobasen-Typ (d18:2) zeigte der Trihydroxy-Typ (t18:1) außerdem ein weiteres Fragment im negativen Massenspektrum unter den verwendeten Methodenparametern: W (m/z 410,5; $[M-C_6H_{12}O_6-C_{15}H_{28}O-H]^-$). Es stellte im Vergleich zu Z_0 die zusätzliche Spaltung der Sphingobase zwischen Position C-3 und C-4 dar.

Die Fragmente O ($[M-acyl+Na]^+$) und U ($[M-Zucker-LCB-H]^-$) waren für alle Verbindungen (**1-46**) detektierbar. Für die Beurteilung der Sphingobase wurde das Fragment O ($[M-acyl+Na]^+$) des positiven Ionenmodus genutzt. GlyCer vom Sphingenin (d18:1)-Typ wurden durch das Fragment O (m/z 484,2; $[M-acyl+Na]^+$) und der damit verbundenen Hydrierung einer Doppelbindung (+2 amu) im Gegensatz zum Sphingadienin (d18:2)-Typ (O: m/z 482,2; $[M-acyl+Na]^+$) bestimmt. Ein GlyCer vom Sphingatrienin (d18:3)-Typ wurde in Weizenkeimen anhand des Fragments O (m/z 480,2; $[M-acyl+Na]^+$) identifiziert.

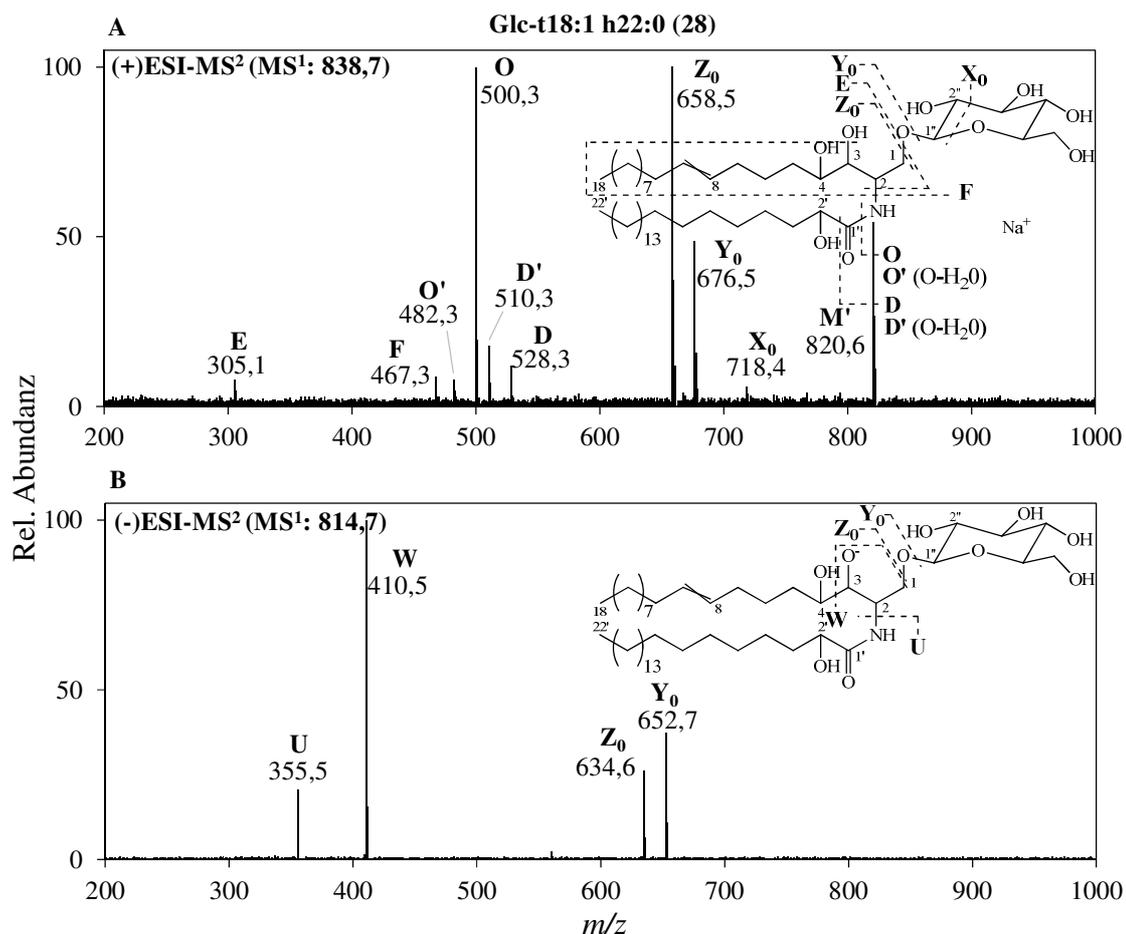


Abb. 16: MS/MS-Spektren und Fragmentierungsmuster von Glc-t18:1^{Δ8E/Z} h22:0 (28)

Positiver (A) und negativer (B) Ionenmodus. Vorläuferionen sind in Klammern angegeben, Fragmente in Anlehnung an die Nomenklatur von Ann und Adams, 1993, basierend auf den Vorschlägen von Domon und Costello, 1988, und Costello, 1993.

Im Gegensatz zum GlyCer vom Sphingadienin (d18:2)-Typ wurde hier eine zusätzliche Doppelbindung in der Sphingobase nachgewiesen (-2 amu). Die Lage der Doppelbindung konnte nicht bestimmt werden. Für die Länge der Fettsäure und deren Sättigungsgrad ist das Fragment U ([M-Zucker-LCB-H]⁻) im negativen Ionenmodus herangezogen worden. Es wurden ungesättigte Fettsäuren anhand dieses Fragmentes U aufgrund einer *m/z*-Differenz von -2 amu bestimmt. GlyCer mit ungesättigten Fettsäuren wurden nur für Weizenkeime bestimmt. Eine zweifach ungesättigte Fettsäure ist in einem Weizenkeim-GlyCer (Glc-t18:1 h24:2 (20)) identifiziert worden (U, *m/z* 379,5; [M-Zucker-LCB-H]⁻).

In Tab. 32 sind die im Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz identifizierten GlyCer aufgeführt. Insgesamt wurden 11 GlyCer-Klassen beschrieben. Im Apfeltrester wurden neue GlyCer (1-4, 10, 13, 18, 25) identifiziert. Deren Strukturaufklärung ist in Kapitel 4.2.8 detailliert dargestellt. Eine Übersicht über alle detektierten MS-Fragmente (Tab. A1) und die Massenspektren der übrigen GlyCer-Klassen (Abb. A16-A18) befinden sich im Anhang.

Tab. 32: LC-MS- und ESI-MS/MS-Identifizierung der Glycosylceramide

^a – Strukturvorschläge (Lage und Stereochemie der DB und OH-Gruppen unbekannt); ^b – detektiert als [M-H₂O+H]⁺ (CID 150 V); ^c – Ionen indirekt über MS/MS-Experimente detektiert; n.d. – nicht detektiert; RT – Retentionszeit, acyl – Fettsäure, Zuc – Zuckerteil; Nomenklatur (Glc-Sphingobase Fettsäure, z.B. Glc-d18:2 h16:0 (7)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, OH – Hydroxygruppe, keto – Ketogruppe, h – α -hydroxy

Glycosylceramid	RT [min]	LC-APCI/MS m/z			ESI-MS/MS m/z			
		[M+H] ⁺	[M-18+H] ⁺	[M-162+H] ⁺	MS ¹ [M+Na] ⁺	MS ² (O) [M-acyl+Na] ⁺	MS ¹ [M-H] ⁻	MS ² (U) [M-Zuc-LCB-H] ⁻
Glc-d18:1 h16:0 (9)	9,2	716,5	698,5	554,5	738,6	484,2	714,5	271,5
Glc-d18:1 h18:0 (15)	12,3	744,6	n.d.	n.d.	766,6	484,3	742,6	299,5
Glc-d18:1 h20:0 (26)	16,9	772,6	754,4	610,5	794,6	484,2	770,6	327,4
Glc-d18:1 h22:0 (34)	21,0	800,7	n.d.	n.d.	822,6	484,2	798,6	355,4
Glc-d18:1 h24:0 (42)	25,4	828,7	n.d.	n.d.	850,7	484,2	826,6	383,5
Glc-d18:2 h15:0 (5)	7,3	700,5	n.d.	n.d.	722,5	482,2	698,5 ^c	257,4
Glc-d18:2 h16:0 (7)	8,4	714,5	696,5	552,5	736,6	482,2	712,6	271,3
Glc-d18:2 h18:0 (11)	11,1	742,6	724,5	580,5	764,6	482,2	740,6	299,4
Glc-d18:2 h19:0 (16)	12,4	756,5	738,6	n.d.	778,6	482,2	754,6	313,5
Glc-d18:2 h20:0 (22)	15,1	770,5	752,6	610,5	792,6	482,2	768,6	327,5
Glc-d18:2 h21:0 (27)	17,4	784,7	n.d.	n.d.	806,6	482,3	782,6	341,4
Glc-d18:2 h22:0 (31)	19,5	798,7	780,6	636,5	820,6	482,2	796,6	355,5
Glc-d18:2 h23:0 (35)	21,3	812,6	n.d.	n.d.	834,7	482,3	810,3	369,6
Glc-d18:2 h24:0 (39)	23,3	826,7	808,5	664,5	848,6	482,2	824,6	383,5
Glc-d18:2 h25:0 (43)	25,6	840,7	822,7	n.d.	862,7	482,2	838,7	397,5
Glc-d18:2 h26:0 (46)	28,8	854,6	836,7	n.d.	876,6	482,2	852,7	411,5
Glc-d18:2 h18:1 (8)	8,5	740,6	n.d.	n.d.	762,7	482,2	738,6 ^c	297,4
Glc-d18:2 h20:1 (12)	11,2	768,5	750,5	n.d.	790,6	482,3	766,6	325,3
Glc-d18:2 h22:1 (24)	15,2	796,7	n.d.	n.d.	818,5	482,2	794,5	353,4
Glc-d18:2 h24:1 (30)	19,4	824,7	806,6	662,7	846,6	482,3	822,6	381,5
Glc-d18:2 h25:1 (37)	21,6	838,6	n.d.	n.d.	860,7	482,2	836,6	395,6
Glc-d18:2 h26:1 (40)	23,4	852,6	n.d.	n.d.	874,5	482,2	850,6	409,6
Glc-d18:3 h20:0 (14)	12,2	768,5	n.d.	n.d.	790,6	480,2	766,6	327,5
Glc-t18:1 h16:0 (6)	7,3	732,6	n.d.	570,5	754,6	500,3	730,6	271,4
Glc-t18:1 h20:0 (17)	12,6	788,5	n.d.	626,5	810,6	500,3	786,6	327,6
Glc-t18:1 h21:0 (23)	15,1	802,6	n.d.	640,7	824,5	500,3	800,6	341,6
Glc-t18:1 h22:0 (28)	17,6	816,6	n.d.	654,6	838,7	500,3	814,7	355,5
Glc-t18:1 h23:0 (32)	19,5	830,8	812,6	668,6	852,7	500,2	828,6	369,7
Glc-t18:1 h24:0 (36)	21,4	844,7	826,7	682,6	866,7	500,3	842,6	383,5
Glc-t18:1 h25:0 (41)	23,8	858,6	n.d.	696,7	880,6	500,3	856,6	397,6
Glc-t18:1 h26:0 (44)	25,8	872,7	n.d.	710,4	894,7	500,2	870,7	411,6
Glc-t18:1 h22:1 (19)	12,7	814,5	n.d.	652,4	836,6	500,3	812,6	353,5
Glc-t18:1 h23:1 (21)	15,0	828,7	n.d.	n.d.	850,5	500,3	826,5	367,5
Glc-t18:1 h24:1 (29)	17,7	842,7	n.d.	680,5	864,6	500,2	840,6	381,5
Glc-t18:1 h25:1 (33)	19,6	856,6	n.d.	694,5	878,6	500,3	854,8	395,5
Glc-t18:1 h26:1 (38)	21,6	870,7	n.d.	708,7	892,6	500,2	868,6	409,5
Glc-t18:1 h28:1 (45)	25,8	898,6	n.d.	736,4	920,7	500,3	896,4	437,7
Glc-t18:1 h24:2 (20)	13,5	840,6	n.d.	n.d.	862,6	500,3	838,6	379,5
Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (1)								
Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (2)	4,9	730,5	712,5	n.d.	752,5	498,3	728,5	271,4
Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (4)	5,3	728,5	710,5	566,5	750,5	496,2	726,5	271,4
Glc-OH-t18:1 h22:0 ^a (10)	9,7	n.d.	814,5 ^b	n.d.	854,7	516,3	830,7	355,6
Glc-OH-t18:1 h24:0 ^a (18)	11,8	n.d.	842,5 ^b	n.d.	882,7 ^c	516,4	858,6	383,5
Glc-2OH-d18:2 h16:0 ^a (3)	5,1	746,5	n.d.	584,5	768,4	514,3	744,4	271,4
Glc-2OH-d18:2 h22:0 ^a (13)	11,8	830,6	n.d.	n.d.	852,6	514,3	828,6	355,5
Glc-2OH-d18:2 h24:0 ^a (25)	16,5	858,7	840,7	n.d.	880,6	514,3	856,6	383,5

4.2.4 NMR-Experimente zur Strukturaufklärung von Glycosylceramiden

Jede isolierte GlyCer-Fraktion (A1-12, W1-12, C1-5) sollte eingehenden NMR-Experimenten unterzogen werden. Da diese Fraktionen zwischen einem und sechs GlyCer enthielten, wurden Leitsubstanzen für eine vollständige Strukturaufklärung ausgewählt. Die GlyCer Glc-d18:2^{Δ^{AE},8E/Z} h16:0 (**7**), Glc-d18:1^{Δ^{8Z}} h16:0 (**9**) und Glc-t18:1^{Δ^{8E/Z}} h22:0 (**28**) wurden 1D- und 2D-Experimenten unterzogen. Anschließend wurden die anderen Fraktionen in einem ¹H-NMR-Fingerprinting anhand der chemischen Verschiebungen der Leitsubstanzen auf GlyCer untersucht. Die Verbindungen lagen zum Teil als Isomere vor und konnten chromatographisch (LC, SC) nicht voneinander getrennt werden. Jedoch wurde ihre 8E/Z-Konfiguration in den NMR-Spektren nachgewiesen.

Glc-d18:2^{Δ^{AE},8E/Z} h16:0 (7)

Bei der Fraktion A3 handelte es sich um ein Gemisch aus zwei Verbindungen, die eine E/Z-Isomerie an Position C-8,9 zeigten. Die ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen sind in Tab. 33 dargestellt. Die Signalzuordnungen wurden mithilfe von COSY-, TOCSY-, HSQC-, HMBC- und ROESY-Experimenten (siehe Abb. 17) durchgeführt. Über C-H und H-H-Korrelationen wurde der Sphingobasenteil des Moleküls von C-1 bis C-12, die Fettsäure von C-1' bis C-6' und der Zucker (C-1'' bis C-6'') vollständig dargestellt.

Zwei Dubletts bei δ_H 8,382 ppm (d, 8,9 Hz) und δ_H 8,374 ppm (d, 9,0 Hz) wurden als Amid-Protonen (CO-NH) identifiziert. Diese hatten dieselben COSY- und HMBC-Korrelationen zu benachbarten Atomen (Abb. 17) und deuteten einen grundlegend gleichen Molekülaufbau an.

Zwei Doppelbindungen je Verbindung wurden aufgrund von ¹H-NMR-Signalen von δ_H 5,496-6,016 ppm angenommen. Eine Doppelbindung wurde der Position C-4,5 zugeordnet. Trotz des vorliegenden Spektrums höherer Ordnung beider Multipletts (δ_H 6,016 ppm und 5,939 ppm) wurde aufgrund der großen Kopplungskonstante von 15,4 Hz eine E-Isomerie bestätigt (Mitchell und Costisella, 2007). Die Doppelbindung war bei beiden Verbindungen gleichermaßen vertreten.

Je eine weitere Doppelbindung befand sich an Position C-8,9. Die Signale überlagerten sich bei δ_H 5,496 ppm (H-8Z und H-9Z) und δ_H 5,511 ppm (H-8E und H-9E) zu einem Multiplett. Kopplungskonstanten konnten nicht ermittelt werden. Die Zuordnung erfolgte mithilfe von ¹³C-NMR-Verschiebungen der benachbarten Methylen-Einheiten (C-7 und C-10), da Doppelbindungen in langkettigen Alkenen eine ¹³C-chemische Verschiebung dieser bewirken (De Haan und Van De Ven, 1973). So wurden im ¹³C-NMR-Spektrum Verschiebungen von C-7 und C-10 bei δ_C ca. 27-28 ppm (8Z-Isomer) und bei δ_C ca. 32-33 ppm (8E-Isomer) identifiziert (Abb. A27), E und F; Shibuya *et al.*, 1990; Inagaki *et al.*, 1998; Voutquenne *et al.*, 1999). Auch die Signalintensitäten der ¹³C-Signale (C-4, C-5, C-8, C-9) der Z- und E-olefinischen Verbindung unterstützten diese Aussage (Abb. A26-27). Während einige Protonen der

verwandten Verbindungen (*E/Z*-Isomer) aufgrund ihrer Komplexität im ^1H -NMR-Spektrum zusammenfielen (z.B. H-2, H-3, H-4, H-5, H-6), wurde für Protonen in unmittelbarer Umgebung der Doppelbindung (H-7, H-10) sowie die NH-Signale und H-1'' des Zuckers eine leichte chemische Signalverschiebung festgestellt.

Tab. 33: ^1H -, ^{13}C -chemische Verschiebungen von Glc-d18:2 $^{\Delta 4E,8E/Z}$ h16:0 (7, Pyridin- d_5)

- ^a – ^1H -chemische Verschiebungen aus HSQC-Korrelationen,
^b – ^1H -chemische Verschiebungen aus TOCSY-Korrelationen,
^c – ^1H -chemische Verschiebungen aus HMBC-Korrelationen,
^d – Signale sind innerhalb einer Spalte austauschbar

Position	δ_{H} [ppm] (M, J [Hz])		δ_{C} [ppm]	
	$\Delta 8Z$	$\Delta 8E$	$\Delta 8Z$	$\Delta 8E$
Sphingobase				
1a	4,726 (m)		70,19	
1b	4,262 ^a (m)		-	
2	4,832 (m)		54,64	54,60
3	4,785 (m)		72,32	
4	6,016 (m, 15,4)		132,18	132,12
5	5,939 (m, 15,4)		132,08	132,03
6	2,189 ^a (m)		32,78	
7	2,199 ^a (m)	2,178 ^a (m)	27,35	32,92
8	5,496 ^b (m)	5,511 ^b (m)	129,42	129,94
9	5,496 ^b (m)	5,511 ^b (m)	130,65	131,11
10	2,086 ^b (m)	2,027 ^a (m)	27,62	32,99
11	1,389 ^c (m)		29,54-30,08	
12-16	1,262 (m)		29,54-30,08	
16	-		32,15-32,14	
17	1,262 (m)		22,96	
18	0,875 (t, 6,8)		14,31	
NH	8,382 (d, 8,9)	8,374 (d, 9,0)	-	
Fettsäure				
1'	-		175,69	175,67
2'	4,596 (m)		72,50	72,53
3'a	2,225 ^a (m)		35,68	35,70
3'b	2,024 ^a (m)		-	
4'a	1,822 (m)		25,95	25,92
4'b	1,735 (m)		-	
5'	1,393 ^c (m)		29,54-30,08	
6'-14'	1,262 (m)		29,54-30,08	
14'	-		32,15-32,14	
15'	1,262 (m)		22,96	
16'	0,875 (t, 6,8)		14,31	
Zucker				
1''	4,941 (d, 7,8) ^d	4,939 (d, 7,8) ^d	105,70	
2''	4,052 (t, 7,7)		75,15	
3'' ^d	4,231 ^a (m)		78,49	
4'' ^d	4,245 ^a (m)		71,53	
5''	3,927 (m)		78,60	
6''a	4,531 (dd, 11,9; 2,5)		62,67	
6''b	4,381 (dd, 11,9; 5,3)		-	

Die Verbindung der Sphingobase (NH) zur Fettsäure und der Zuckereinheit wurde unter anderem mithilfe von HMBC- und ROESY-Korrelationen (NH \rightarrow C/H-1', H-1'' \rightarrow C-1, Abb. 17) erkannt. Mithilfe von TOCSY-Korrelationen (Abb. 17) wurden der Zuckerteil und beide

aliphatischen Ketten bis zu den jeweiligen Positionen H-12 und H-6' nachgewiesen. Ein breites Singulett bei δ_{H} 1,262 gab die übrigen Methylen-Protonen (CH_2) zweier langer Kohlenstoffketten an. Eine Aussage über die Kettenlänge ist aufgrund der mangelnden Korrelationen zum Methylen (δ_{H} 0,875 ppm (t, 6,8 Hz)) nicht getroffen worden. In Anbetracht der ESI-MS/MS-Daten (siehe 4.2.3) wurden diese mit Kettenlängen von C18 für die Sphingobase und C16 für die Fettsäure bestimmt. Eine α -Hydroxylierung der Fettsäure ist mit dem Signal δ_{H} 4,596 ppm (m) und seinen COSY-Korrelationen nachgewiesen worden.

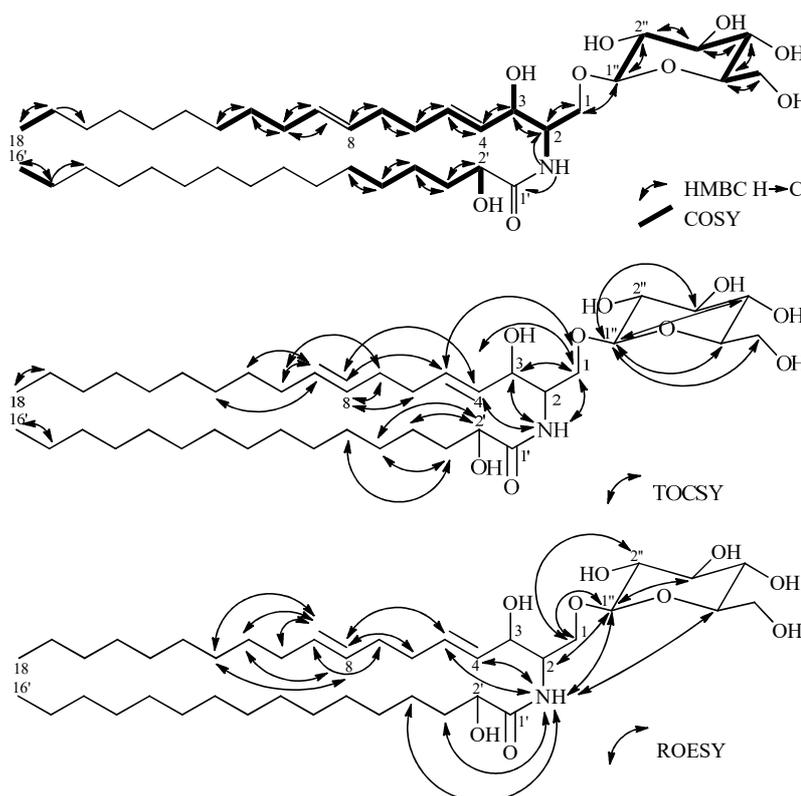


Abb. 17: 2D-NMR-Korrelationen von $\text{Glc-d18:2}^{\Delta 4\text{E},8\text{E/Z}} \text{h16:0 (7)}$

Weitere 2D-Korrelationen sind in Tab. A11 aufgeführt.

Es wurden außerdem zwei $1''$ -Protonen detektiert. Die anomeren Protonen der jeweiligen Verbindung lagen bei δ_{H} 4,941 ppm (d, 7,8 Hz) sowie 4,939 ppm (d, 7,8 Hz) und fielen mit einem Wassersignal zusammen. Die Kopplungskonstante von $J = 7,8$ Hz ließ auf eine β -D-Glucopyranosid-Verbindung schließen (Shibuya *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2013). α -Glucopyranosid-Strukturen haben dagegen kleinere Kopplungskonstanten von 3-4 Hz (Roslund *et al.*, 2011). Die ^{13}C -Signale wurden bei δ_{C} 105,70 ppm (C-1''), δ_{C} 75,15 ppm (C-2''), δ_{C} 78,49 ppm (C-3''), δ_{C} 71,53 ppm (C-4''), δ_{C} 78,60 ppm (C-5''), and δ_{C} 62,67 ppm (C-6'') detektiert und entsprachen denen eines β -D-Glucopyranosid-Restes (Shibuya *et al.*, 1990; Inagaki *et al.*, 1998).

In Übereinstimmung mit den Signalen für Sojacerebroxid I und II, isoliert aus Sojabohnen (1-O-(β -D-glucopyranosyl)- (2*S*,3*R*,4*E*,8*E*/*Z*)-2*N*-[(2'*R*)-2'-hydroxyhexadecanoylamino]-octadeca-diene-1,3-diol (Glc-d18:2 h16:0, C_{I-2} δ_C 54,4 ppm; C_{I-3} δ_C 72,4 ppm; C_{I-2'} δ_C 72,6 ppm; C_{II-2} δ_C 54,3 ppm; C_{II-3} δ_C 72,3 ppm; C_{II-2'} δ_C 72,0 ppm; Shibuya *et al.*, 1990) und Sojacerebroxid I, isoliert aus *Euphorbia platyphyllos* (Glc-d18:2 h16:0, C_{I-2} δ_C 54,7 ppm; C_{I-3} δ_C 72,4 ppm, C_{I-2'} δ_C 72,6 ppm; Cateni *et al.*, 2008) wurde die relative Stereochemie von 2*S*, 3*R*, 2'*R* angenommen (C-2 δ_C 54,64 ppm; C-3 δ_C 72,32 ppm; C-2' δ_C 72,53 ppm).

Glc-d18:1 ^{Δ 8*Z*} h16:0 (9)

In Fraktion W2 war das GlyCer Glc-d18:1 ^{Δ 8*Z*} h16:0 (9) enthalten. Die Signale der Verbindung unterschieden sich vom bereits beschriebenen Glc-d18:2 ^{Δ 4*E*,8*E*/*Z*} h16:0 (7) nur geringfügig. Die NMR-Spektren der Fraktionen wiesen weitere GlyCer (z.B. Glc-d18:1 ^{Δ 8*Z*} h16:0 (7)) auf (Abb. A30-31), weshalb nicht alle Signale eindeutig ermittelt werden konnten. Dennoch wurden die wichtigsten Molekülbereiche mit COSY-, TOCSY- und HMBC-Korrelationen aufgeklärt (Abb. 18). ¹H- und ¹³C-chemische Verschiebungen sind in Tab. 34 zusammengefasst.

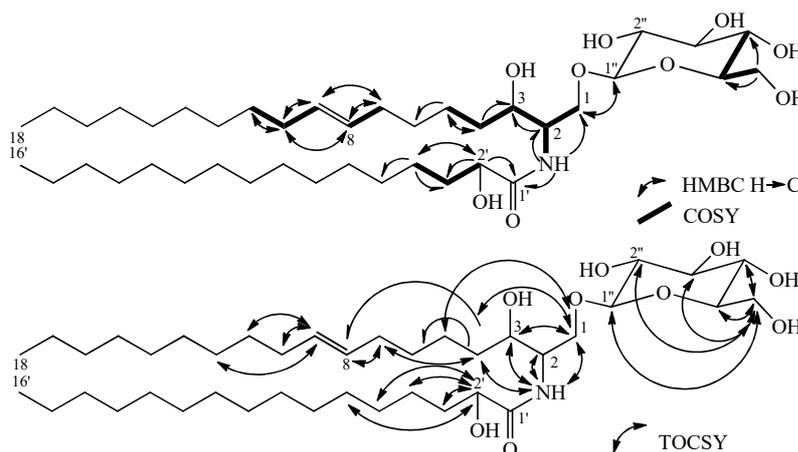


Abb. 18: 2D-NMR-Korrelationen von Glc-d18:1 ^{Δ 8*Z*} h16:0 (9)

Weitere 2D-Korrelationen sind in Tab. A13 aufgeführt.

Ein Dublett bei δ_H 8,436 ppm (d, 8,6 Hz) wurde als Amid-Proton (CO-NH) detektiert. Es wurde keine Doppelbindung an Position C-4 ausgemacht. Anstelle dessen sind die Signale an C-4 und C-5 als Methylengruppen bestimmt worden (Abb. A30-A31). Eine Doppelbindung an Position C-8,9 wurde bei δ_H 5,494 ppm als überlagertes Multipllett nachgewiesen. Die Konfiguration wurde anhand der C-7 und C-10 ¹³C-Signale (27-28 ppm) als *Z* bestimmt (Abb. A31).

Ein anomeres Proton (H-1'') wurde bei δ_H 4,932 ppm (d, 7,8 Hz) nachgewiesen und ließ mit der Kopplungskonstante von $J = 7,8$ Hz auf eine β -D-glucosidische Bindung schließen. COSY-Korrelationen und ein Signal bei δ_H 4,624 ppm (dd, 7,7; 3,9 Hz) bewiesen eine α -Hydroxylierung der Fettsäure. Die Kettenlängen der Sphingobase und der Fettsäure wurden mittels ESI-MS/MS als C18 und C16 ermittelt (siehe 4.2.3).

Tab. 34: ^1H -, ^{13}C -chemische Verschiebungen von Glc-d18:1 $^{\Delta 8Z}$ h16:0 (9, Pyridin- d_3)

- ^a – ^1H -chemische Verschiebungen aus TOCSY-Korrelationen,
^b – ^1H -chemische Verschiebungen aus HSQC-Korrelationen,
^c – ^1H -chemische Verschiebungen aus COSY-Korrelationen,
^d – Signale sind innerhalb der Spalte austauschbar,
^e – Signale konnten nicht aufgetrennt werden, n.d. – nicht detektiert

Position	δ_{H} [ppm] (M, J [Hz])	δ_{C} [ppm]
	$\Delta 8Z$	$\Delta 8Z$
Sphingobase		
1a	4,734 (m)	n.d.
1b	4,257 ^a (m)	-
2	4,744 ^b (m)	54,53
3	4,156 (m)	72,26
4	1,882 (m)	35,04 ^b
5	1,564 (m)	26,56
6	1,381 ^{a,c} (m)	n.d.
7	2,124 (m)	27,50 ^d
8	5,494 ^c (m)	129,42
9	5,494 ^c (m)	130,65
10	2,095 (m)	27,55 ^d
11	1,381 ^{a,c} (m)	n.d.
12-16	1,263 (m)	n.d.
17	1,263 (m)	n.d.
18	0,874 (t, 7,0)	n.d.
NH	8,436 (d, 8,6)	-
Fettsäure		
1'	-	175,53
2'	4,624 (dd, 7,7; 3,9)	72,51 ^b
3'a	2,227 ^a (m)	n.d.
3'b	2,098 ^a (m)	-
4'	1,782 ^a (m)	n.d.
5'	1,393 ^a (m)	n.d.
6'-14'	1,263 (m)	n.d.
15'	1,263 (m)	n.d.
16'	0,874 (t, 7,0)	n.d.
Zucker		
1''	4,932 (d, 7,8)	n.d.
2''	4,050 (m)	n.d.
3'' ^e	4,233 ^e (m)	n.d.
4'' ^e	4,250 ^e (m)	n.d.
5''	3,932 (m)	n.d.
6''a	4,547 (dd, 11,9; 2,5)	n.d.
6''b	4,377 (dd, 11,9, 5,5)	-

In Übereinstimmung mit den Signalen für isolierte Weizencerebroside (1-O-(β -D-glucopyranosyl)- (2*S*,3*R*,8*Z*)-2N-[(2'*R*)-2'-hydroxyicosanoylamino]-octadecen-1,3-diol, Glc-d18:1 h18:0, C-2 δ_{C} 55,0 ppm; C-3 δ_{C} 71,7 ppm; C-2' δ_{C} 72,9 ppm ; Zhu *et al.*, 2013) wurde die relative Stereochemie als 2*S*, 3*R*, 2'*R* angenommen (C-2 δ_{C} 54,53 ppm; C-3 δ_{C} 72,26 ppm; C-2' δ_{C} 72,51 ppm).

Glc-t18:1^{Δ8E/Z} h22:0 (28)

Fraktion A8 enthielt zwei Verbindungen in Form eines Gemisches von *E/Z*-Isomeren. Mithilfe von COSY-, TOCSY-, HSQC-, HMBC- und ROESY-Experimenten (Abb. 19) wurden die Moleküle aufgeklärt. Die ermittelten ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen sind in Tab. 35 dargestellt. Im Gegensatz zum Dihydroxy-basierten GlyCer (d18:2) wurde nur ein Signal der Amid-Protonen (CO-NH, δ_H 8,585 ppm (d, 9,1 Hz)) detektiert, obwohl zwei Konfigurationsisomere (*E/Z*) nachgewiesen werden konnten. Dieses Signal lag an der Stelle eines Pyridin-*d*₅-bedingten ¹³C-Satelliten (Abb. A28). COSY- und HMBC-Korrelationen offenbarten einen anderen Molekülaufbau ab Position C-4 als bei Glc-d18:2 h16:0 (7) (Abb. 19). ¹H- und ¹³C-Signale an Position C-4 (H-4: δ_H 4,225 ppm) deuteten auf eine Hydroxygruppe und an Position C-5 (H-5a: δ_H 2,319 ppm; H-5b: δ_H 1,931 ppm) auf eine Methylengruppe hin (Tab. 35). Eine Doppelbindung wurde wie schon bei den beiden zuvor beschriebenen GlyCer an Position C-8,9 detektiert.

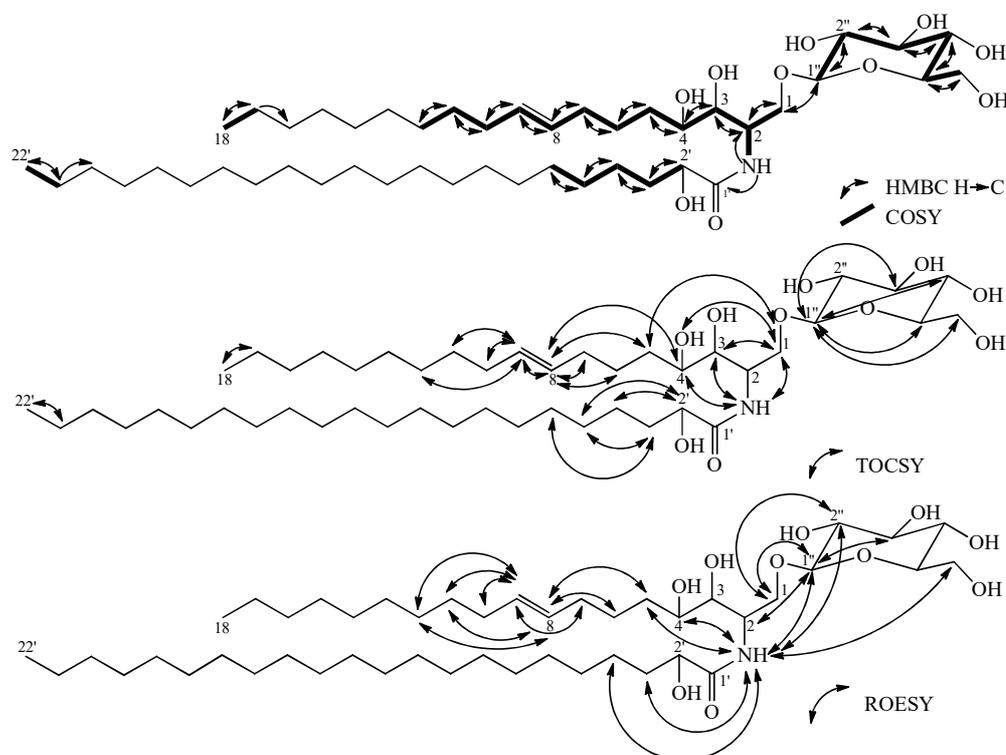


Abb. 19: 2D-NMR-Korrelationen von Glc-t18:1^{Δ8E/Z} h22:0 (28)

Weitere 2D-Korrelationen sind in Tab. A12 aufgeführt.

Auch hier wurden ein *E*- und ein *Z*-Isomer nachgewiesen, obwohl die ¹H-Signale in einem Multipllett übereinander lagen. Die Konfiguration wurde über die benachbarten C-7 und C-10 ¹³C-Signale bei δ_H ca. 27-28 ppm (8*Z*-Isomer) und bei δ_H ca. 32-33 ppm (8*E*-Isomer) bestimmt. Aufgrund der Reinheit der Probe wurden unterschiedliche ¹³C-Signalintensitäten (C-8, C-9) der *Z*- und *E*-olefinischen Verbindungen festgestellt (Abb. A29). Mithilfe von HMBC-

Korrelationen sind die Signale (H-8E: δ_{H} 5,535 ppm; H-9E: δ_{H} 5,508 ppm; H-8Z: δ_{H} 5,535 ppm; H-9Z: δ_{H} 5,475 ppm) aufgeschlüsselt worden.

Tab. 35: ^1H -, ^{13}C -chemische Verschiebungen von Glc-t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (28, Pyridin- d_5)

- ^a – ^1H -chemische Verschiebungen aus HSQC-Korrelationen,
^b – ^1H -chemische Verschiebungen aus HMBC-Korrelationen,
^c – Signale sind innerhalb einer Reihe austauschbar
^d – Signale sind innerhalb der Spalte austauschbar,

Position	δ_{H} [ppm] (M, J [Hz])		δ_{C} [ppm]	
	$\Delta 8Z$	$\Delta 8E$	$\Delta 8Z$	$\Delta 8E$
<i>Sphingobase</i>				
1a	4,730 (dd, 10,7; 6,7)		70,52 ^c	70,49 ^c
1b	4,545 (dd, 10,7; 4,6)		-	-
2	5,311 (m)		-	51,75
3	4,310 (dd, 7,1; 4,7)		-	75,91
4	4,225 ^a (m)		-	72,48
5a	2,319 ^a (m)		34,01 ^c	33,90 ^c
5b	1,931 ^a (m)		-	-
6a	2,043 ^a (m)		26,83 ^c	26,68 ^c
6b	1,792 ^a (m)		-	-
7	2,245 ^a (m)	2,157 ^a (m)	27,95	33,34
8	5,535 ^b (m)	5,535 ^b (m)	130,41	130,85
9	5,475 ^b (m)	5,508 ^b (m)	130,21	130,67
10	2,088 ^a (m)	2,013 ^a (m)	27,60	33,01
11	1,359 ^b (m)		29,55-30,13	
12-16	1,268 (m)		29,55-30,13	
16	-		32,14-32,13	
17	1,268 (m)		22,96	
18	0,874 (t, 6,6)		14,31	
NH	8,585 (d, 9,1)		-	
<i>Fettsäure</i>				
1'	-		175,66	
2'	4,595 (ddd, 8,2; 3,8; 1,7)		72,43	
3'a	2,208 ^a (m)		35,59	
3'b	1,994 ^a (m)		-	
4'a	1,773 ^a (m)		25,89 ^c	25,87 ^c
4'b	1,705 ^a (m)		-	
5'	1,367 ^b (m)		29,55-30,13	
6'-20'	1,268 (m)		29,55-30,13	
20'	-		32,14-32,13	
21'	1,268 (m)		22,96	
22'	0,874 (t, 6,6)		14,31	
<i>Zucker</i>				
1''	4,976 (d, 7,8)	4,974 (d, 7,8)	105,62	
2''	4,026 (t, 8,0)		75,19	
3'' ^d	4,208 ^a (m)		78,47	
4'' ^d	4,218 ^a (m)		71,47	
5''	3,880 (m)		78,59	
6''a	4,504 (dd, 11,8; 2,5)		62,62	
6''b	4,362 (dd, 11,8; 4,3)		-	

Über HMBC- und ROESY-Korrelationen ist die Verknüpfung der Sphingobase mit der Fettsäure und dem Zucker (NH \rightarrow C/H-1', H-1'' \rightarrow C-1, Abb. 19) nachgewiesen worden. Anhand der 2D-NMR-Spektren (TOCSY und HMBC) wurde das Molekül bis einschließlich Position C-12, C-6' und des gesamten Zuckerteils aufgeklärt. Es sind zwei anomere Protonen (H-1'') bei

δ_{H} 4,976 ppm (d, 7,8 Hz) und 4,974 ppm (d, 7,8 Hz) detektiert worden. Die Kopplungskonstante von $J = 7,8$ Hz ließ auf eine β -D-Glucopyranosid-Verbindung schließen. Die α -Hydroxylierung der Fettsäure wurde mit COSY-Korrelationen und der ^1H -Verschiebung δ_{H} 4,595 ppm (ddd, 8,2; 3,8; 1,7 Hz) bestätigt. ESI-MS/MS-Spektren komplettierten mit der Kettenlängenbestimmung die Molekülstruktur zu Glc-t18:1 ^{$\Delta^{8E/Z}$} h22:0 (**28**) (siehe 4.2.3).

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten zu 1-O- β -D-glucopyranosyl-(2*S*,3*S*,4*R*,8*E*)-2N-[(2'*R*)-2'-hydroxybehenoylamino]-octadecen-1,3,4-triol, isoliert aus *Euphorbia nicaensis*, *Euphorbia sororia*, *Serratula chinensis* (Glc-t18:1 h22:0 C-2 δ_{C} 51,7-51,8 ppm; C-3 δ_{C} 75,9-76,0 ppm; C-4 δ_{C} 72,4-72,5 ppm; C-2' δ_{C} 72,5 ppm; Cateni *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007) wurde eine relative Stereochemie von 2*S*, 3*S*, 4*R*, 2'*R* für beide GlyCer angenommen (C-2 δ_{C} 51,75 ppm; C-3 δ_{C} 75,91 ppm; C-4 δ_{C} 72,48 ppm; C-2' δ_{C} 72,43 ppm).

4.2.5 1D-TOCSY zur Strukturaufklärung von Glycosylceramiden

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde auch die Verwendung von 1D-TOCSY-Experimenten untersucht. Es wurde gezeigt, dass mittels vier einfacher 1D-TOCSY-Messungen die entscheidenden Molekülteile identifiziert werden können.

Beispielweise wurden durch die 1D-TOCSY-Spektren bei selektiver Anregung des jeweiligen NH-Signals alle Protonensignale der Positionen C-1 bis C-4 bzw. C-5 zugeordnet (Abb. 20).

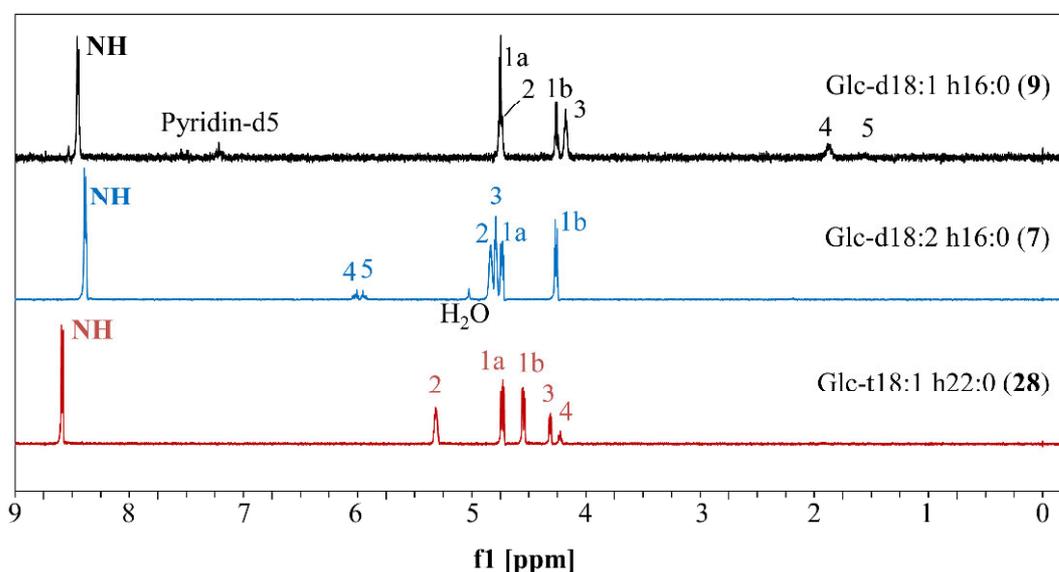


Abb. 20: 1D-TOCSY-NMR-Spektren der Glycosylceramid-Leitstrukturen
Selektive Anregung von NH (Pyridin- d_5)

Nur das GlyCer vom Sphingadienin (d18:2)-Typ hatte ^1H -Signale einer Doppelbindung an Position C-4 und C-5. Dagegen waren ebendiese Positionen beim Sphingenin (d18:1)-Typ als Methylengruppen ersichtlich und das Fehlen der Doppelbindung wurde nachgewiesen. Der Phytosphingenin (t18:1)-Typ zeigte wiederum eine zusätzliche Hydroxy-bedingte Verschiebung des ^1H -Signals an Position C-4.

Für die GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-d18:1 h16:0 (**9**) und Glc-t18:1 h22:0 (**28**) sind die 1D-TOCSY-Korrelationen innerhalb der Moleküle in Abb. 21 dargestellt.

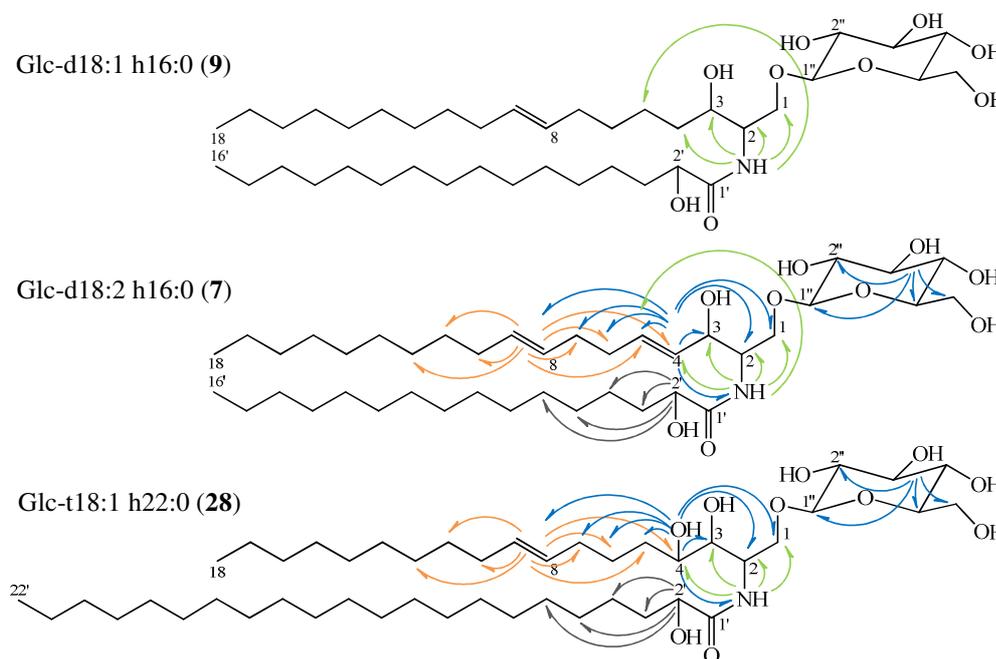


Abb. 21: 1D-TOCSY-Korrelationen der Glycosylceramid-Leitstrukturen

Es ist zu erkennen, dass für Glc-d18:2 h16:0 (**7**) die Sphingobase (NH, H-1b, H-8,9), die Fettsäure (H-2') und auch der Zucker (H-3'',4'') anhand der 1D-TOCSY-Korrelationen aufgeklärt werden konnten. Das GlyCer Glc-d18:1 h16:0 (**9**) wurde anhand der selektiven Anregung des NH-Signals untersucht, da sich hier Unterschiede zum bereits beschriebenen Glc-d18:2 h16:0 (**7**) zeigten. Mit einer Messung wurde nachgewiesen, dass anstelle einer Doppelbindung an Position C-4 und C-5 Methylengruppen vorlagen (Abb. 21). Für die Verbindung Glc-t18:1 h22:0 (**28**) ergab sich ein ähnliches Bild. Das Molekül wurde mit den vier 1D-TOCSY-Messungen bezüglich der Sphingobase (NH, H-4, H-8,9), der Fettsäure (H-2') und des Zuckeranteils (H-3'',4'') identifiziert.

4.2.6 $^1\text{H-NMR}$ -Fingerprinting von Glycosylceramiden

Mithilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Leitsubstanzen (**7**, **9**, **28**) sollten Signale und Spektrenbereiche identifiziert werden, die ein Fingerprinting der GlyCer in Mischfraktionen zuließen. Durch 1D-TOCSY-Experimente war bekannt, dass beispielsweise Sphingobasen unterschiedliche Signalverschiebungen hervorrufen, die für eine Zuordnung genutzt werden können (Abb. 20). Für die GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-d18:1 h16:0 (**9**) und Glc-t18:1 h22:0 (**28**) sind die relevanten Spektrenbereiche eines $^1\text{H-NMR}$ -Fingerprintings in Abb. 22 dargestellt. Außerdem ist eine weitere Fraktion (W4), die alle benannten GlyCer-Klassen als Gemisch enthielt, aufgeführt, um die Funktionalität der Methode nachzuweisen.

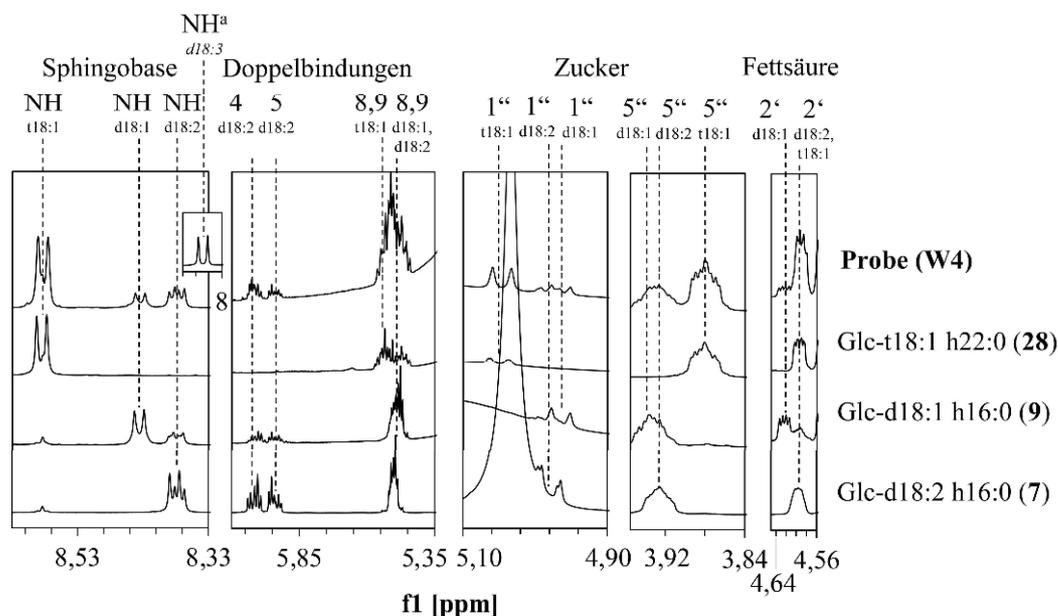


Abb. 22: Wichtige ^1H -Signale für ein ^1H -NMR-Struktur-Fingerprinting

W4: Glc-*d18:3*^a h20:0 (**14**), Glc-d18:1 h18:0 (**15**), Glc-d18:2 h19:0 (**16**), Glc-t18:1 h20:0 (**17**), Glc-t18:1 h22:1 (**19**), Glc-t18:1 h24:2 (**20**); ^a – Signallage nicht bestätigt, da keine Referenzsubstanz vorlag; Nomenklatur (Glc-Sphingobase Fettsäure, z.B. Glc-d18:2 h16:0 (**7**)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, h – α -hydroxy

Die Sphingobasen wurden bereits anhand der NH-Signale eindeutig zugeordnet. Weiterhin wurde mithilfe des Vergleichs das Doppelbindungsspektrum aufgeklärt. Während bei Glc-d18:2 h16:0 (**7**) für beide Doppelbindungen an Position C-4,5 und C-8,9 alle vier olefinischen Signale erkannt wurden, sind für die Sphingobasen mit einer Doppelbindung an Position C-8,9 (Glc-d18:1 h16:0 (**9**) und Glc-t18:1 h22:0 (**28**)) für beide Protonen nur nicht aufgelöste Multipletts nachgewiesen worden. Weitere Signale im Spektrum von Glc-d18:1 h16:0 (**9**) waren Verunreinigungen mit Glc-d18:2 h16:0 (**7**) zuzuschreiben. Ein weiterer auffälliger Bereich stellte die Position C-1'' dar. Die anomeren Protonen (C-1'') zeigten alle eine unterschiedliche chemische Verschiebung, jedoch stets die gleiche Kopplungskonstante ($J=7,8$ Hz), was für die Verknüpfung einer β -Glucose sprach (vgl. 4.2.4). Ein weiteres Zuckersignal wurde ebenfalls zur Sphingobasenaufklärung herangezogen: für Position C-5'' wurden unterschiedliche chemische Verschiebungen detektiert. Über das Vorhandensein einer amidartig verknüpften α -hydroxylierten Fettsäure gab das Signal der Position C-2' Auskunft. Dieses hatte beim Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typ eine ähnliche chemische Verschiebung. Beim Sphingenin (d18:1)-Typ trat es dagegen leicht tieffeldverschoben auf. Anhand der Fraktion W4, die nach massenspektrometrischer Aufklärung sechs GlyCer enthielt (siehe auch Abb. A14), sollte die Funktionalität der Methode überprüft werden. Die Sphingobasen wurden anhand der NH-Signale (d18:2, d18:1 und t18:1) nachgewiesen. Ein weiteres NH-Signal wurde der Sphingobase d18:3 zugeordnet. Die Lage des Signals nicht bestätigt worden, da keine Referenzsubstanz des Sphingatrienin (d18:3)-GlyCer vorlag.

Tab. 36: ¹H-NMR-Fingerprinting der Glycosylceramid-angereicherten Fraktionen

Fr. – Fraktion, A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, C – Kaffeesatz,
^a – Signallage nicht bestätigt, da keine Referenzsubstanz vorlag; Grau – Struktur müsste vorhanden sein, n.d. – nicht detektiert; Nomenklatur (Glc-Sphingobase Fettsäure, z.B. Glc-d18:2 h16:0 (7)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, h – α -hydroxy; Neu identifizierte GlyCer wurden nicht aufgeführt, da die Lagen der Signale aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht bestätigt werden konnten.

Fr.	Glycosylceramid	Sphingobase				Doppelbindungen		Zucker		Fettsäure
		NH (d18:2)	NH (d18:1)	NH (t18:1)	NH (d18:3 ^a)	Δ 4,5	Δ 8,9	1''	5''	2'
A2	Glc-d18:2 h15:0 (5)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h16:0 (6)			X			X	X	X	X
A3	Glc-d18:2 h16:0 (7)	X				X	X	X	X	X
A6	Glc-t18:1 h20:0 (17)			X			X	n.d.	X	X
A7	Glc-d18:2 h20:0 (22)	X				X	n.d.	X	X	X
	Glc-t18:1 h21:0 (23)			X			X	X	X	X
A8	Glc-t18:1 h22:0 (28)			X			X	X	X	X
A9	Glc-d18:2 h22:0 (31)	n.d.				n.d.	X	n.d.	n.d.	X
	Glc-t18:1 h23:0 (32)			X			X	X	X	X
A10	Glc-d18:2 h23:0 (35)	n.d.				n.d.	X	n.d.	n.d.	X
	Glc-t18:1 h24:0 (36)			X			X	X	X	X
A11	Glc-d18:2 h24:0 (39)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h25:0 (41)			X			X	X	X	X
A12	Glc-d18:2 h25:0 (43)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h26:0 (44)			X			X	X	X	X
W1	Glc-d18:2 h16:0 (7)	X				X	X	X	X	X
	Glc-d18:2 h18:1 (8)	X				X	X	X	X	X
W2	Glc-d18:1 h16:0 (9)		X				X	X	X	X
W3	Glc-d18:2 h18:0 (11)	X				X	X	X	X	X
	Glc-d18:2 h20:1 (12)	X				X	X	X	X	X
W4	Glc-d18:1 h18:0 (15)		X				X	X	X	X
	Glc-d18:2 h19:0 (16)	X				X	X	X	X	X
	Glc-d18:3 ^a h20:0 (14)				X	X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h20:0 (17)			X			X	X	X	X
	Glc-t18:1 h22:1 (19)			X			X	X	X	X
	Glc-t18:1 h24:2 (20)			X			X	X	X	X
W5	Glc-t18:1 h23:1 (21)			X			X	X	X	X
	Glc-d18:2 h20:0 (22)	X				X	X	X	X	X
	Glc-d18:2 h22:1 (24)	X				X	X	X	X	X
W6	Glc-d18:1 h20:0 (26)		X				X	X	X	X
W7	Glc-d18:2 h21:0 (27)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h22:0 (28)			X			X	X	X	X
	Glc-t18:1 h24:1 (29)			X			X	X	X	X
W8	Glc-d18:2 h24:1 (30)	X				X	X	X	X	X
	Glc-d18:2 h22:0 (31)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h23:0 (32)			X			X	X	X	X
	Glc-t18:1 h25:1 (33)			X			X	X	X	X
W9	Glc-d18:1 h22:0 (34)		X				X	X	X	X
	Glc-d18:2 h23:0 (35)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h24:0 (36)			X			X	X	X	X
	Glc-d18:2 h25:1 (37)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h26:1 (38)			X			X	X	X	X
W10	Glc-d18:2 h24:0 (39)					X	X	X	X	X
	Glc-d18:2 h26:1 (40)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h25:0 (41)			X			X	X	X	X
W11	Glc-d18:1 h24:0 (42)		X				X	X	X	X
	Glc-d18:2 h25:0 (43)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h26:0 (44)			X			X	X	X	X
	Glc-t18:1 h28:1 (45)			X			X	X	X	X
W12	Glc-d18:2 h26:0 (46)	X				X	X	X	X	X
C1	Glc-d18:2 h16:0 (7)	X				X	X	X	X	X
C2	Glc-t18:1 h22:0 (28)			X			X	X	X	X
C3	Glc-d18:2 h22:0 (31)	X				X	X	X	X	X
	Glc-t18:1 h23:0 (32)			X			X	X	X	X
C4	Glc-t18:1 h24:0 (36)			X			X	X	X	X
C5	Glc-d18:2 h24:0 (39)	X				X	X	n.d.	X	X
	Glc-t18:1 h25:0 (41)			X			X	n.d.	X	X

Doppelbindungen an den Positionen C-4,5 und C-8,9 wurden ebenfalls ermittelt. Für die Fraktion W4 wurden drei unterschiedliche 1''- und 5''-Signale detektiert, was für das Vorhandensein von Zuckerkopfgruppen an drei unterschiedlichen Sphingobasen (d18:2, d18:1, t18:1) sprach. Zusätzliche C-1''-Signale des d18:3-basierten GlyCer wurden nicht ausgemacht. Alle 1''-Signale hatten dieselbe Kopplungskonstante ($J=7,8$ Hz) und wiesen auf eine verknüpfte β -Glucose hin. Alle GlyCer enthielten α -hydroxylierte Fettsäuren, was mit den Signalen (2') unterschiedlicher Intensität nachgewiesen wurde. Es konnte keine Aussage über Doppelbindungen innerhalb der massenspektrometrisch nachgewiesenen Fettsäuren (h22:1 und h24:2) getroffen werden, da diese Signale mit denen der Sphingobasendoppelbindung C-8,9 zusammenfielen. Auch die Kettenlängen der enthaltenen Sphingobasen und Fettsäuren konnten nicht bestimmt werden. Dafür dienten massenspektrometrische Methoden (3.2.3.1, 3.2.3.2).

Für die isolierten Fraktionen des Apfeltresters, der Weizenkeime und des Kaffeesatzes sind die Ergebnisse des $^1\text{H-NMR}$ -Fingerprintings in Tab. 36 zusammengefasst. Die $^1\text{H-NMR}$ -Fingerprinting-Spektren aller Fraktionen befinden sich im Anhang (Abb. A45-A47). In allen Fraktionen wurden die Molekülbestandteile (Sphingobase, Doppelbindungen, Zucker und Fettsäure) der bereits massenspektrometrisch nachgewiesenen GlyCer bestätigt, ohne intensive ^{13}C - oder 2D-Spektren aufnehmen zu müssen. Jedoch konnten Strukturmerkmale von Spurenverbindungen nicht eindeutig nachgewiesen werden (z.B. A9, A10). Die neuen GlyCer des Apfeltresters (Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**), Glc-8/9-OH-d18:2 h16:0 (**1/2**), 2OH-d18:2- (**3/13/25**) und OH-t18:1-Typ (**10/18**)) wurden für ein $^1\text{H-NMR}$ -Fingerprinting nicht weiter untersucht, da Referenzsubstanzen fehlten.

4.2.7 Doppelbindungsnachweis der Fettsäureinheit

Die Doppelbindung innerhalb der Fettsäuren wurde anhand von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (Abb. 23) und mit massenspektrometrischen Analysen nach Derivatisierung nachgewiesen.

NMR-Signale der Positionen C-15',16' (für Glc-t18:1 h24:1 (**29**)) wurden im ^1H - und im ^{13}C -NMR-Spektrum detektiert. Z-Doppelbindungen erscheinen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Triplet-ähnlich (Rossi und Carpita, 1977; Inagaki *et al.*, 1998), was für die Signale der vorliegenden Doppelbindungen nachgewiesen worden ist. Die Z-Konfiguration wurde weiterhin anhand der ^{13}C -chemischen Verschiebungen der benachbarten Methylengruppen (C-14' und C-17', δ_{C} 27-28 ppm, Abb. 23) festgestellt (De Haan und Van De Ven, 1973).

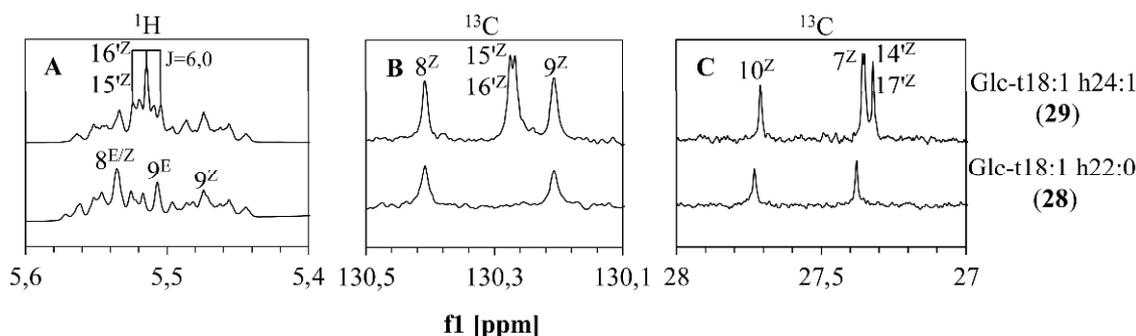


Abb. 23: Doppelbindungsnachweis der Fettsäure mittels NMR

¹H- (A) und ¹³C- (B, C) chemische Verschiebungen (Pyridin-*d*₅)

Zusätzlich wurde die Doppelbindung der Fettsäure mit massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigt (Abb. 24). Diese Methode wurde für jene GlyCer angewendet, die in ausreichenden Konzentrationen vorlagen. Nach der Derivatisierung des GlyCer (Glc-t18:1 h22:1 (**19**)) mit DMDS wurde im negativen ESI-Modus (ESI/MS/MS) ein Fettsäurefragment (FS+2SCH₃) detektiert (Abb. A19). Es enthielt die addierten Thioethergruppen (R-S-CH₃) und galt damit als Beweis für eine Doppelbindung innerhalb der Fettsäure (Glc-t18:1 h22:1 (**19**)): FS-Fragment, (-)ESI-MS SID 50 %: *m/z* 447,5). Die MS/MS-Spektren des FS-Fragmentes enthielten ein Spaltfragment (*m/z* 173,2), das auf die Spaltung innerhalb der Doppelbindung und die Position innerhalb der Alkylkette vom Ende der Fettsäure hinwies. Die Position der Doppelbindung wurde als ω-9 bestimmt. Für weitere Hauptkomponenten (Glc-t18:1 h24:1 (**29**)): FS-Fragment, (-)ESI-MS SID 50 %: *m/z* 475,4; Glc-d18:2 h24:1 (**30**): FS-Fragment, (-)ESI-MS SID 50 %: *m/z* 475,4) wurden gleiche Ergebnisse ermittelt.

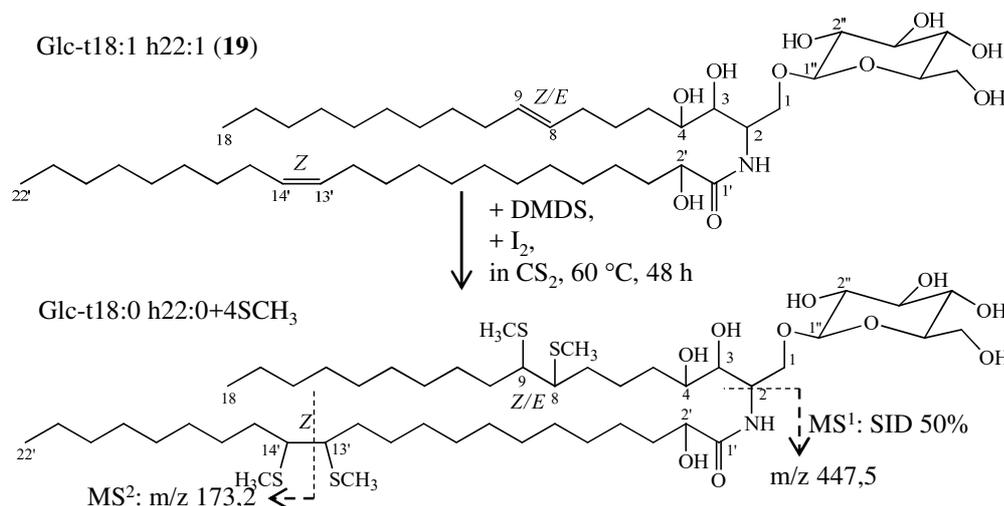


Abb. 24: Doppelbindungsnachweis der Fettsäure mittels ESI-MS/MS (DMDS-Derivate)

4.2.8 Neuartige Glycosylceramide des Apfeltresters

Neue GlyCer wurden in den Fraktionen des Apfeltresters (A1: **1-4**, A4: **10**, A5: **13**, A6: **18**, A7: **25**) nachgewiesen. Die GlyCer **3**, **10**, **13**, **18** und **25** konnten als Spurenkomponenten strukturell

per NMR nicht aufgeklärt werden. Die GlyCer innerhalb der Fraktion A1 co-eluierten mit der beschriebenen LC-MS-Methode (3.2.2.3). Drei GlyCer (**1**, **2** und **4**) wurden jedoch mit einer abgewandelten LC-MS-Methode (abgesenkter Fluss von 0,8 ml/min und veränderter Elutionsgradient, 3.2.1.5) aufgetrennt (Abb. 25). Das in Spuren vorkommende GlyCer **3** wurde nicht detektiert.

Die Fraktion A1 (10,2 mg) des Apfeltresters wurde zusätzlich einer Säulenchromatographie unterzogen (siehe 3.2.1.5), um die GlyCer **1**, **2** und **4** anhand ihrer Polarität an Kieselgel zu isolieren. Zwei Fraktionen wurden erhalten: Fraktion A1-1 enthielt ein GlyCer (**4**, 2,5 mg) und Fraktion A1-2 zwei co-eluierende GlyCer (**1** und **2**, zusammen 2,7 mg). GlyCer **1** und **2** konnten präparativ nicht voneinander getrennt werden. Zusätzlich zu den ESI-HRMS-Daten und MS/MS-Fragmentierungen wurden eingehende NMR-Experimente zur Strukturaufklärung durchgeführt.

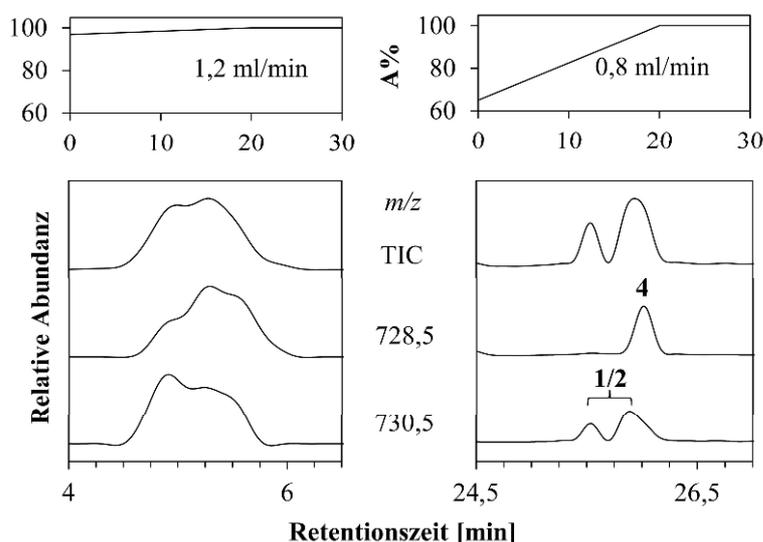


Abb. 25: LC-MS der Fraktion A1 mit unterschiedlicher LC-Trennung

A: MeOH+0,1 % FA (Ameisensäure); B: H₂O+0,1 % FA; 8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**1**), 9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (**2**) und 8-keto- d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**4**)

Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (Malusid I, **4**)

Fraktion A1-1 enthielt GlyCer **4**. Die ESI-HRMS-Messung ergab die Summenformel C₄₀H₇₃NO₁₀ ([M+Na]⁺ *m/z* 750,5116, berechnet als C₄₀H₇₃NO₁₀Na⁺ *m/z* 750,5127). Im Vergleich zum GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**, C₄₀H₇₅NO₉) hatte die Verbindung ein zusätzliches Sauerstoffatom. Das Fragment Z₀' (*m/z* 528,4; [M-C₆H₁₀O₅-2H₂O-H]) der MS/MS-Spektren im negativen Modus indizierte eine zusätzliche Wasserabspaltung innerhalb des Moleküls. Mit 5 DBE musste eine weitere Doppelbindung im Vergleich zu den Sphingadienin (d18:2)-basierten GlyCer (z.B. Glc-d18:2 h16:0 (**7**), 4 DBE) vorliegen. Die ESI-MS/MS-Fragmente, die für die Sphingobase charakteristisch waren, zeigten gegenüber der Referenzverbindung Glc-d18:2 h16:0 (**7**) eine Differenz von +14 amu: O (*m/z* 496,2; [M-C₁₆H₃₀O₂+Na]⁺), E (*m/z* 301,0; [M-

$C_6H_{10}O_5-C_{16}H_{31}O_2N-H_2O+Na]^+$) und F (m/z 463,2; $[M-C_{16}H_{31}O_2N-H_2O+Na]^+$) (Tab. 32, Abb. A18). Dies deutete auf eine Abwandlung des Moleküls innerhalb der Sphingobase hin. Anhand des negativen MS/MS-Spektrums wurde die Fettsäureeinheit (h16:0) mit U (m/z 271,4; $[M-C_6H_{10}O_5-C_{18}H_{31}O_3-H]^+$) nachgewiesen (Tab. 32, Abb. A18). Mithilfe von 1D- und 2D-NMR-Experimenten wurde die Veränderung des Moleküls gegenüber Glc-d18:2 h16:0 (7) an Position C-8 festgestellt (Abb. 26-27).

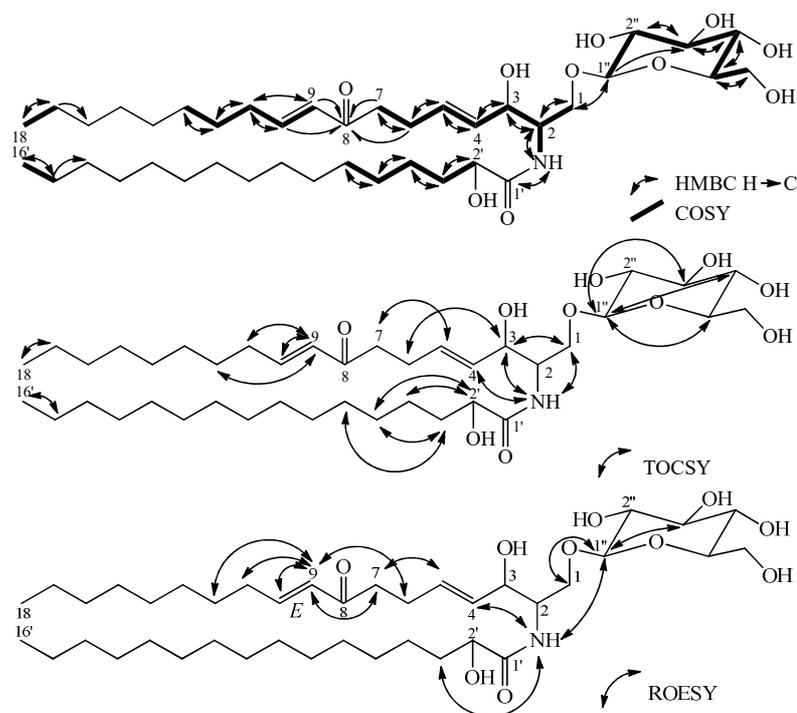


Abb. 26: 2D-Korrelationen von Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (4)
 Weitere 2D-Korrelationen sind in Tab. A14 aufgeführt.

Anhand von COSY- und TOCSY-Korrelationen wurden die Positionen C-1 bis C-7 und C-9 bis C-12 aufgeklärt. Mithilfe von HMBC-Korrelationen ist die Position C-8 bestimmt worden. Die tieffeldverschobene C-8-Position (δ_C 199,106 ppm) im ^{13}C -Spektrum indizierte ein Keton. 1D-TOCSY-NMR-Untersuchungen der Spin-Systeme von Position C-7 und C-10 wiesen auf keine Verbindung zu C-8 (Ketogruppe) hin, dafür aber Korrelationen zu den Doppelbindungen C-9,10 und C-4,5 (Abb. 27).

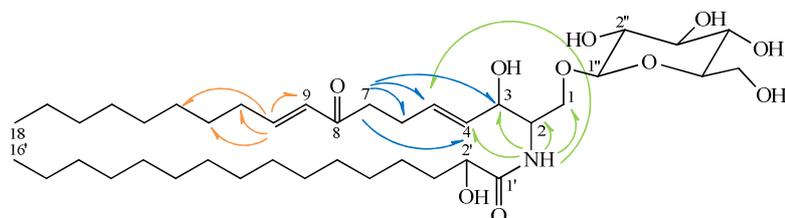


Abb. 27: 1D-TOCSY-Korrelationen von Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (4)

Für das GlyCer der Fraktion A1-1 wurde die Struktur Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**4**) ermittelt. Dies war das einzig detektierbare GlyCer dieser Klasse. Die ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen des GlyCer sind in Tab. 37 aufgeführt.

Tab. 37: ¹H-, ¹³C-chemische Verschiebungen von Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**4**, Pyridin-d₅)

^a – ¹H-chemische Verschiebungen aus HSQC-Korrelationen,
^b – ¹H-chemische Verschiebungen aus TOCSY-Korrelationen,
^c – Signale sind innerhalb der Spalte austauschbar

Position	δ _H [ppm] (M, J [Hz])	δ _C [ppm]
<i>Sphingobase</i>		
1a	4,721 (dd, 10,6; 5,8)	70,13
1b	4,260 ^a (m)	-
2	4,818 (m)	54,60
3	4,768 (m)	72,26
4	6,042 (dd, 15,5; 6,1)	132,45
5	5,981 (dt, 15,5; 6,2)	131,29
6	2,494 (m)	27,10
7	2,719 (m)	39,59
8	-	199,11
9	6,222 (dt, 16,0; 1,5)	130,72
10	6,936 (dt, 16,0; 6,9)	147,32
11	2,131 (m)	32,64
12	1,379 ^a (m)	28,39
13-16	1,265 (m)	29,47-30,05
16	-	32,07-32,15
17	1,265 (m)	22,93-22,97
18	0,873 (td, 7,2; 7,1; 2,6)	14,31-14,29
NH	8,382 (d, 9,0)	-
<i>Fettsäure</i>		
1'	-	175,65
2'	4,591 (dd, 8,1; 3,8)	72,49
3'a	2,223 (m)	35,69
3'b	2,022 (m)	-
4'a	1,812 (m)	25,96
4'b	1,737 (m)	-
5'	1,410 ^b (m)	29,47-30,05
6'-14'	1,265 (m)	29,47-30,05
14'	-	32,07-32,15
15'	1,265 (m)	22,93-22,97
16'	0,873 (td, 7,2; 7,1; 2,6)	14, 29-14, 31
<i>Zucker</i>		
1''	4,939 (d, 7,9)	105,71
2''	4,050 (m)	75,16
3'' ^c	4,232 ^a (m)	78,51
4'' ^c	4,240 ^a (m)	71,55
5''	3,931 (m)	78,62
6''a	4,534 (dd, 11,8; 2,5)	62,69
6''b	4,377 (dd, 11,8; 5,4)	-

Glc-8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (Malusid II, **1**) und **Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0** (Malusid III, **2**)

Zwei weitere neue GlyCer (**1**, **2**) wurden in der Fraktion A1-2 (2,7 mg) als Gemisch gewonnen. Anhand der modifizierten LC-MS-Methode wurden sie retentionsverschoben mit der gleichen *m/z* 730,5 (als extrahierte Ionen) nachgewiesen (Abb. 25). Zusammen in einer Fraktion

vorliegend konnten die GlyCer massenspektrometrisch nicht unterschieden werden. Das ESI-HRMS-Spektrum wies mit der Summenformel $C_{40}H_{75}NO_{10}$ ($[M+Na]^+$ m/z 752,5273, berechnet als $C_{40}H_{75}NO_{10}Na^+$ m/z 752,5283) auf eine Verwandtschaft zu Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**, $C_{40}H_{73}NO_{10}Na$) hin. Die Fettsäure (h16:0) wurde im negativen MS/MS-Massenspektrum mit U (m/z 271,4; $[M-C_6H_{10}O_5-C_{18}H_{31}O_3-H]$) als h16:0 bestimmt. Neben Y_0 und Z_0 (Abb. A18) wurde ein Fragment Z_0' (m/z 530,4; $[M-C_6H_{10}O_5-2H_2O-H]$) detektiert und indizierte eine zusätzliche Hydroxygruppe im Molekül. Die MS/MS-Fragmente O (m/z 498,3; $[M-C_{16}H_{30}O_2+Na]^+$), E (m/z 303,1; $[M-C_6H_{10}O_5-C_{16}H_{31}O_2N-H_2O+Na]^+$) und F (m/z 465,2; $[M-C_{16}H_{31}O_2N-H_2O+Na]^+$) ließen auf einen Unterschied (+2 amu) innerhalb der Sphingobase gegenüber Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**) schließen (Tab. 32, Abb. A18). Mit einem Doppelbindungsäquivalent von 4 wurde der molekulare Unterschied zur Verbindung Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**) in Form einer Doppelbindung identifiziert – die Reduktion der Ketogruppe. Dies wurde mit 1D- und 2D-NMR-Untersuchungen bestätigt (Abb. 28, Abb. A34).

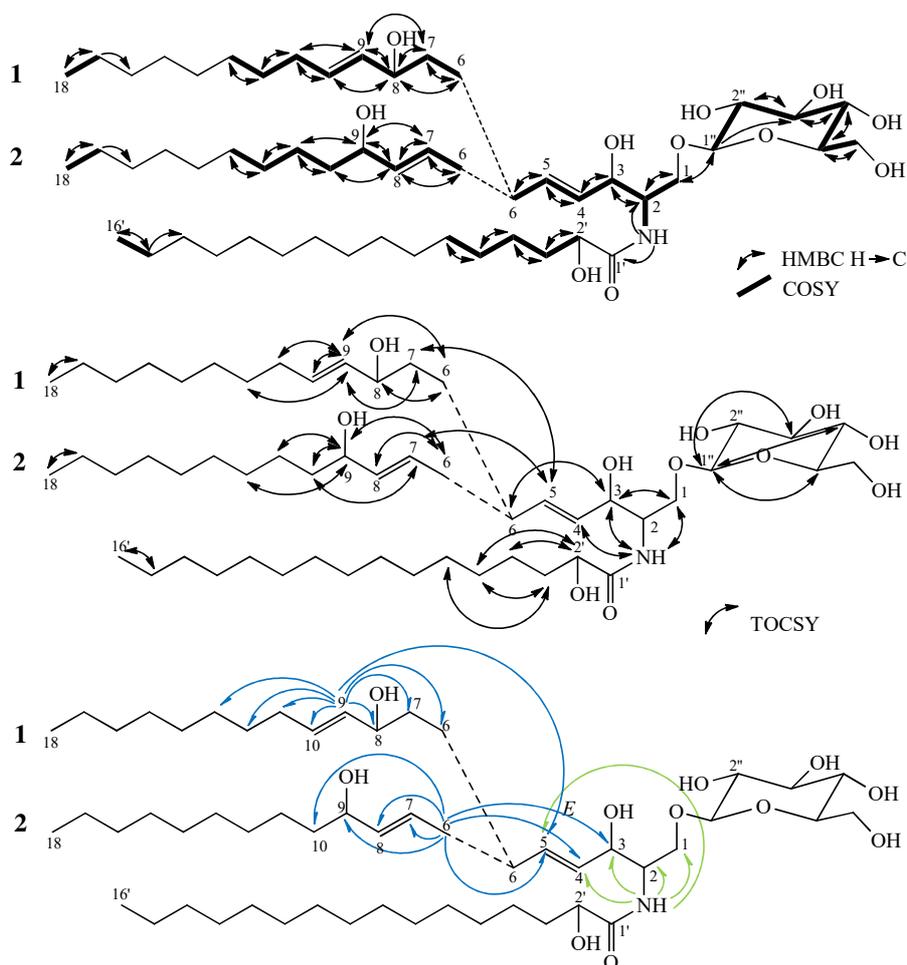


Abb. 28: 2D- und 1D-TOCSY-Korrelationen von Glc-8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**1**) und Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (**2**)

Weitere Korrelationen sind in Tab. A15-16 aufgeführt.

Für beide GlyCer wurde mit 1D- und 2D-TOCSY-Experimenten die gleiche Fettsäure (h16:0) und der gleiche Zucker (β -Glucose, $J = 7,8$ Hz) nachgewiesen (Abb. 28). Mithilfe der 1D-TOCSY-Methode wurden die Verbindungen nebeneinander identifiziert (Abb. 28, Abb. A37).

Tab. 38: ^1H -, ^{13}C -chemische Verschiebungen von Glc-8-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,9E}$ h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,7E}$ h16:0 (2, Pyridin- d_5)

^a – ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen aus HSQC-Korrelation

^b – ^1H -chemische Verschiebungen aus TOCSY-Korrelation

^c – Signale sind innerhalb der Zeile austauschbar

^d – Signale lagen übereinander

Position	8-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,9E}$ h16:0 (1)		9-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,7E}$ h16:0 (2)	
	δ_{H} [ppm] (M, J [Hz])	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm] (M, J [Hz])	δ_{C} [ppm]
Sphingobase				
1a	4,718 (m)	70,09 ^c	4,718 (m)	70,21 ^c
1b	4,253 ^a (m)	-	4,253 ^a (m)	-
2	4,832 (m)	54,65 ^c	4,832 (m)	54,60 ^c
3	4,794 (m)	72,28	4,794 (m)	72,28
4	6,048 (m)	131,84	6,045 (m)	132,71
5	6,045 (m)	132,71	5,979 ^a (m)	130,72
6a	2,456 ^a (m)	29,18 ^a	2,907 (t, 6,1)	35,48
6b	2,416 ^a (m)	-	-	-
7a	1,941 ^a (m)	38,07	5,882 (m)	136,66
7b	1,850 ^b (m)	-	-	-
8	4,420 ^a (m)	71,70	5,893 ^a (m)	127,80
9	5,787 (dd, 15,4; 6,3)	135,22 ^a	4,394 ^a (m)	72,14
10a	5,851 ^a (m)	130,33	1,694 ^a (m)	38,52
10b	-	-	1,810 ^b (m)	-
11	2,094 (m)	32,70	1,561 (m)	26,30
12	1,384 (m)	29,55-30,16	1,384 (m)	29,55-30,16
13-16	1,243 (m)	29,55-30,16	1,243 (m)	29,55-30,16
16	-	32,12-32,15	-	32,12-32,15
17	1,243 (m)	22,95-22,97	1,243 (m)	22,95-22,97
18	0,869 (m)	14, 31	0,869 (m)	14, 31
NH	8,387 (d, 8,7)	-	8,387 (d, 8,7)	-
Fettsäure				
1'	-	175,69	-	175,69
2'	4,592 (dd, 8,1; 3,7)	72,53	4,592 (dd, 8,1; 3,7)	72,53
3'a	2,229 (m)	35,67	2,229 (m)	35,67
3'b	2,032 (m)	-	2,032 (m)	-
4'a	1,817 ^a (m)	25,98	1,817 ^a (m)	25,98
4'b	1,728 ^a (m)	-	1,728 ^a (m)	-
5'	1,384 (m)	29,55-30,16	1,384 (m)	29,55-30,16
6'-14'	1,243 (m)	29,55-30,16	1,243 (m)	29,55-30,16
14'	-	32,12-32,15	-	32,12-32,15
15'	1,243 (m)	22,95-22,97	1,243 (m)	22,95-22,97
16'	0,869 (m)	14, 31	0,869 (m)	14, 31
Zucker				
1''	4,934 ^c (d, 7,8)	105,71 ^c	4,931 ^c (d, 7,8)	105,68 ^c
2''	4,052 (m)	75,17	4,052 (m)	75,17
3'' ^d	4,233 ^a (m)	78,51 ^c	4,233 ^a (m)	78,49 ^c
4'' ^d	4,239 ^a (m)	71,53	4,239 ^a (m)	71,55
5''	3,925 (m)	78,61	3,925 (m)	78,61
6''a	4,530 (m)	62,68	4,530 (m)	62,68
6''b	4,374 (m)	-	4,374 (m)	-

Die Untersuchungen der Spin-Systeme von zwei Signalen des jeweiligen GlyCer (H-9 von Glc-8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**1**) und H-6 von Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (**2**)) wiesen die Signale bis zur Position C-5 der Sphingobase nach (Abb. 28). Eine Veränderung innerhalb der Sphingobase trat erst ab Position C-7 auf. Während für Glc-8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**1**, Malusid II) eine Methylengruppe (C-7), eine Hydroxygruppe (C-8) und schließlich eine Doppelbindung (C-9,10) detektiert wurde, ist für Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (**2**, Malusid III) dagegen bereits an Position C-7,8 eine Doppelbindung und darauffolgend die Hydroxygruppe (C-9) identifiziert worden (Abb. 28-29). Das molekulare Verhältnis der Verbindungen **1** und **2** wurde mittels NMR mit ca. 2:3 festgestellt. Die Stereozentren konnten aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht bestimmt werden. Die ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen sind in Tab. 38 aufgeführt.

Glc-2OH-d18:2 h16/22/24:0 (3/13/25) und Glc-OH-t18:1 h22/24:0 (10/18)

Zwei weitere neue GlyCer-Klassen mit mehreren Vertretern wurden innerhalb der Apfeltresterfraktionen (A1, A4-A7) massenspektrometrisch detektiert und die Strukturen auf Grundlage bekannter GlyCer vorgeschlagen. Summenformeln wurden mit ESI-HRMS-Daten erhoben (Tab. 31). Diese und die Doppelbindungsäquivalente von 3 und 4 sprachen für einen grundsätzlich ähnlichen Aufbau der GlyCer vom Sphingadienin (d18:2, 4 DBE)- und Phytosphingenin (t18:1, 3 DBE)-Typ. Für beide GlyCer-Klassen sind 11 Sauerstoffatome berechnet worden, was auf zusätzliche Hydroxygruppen im Vergleich zu den identifizierten GlyCer vom Sphingadienin (d18:2, insgesamt 9 Sauerstoffatome bzw. OH-d18:2, insgesamt 10 Sauerstoffatome)- und Phytosphingenin (t18:1, insgesamt 10 Sauerstoffatome)-Typ hinwies. Anhand der vorliegenden MS/MS-Fragmentierung wurden die Fettsäure (α -hydroxyliert, gesättigt; U [M-Zucker-LCB-H]⁺) und der Zuckerteil (Hexose, Y₀ [M-Zucker-H]⁺, Z₀ [M-Zucker-H₂O-H]⁺) für zusätzliche Hydroxylierungen ausgeschlossen (Abb. A18).

Anhand der *m/z*-Zunahme (+16 amu gegenüber OH-d18:2-Typ) charakteristischer Fragmente (O (*m/z* 514,3; [M-acyl+Na]⁺), E (*m/z* 319,1; [M-Zucker-acyl-H₂O+Na]⁺) und F (*m/z* 481,2; [M-acyl-H₂O+Na]⁺)) wurde eine zusätzliche Hydroxygruppe innerhalb der Sphingobase nachgewiesen. Zusätzlich zu den Fragmenten Y₀, Z₀ und Z₀' (vgl. Glc-d18:2 h16 (**7**), Abb. A18) wurde außerdem eine weitere Wasserabspaltung (-18 amu, Z₀'' [M-Zucker-3H₂O-H]⁺) im negativen Ionenmodus detektiert. Die Sphingobasenklasse wurde als 2OH-Sphingadienin-Typ (2OH-d18:2) bezeichnet, wobei die Position der Hydroxygruppen nicht bestimmt werden konnte. Es wurden die GlyCer Glc-2OH-d18:2 h16:0 (**3**), Glc-2OH-d18:2 h22:0 (**13**) und Glc-2OH-d18:2 h24:0 (**25**) identifiziert.

Für eine weitere GlyCer-Klasse wurde aufgrund der *m/z*-Differenz von +16 amu gegenüber der GlyCer-Klasse vom Phytosphingenin (t18:1)-Typ in charakteristischen Fragmenten (Y₀, Z₀, O (*m/z* 516,4; [M-acyl+Na]⁺), E (*m/z* 321,1; [M-Zucker-acyl-H₂O+Na]⁺) und F (*m/z* 483,2; [M-acyl-H₂O+Na]⁺)) die Sphingobase als veränderter Molekülteil identifiziert (Abb. A18).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine neue GlyCer-Klasse in Anlehnung an den Phytosphingenin (t18:1)-Typ als OH-t18:1 etabliert. Es wurden die GlyCer Glc-OH-t18:1 h22:0 (**10**) und Glc-OH-t18:1 h24:0 (**18**) identifiziert. Die Positionen der zusätzlichen Hydroxygruppen konnten nicht bestimmt werden. NMR-Daten liegen für diese neuen GlyCer-Klassen nicht vor, da sie nur in Spuren isoliert worden sind.

4.2.9 HPLC-MS zur Identifizierung von Glycosylceramiden

Die Parameter der HPLC-MS wurden empirisch mit einer Referenzsubstanz (Glc-d18:2 h16:0 (**7**, Sojabohnen), 10 µg/ml) erhoben. Zusammen mit den Ergebnissen der ESI-HRMS (4.2.2), ESI-MS/MS (4.2.3) und NMR-Experimenten (4.2.4) wurden insgesamt 46 GlyCer identifiziert. GlyCer wurden im positiven Ionenmodus als $[M+H]^+$ -Ionen nachgewiesen (Abb. 29). Für die meisten Verbindungen wurde außerdem das Aglycon ($[M-162+H]^+$) nachgewiesen. Eine Basislinientrennung aller GlyCer wurde mit den verwendeten Bedingungen nicht erreicht. In den Fraktionen befanden sich bis zu sechs GlyCer. Aufgrund der massenspektrometrischen Detektion und den Retentionszeiten wurden diese identifiziert und unterschieden.

Im Apfeltrester wurden 23 GlyCer nachgewiesen (Abb. 29). Die detektierten Sphingobasen waren vom Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typ. Zudem fanden sich weitere neuartige Sphingobasen (8-keto-d18:2, 8/9-OH-d18:2, 2OH-d18:2, OH-t18:1), welche teilweise nur als Spuren nachweisbar waren. Die detektierten Fettsäurekettenlängen variierten zwischen C15 und C26. Die Fettsäuren waren gesättigt und α -hydroxyliert.

Die Fraktionen der Weizenkeime wiesen 35 GlyCer auf. Ihre Sphingobasen waren hauptsächlich vom Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typ. Weitere Sphingobasen wurden als Sphingenin (d18:1)- und Sphingatrienin (d18:3)-Typ identifiziert. Fettsäuren sind mit Kettenlängen von C16 bis C28 und als gesättigt sowie einfach oder in einem Fall zweifach ungesättigt nachgewiesen worden. Alle Fettsäuren waren α -hydroxyliert.

Das GlyCer-Spektrum des Kaffeesatzes war im Gegensatz zu Apfeltrester und Weizenkeimen weniger komplex (7 GlyCer). Es trat nur der Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typ sowie Fettsäurekettenlängen von C16-C25 auf, die α -hydroxyliert und gesättigt vorlagen.

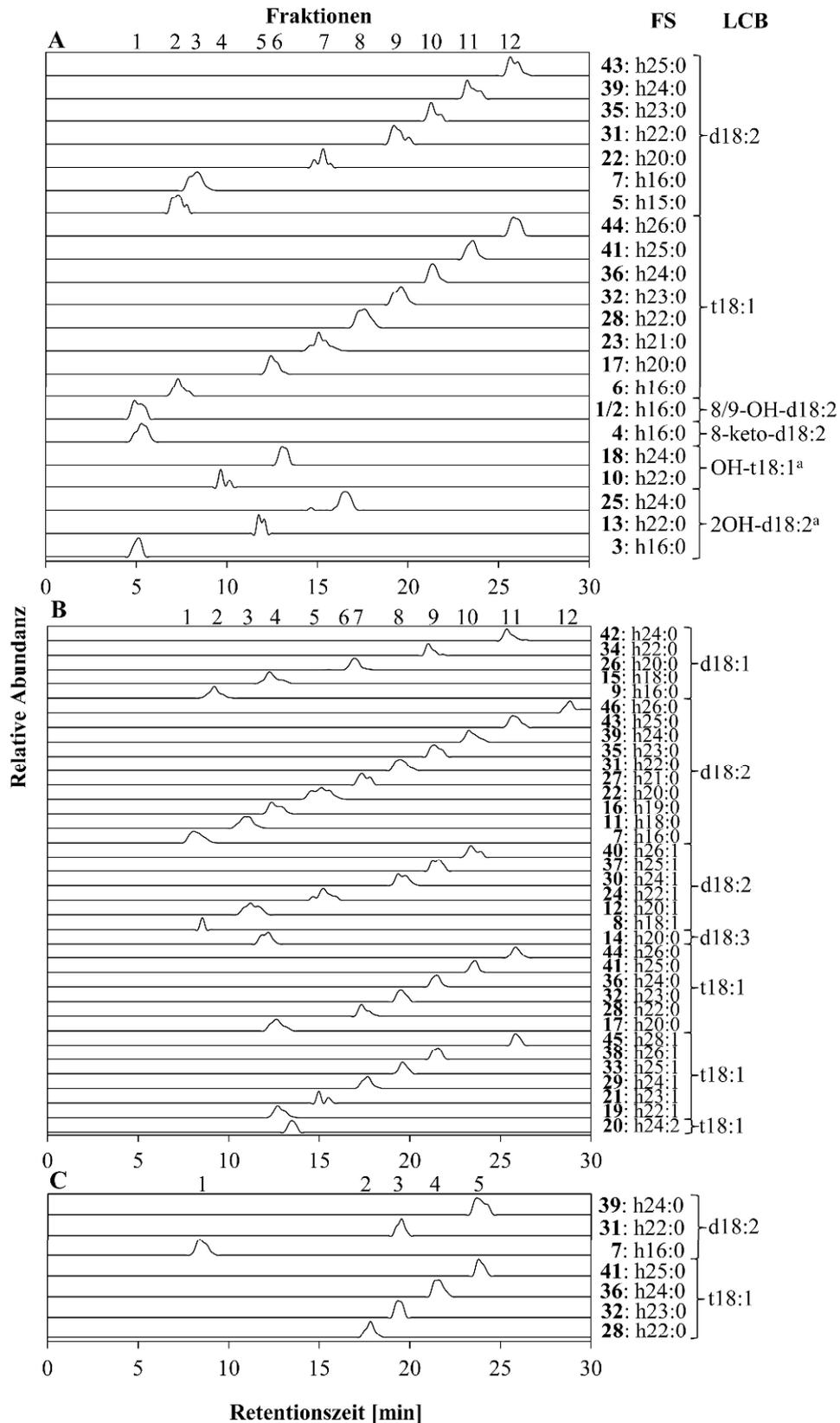


Abb. 29: HPLC-MS der Glycosylceramide des Apfeltresters (A), der Weizenkeime (B) und des Kaffeesatzes (C)

Nomenklatur (Glc-Sphingobase Fettsäure, z.B. Glc-d18:2 h16:0 (7)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, OH – Hydroxygruppe, keto – Ketogruppe, h – α -hydroxy. ^a – Strukturvorschläge, FS – Fettsäure, LCB – Sphingobase

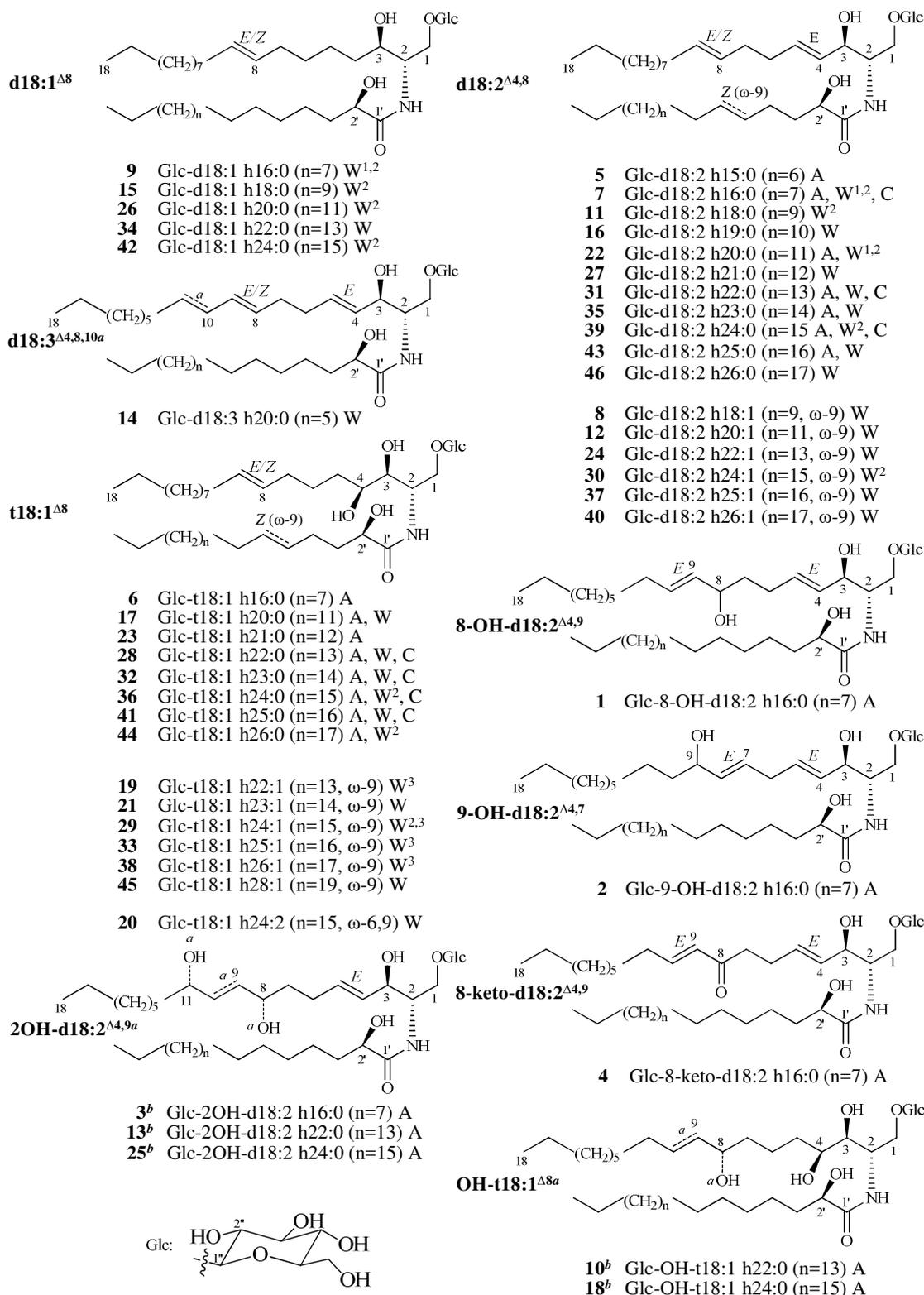


Abb. 30: Identifizierte Glycosylceramide aus Apfeltrester (A), Weizenkeimen (W) und Kaffeesatz (C)

Bekannte Strukturen des Weizen sind angegeben: ¹ – Sullards *et al.*, 2000; ² – Zhu *et al.*, 2013; ³ – Imai *et al.*, 1995. Intakte GlyCer wurden bisher nicht für Apfeltrester und Kaffeesatz beschrieben. Nomenklatur (Glc-Sphingobase Fettsäure, z.B. Glc-d18:2 h16:0 (7)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, OH – Hydroxygruppe, keto – Keto-Gruppe, h – α -hydroxy. ^a – Position nicht bestimmt, ^b – Strukturvorschlag;

4.2.10 Überblick über identifizierte Glycosylceramide

Die GlyCer wurden mithilfe unterschiedlicher analytischer Methoden (LC-MS, ESI-HRMS, ESI-MS/MS, NMR) strukturell aufgeklärt. Insgesamt wurden 46 GlyCer (**1-46**) identifiziert (Abb. 30). Davon sind 8 GlyCer (**1-4, 10, 13, 18, 25**) bisher nicht beschrieben worden.

Die GlyCer waren hauptsächlich aus drei Sphingobasen aufgebaut: Sphingadienin (d18:2), Sphingenin (d18:1) und Phytosphingenin (t18:1). Sphingenin (d18:1) wurde nur in Weizenkeimen nachgewiesen. Neue detektierte Sphingobasen (8/9-OH-d18:2, 8-keto-d18:2, 2OH-d18:2 und OH-t18:1) leiteten sich von den bekannten Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typen ab. Sie enthielten zusätzliche Hydroxy- oder Ketogruppen. Die verknüpften Fettsäuren hatten Kettenlängen von C15 bis C28 und waren α -hydroxyliert. Sie traten sowohl in geraden und ungeraden Kettenlängen als auch gesättigt und einfach bzw. zweifach ungesättigt auf. Die einfach ungesättigten Fettsäuren waren vom ω -9-Typ (*Z*) und wurden nur in Weizenkeimen nachgewiesen. Die häufigsten Fettsäuren waren h16:0, h22:0 und h24:0. Diese wurden in allen Pflanzenmaterialien nachgewiesen. Für alle isolierten GlyCer ist eine β -Glucose als Zuckereinheit nachgewiesen worden. Im Allgemeinen hatten Weizenkeime ein größeres GlyCer-Spektrum als Apfeltrester und Kaffeesatz.

4.3 Hydrolyse pflanzlicher Glycosylceramide

4.3.1 Entwicklung unterschiedlicher Hydrolysemethoden

Eine saure Hydrolyse und eine oxidative Reduktionshydrolyse (Iga *et al.*, 2011) wurden als chemische Hydrolysen pflanzlicher GlyCer zu „Phyto“-Cer untersucht. Außerdem sind enzymatische Hydrolysen mit einer unspezifischen β -Glucosidase (aus Mandeln) und einer spezifischen Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®) getestet worden. Für die Experimente wurden drei GlyCer genutzt, die je eine spezifische GlyCer-Klasse repräsentierten:

Sphingadienin (d18:2)-Typ:	Glc-d18:2 h16:0 (7)
Sphingenin (d18:1)-Typ:	Glc-d18:1 h16:0 (9)
Phytosphingenin (t18:1)-Typ:	Glc-t18:1 h22:0 (28)

Chemische Hydrolyse mit HCl

Da eine chemische Hydrolyse mit Salzsäure (HCl) etabliert werden sollte, wurden Versuchsansätze basierend auf der Veränderung von Temperatur (35, 60 und 90 °C), Zeit (1, 6 und 12 h) und Konzentration (1 M) getestet.

Die TLC-Ergebnisse sind in Abb. 31 dargestellt. In den TLC-Chromatogrammen der drei Verbindungen (**7, 9, 28**) ließ sich erkennen, dass bei Verwendung von 1M HCl mit zunehmender Temperatur und längerer Inkubation GlyCer hydrolysiert wurden (Bandenintensität nahm ab). Während bei 35 °C und 12 h die GlyCer-Bande intensiv war, wurde sie bei 90 °C und 1 h nicht mehr nachgewiesen. Die Abhängigkeit der Hydrolysedauer

und Temperatur wurde für den Verlauf bei 60 °C veranschaulicht. Für alle Verbindungen ließ sich mit zunehmender Dauer (6 und 12 h) eine Verringerung der GlyCer-Bande und das Auftreten neuer Banden (niedrigere und höhere R_f-Werte) feststellen. Obwohl auf Höhe der Cer-Referenz Banden nachweisbar waren, entsprachen diese nicht den hydrolysierten Cer.

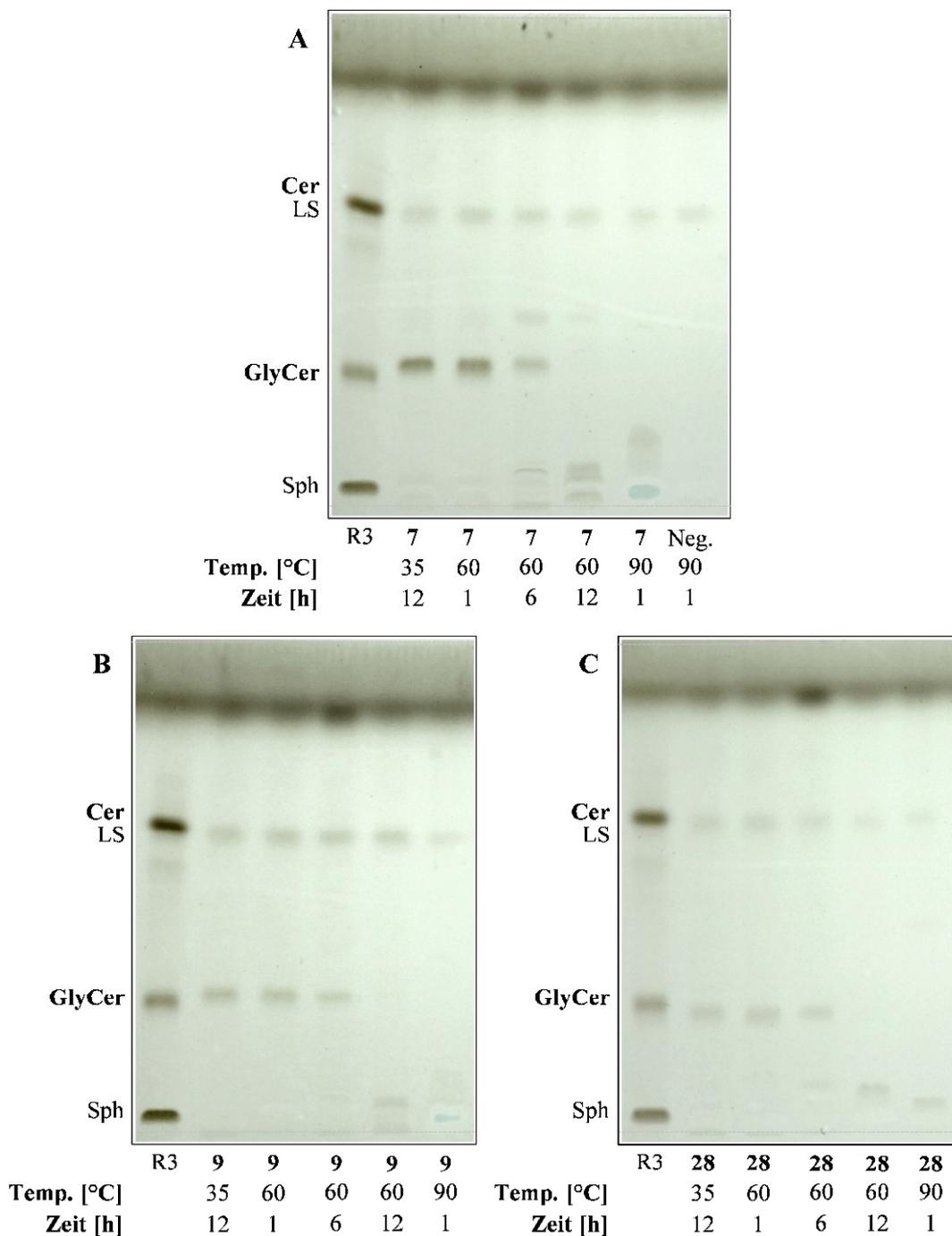


Abb. 31: TLC der sauren (HCl) Hydrolyse

Glc-d18:2 h16:0 (7, A), Glc-d18:1 h16:0 (9, B), Glc-t18:1 h22:0 (28, C),
 R3 – Referenzlösung 3: Cer – Ceramid (d18:2 h16:0 (47), Apfeltrester),
 LS – Linolsäure, GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7),
 Sojabohnen), Sph – Sphingosin (d18:1); Neg. – Negativkontrolle
 (Methanol)

Eine Negativkontrolle (Methanol) zeigte, dass diese Banden aufgrund von Verunreinigungen (Reaktionsgefäße und Lösungsmittel) infolge des Durchführungsprozesses auftraten. Diese hatten ähnliche R_f -Werte wie die Cer-Referenz und wiesen in allen Proben gleiche Intensitäten auf. Die massenspektrometrische Analyse zeigte ebenfalls kein Cer. Zusammenfassend wurden GlyCer bei den verwendeten Bedingungen hydrolysiert, jedoch nicht zu Cer.

Zur weiteren Aufklärung des Reaktionsverlaufes wurden die Proben der Versuchsreihen (bei 60 °C, für 1, 6 und 12 h) einer AMD-HPTLC-Analyse unterzogen (Abb. 32). Es war zu erkennen, dass bei der kürzesten Expositionsdauer von 1 h keine Reaktion abgelaufen ist. Die zusätzlich zur GlyCer-Bande detektierten Banden (z.B. auf Höhe der Linolsäure) lagen in der Durchführung begründet. Nach 6 h waren bei allen getesteten Verbindungen weitere Banden neben der GlyCer-Bande (unter Abnahme der Intensität dieser) erkennbar. Jedoch trat keine Bande auf Höhe der Cer-Referenz auf. Nach insgesamt 12 h war die GlyCer-Bande kaum noch nachweisbar, was für die Umsetzung der GlyCer sprach. Allerdings erfolgte die Umsetzung nicht in Cer, sondern in andere unbekannte Derivate.

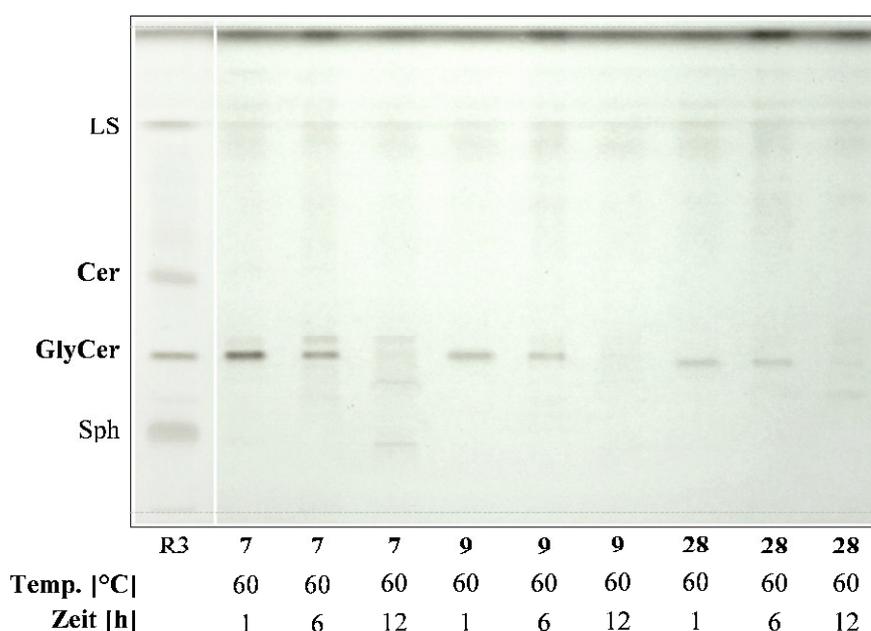


Abb. 32: AMD-HPTLC der sauren (HCl) Hydrolyse

Glc-d18:2 h16:0 (**7**, A), Glc-d18:1 h16:0 (**9**, B), Glc-t18:1 h22:0 (**28**, C), R3 – Referenzlösung 3: Cer – Ceramid (d18:2 h16:0 (**47**), Apfeltrester), LS – Linolsäure, GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Sojabohnen), Sph – Sphingosin (d18:1); Die abgebildete Referenz (R3) entsprach einem anderen Plattenausschnitt und wurde daher separat dargestellt.

Oxidative Reduktionshydrolyse mit HCl nach Iga *et al.*, 2011

Infolge der chemischen Hydrolyse nach Iga *et al.*, 2011, wurden bei allen drei Verbindungen (**7**, **9** und **28**) keine GlyCer nachgewiesen (Abb. 33). Dafür wurden Banden auf Höhe der Cer-Referenz mit ähnlichen R_f -Werten identifiziert, was für die Umsetzung der GlyCer in Cer und

Cer-Derivate sprach. Eine Negativkontrolle (Neg.) zeigte, dass die intensivsten Banden der Proben (Start und Laufmittelfront) auf Verunreinigungen (Reaktionsgefäße, Lösungsmittel) des Durchführungsprozesses zurückzuführen waren.

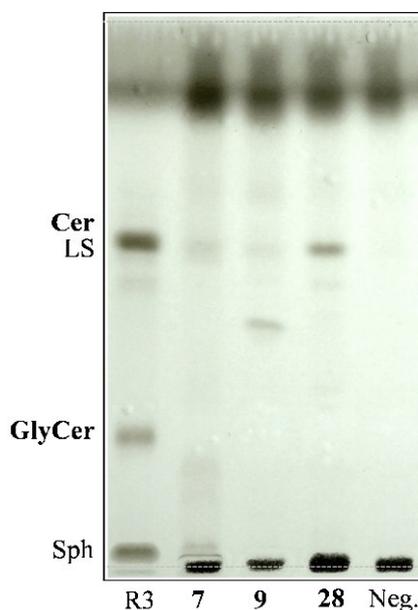


Abb. 33: TLC der chemischen Hydrolyse nach Iga *et al.*, 2011

Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-d18:1 h16:0 (**9**) und Glc-t18:1 h22:0 (**28**), R3 – Referenzlösung 3: Cer – Ceramid (d18:2 h16:0 (**47**), Apfeltrester), LS – Linolsäure, GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Sojabohnen), Sph – Sphingosin (d18:1), Neg. – Negativkontrolle (Methanol)

Das Ergebnis der Hydrolyse wurde massenspektrometrisch analysiert. In keiner der Fraktionen war GlyCer nachzuweisen. In Abb. 34 ist dargestellt, welche Cer und Zwischenverbindungen (als m/z) theoretisch zu erwarten waren und welche m/z -Zahlen tatsächlich detektiert worden sind. Im Fall der 1,3-Diol-Verbindungen (Glc-d18:1 h16:0 (**9**) und Glc-d18:2 h16:0 (**7**)) sind die entsprechenden Strukturen des Cer (m/z 574,4 und 576,6) detektiert worden.

Allerdings wurden auch Derivate identifiziert, bei denen es nicht zur Zuckerspaltung gekommen war (m/z 710,6 und 708,6). Diese stellten die zusätzlichen Banden des TLC-Chromatogramms dar (Abb. 33). Die untersuchte 1,3,4-Triol-Verbindung (Glc-t18:1 h22:0 (**28**)) zeigte ein anderes Bild. Obwohl auch hier das GlyCer nicht mehr nachweisbar war, konnte auch kein intaktes Cer detektiert werden. Aufgrund der benachbarten Hydroxygruppen (Position C-3,4 der Sphingobase) kam es mit dem eingesetzten Periodat zur 3,4-Diol-Spaltung. Ein derartig gespaltenes Molekül wurde in Form von m/z 584,4 nachgewiesen. Daraufhin folgte keine weitere Zuckerabspaltung (m/z 450,4 nicht detektiert).

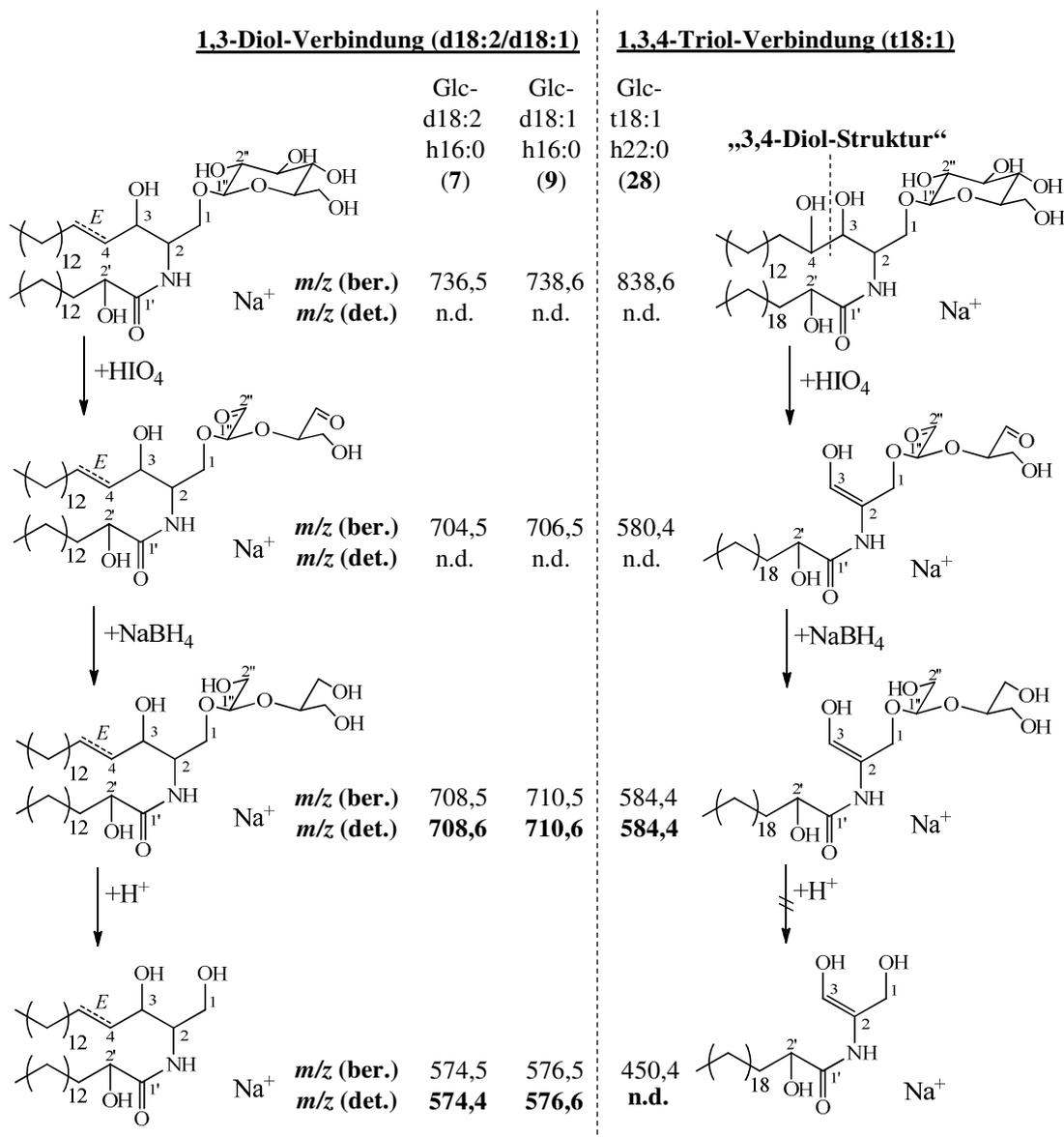


Abb. 34: ESI-MS-gestützter Reaktionsverlauf der oxidativen Reduktionshydrolyse

Glc – Glucose, d – dihydroxy, t – trihydroxy, ber. – berechnet, det. – detektiert

Enzymatische Hydrolyse mit β -Glucosidase (Mandeln)

Für eine enzymatische Hydrolyse stand eine unspezifische β -Glucosidase (Mandeln) zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 in Form von TLC-Chromatogrammen dargestellt und zeigen für jedes GlyCer (7, 9 und 28) eine Positiv- (aktives Enzym) und eine Negativ-Probe (inaktiviertes Enzym). Für alle Fraktionen war keine Bande auf Höhe der Cer-Referenz erkennbar. Auch die Intensität der GlyCer-Bande änderte sich nicht und ließ auf das Ausbleiben eines hydrolytischen Prozesses schließen. Die Umsetzung von Salicin zu Saligenin (nicht vollständig unter den gewählten Bedingungen) diente als Nachweis der Enzymaktivität.

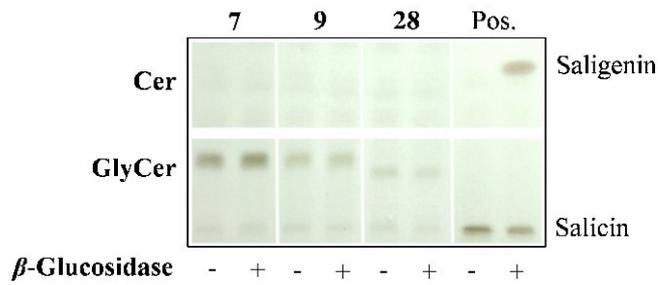


Abb. 35: TLC der enzymatischen Hydrolyse mit β -Glucosidase (Mandeln)
 Glc-d18:2 h16:0 (7), Glc-d18:1 h16:0 (9) und Glc-t18:1 h22:0 (28), Cer – Ceramid, GlyCer – Glycosylceramid, Pos. – Positivkontrolle, + – aktives Enzym eingesetzt, - – inaktiviertes Enzym eingesetzt

Enzymatische Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®)

Eine spezifische Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®) wurde für die enzymatische Umsetzung der GlyCer eingesetzt.

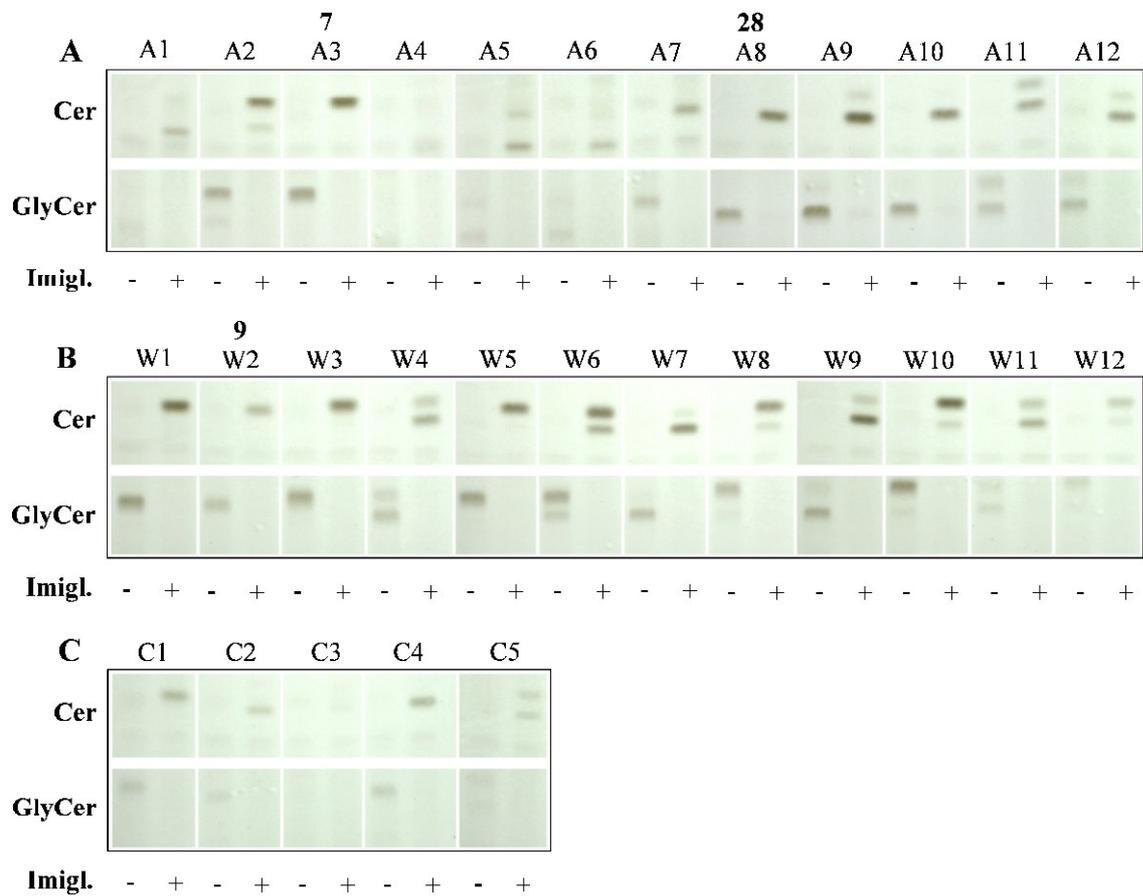


Abb. 36: TLC der enzymatischen Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®)
 Enzymatische Hydrolyse der Fraktionen des Apfeltresters (A), der Weizenkeime (B) und des Kaffeesatzes (C). Glc-d18:2 h16:0 (7), Glc-d18:1 h16:0 (9) und Glc-t18:1 h22:0 (28); Fraktionen enthalten bis zu sechs GlyCer. Cer – Ceramid, GlyCer – Glycosylceramid, A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, C – Kaffeesatz, + – aktives Enzym eingesetzt, - – inaktiviertes Enzym eingesetzt, Imigl. – Imiglucerase

Das verwendete Enzym war ein Fertigarzneimittel, das als Überrest einer Infusion eines Gaucher-Kranken erhalten wurde. Da es für dieses Fertigarzneimittel zwar eine Konzentrationsangabe von 40 U/ml (1 Unit Protein setzt 1,0 µmol para-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid (pNP-GLc) pro min bei 37 °C um) gibt, jedoch herstellungsbedingt keine chargenübergreifende Konzentration in mg/ml angegeben wird, wurde die Konzentration mithilfe der Bradford-Bestimmung (Bradford, 1976) und zusätzlich der photometrischen Proteinbestimmung (bei 280 nm) ermittelt (Tab. A4). Anhand der Kalibrierfunktion der Bradford-Bestimmung ist für die vorliegende enzymatische Lösung (als 1:20-Verdünnung) eine Konzentration von 1,05 mg/ml bestimmt worden. Das Ergebnis wurde mit der Konzentrationsbestimmung für Proteine bei 280 nm bestätigt (1,04 mg/ml, Tab. A4) und entsprach damit den Produktangaben (40 U entsprechen ca. 1 mg; 40 U/ml, European Medicines Agency, 2016). Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Konzentration von 1 mg/ml angenommen.

Zusätzlich zu den Leitsubstanzen (7, 9 und 28) wurden alle GlyCer-Fractionen (Apfeltrester A1-12, Weizenkeime W1-12, Kaffeesatz C1-5) der enzymatischen Hydrolyse mit Imiglucerase (Cerezyme®) unterzogen (Abb. 36). Das Enzym akzeptierte alle eingesetzten GlyCer mit unterschiedlichen Sphingobase- und Fettsäureresten als Substrat und spaltete den Zucker quantitativ ab. Während intensive Banden auf Höhe der GlyCer beim inaktivierten Enzym (-) zu erkennen waren, konnten beim aktiven Enzym (+) die entsprechenden Banden auf Höhe der Cer-Referenz nachgewiesen werden (Abb. 36). Da in einigen Fraktionen mehrere GlyCer vorkamen (z.B. A2, A5, A11, W4, W6, W11, C5, etc.), wurden diesen mehrere Cer-Banden mit unterschiedlichen R_f -Werten zugeordnet. Spurenverbindungen wurden nicht detektiert.

4.3.2 Umsetzung der Glycosylceramide in „Phyto“-Ceramide mit Imiglucerase

Drei GlyCer-Fractionen des Apfeltresters (A3: Glc-d18:2 h16:0 (7), A8: Glc-t18:1 h22:0 (28) und A10: Glc-t18:1 h24:0 (36)) wurden aufgrund ihrer Reinheit und vorhandenen Menge mit Imiglucerase (Cerezyme®) in „Phyto“-Cer hydrolysiert.

Die enzymatische Umsetzung mit Imiglucerase (Cerezyme®) verlief unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht quantitativ. Daher wurden 2 Durchgänge der Hydrolyse vollzogen.

Tab. 39: Gesamtmen gen der „Phyto“-Ceramide nach zwei Durchgängen der enzymatischer Hydrolyse

^a – zurückgerechnet als Anteil GlyCer

	d18:2 h16:0 (47)	t18:1 h22:0 (48)	t18:1 h24:0 (49)
Gesamtmenge [mg]	25,5	11,3	11,8
Anteil Ausgangsmenge ^a [%]	82,5	80,6	73,0

Nach der ersten Hydrolyse wurden 51 bis 74 % der GlyCer umgesetzt. Es wurden zwei Durchgänge der Hydrolyse durchgeführt, um die Ausbeute zu erhöhen. Es folgte eine Isolierung

der entstandenen Cer von nicht hydrolysierten GlyCer mittels Säulenchromatographie (3.2.1.7). Das rückgewonnene GlyCer wurde einer weiteren Hydrolyse ausgesetzt. Nach zweimaliger enzymatischer Hydrolyse der drei GlyCer wurde ein Umsatz von 73-83 % bestimmt (Tab. 39).

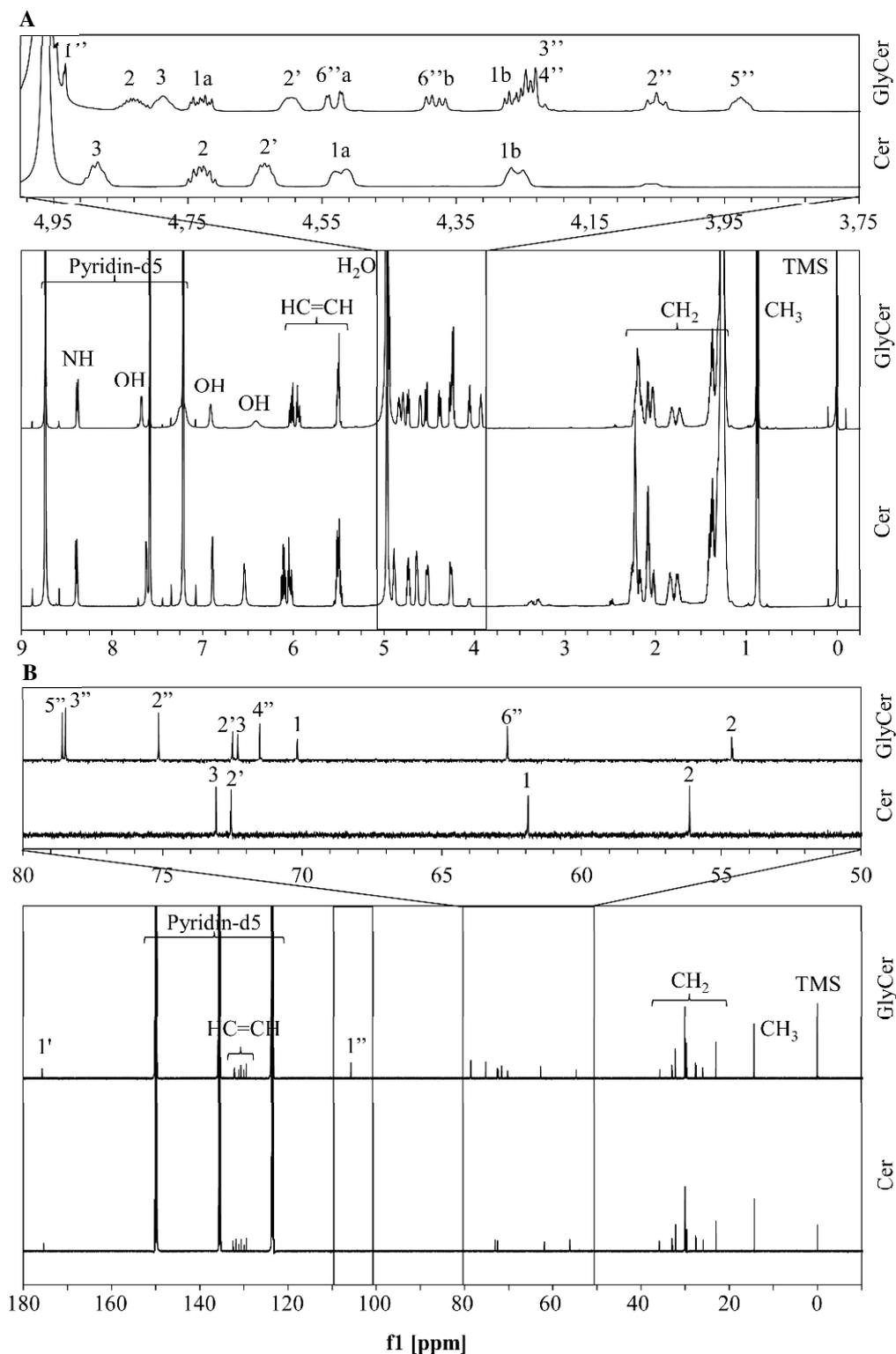


Abb. 37: Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von Glc-d18:2 ^{$\Delta^{4E,8E/Z}$} h16:0 (7) und d18:2 ^{$\Delta^{4E,8E/Z}$} h16:0 (47, Pyridin- d_5)

A: ^1H -NMR-Spektrum, B: ^{13}C -NMR-Spektrum, Cer – Ceramide, GlyCer – Glycosylceramid, referenziert auf TMS (0 ppm)

Als Nachweis der Zuckerabtrennung von der C-1-Position der GlyCer wurden die NMR-Spektren vor (GlyCer) und nach (Cer) der Hydrolyse verglichen. Dies ist in Abb. 37 für Glc-d18:2^{Δ^{AE,8EZ}} h16:0 (**7**) und in Abb. A44 für Glc-t18:1^{Δ^{8EZ}} h22:0 (**28**) (analog: Glc-t18:1^{Δ^{8EZ}} h24:0 (**36**)) dargestellt. In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass die Protonen und Kohlenstoffatome des Zuckers (C-1'' bis C-6'') nach der Hydrolyse nicht mehr nachweisbar waren. Dafür kam es zu einer Veränderung der chemischen Verschiebung der H- und C-Signale (C-1, C-2, C-3 und C-2') in unmittelbarer Umgebung der C-1-Position.

Um den nach der enzymatischen Hydrolyse abgetrennten und in der wässrigen Phase gelösten (3.2.1.6) Zucker nachzuweisen, wurde eine TLC-Methode (3.2.3.5) verwendet. Abb. 38 zeigt die Zucker nach Hydrolyse von Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**). Zum Vergleich sind die Zucker D-Mannose, L-Rhamnose, D-Fructose, D-Galactose und D-Glucose aufgetragen. Sie zeigten neben unterschiedlichen R_f-Werten auch teilweise andere Färbungen der Banden. Für alle drei Fraktionen (A3, A8 und A10) wurde D-Glucose als abgetrennter Zucker nachgewiesen.

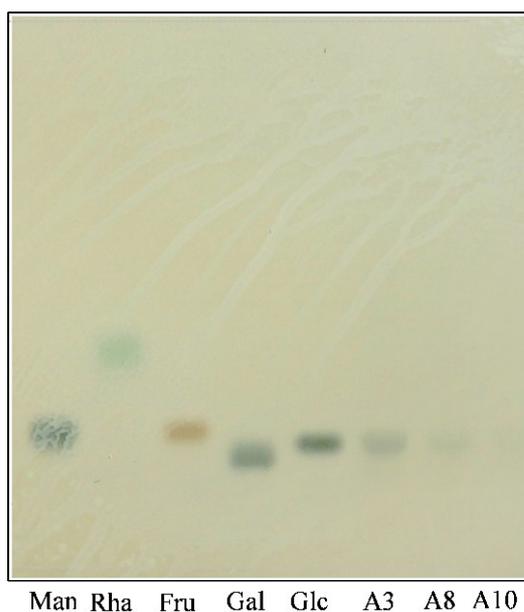


Abb. 38: Zuckernachweis der hydrolysierten Glycosylceramide

A3: Zucker von Glc-d18:2 h16:0 (**7**), A8: Zucker von Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und A10: Zucker von Glc-t18:1 h24:0 (**36**); Man – Mannose, Rha – Rhamnose, Fru – Fructose, Gal – Galactose, Glc – Glucose

4.3.3 Strukturnachweis der „Phyto“-Ceramide

Die Struktur der produzierten „Phyto“-Cer wurde mit denselben Methoden (ESI-HRMS, ESI-MS/MS, LC-MS, NMR, siehe 3.2.3) wie für GlyCer aufgeklärt. ESI-HRMS-Messungen gaben Hinweise auf die Summenformeln (Tab. 40). Die Cer waren als Natrium-Addukte [M+Na]⁺ detektierbar und wiesen Fehler $\leq 0,5677$ ppm auf. Anhand der Summenformeln wurde

festgestellt, dass während der Hydrolyse ein Verlust von C₆H₁₀O₅ (*m/z* -162 amu = Zucker) aufgetreten ist, was der Zuckerkopfgruppe des GlyCer entsprach.

Tab. 40: ESI-HRMS der hydrolysierten „Phyto“-Ceramide

Cer – Ceramid, DBE – Doppelbindungsäquivalente, ¹ – berechnet mit ChemCalc (Patiny und Borel, 2013); Nomenklatur (Sphingobase Fettsäure, z.B. d18:2 h16:0 (47)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, h – α -hydroxy

„Phyto“-Cer	<i>m/z</i> (det.) [M+Na] ⁺	<i>m/z</i> (ber.) ¹ [M+Na] ⁺	Summen- formel für [M+Na] ⁺	Fehler [ppm]	DBE
d18:2 h16:0 (47)	574,4810	574,4811	C ₃₄ H ₆₅ NO ₄ Na	0,1741	3
t18:1 h22:0 (48)	676,5853	676,5856	C ₄₀ H ₇₉ NO ₅ Na	0,4434	2
t18:1 h24:0 (49)	704,6165	704,6169	C ₄₂ H ₈₃ NO ₅ Na	0,5677	2

LC-MS-Untersuchungen zeigten nach APCI im Positivmodus [M+H]⁺- und [M-H₂O+H]⁺-Ionen sowie aufgrund der Zuckerabspaltung Retentionszeitverschiebungen im Gegensatz zu GlyCer (Tab. 41). Durch ESI-MS/MS-Experimente wurde die Struktur der Cer nachgewiesen (Tab. 41). Die Cer sind unter Verwendung der gleichen Ionisierungsparameter (3.2.3.2) wie GlyCer als Natriumaddukte [M+Na]⁺ im positiven Ionenmodus und als [M-H]⁻-Ionen im Negativmodus nachgewiesen worden.

Tab. 41: LC-MS- und ESI-MS/MS-Identifizierung der hydrolysierten „Phyto“-Ceramide

Nomenklatur (Sphingobase Fettsäure, z.B. d18:2 h16:0 (47)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, h – α -hydroxy

„Phyto“-Cer	LC-APCI/MS			ESI-MS/MS			
	RT [min]	<i>m/z</i>		<i>m/z</i>			
		[M+ H] ⁺	[M- 18+ H] ⁺	MS ¹ [M+ Na] ⁺	MS ² (O) [M-acyl+ Na] ⁺	MS ¹ [M-H] ⁻	MS ² (U) [M- LCB-H] ⁻
d18:2 h16:0 (47)	9,9	552,5	534,5	574,5	320,2	550,6	271,5
t18:1 h22:0 (48)	21,1	654,6	636,5	676,6	338,1	652,6	355,5
t18:1 h24:0 (49)	24,6	682,7	664,5	704,6	338,1	680,6	383,5

Vorgeschlagene MS/MS-Fragmentierungsmuster für d18:2 h16:0 (47) und t18:1 h22:0 (48) sind in Abb. 39 angegeben. Im Gegensatz zu den Fragmentierungserscheinungen der GlyCer (siehe 4.2.3) wurden unter Verwendung der gleichen Parameter teilweise sehr unterschiedliche Fragmente detektiert. Im positiven Ionenmodus konnte neben dem Fragment M' ([M-H₂O+Na]⁺) nur O ([M-acyl+Na]⁺) als weiteres nachgewiesen werden, welches allerdings charakteristisch für die jeweilige Sphingobase (d18:2, *m/z* 320,2; t18:1, *m/z* 338,1) war.

Im negativen Ionenmodus wurden dagegen weitere Fragmente analysiert. So traten intakte Cer-Fragmente wie M' ([M-H₂O-H]⁻), M'' ([M-2H₂O-H]⁻), a ([M-32]⁻) und b ([M-48]⁻) auf. Während unter den gewählten Bedingungen für GlyCer im negativen Ionenmodus keine Sphingobasen-spezifischen Ionen detektiert wurden, waren für Cer die Ionen O ([M-acyl-H]⁻; d18:2, *m/z* 296,4; t18:1, *m/z* 314,2) nachweisbar.

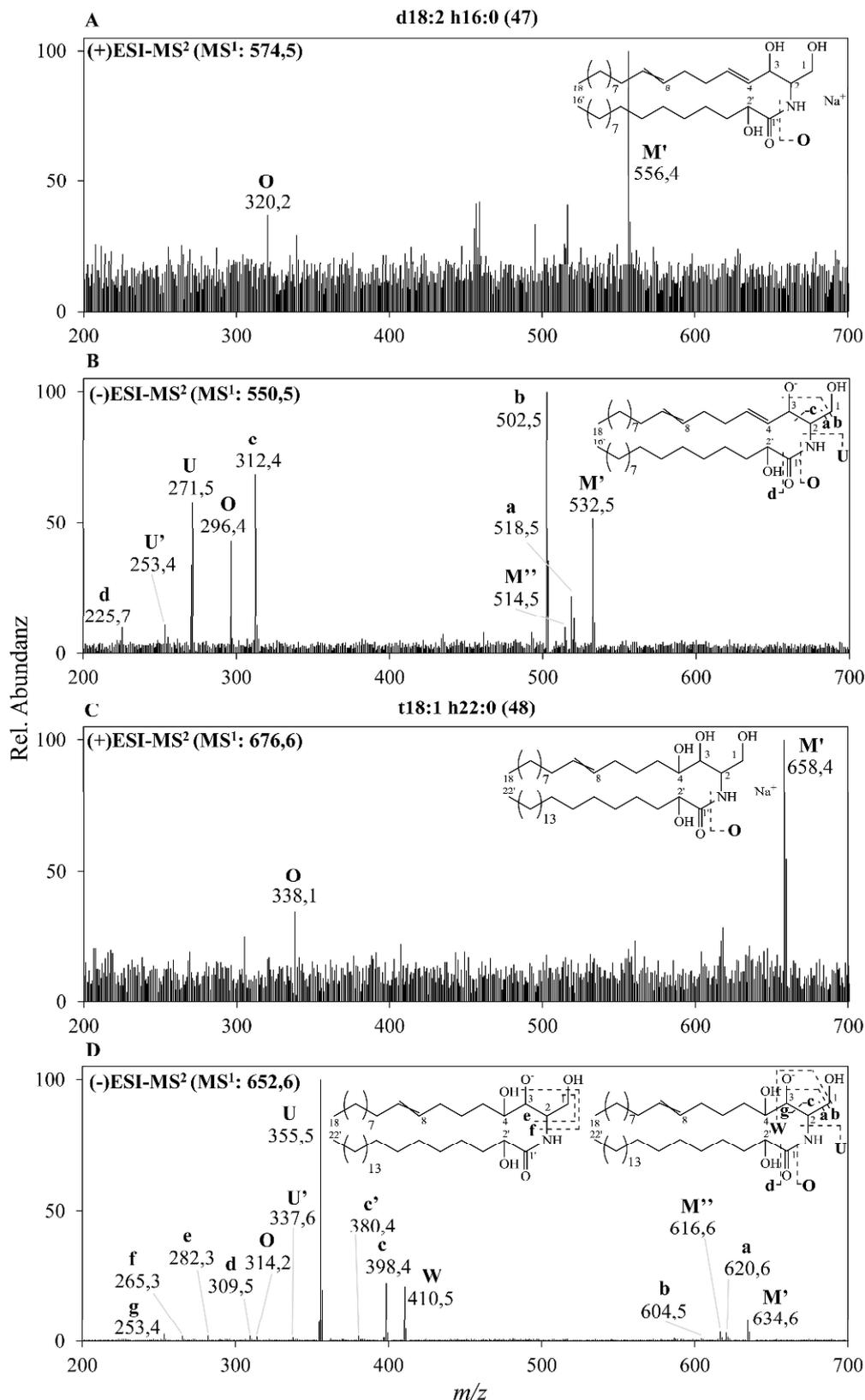


Abb. 39: MS/MS-Spektren und Fragmentierungsmuster von d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47, A, B) und t18:1^{Δ8E/Z} h22:0 (48, C, D)

Positiver (A, C) und negativer (B, D) Ionenmodus; Vorläuferionen in Klammern angegeben; Fragmente in Anlehnung an die Nomenklatur von Ann und Adams, 1993, basierend auf den Vorschlägen von Domon und Costello, 1988, und Costello, 1993.

Für den Phytosphingenin-Typ (t18:1) wurden darüber hinaus die Fragmente e (m/z 282,3), f (m/z 265,3) und g (m/z 253,4) identifiziert. Die Fragmente U ([M-LCB-H]⁻; h16:0, m/z 271,5; h22:0, m/z 355,5; h24:0, m/z 383,5), U' ([M-LCB-H₂O-H]⁻), c (d18:2, [M-238]⁻; t18:1, [M-254]⁻) und d (d18:2, [M-325]⁻; t18:1, [M-343]⁻) waren den Kettenlängen der Fettsäureeinheit entsprechend verschieden. Die Fragmente W ([M-242]⁻) und c' ([M-272]⁻) traten nur beim Phytosphingenin (t18:1)-Typ auf und deuteten auf die Trihydroxystruktur hin. In Tab. 41 sind wichtige Fragmente (O, U) der hydrolysierten „Phyto“-Cer aufgeführt. Mit ihnen ließen sich Sphingobasen- (O [M-acyl+Na]⁺) und Fettsäurekettenlänge (U [M-LCB-H]⁻) identifizieren. Alle detektierten Fragmente sind im Anhang (Tab. A2) gelistet.

Mithilfe von 2D-NMR-Experimenten (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC; Tab. A17-A18) wurden die Strukturen aufgeklärt. Da sich das „Phyto“-Cer t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49) um eine C₂H₄-Gruppe innerhalb der Fettsäurekomponente von t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48) unterschied und dies keinen Einfluss auf die gemessenen NMR-Spektren hatte, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. In Tab. 42 sind die ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen der Cer d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47), t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48) und t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49) aufgeführt.

Da es sich bei den isolierten „Phyto“-Cer jeweils um Diastereomere (*E/Z*-Isomerie) handelte, sollte ein Verhältnis der vorliegenden Verbindungen innerhalb einer Fraktion erhoben werden. Dies wurde mithilfe der Peakflächen der ¹³C-NMR-Signale bewerkstelligt. Dafür wurden Peakbreiten und -höhen analysiert und die Peakflächen untereinander verglichen (Tab. A19). Es handelte sich dabei nicht um ein absolutes Ergebnis, sondern um einen Trend. Für d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47) wurde ein Verhältnis von 2,5:1 für das 8*Z*-Isomer gegenüber dem 8*E*-Isomer bestimmt. Die Cer t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48) und t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49) wiesen dagegen Verhältnisse von 2:1 und 3:1 (*Z:E*) auf (Abb. 40). Das *Z*-Isomer lag mindestens in doppelter Menge in den Fraktionen vor.

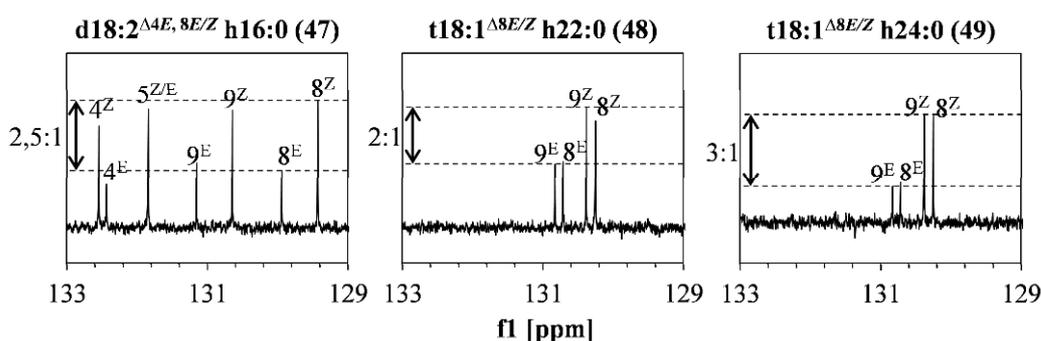


Abb. 40: *E/Z*-Isomerenverhältnisse von d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47), t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48) und t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49, Pyridin-*d*₅)

Angegeben sind die Verhältnisse der *Z:E*-Verbindungen der hydrolysierten „Phyto“-Cer.

Tab. 42: ¹H-, ¹³C-chemische Verschiebungen von d18:2^{ΔE,8E/Z} h16:0 (47), t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48) und t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49, Pyridin-d₅)

Zur Unterscheidung der ¹³C-Signale der Isomere sind 2 Kommastellen angegeben;

- a – ¹H-chemische Verschiebungen aus HSQC-Korrelationen,
- b – ¹H-chemische Verschiebungen aus TOCSY-Korrelationen,
- c – ¹H-chemische Verschiebungen aus HMBC-Korrelationen,
- d – Signale liegen übereinander
- e – ¹H-chemische Verschiebungen aus COSY-Korrelationen

Pos.	d18:2 ^{ΔE,8E/Z} h16:0 (47)		t18:1 ^{ΔE/Z} h22:0 (48)		t18:1 ^{ΔE/Z} h24:0 (49)	
	δ _H [ppm] (M, J [Hz]) Δ8Z Δ8E	δ _C [ppm] Δ8Z Δ8E	δ _H [ppm] (M, J [Hz]) Δ8Z Δ8E	δ _C [ppm] Δ8Z Δ8E	δ _H [ppm] (M, J [Hz]) Δ8Z Δ8E	δ _C [ppm] Δ8Z Δ8E
Sphingobase						
1a	4,521(m)	61,91	4,531 (dd, 10,8; 4,5)	62,01	4,533 (dd, 10,8; 4,6)	62,00
1b	4,264 (m)	-	4,444 (dd, 10,8; 5,0)	-	4,446 (dd, 10,8; 5,0)	-
2	4,729 (m)	56,13	5,139 (m)	52,97	5,143 (m)	52,97
3	4,888 (m)	73,09	4,364 (dd, 6,8; 4,5)	76,89	4,367 (dd, 6,8; 4,4)	76,88
4	6,109 (m, 15,4)	132,55	4,307 (ddd, 9,2; 6,8; 2,6)	72,97	4,310 (ddd, 9,3; 6,8; 2,6)	72,97
5a	6,040 (m, 15,4)	131,84 ^d	2,335 ^a (m)	33,98	2,335 ^a (m)	33,98
5b	-	-	1,977 ^a (m)	-	1,977 ^a (m)	-
6a	2,219 ^a (m)	32,96	2,052 ^a (m)	26,92	2,054 ^a (m)	26,91
6b	-	-	1,812 ^a (m)	-	1,809 ^a (m)	-
7	2,221 ^a (m)	27,41	2,261 ^a (m)	27,94	2,261 ^a (m)	27,94
8	5,497 ^b (m)	129,43	5,558 ^c (m)	130,38	5,558 ^a (m)	130,38
9	5,497 ^b (m)	130,65	5,475 ^c (m)	130,25	5,480 ^a (m)	130,25
10	2,086 ^b (m)	27,61	2,091 ^a (m)	27,60	2,089 ^a (m)	27,60
11	1,384 ^c (m)	29,53-30,08	1,371 ^c (m)	29,54-30,12	1,356 ^c (m)	29,54-30,12
12-16	1,260 (m)	29,53-30,08	1,283 (m)	29,54-30,12	1,283 (m)	29,54-30,12
16	-	32,14-32,15	-	32,13-32,15	-	32,13-32,14
17	1,260 (m)	22,96-22,97	1,283 (m)	22,96	1,283 (m)	22,96
18	0,873 (t, 6,9)	14,31	0,874 (t, 7,0)	14,31	0,875 (t, 6,8)	14,31
NH	8,392 (d, 8,9)	-	8,603 ^d (d, 9,0)	-	8,607 ^d (d, 8,9)	-
Fettsäure						
1'	-	175,38	-	175,23	-	175,23
2'	4,635 (dt, 8,0; 3,9)	72,55	4,639 (m)	72,47	4,641 (dd, 8,0; 3,7)	72,47
3'a	2,262 ^a (m)	35,84	2,246 ^a (m)	35,74	2,246 ^a (m)	35,74
3'b	2,077 ^a (m)	-	2,061 ^a (m)	-	2,053 ^a (m)	-
4'a	1,842 (m)	25,92	1,802 ^a (m)	25,86	1,804 ^a (m)	25,86
4'b	1,764 (m)	-	1,740 ^a (m)	-	1,737 ^a (m)	-
5'	1,384 ^c (m)	29,53-30,08	1,371 ^c (m)	29,54-30,12	1,381 ^c (m)	29,54-30,12
6'-14'/20'/22'	1,260 (m)	29,53-30,08	1,283 (m)	29,54-30,12	1,283 (m)	29,54-30,12
14'/20'/22'	-	32,14-32,15	-	32,13-32,15	-	32,13-32,14
15'/21'/23'	1,260 (m)	22,96-22,97	1,283 (m)	22,96	1,283 (m)	22,96
16'/22'/24'	0,873 (t, 6,9)	14,31	0,874 (t, 7,0)	14,31	0,875 (t, 6,8)	14,31

Die Strukturen der enzymatisch gewonnenen „Phyto“-Cer sind in Abb. 41 angegeben.

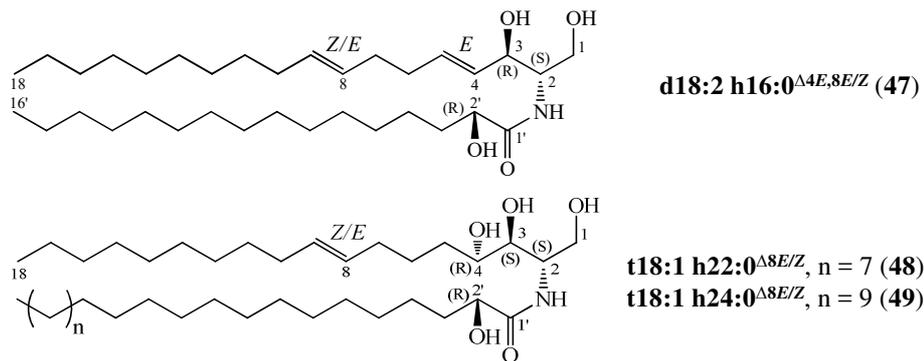


Abb. 41: „Phyto“-Ceramide, gewonnen aus Apfeltrester nach enzymatischer Hydrolyse

4.4 Hautpenetrationsversuche mit „Phyto“-Ceramiden

Das Penetrationsverhalten von „Phyto“-Cer in menschliche Haut wurde mithilfe von zwei produzierten Cer (d18:2 h16:0 (47) und t18:1 h22:0 (48)) untersucht. Die Cer, eingearbeitet in Basiscreme DAC, wurden einer 100 minütigen Penetration in menschliche Haut bei 32 °C ausgesetzt. Die Hautlipide wurden extrahiert und einer massenspektrometrischen Analyse nach flüssigchromatographischer Auftrennung unterzogen (Abb. 42). Die Creme-Überreste nach Abwischen mit Watte sind ebenfalls untersucht worden.

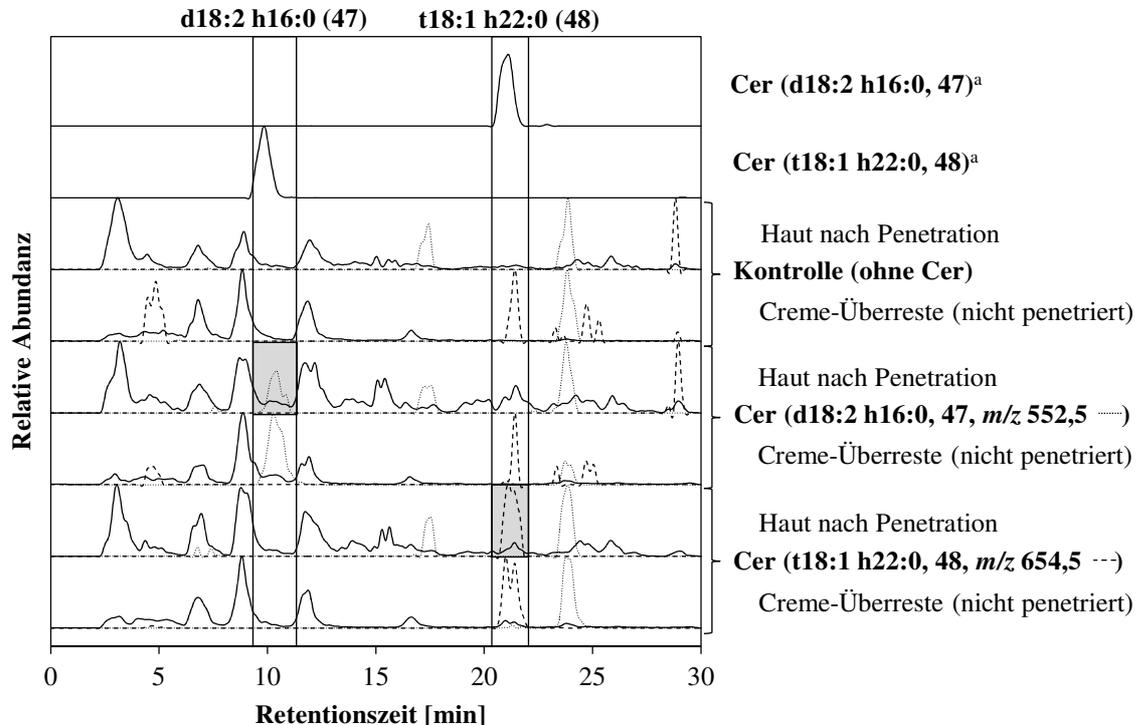


Abb. 42: LC-MS-Identifizierung der „Phyto“-Ceramide nach Hautpenetration

^a – Chromatogramme der Cer sind mit einer anderen Säule erhalten worden. Daher ist eine leichte Retentionszeitverschiebung auszumachen. Nomenklatur (Sphingobase Fettsäure, z.B. d18:2 h16:0 (47)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, h – α-hydroxy

Die Hautproben (Haut nach Penetration) zeigten alle ein ähnliches Chromatogramm, was für eine vergleichbare Extraktion der Lipide sprach. Die anderen extrahierten Lipide wurden nicht weiter untersucht. Cer wurden als $[M+H]^+$ (**47**: m/z 552,5; **48**: m/z 654,5) und $[M-18+H]^+$ (**47**: m/z 534,5; **48**: m/z 636,5) detektiert. Als Referenzen dienten die jeweiligen Cer-Lösungen (d18:2 h16:0 (**47**), t18:1 h22:0 (**48**), je 100 $\mu\text{g/ml}$ Methanol, ULC-MS). Anhand der extrahierten Ionen (m/z 552, 5 für d18:2 h16:0 (**47**) und m/z 654,5 für t18:1 h22:0 (**48**)) und den mit authentischen Standards vergleichbaren Retentionszeiten (**47**: RT 10,2 min (Referenz: RT 9,9 min); **48**: RT 21,2 min (Referenz: RT 21,1 min)) wurden die entsprechenden „Phyto“-Cer in den Haut- und Formulierungsproben nachgewiesen. Eine leichte Retentionszeitverschiebung war auf die Verwendung unterschiedlicher stationärer Säulen (gleicher Art) zurückzuführen. Innerhalb der Proben wurden weitere Peaks mit m/z 552,5 und m/z 654,5 nachgewiesen (Abb. 42), die nicht auf „Phyto“-Cer zurückzuführen waren. Diese hatten zum einen andere Retentionszeiten als die „Phyto“-Cer, zum anderen wurden sie als Isotope ($[M+1+H]^+$) anderer Verbindungen nachgewiesen. In der Kontrollprobe der Haut (ohne Cer) wurde keine den Cer zugehörige m/z 552,5 (RT 10,2 min) oder m/z 654,5 (RT 21,2 min) nachgewiesen. Darüber hinaus wurde versucht, eine Aussage über die penetrierte und nicht-penetrierte Menge an Cer zu treffen. Es lag keine validierte Quantifizierungsmethode vor. Jedoch wurde mithilfe einer vorläufigen 5-Punkt-Kalibrierung ($n=1$) der Cer d18:2 h16:0 (**47**) und t18:1 h22:0 (**48**) eine Kalibrierfunktion ermittelt (Abb. 43).

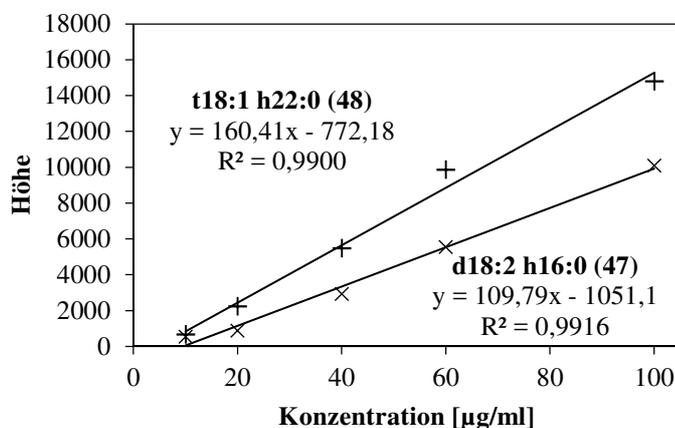


Abb. 43: 5-Punkt-Kalibrierung ($n=1$) der „Phyto“-Ceramide

Mit dieser ist die enthaltene Menge an „Phyto“-Cer in der Haut und im Formulierungsrest ermittelt worden ($n=1$). Wiederfindungsraten aus penetrierten und nicht penetrierten „Phyto“-Cer wurden mit 105,4 % (**47**) und 121,6 % (**48**) bestimmt. Der Anteil der penetrierten Cer lag bei 16,9 % (**47**) und 10,3 % (**48**) (Tab. 43).

Tab. 43: Anteil der penetrierten „Phyto“-Ceramide und Wiederfindungsraten
 Applizierte Menge Cer: 9 µg

Probe (n=1)	m _{Cer, Haut} (penetriert)	m _{Cer, Formul.} (nicht penetriert)	Anteil _{Cer, pen.} (penetriert)	WFR
	[µg]	[µg]	[%]	[%]
d18:2 h16:0 (47)	1,52	7,97	16,9	105,4
t18:1 h22:0 (48)	0,93	10,01	10,3	121,6

4.5 Quantifizierung von Glycosylceramiden in Pflanzenmaterial

4.5.1 Probenaufbereitung

Zur Probenaufbereitung von neun Pflanzenmaterialien (Apfeltrester, Weizenkeime, Kaffeesatz und sechs Fabaceae-Samen) wurde eine Extraktion mit einem organischen Lösungsmittelgemisch (3.2.1.1) und eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (3.2.1.2) zu einem angereicherten Extrakt durchgeführt. Die Ergebnisse der sechs Fabaceae-Arten sind in Tab. 44 aufgeführt, die der anderen Pflanzenmaterialien bereits in Tab. 30 beschrieben.

Tab. 44: Fraktionsmassenrückstände der Probenaufbereitung von sechs Fabaceae

Pflanzenmaterial (Samen)	Ausgangsmasse [g]	Totallipidextrakt [g]	Angereicherter Extrakt [g]
<i>Albizia grandibracteata</i>	100,0	18,4	2,1
<i>Albizia gummifera</i>	100,0	25,6	6,8
<i>Albizia lebbeck</i>	100,0	30,7	2,5
<i>Albizia schimperiana</i>	100,0	23,1	5,2
<i>Acacia etbaica</i>	100,0	15,3	8,3
<i>Robinia pseudoacacia</i>	100,0	14,0	5,6

Identische Ausgangsmengen führten zu sehr unterschiedlichen Totallipidextraktmengen (18,4-30,7 g). Mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion (Chloroform-Methanol-Wasser 1:1:1 (V/V/V)) wurden polare Verbindungen und Nicht-Lipide abgetrennt. Die angereicherten Extrakte wiesen Lipidmengen zwischen 2,1 und 8,3 % der Ausgangsmenge an Pflanzenmaterial auf. Während *Albizia lebbeck* den mengenmäßig größten Totallipidextrakt hatte (30,7 g), wies der angereicherte Extrakt einen der geringsten Anteile (2,5 g) auf.

4.5.2 Validierung der AMD-HPTLC-Densitometrie-Methode

Die TLC-Methode (3.2.2.1) konnte nicht zur Quantifizierung von GlyCer in den angereicherten Extrakten verwendet werden, da die GlyCer-Banden nicht ausreichend intensiv und scharf waren (Abb. 44). Daher wurde für die Quantifizierung von GlyCer eine AMD-HPTLC-Methode mit densitometrischer Detektion auf Basis der Arbeiten von Farwanah *et al.*, 2002, und Opitz *et al.*, 2011, entwickelt (siehe 3.2.2.2). Die Methode wurde unter Verwendung von Referenzsubstanzen validiert.

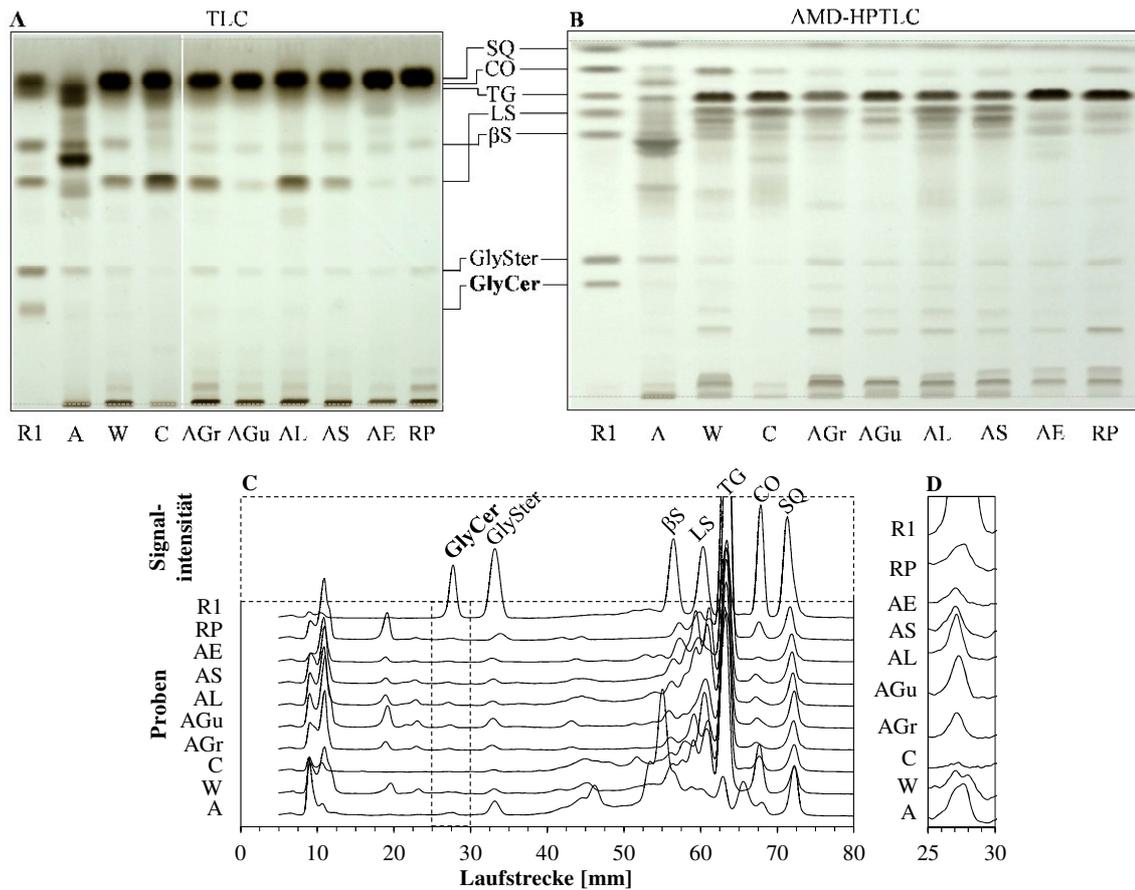


Abb. 44: TLC (A), AMD-HPTLC (B) und Densitogramme (C, D) der angereicherten Extrakte

R1 – Referenzlösung 1: CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen). A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, C – Kaffeesatz, AGr – *Albizia grandibracteata*, AGu – *Albizia gummifera*, AL – *Albizia lebbek*, AS – *Albizia schimperiana*, AE – *Acacia etbaica*, RP – *Robina pseudoacacia*

Der Nachweis der Selektivität der Methode wurde mithilfe eines Vergleiches von Proben und Referenzsubstanzen erbracht. Zum Vergleich diente eine Referenzlösung (R1), die charakteristische Lipide zur Zuordnung der Lipidklassen enthielt. GlyCer konnten innerhalb der Referenzlösung ohne störenden Einfluss anderer Verbindungen von allen anderen relevanten Lipidklassen getrennt werden. Eine intensive Bande auf Höhe der Laufmittelfront war auf Kontaminationen des Laufmittels *n*-Hexan zurückzuführen (Abb. 44).

In Abb. 44 sind die AMD-HPTLC-Chromatogramme und Densitogramme der angereicherten Extrakte aller untersuchten Pflanzenmaterialien dargestellt. Die Proben der angereicherten Extrakte konnten in scharfe Banden aufgetrennt werden. Dabei zeigten Pflanzen der gleichen Familie (Fabaceae) auch ähnliche TLC-Bandenintensitäten. Im Bereich der GlyCer-Referenz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen) der sind in allen Pflanzen TLC-Banden visuell nachgewiesen worden (mit Ausnahme des Kaffeesatzes, diese nur im Densitogramm detektierbar).

Diese konnten von den übrigen Matrixbestandteilen getrennt werden. Das Hinzufügen der Standardsubstanz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen) zum angereicherten Extrakt von *A. gummifera* führte zu einem größeren Peak desselben R_f -Wertes. Die Selektivität der Methode in Hinsicht auf die Bestimmung von GlyCer in angereicherten Pflanzenextrakten mit guter Basislinientrennung konnte auf diese Weise nachgewiesen werden.

Ein Ausschnitt des Densitogramms (Abb. 44, D) im Bereich der GlyCer-Referenz um den R_f -Wert 0,33 zeigte, dass alle Pflanzenmaterialien GlyCer enthielten. Weizenkeime zeigten einen Doppelpack im Bereich der GlyCer-Referenz. Mit Abweichungen von $R_f \leq 0,01$ und $RSD \leq 1,4\%$ ($n=3$, Tab. A6) der eingesetzten Referenzsubstanzen nach chromatographischer Mehrfachentwicklung (3 Platten, $n=3$) war die Laufstrecke reproduzierbar. Die Analytische Response (Kalibrierkurve) wurde mithilfe einer Referenzsubstanz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen) in konzentrationsabhängiger Weise bestimmt (Abb. A23). Mit der Referenzsubstanz (Glc-d18:2 h16:00 (7), Sojabohnen) wurde eine Kalibrierfunktion (6 Konzentrationslevels, 25-1000 ng/Bande, $n=3$) erstellt (Abb. 45).

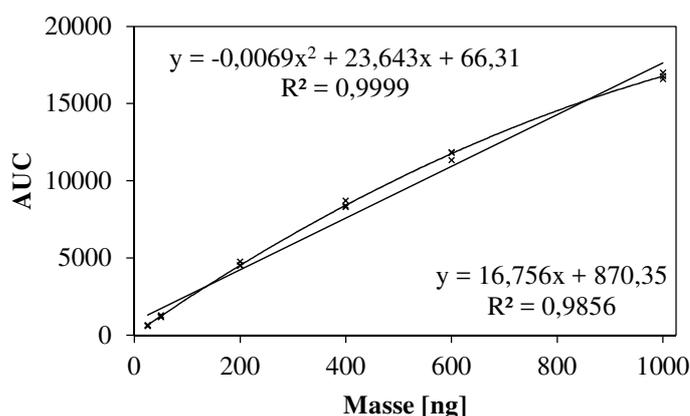


Abb. 45: Kalibrierkurve für 25-1000 ng/Bande Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen)

Als Bezugsgröße diente die Fläche: AUC – Area under the curve. Es erfolgte eine 6-Punkt-Kalibrierung ($n=3$). Die lineare und polynomiale Regression sind dargestellt.

Die Peakfläche wurde zur Bestimmung der Kalibrierfunktion verwendet, basierend auf der Annahme, dass alle GlyCer gleich intensiv visualisiert werden. Aufgrund der R_f -Werte einzelner GlyCer-Klassen (z.B. Weizenkeime, siehe Abb. 44) wurde die Peakhöhe nicht zur Quantifizierung herangezogen. Eine polynomiale Regression ($R^2 = 0,9999 \pm 0,0001$) wurde bevorzugt gegenüber einer linearen Regression ($R^2 = 0,9856 \pm 0,0034$; Abb. 45) angewendet. Dieses Ergebnis wurde auch visuell bei Betrachtung der Signalintensität der unterschiedlichen Referenzkonzentrationen beobachtet (Abb. A23). Für einen Konzentrationsbereich von 25 bis 1000 ng/Bande wurde ein direkter Zusammenhang nachgewiesen. Die Nachweisgrenze (LOD, $S/N=3$) und die Bestimmungsgrenze (LOQ, $S/N=10$) wurden experimentell über das Signal-

Rausch-Verhältnis (Ph. Eur. 8.8, 2.2.46) in Übereinstimmung mit der ICH (International Conference on Harmonisation, 2005) mit 10 ng/Bande und 25 ng/Bande bestimmt.

Die Richtigkeit wurde als Wiederfindungsrate nach dem Additionsverfahren ausgedrückt. Dafür wurden drei Proben des angereicherten Extraktes von *A. gummifera* (voranalysierte Probe mit 0 ng/Bande Referenz) mit drei Konzentrationen der Referenzsubstanz Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen, 25, 100 und 400 ng/Bande, n=5) versetzt und die Wiederfindungsrate nach Formel (6) berechnet. Die Wiederfindungsrate lag zwischen 106,5±6,1 und 112,1±6,1 %, die relative Standardabweichung (RSD) zwischen 5,4 und 7,4 % (Tab. 45).

Tab. 45: Richtigkeit der AMD-HPTLC-Quantifizierung

Als Wiederfindungsrate (WFR) [%] und relative Standardabweichung (RSD) [%] nach Additionsverfahren; Probe: angereicherter Extrakt von *A. gummifera*., 10 µl je Bande

m_{addierte Ref.} [ng/Bande]	n	m_{quantifizierte Ref.} ± RSD [ng/Bande]	WFR [%]	RSD [%]
25	5	27,4±2,0	109,6±8,1	7,4
100	5	112,1±6,1	112,1±6,1	5,4
400	5	426,0±24,2	106,5±6,1	5,7

Die Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision auf einer Platte) wurde für den LOQ (25 ng/Bande, n=6) mit RSD ±2,4 % bestimmt (Tab. A8). Die Präzision innerhalb einer Analyse (Wiederholpräzision auf einer Platte) für drei Konzentrationslevels mit je drei Replikaten (25 400 und 1000 ng/Bande als LOQ, mittlere und hohe Konzentration, n=3) war für alle Konzentrationen besser als RSD ±5,9 % (Tab. 46). Die Präzision zwischen Analysen (Wiederholpräzision zwischen Platten) wurde an fünf Tagen mit je drei Replikaten von drei Konzentrationen (25, 400 und 1000 ng/Bande als LOQ, mittlere und hohe Konzentration, n=3) erhoben. Die RSD aller Konzentrationen variierten zwischen ±2,0 und ±5,0 %. Die AMD-HPTLC-Methode wurde anhand dieser Ergebnisse als reproduzierbar bewertet.

Tab. 46: Präzision der AMD-HPTLC-Quantifizierung

Die Präzision innerhalb einer Analyse wurde bestimmt als WFR und RSD (n=3 je Platte), die Präzision zwischen Analysen als WFR und RSD (n=3 je Platte an fünf Tagen), Referenz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), WFR – Wiederfindungsrate, RSD – relative Standardabweichung, weitere Daten im Anhang (Tab. A10).

m_{addierte Ref.} [ng/Bande]	Präzision	n	m_{quantifizierte Ref.} ± RSD [ng/10µl]	WFR [%]	RSD [%]
25	<i>innerhalb einer Analyse</i> (min)	3	25,3±0,4	101,2±1,4	1,4
	<i>innerhalb einer Analyse</i> (max)	3	26,4±0,8	105,7±3,1	2,9
	<i>zwischen Analysen</i>	5x3	25,9±0,5	103,6±2,1	2,0
400	<i>innerhalb einer Analyse</i> (min)	3	396,5±10,3	99,1±2,6	0,9
	<i>innerhalb einer Analyse</i> (max)	3	440,7±3,8	109,3±4,1	5,2
	<i>zwischen Analysen</i>	5x3	418,5±21,1	104,6±5,3	5,0
1000	<i>innerhalb einer Analyse</i> (min)	3	934,9±50,0	93,5±5,0	1,2
	<i>innerhalb einer Analyse</i> (max)	3	1051,0±13,1	105,1±1,3	5,9
	<i>zwischen Analysen</i>	5x3	981,0±46,1	98,1±4,6	4,7

4.5.3 Glycosylceramid-Gehalte unterschiedlicher Pflanzenmaterialien

Mit der validierten Methode wurde das Pflanzenmaterial auf den Gehalt an GlyCer in neun Pflanzenmaterialien untersucht (Tab. 47).

Tab. 47: Glycosylceramid-Gehalte des pflanzlichen Materials nach AMD-HPTLC-Densitometrie

det. – detektiert, aber außerhalb des quantifizierbaren Bereiches, RSD – relative Standardabweichung (n=3), Extr. – Angereicherter Extrakt

Probe	$m_{\text{GlyCer}}/\text{Bande}$ $\pm \text{RSD}$ [ng/10 μ l]	$m_{\text{GlyCer}}/\text{Extr.}$ ($m_{\text{Extr.}}$) [mg]	$m_{\text{GlyCer}}/100 \text{ g}$ Ausgangsmaterial [mg]
Apfeltrester	131,2 \pm 4,5	200,6 (30,42 g)	26,8
Wweizenkeime	77,8 \pm 2,7	118,6 (30,37 g)	39,5
Kaffeesatz	det.	- (30,44 g)	-
<i>Albizia grandibracteata</i>	96,7 \pm 4,6	10,1 (2,1 g)	10,1
<i>Albizia gummifera</i>	67,5 \pm 1,8	23,1 (6,8 g)	23,1
<i>Albizia lebbeck</i>	93,7 \pm 0,2	9,4 (2,0 g)	9,4
<i>Albizia schimperiana</i>	69,5 \pm 2,1	18,2 (5,2 g)	18,2
<i>Acacia etbaica</i>	43,1 \pm 2,0	18,3 (8,3 g)	18,3
<i>Robinia pseudoacacia</i>	68,9 \pm 3,5	19,6 (5,6 g)	19,6

Dabei wurden in Bezug auf 100 g Pflanzenmaterial für Weizenkeime und Apfeltrester die höchsten Gehalte (39,5 mg und 26,8 mg/100 g Pflanzenmaterial) ermittelt. Sie lagen im Bereich der nach vollständiger Isolierung ausgewogenen Mengen von GlyCer (Apfeltrester 28,9 mg und Weizenkeime 33,7 mg/100g Pflanzenmaterial, 3.2.1.4). In den Proben des Kaffeesatzes konnten zwar GlyCer detektiert, jedoch nicht quantifiziert werden, da sich die applizierte Menge GlyCer (10 μ l angereicherter Extrakt) unterhalb des ermittelten LOQ (25 ng/Bande) befand.

Die Gehalte der Fabaceae-Arten lagen zwischen 9,4 und 23,1 mg/100 g Ausgangsmaterial. Mit 23,1 mg/100 g Ausgangsmaterial wurde für *Albizia gummifera* der höchste Gehalt, mit 9,4 mg/100 g Ausgangsmaterial für *Albizia lebbeck* der niedrigste Gehalt ermittelt, obwohl *Albizia lebbeck* neben *Albizia grandibracteata* einen der höchsten Gehalte (93,7 \pm 0,2 und 96,7 \pm 4,6 ng/Bande) innerhalb des angereicherten Extraktes aufwiesen. Jedoch waren die gewonnenen Mengen des angereicherten Extraktes (2,0 und 2,1 g) am geringsten. Zum Vergleich des äthiopischen Pflanzenmaterials (*Albizia*- und *Acacia*-Arten) wurde eine in Deutschland weitläufig vorkommende Fabaceae-Art auf ihren GlyCer-Gehalt untersucht. Für *Robinia pseudoacacia* wurde ein GlyCer-Gehalt von 19,6 mg/100 g Pflanzmaterial bestimmt.

4.5.4 Massenspektrometrischer Glycosylceramid-Nachweis nach präparativer TLC

GlyCer wurden innerhalb der AMD-HPTLC-Methode über den Vergleich der R_f -Werte mit einer Referenzsubstanz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen) identifiziert. Um den Nachweis von GlyCer innerhalb der für die Quantifizierung gemessenen Banden zu erbringen (Tab. 48), wurde

erst eine präparative TLC des entsprechenden R_f -Bereiches und anschließend eine LC-MS-Analyse vollzogen.

Die Verbindungen wurden als $[M+H]^+$ -Ionen detektiert. Eine Zuckerkopfgruppe wurde durch die bekannten Fragmente $[M-162+H]^+$ nachgewiesen. Insgesamt wurden fünf GlyCer vom Sphingadienin (d18:2)-, Sphingenin (d18:1)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typ aufgrund von m/z -Zahlen und Retentionszeiten im Vergleich zu authentischen Vergleichssubstanzen (4.2.9) nachgewiesen. α -Hydroxylierte Fettsäuren mit Kettenlängen von C16, C20, C22 und C24 stellten die verknüpften Fettsäurekomponenten dar.

Tab. 48: LC-MS-Identifizierung der Glycosylceramide nach präparativer TLC

Nomenklatur (Gly-Sphingobase Fettsäure, z.B. Glc-d18:2 h16:0 (**7**)); Kettenlänge : Desaturierung, d – dihydroxy, t – trihydroxy, h – α -hydroxy, Gly – Glycosylrest (Zucker nicht bestimmt); A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, AGr – *Albizia grandibracteata*, AGu – *Albizia gummifera*, AL – *Albizia lebbeck*, AS – *Albizia schimperiana*, AE – *Acacia etbaica*, RP – *Robinia pseudoacacia*

Pflanzenmaterial								GlyCer	LC-APCI/MS		
A	W	AGr	AGu	AL	AS	AE	RP		RT [min]	m/z [M+H] ⁺	m/z [M-162+H] ⁺
X		X	X	X	X	X	X	Gly-d18:2 h16:0 (7)	8,6	714,6	552,5
	X							Gly-d18:2 h20:0 (22)	15,0	770,6	n.d.
	X							Gly-d18:1 h20:0 (26)	17,1	772,7	n.d.
X		X	X	X	X			Gly-t18:1 h22:0 (28)	17,6	816,6	654,6
X	X	X	X	X	X			Gly-t18:1 h24:0 (36)	21,3	844,6	682,6

Für den Apfeltrester und Weizenkeime wurden die bereits über eine vollständige Isolierung identifizierten GlyCer (Apfeltrester: Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**); Weizenkeime: Glc-d18:2 h20:0 (**22**), Glc-d18:1 h20:0 (**26**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**)) nachgewiesen. Die *Albizia*-Arten wiesen dasselbe GlyCer-Spektrum wie der Apfeltrester auf, allerdings mit Unterschieden in der konzentrationsabhängigen Verteilung der Verbindungen. In den Pflanzen *Acacia etbaica* und *Robinia pseudoacacia* wurde nur eine GlyCer-Verbindung (Glc-d18:2 h16:0 (**7**)) nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass in Bezug auf die vollständig isolierten GlyCer des Apfeltresters und der Weizenkeime die anteilmäßig häufigsten GlyCer auch in den Banden der AMD-HPTLC nachgewiesen wurden. Dies bedeutete, dass jene GlyCer (Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**)) auch die größten Mengen in den Fabaceae-Pflanzen ausmachten. Spurenverbindungen konnten mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

5 DISKUSSION

5.1 Gewinnung von Glycosylceramiden aus pflanzlichem Material

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einfacher und effektiver Methoden zur Gewinnung von GlyCer aus pflanzlichem Abfallmaterial, um daraus „Phyto“-Cer zu produzieren. Dies umfasste Extraktions-, Aufreinigungs- und Analysemethoden zur Strukturaufklärung. Die Methoden wurden an den drei industriellen Abfallpflanzenmaterialien Apfeltrester, Weizenkeime und Kaffeesatz beschrieben.

5.1.1 Optimierung der Extraktion der Gesamtlipide und Aufarbeitung des Extraktes

Die quantitative Isolierung von Verbindungen aus einer Matrix wie dem Gesamtlipidextrakt einer Pflanze stellt hohe Anforderungen an die Methoden dar. Für eine industriell umsetzbare Aufreinigung müssen effektive und skalierbare Methoden zur Verfügung stehen.

Pflanzliche Lipide werden heute weitestgehend mit organischen Flüssigkeiten extrahiert. Die Verwendung der Methode nach Folch *et al.*, 1957, bzw. in modifizierter Form nach Bligh und Dyer, 1959, hat sich zur Extraktion von Sphingolipiden aus Pflanzen bewährt (Cahoon und Lynch, 1991; Bartke *et al.*, 2006; Markham *et al.*, 2006). Hierbei wird ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (2:1 V/V) zur Extraktion und anschließend zur Phasenseparation mit Wasser genutzt (Folch *et al.*, 1957). Bligh und Dyer, 1959, führten die Extraktion und Flüssig-Flüssig-Trennung (Chloroform-Methanol-Wasser) in einem Schritt durch. Ein Vergleich der Methoden nach Folch *et al.*, 1957, und Bligh und Dyer, 1959, zeigte, dass Proben der letzteren mit höherem Lipidgehalt fälschlicherweise als zu gering bestimmt werden können (Iverson *et al.*, 2001). Chloroform wird als vermutlich karzinogen und reproduktionstoxisch angesehen (Golden *et al.*, 1997; European Chemicals Agency, 2011). Daher wurden alternative Extraktionsmethoden gesucht. Macmurray und Morrison, 1970, verwendeten erfolgreich wasser-gesättigtes *n*-Butanol als Extraktionsmittel von GlyCer aus Weizenmehl. Dieses Extraktionsmittel war dem Gemisch aus Chloroform-Methanol 2:1 (V/V) überlegen (Macmurray und Morrison, 1970). Hara und Radin, 1978, extrahierten mit einem *n*-Hexan-Isopropanol-Gemisch 3:2 (V/V) Lipide aus Nervengewebe. Darüber hinaus extrahierten Farwanah *et al.*, 2002, Cer aus menschlicher Haut mit einem *n*-Hexan-Alkohol-Gemisch 2:1 (V/V). Das Extraktionsmittel Isopropanol-*n*-Hexan-Wasser 55:20:25 (V/V/V) wurde schließlich für die Extraktion der Gesamtlipide aus unterschiedlichem pflanzlichen Gewebe (*Arabidopsis thaliana*, Tomaten, Sojabohnen) erfolgreich eingesetzt (Markham *et al.*, 2006). Dabei inaktiviert Isopropanol die Lipase, welche Glycolipide hydrolysiert (Markham *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden die Gesamtlipide mit Isopropanol-*n*-Hexan-Wasser 55:20:25 (V/V/V) (Markham *et al.*, 2006) im Ultraschallbad dreimal für 15 min extrahiert. Markham *et al.*, 2006, inkubierten das Gemisch dreimal bei 60 °C für 15 min. Der direkte Vergleich der Extraktion nach Markham *et al.*, 2006, und der vorgestellten, leicht modifizierten

Methode ergab ähnliche Ergebnisse. Pflanzeninhaltsstoffe können mit Ultraschallbehandlung effektiver, einfacher und bei niedrigeren Temperaturen extrahiert werden als das mit Mazeration der Fall ist (Schinor *et al.*, 2004). Mit 15 min wurde die Zeit der Extraktion bewusst kurz gehalten. Bereits Romanik *et al.*, 2007, beschrieben die Vorteile der kürzeren Extraktionsdauer durch Ultraschallbehandlung gegenüber konventioneller Extraktionen.

Die erschöpfende Extraktion wurde mit TLC überprüft. Nach dem dritten Extraktionsschritt konnte keine Bande auf Höhe der GlyCer-Referenz nachgewiesen werden. Die Extraktion der Gesamtlipide zeigte für alle Pflanzenmaterialien Anteile zwischen 11,5 % und 36,8 % (Tab. 49). Weizenkeime hatten eine größere Totallipidextraktfraktion, da sie das lipidreiche Gewebe des Weizenkorns sind (Barnes, 1982; de Vasconcelos *et al.*, 2013). Dagegen wiesen Apfeltrester als Gemisch unterschiedlicher anatomischer Bestandteile und Kaffeesatz als geröstete, gemahlene Bohnen eine geringere Menge auf.

Tab. 49: Anteile der Totallipidextrakte und der angereicherten Extrakte vom Ausgangsmaterial

Pflanzenmaterial	Total-lipid-extrakt [%]	Angereicherter Extrakt [%]	Berichteter Lipidgehalt [%]	Literatur
Apfeltrester	13,2	4,1	~4	Vendruscolo <i>et al.</i> , 2008
Weizenkeime	36,8	10,1	~10	Barnes, 1982; de Vasconcelos <i>et al.</i> , 2013
Kaffeesatz	11,5	10,1	11-17	Belitz <i>et al.</i> , 2009
<i>Alb. grandibracteata</i>	18,4	2,1		
<i>Alb. gummifera</i>	25,6	6,8	0,8-20,9 (Fabaceae)	Wolff und Kwolek, 1971
<i>Alb. lebbeck</i>	30,7	2,5	10,5 (<i>Alb. julibrissin</i>)	Nehdi, 2011
<i>Alb. schimperiana</i>	23,1	5,2		
<i>Acacia etbaica</i>	15,3	8,3	8,8 (<i>Acacia</i> spp.)	Wolff und Kwolek, 1971
<i>Rob. pseudoacacia</i>	14,0	5,6	3,7	Wolff und Kwolek, 1971

Mithilfe einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (Chloroform-Methanol-Wasser) wurden polare Verbindungen und Nicht-Lipide abgetrennt (Rupcic *et al.*, 2004). Die Zugabe von 0,5-1 % w/V NaCl zur Wasserphase führte zu einer verbesserten Phasentrennung, was bereits Axelsson und Gentili, 2014, beschrieben hatten. Die GlyCer-Mengenanteile der angereicherten Extrakte aller untersuchten Pflanzenmaterialien lagen zwischen 2,1 und 10,1 % (Tab. 49). Die Ausgangsmaterialien des Apfeltresters, der Weizenkeime und des Kaffeesatzes zeigten ähnliche Mengen an angereicherten Extrakten (30,37-30,44 g). Dabei war die Apfeltresterausgangsmenge (750,0 g) um das 2,5fache größer als bei Weizenkeimen und Kaffeesatz (je 300,0 g). Die Anteile der angereicherten Extrakte am Ausgangsmaterial entsprachen den berichteten Lipidmengen innerhalb dieser Pflanzen (Tab. 49). Die hohe Ausbeute (88,4 %) des angereicherten Extraktes des Kaffeesatzes aus dem Totallipidextrakt lag im Herstellungsverfahren des Kaffeesatzes begründet. Da der Kaffeesatz bereits einer Perkolation

mit heißem Wasser unterzogen wurde, waren bereits große Mengen polarer Verbindungen im Filtrat abgetrennt worden.

5.1.2 Isolierung der Glycosylceramide durch Kopplung säulenchromatographischer Methoden

Die Isolierung einer GlyCer-angereicherten Fraktion aus dem Lipidextrakt umfasste zwei chromatographische Schritte. Diese waren eine polaritätsabhängige Auftrennung der enthaltenen Lipidklassen (z.B. in Triglyceride, Sterole, Fettsäuren, Sterolglucoside und GlyCer) und eine nachfolgende größenausschlusschromatographische Trennung von Sterolglucosiden und GlyCer, da diese aufgrund ihrer ähnlichen Polarität unter den angewendeten Bedingungen nicht an Kieselgel 60 getrennt werden konnten.

Für die Trennung eines Stoffgemisches steht mit der Säulenchromatographie (SC) eine effektive Methode zur Verfügung. Für die Beladung ergibt sich folgende Faustregel Probe 1 : stationäre Phase 100-500 : Mobile Phase 500-5000 (nach Heilmann, 2010). Für eine SC-Trennung an Kieselgel 60 wäre bei einer Aufgabe von 20,0 g Extrakt mindestens 2 kg Kieselgel 60 und 10 l Lösungsmittel notwendig. Für eine Grobtrennung von Rohextrakten ist auch eine Beladung zwischen 1:10 bis 1:25 (Probe : stationäre Phase) möglich (Heilmann, 2010). In der beschriebenen Methode (3.2.1.3) wurde ein Verhältnis von 1:12,5 gewählt (20,0 g Probe : 250,0 g stationäre Phase). Es wurde mit insgesamt 6 SV (entsprechend 3 l) eluiert. Die vorliegende Methode dient der Grobauftrennung. Eine ausreichend scharfe Trennleistung des angereicherten Extraktes und eine zeitlich akzeptable Trennung bei minimiertem Verbrauch von Chromatographiematrix und Lösemitteln war das Ziel der Methodenentwicklung.

Im Allgemeinen kann ein Gesamtlipidextrakt an einer polaren stationären Phase (z.B. Kieselgel) mit unpolaren Lösungsmitteln (z.B. Chloroform, Aceton) aufgetrennt werden. Unterschiedliche Zusammensetzungen von Chloroform, Methanol, Aceton und Wasser erwiesen sich für die Aufreinigung einzelner Klassen wie freie Fettsäuren, Sterolglucoside und GlyCer aus einem Gesamtlipidextrakt (z.B. aus Roggen, Weizenkeimen oder Hefen) als erfolgreich (Cahoon und Lynch, 1991; Sullards *et al.*, 2000; Rupcic *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006b). Die erste Säulenchromatographie erfolgte aufgrund dieser Vorkenntnisse an polarem Kieselgel 60 mit einem Chloroform-Methanol-Gradienten. GlyCer wurden nicht von reinem Chloroform eluiert, jedoch die Lipidklassen der Triglyceride, Sterole und Fettsäuren. Die Elution von GlyCer erfolgte mit Chloroform-Methanol 9:1 (V/V) und 8:2 (V/V) (siehe Abb. 13, Abb. A3-A4). So wurde eine Fraktion erhalten, die neben GlyCer außerdem noch Sterolglucoside enthielt.

Die Trennung von Sterolglucosiden und GlyCer an Kieselgel (TLC: Chloroform-Methanol 85:15 (V/V); R_f 0,36±0,02 und 0,25±0,02) war unter den effizienzorientierten, säulenchromatographischen Bedingungen aufgrund der polaritätsbestimmenden Zuckergruppe in beiden Molekülen nicht hinreichend möglich. Durch die unterschiedliche Molekülgröße wurde jedoch

eine Trennung an Sephadex LH-20 erreicht. Sephadex LH-20 bedient Eigenschaften der Größenausschluss- und untergeordnet der Affinitätschromatographie. Durch die aliphatischen Ketten der GlyCer ist die räumliche Ausdehnung größer als bei Sterolglucosiden. Diese wurde für die Trennung an Sephadex LH-20 ausgenutzt. Die Abtrennung der GlyCer von den Sterolglucosiden wurde mittels HPLC-MS überprüft (Abb. 46).

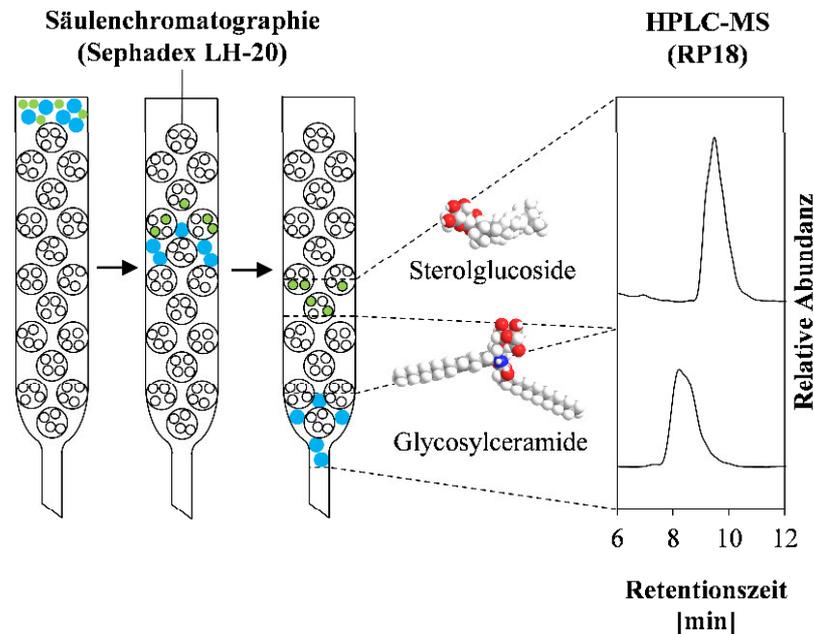


Abb. 46: Trennung von Glycosylceramiden und Sterolglucosiden an Sephadex LH-20

Die Strukturen sind schematisch dargestellt. Das GlyCer liegt in der voll gestreckten Konformation vor. Andere Konformationen (z.B. *Hairpin*-Konformation) sind möglich.

Sephadex LH-20 wurde bereits erfolgreich für die Gewinnung von GlyCer-angereicherten Fraktionen verwendet (Gao *et al.*, 2001; Napolitano *et al.*, 2011). Dabei diente Methanol als mobile Phase, das Verhältnis Probe : stationäre Phase betrug 2:100 (Gao *et al.*, 2001; Napolitano *et al.*, 2011). Bei der hier vorgestellten Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 wurde auf das Lösungsmittelgemisch Dichlormethan-Methanol 1:1 (V/V) zurückgegriffen, da die Probe im angestrebten kleinen Volumen Methanol nicht ausreichend löslich war.

Obwohl sich durch die unvollständige Trennung von GlyCer und Sterolglucosiden der ersten Säulenchromatographie eine weitere Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 anschloss, war diese wirtschaftlich sinnvoll, da eine isokratische einmalige Elution beide Verbindungsklassen trennen konnte. Die Säule mit Sephadex LH-20 kann mehrfach genutzt werden. Die Vorteile der Säulenchromatographie liegen in ihrem geringen apparativen Aufwand und der einfachen Durchführung. Einen Nachteil stellt dagegen der Zeitaufwand dar, welcher durch die Elution unter Normaldruck entsteht. Die Verwendung der Flash-Chromatographie (Elution unter Anwendung von Druck) könnte als Alternative neben einer verbesserten

Trennleistung auch für eine schnellere Durchführung sorgen (Still *et al.*, 1978; Stevens und Hill, 2009).

In der Medizin finden standardisierte Pflanzenextrakte Verwendung. Obwohl auch standardisierte GlyCer-angereicherte Extrakte, z.B. gewonnen nach der zweiten Säulenchromatographie an Sephadex LH-20, zukünftig in der Dermatotherapie verwendet werden könnten, ist die Isolierung einzelner GlyCer unerlässlich in der Untersuchung von pflanzlichen Cer für eine medizinische Anwendung. Bevor ein Stoffgemisch therapeutisch genutzt wird, sollten seine Bestandteile aufgeklärt und bekannt sein. Nur so kann sichergestellt werden, dass sich einzelne enthaltene Verbindungen den Haut-Cer ähnlich verhalten und nicht nachteilig für den Erfolg der Behandlung sind. Da bisher keine Untersuchungen zur Anwendung strukturell unterschiedlicher „Phyto“-Cer in Hautcremes vorliegen, sollten Experimente zur Sicherheit, Qualität und Unbedenklichkeit mit isolierten Verbindungen erfolgen. Erst dann kann ein Gemisch einer GlyCer-angereicherten Fraktion Anwendung finden.

Für die Isolierung einzelner GlyCer aus der GlyCer-angereicherten Fraktion wurde daher eine präparative HPLC-MS-Methode entwickelt, die auf der analytischen HPLC-MS-Methode für die Identifizierung von GlyCer basierte (3.2.2.3). GlyCer wurden an einer RP18-Phase mithilfe eines Methanol-Wasser-Gradienten anhand ihrer Sphingobasen und Fettsäurekettenlängen aufgetrennt. Es wurde keine Basislinientrennung aller Verbindungen erreicht. Daher befanden sich in den meisten Fraktionen mehrere GlyCer (bis zu sechs), die jedoch mithilfe der massenspektrometrischen Detektion identifiziert werden konnten (4.2). Eine Basislinientrennung war mit modifiziertem Gradienten und geringerem Fluss möglich, wurde jedoch als nicht wirtschaftlich angesehen. Der Lösungsmittelverbrauch wurde aufgrund des hohen angewendeten Flusses während der präparativen HPLC-MS (25 ml/min) durch eine kurze Laufzeit möglichst gering gehalten (Gesamtlaufzeit 25 min). Als Detektionsmethode von Lipiden hat sich die Massenspektrometrie nach Chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) als erfolgreich erwiesen. APCI gilt als schonende Ionisationstechnik mit wenigen Fragmenten (Byrdwell, 2001). Sie wurde bereits für die Detektion von Haut-Cer (Farwanah *et al.*, 2003; van Smeden *et al.*, 2011) oder pflanzlichen GlyCer (Yamauchi *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2005) eingesetzt. Die präparative HPLC-Methode zur Auftrennung der GlyCer-angereicherten Fraktionen hat sich als effektiv erwiesen. Mit der vorliegenden Methode wurden die GlyCer-angereicherten Fraktionen in jeweils 12 (Apfeltrester und Weizenkeime) und 5 Fraktionen (Kaffeesatz) aufgetrennt. Die Fraktionen enthielten von einem bis zu maximal sechs GlyCer (Abb. A13-A15).

5.1.3 Glycosylceramid-Gehalte des Apfeltresters, der Weizenkeime und des Kaffeesatzes

Vor allem Sojabohnen und Reis dienen heute der Gewinnung von pflanzlichen GlyCer in kleinem Maßstab. Es wurden GlyCer-Gehalte von ca. 28-35 mg/100 g Trockengewicht

(Gutierrez *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006b) bestimmt. Die hier untersuchten Pflanzenmaterialien des Apfeltresters und der Weizenkeime wiesen GlyCer-Gehalte von 28,9 und 33,7 mg/100 g Pflanzenmaterial auf und könnten damit einer gleichwertigen GlyCer-Gewinnung dienen.

Äpfel wurden bereits als ergiebige Quelle für GlyCer ausgemacht (Takakuwa *et al.*, 2005). Es wurden Mengen zwischen 17,0 und 100,0 mg/100 g Apfeltrester analytisch bestimmt (Ogawa *et al.*, 2014). Im Vergleich lagen die hier isolierten GlyCer-Anteile im unteren Drittel der detektierbaren Mengen von Ogawa *et al.*, 2014. Sie hatten gezeigt, dass der GlyCer-Gehalt in Apfeltrestern unterschiedlicher Sorten stark variiert (Ogawa *et al.*, 2014). Es muss daher gesagt werden, dass in dieser Arbeit nur eine Apfeltresterart untersucht wurde, von der die enthaltenen Apfelsorten bedingt bekannt waren. Es ist sinnvoll, zukünftig Trester einzelner Sorten zu untersuchen und den GlyCer-Gehalt zu bestimmen.

Apfeltrester ist ein Gemisch unterschiedlicher Fruchtbestandteile wie Schale, Fruchtfleisch, Kerne und Stiele (Vendruscolo *et al.*, 2008). Da die Samen von Pflanzen besonders lipidreich sind (Fang *et al.*, 2005), wurden größere Mengen GlyCer in Apfelkernen vermutet. Jedoch konnte der Vergleich der angereicherten Extrakte des Apfeltresters und der Apfelkerne das nicht bestätigen. Der größte Anteil an GlyCer befindet sich nicht in den Kernen (Abb. A6). Dies deckte sich mit den Ergebnissen von Takakuwa *et al.*, 2005. Sie hatten im Fruchtfleisch GlyCer-Gehalte von 94,0 mg und in der Schale 49,0 mg/100 g Pflanzenmaterial bestimmt (Takakuwa *et al.*, 2005), welche zusammen einen großen Anteil des Tresters ausmachen. Folglich müssen Pflanzengewebe separat auf GlyCer untersucht werden.

Im Weizen wurden bereits GlyCer nachgewiesen (Sugawara und Miyazawa, 1999; Vesper *et al.*, 1999; Takakuwa *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2013). Es gibt Untersuchungen zum ganzen Korn (Fujino und Ohnishi, 1983), der Kleie (Zhu *et al.*, 2013) und dem Mehl des Weizens (Sugawara und Miyazawa, 1999; Vesper *et al.*, 1999). Weizenkeime mit einem Lipidanteil von ca. 10 % (Barnes, 1982; de Vasconcelos *et al.*, 2013) sollten größere GlyCer-Mengen enthalten. Der hier ermittelte GlyCer-Gehalt von 33,7 mg/100 g Weizenkeime übertraf die meisten publizierten Werte vom ganzen Korn, dem Mehl oder der Kleie (9-26 mg/100 g, Tab. 3).

In Rahmen dieser Arbeit sind zum ersten Mal GlyCer in *Coffea arabica* nachgewiesen worden. Jedoch war der Gehalt von 4,4 mg/100 g Pflanzenmaterial sehr gering. Trotz des industriellen Röstprozesses (bei ca. 200-230 °C, Belitz *et al.*, 2009) und der Zubereitung des Kaffees durch Perkolation mit heißem Wasser wurden intakte GlyCer nachgewiesen. Da sich die Zusammensetzung der Lipidfraktion mit dem Röstprozess nicht sehr verändert (Hänsel und Pertz, 2010), kann davon ausgegangen werden, dass auch rohe Kaffeebohnen keine großen Mengen an GlyCer enthalten. Jedoch wurden rohe Kaffeebohnen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

5.2 Identifizierung und Strukturaufklärung der isolierten Glycosylceramide

Die GlyCer innerhalb der isolierten Fraktionen (A1-12, W1-12, C1-5) wurden mit TLC, HRMS, MS/MS, HPLC-MS und NMR-Experimenten identifiziert.

5.2.1 TLC-Identifizierung der Lipidklasse und MS-Strukturaufklärung der enthaltenen Glycosylceramide

Pflanzliche Gemische enthalten zahlreiche Begleitstoffe, die eine LC-Säule verstopfen können. Daher sind besonders in wenig vorgereinigten Fraktionen TLC-basierte Auftrennungsmethoden gegenüber HPLC-Techniken zu bevorzugen, da eine schnelle, effiziente und günstige Trennung möglich ist. Für die Auftrennung von Cer des *Stratum corneums* sind viele Methoden beschrieben (Motta *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1994). Die gebräuchlichste stationäre Phase ist Kieselgel. Dagegen gibt es größere Unterschiede in der Verwendung der mobilen Phase. So wurden Gemische aus Chloroform-Methanol-Essigsäure-Wasser 85:15:15:3,5 (V/V/V/V) (Cahoon und Lynch, 1991; Sullards *et al.*, 2000) oder Chloroform-Methanol-Ether-Hexan-Essigsäure 100:20:20:10:1,5 (V/V/V/V/V) (Wang *et al.*, 2006b) verwendet. Säurefreie Laufmittel wie Chloroform-Methanol-Wasser 65:25:4 (V/V/V) (Rupcic *et al.*, 2004) bewirkten eine ebenso effektive Auftrennung der Lipidgemische. In dieser Arbeit wurde ein Chloroform-Methanol-Gemisch 85:15 (V/V) nach Ternes *et al.*, 2011, verwendet, nachdem durch den Zusatz von Essigsäure (1 %) die Sterolglucosid- und GlyCer-Banden schlechter getrennt wurden. Die Entwicklung wurde unter Kammersättigung durchgeführt, da auf diese Weise eine reproduzierbarere Lauffront erhalten wurde.

GlyCer wurden über die Veraschung der Lipide visualisiert, indem ein Gemisch aus Kupfersulfat, Phosphorsäure und Methanol in Wasser und eine anschließende 10-minütige Behandlung im Trockenschrank bei 150 °C grau-braune Banden bewirkte (Farwanah *et al.*, 2002; Opitz *et al.*, 2011). Die Lipid-Veraschung gehört zur Routineanalytik von Lipiden. Während früher Kupferacetat verwendet wurde (Fewster *et al.*, 1969), sollte mit Kupfersulfat und Phosphorsäure eine von Doppelbindungen unabhängige Detektion erreicht werden (Baron und Coburn, 1984). Verbindungen ohne Doppelbindung (z.B. Cer [AP], t18:0 h18:0) zeigten in dieser Arbeit jedoch schwächere Bandenintensitäten gegenüber Cer mit Doppelbindungen (z.B. Cer [AS], d18:1 h18:0) (Abb. A1-A2).

Die Dünnschichtchromatographie wurde für die Kontrolle des Aufreinigungsprozesses mittels Säulenchromatographie verwendet. Mithilfe von Referenzsubstanzen wurden die Lipidklassen zugeordnet und die Fraktionierung verfolgt. Bereits im Gesamtlipidextrakt wurden GlyCer in Form einer schwachen Bande nachgewiesen (Abb. 13, Abb. A3-A4). Dagegen wurden mit jedem weiteren Aufreinigungsschritt intensivere GlyCer-Banden visualisiert. Bei allen Einschränkungen in der Trennung und Detektion war die TLC für das Fraktionsmonitoring gut geeignet: schnell, preisgünstig und ausreichend trennscharf.

Der Goldstandard für die Lipidanalytik ist heute die Kopplung einer effektiven chromatographischen Trennmethode wie HPLC mit einer diskriminierenden Detektionsmethode wie MS. In der Vergangenheit wurden GC-MS-Methoden entwickelt, für die eine Derivatisierung der GlyCer notwendig war (Raith *et al.*, 2000). Obwohl die Effektivität nachgewiesen wurde, war diese Methode sehr zeitaufwendig (Raith *et al.*, 2000) und damit nur bedingt für Screening-Vorhaben geeignet. Heute werden GC-MS-Methoden hauptsächlich dazu verwendet, die Strukturelemente von Cer aufzuklären. So werden die Hexosen und Sphingobasen derivatisiert und Fettsäuren als Methylfettsäureester nach Totalhydrolyse der GlyCer analysiert (Cahoon und Lynch, 1991; Itonori *et al.*, 2004).

Auch andere Detektionsmöglichkeiten nach HPLC-Trennung sind bekannt. Es gibt Studien zu *Evaporative Light Scattering* (ELS)- (Sugawara und Miyazawa, 1999; Farwanah *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006b) oder UV-Detektoren ohne (205-210 nm; Cahoon und Lynch, 1991; Whitaker, 1996) und nach (Benzilyerung bei 254 nm; Iwamori *et al.*, 1979; Snada *et al.*, 1987) Derivatisierung. Diese Methoden sind auf eine sehr effektive Trennmethode angewiesen, um jede Verbindung als eigenständigen Peak zu eluieren. Für jede Verbindung müsste eine Referenzsubstanz zur Verfügung stehen, um Retentionszeiten zuordnen zu können. Dies ist bei der Strukturvielfalt im Gemisch pflanzlicher GlyCer (siehe 1.1.1) nahezu unmöglich.

Die Vorteile der HPLC-MS, die Trennung des Stoffgemisches und die gleichzeitige Identifizierung mehrerer Verbindungen innerhalb eines Peaks darzustellen, macht sie heute zur meistgenutzten Analytikmethode. Die Umkehrphasen (RP)-HPLC ist die gebräuchlichste Methode in der Lipidanalytik, wobei auch Normalphasen (NP)-Methoden eingesetzt werden (Sugawara und Miyazawa, 1999; Markham *et al.*, 2006; Farwanah *et al.*, 2009). Dabei dienen die NP-Methoden eher der Lipidklassentrennung, die RP-Methoden der Trennung der Verbindungen innerhalb der Lipidklassen. Die mobilen Phasen sind meistens aus Wasser, Methanol oder Acetonitril zusammengesetzt (Camera *et al.*, 2004; Albrecht, 2005; Bartke *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurde ein Methanol-Wasser-Gradient erfolgreich zur GlyCer-Trennung genutzt. Während Elektrosprayionisation (ESI) eine gängige Ionisationstechnik unter Atmosphärendruck für Sphingolipide darstellt (Camera *et al.*, 2004; Albrecht, 2005; Bartke *et al.*, 2006; Markham *et al.*, 2006), wurden auch Methoden mit der Chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) etabliert (Fang *et al.*, 2005; Farwanah *et al.*, 2009). Bereits Raith, 1999, hatte auf den Vorteil der APCI-Technik für weniger polare Verbindungen hingewiesen.

Die massenspektrometrische Detektor-*Response* variiert mit der Cer-Klasse (Abb. 43). Die hier verwendete MS-Methode war für das Cer t18:1 h22:0 (**48**) beispielsweise sensitiver (steilerer Anstieg) als für Cer d18:2 h16:0 (**47**). Das gleiche Verhalten wurde für die untersuchten GlyCer beobachtet. Dieses Verhalten stellt ein Problem innerhalb der Lipidanalytik dar, da es zeigt, dass eine Referenzsubstanz nicht ohne weiteres stellvertretend für eine ganze Lipidklasse stehen kann. Bielawski *et al.*, 2006, fanden heraus, dass innerhalb und zwischen den Cer-Klassen

starke Abweichungen in der MS-Response auftreten können. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass bei optimierten Parametern (Ionisation und Fragmentierung für jedes einzelne Molekül) Substanzklassen mit unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen gleiche MS-Responses aufweisen können (Shaner *et al.*, 2009) und damit quantifizierbar sind. Dafür ist eine Kalibrierung der MS-Response notwendig (Markham und Jaworski, 2007). Markham und Jaworski, 2007, haben für jede Lipidklasse einen Response-Faktor eingeführt, um eine Kalibrierung mit einer Referenzsubstanz je Lipidklasse durchführen zu können. Jedoch stellt dieses Vorgehen einen hohen methodischen Aufwand dar.

Die MS/MS-Experimente (Ionenfalle) und HRMS-Untersuchungen (Orbitrap) wurden nach Elektrosprayionisation (ESI) durchgeführt. GlyCer und Cer waren als Natriumaddukte $[M+Na]^+$ im positiven Ionenmodus und als deprotonierte Pseudomolekülonen $[M-H]^-$ im negativen Modus nachweisbar. Mithilfe der hochaufgelösten Massenspektren wurden Summenformeln bestimmt. Ähnliche hochaufgelöste Massenspektren der GlyCer (z.B. Glc-d18:2 h20:1 (**12**) und Glc-d18:3 h20:0 (**14**), Tab. 50) wurden anhand von Retentionszeiten (LC-APCI/MS) oder MS/MS-Experimenten (Bestimmung Sphingobase und Fettsäure) identifiziert.

Tab. 50: MS-Identifizierung von Glycosylceramiden mit ähnlichen Molekülmassen

GlyCer – Glycosylceramide, Glc – Glucose, DBE – Doppelbindungs-äquivalent, RT – Retentionszeit, LCB – Sphingobase, FS – Fettsäure. Alle Daten in Tab. 31-32.

GlyCer	HRMS		DBE	LC-MS RT [min]	MS/MS	
	<i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Summen- formel für [M+Na] ⁺			<i>m/z</i> MS ² O (LCB)	<i>m/z</i> MS ² U (FS)
Glc-d18:1 h24:0 (42)	850,6772	C ₄₈ H ₉₃ NO ₉ Na	3	25,4	484,2	383,5
Glc-t18:1 h23:1 (21)	850,6364	C ₄₇ H ₈₉ NO ₁₀ Na	4	15,0	500,3	367,5
Glc-d18:2 h25:0 (43)	862,6759	C ₄₉ H ₉₃ NO ₉ Na	4	25,6	482,2	397,5
Glc-t18:1 h24:2 (20)	862,6389	C ₄₈ H ₈₉ NO ₁₀ Na	5	13,5	500,3	379,5
Glc-d18:2 h20:1 (12)	790,5822	C ₄₄ H ₈₁ NO ₉ Na	5	11,2	482,3	325,3
Glc-d18:3 h20:0 (14)	790,5811	C ₄₄ H ₈₁ NO ₉ Na	5	12,2	480,2	327,5
Glc-t18:1 h23:0 (32)	852,6540	C ₄₇ H ₉₁ NO ₁₀ Na	3	19,5	500,2	369,7
Glc-2OH-d18:2 h22:0 ^a (13)	852,6189	C ₄₆ H ₈₇ NO ₁₁ Na	4	11,8	514,3	355,5
Glc-t18:1 h25:0 (41)	880,6863	C ₄₉ H ₉₅ NO ₁₀ Na	3	23,8	500,3	397,6
Glc-2OH-d18:2 h24:0 ^a (25)	880,6498	C ₄₈ H ₉₁ NO ₁₁ Na	4	16,5	514,3	383,5

Für GlyCer wurde das Fragmentierungsschema in Anlehnung an die Nomenklatur von Ann und Adams, 1993, und basierend auf den Vorschlägen von Domon und Costello, 1988, sowie Costello, 1993, herangezogen. Es enthält Fragmente der intakten GlyCer (M', X₀, Y₀, Z₀) und weitere Fragmente, die von der Sphingobase (O) und der Fettsäure (U, T) herrühren (z.B. Abb. 15-16). Fragment O und U wurden für die Identifizierung der Sphingobase und der Fettsäure genutzt (Tab. 50, Tab. 32). Innerhalb der MS/MS-Untersuchungen sind auch weitere Fragmente (D, E, F, W, siehe Abb. 15-16) aufgetreten, die in dieser Form nicht den bekannten Fragmentierungsmustern entsprachen (Tab. A1).

Cer zeigten ein teilweise anderes Fragmentierungsmuster als ihre glycosylierten Formen (a-g, Abb. 39). Im positiven Modus waren weniger, im negativen Modus dagegen mehr Fragmente der Cer detektierbar. Jedoch entsprachen die charakteristischen Fragmente (O und U) denen der GlyCer und dienten der Identifizierung (Tab. A2).

5.2.2 NMR-Strukturaufklärung und ^1H -NMR-Fingerprinting als Screening-Methode

Mit den NMR-Experimenten (3.2.3.3) wurden GlyCer und Cer untersucht. Es wurden bereits unterschiedliche Lösungsmittel für die NMR-Untersuchung von GlyCer beschrieben. Sie reichten von reinem deuterierten Methanol (CD_3OD) (Nguyen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013), über ein Chloroform-Methanol-Gemisch ($\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$) (Kim *et al.*, 1997; Voutquenne *et al.*, 1999) bis zu DMSO- d_6 -haltigen Lösungsmitteln ($\text{DMSO-}d_6:\text{CDCl}_3$ (Chen *et al.*, 2003), $\text{DMSO-}d_6:2\% \text{D}_2\text{O}$ (Park *et al.*, 2005)). Auch Pyridin- d_5 wurde erfolgreich für das Lösen und Untersuchen von GlyCer in NMR-Experimenten verwendet (Gao *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2009; Cateni *et al.*, 2010) und diente in dieser Arbeit als Lösungsmittel. Große Mengen GlyCer, die beispielsweise in Methanol nicht rückstandslos gelöst werden konnten, sind in Pyridin- d_5 gelöst worden. Die Proben waren über lange Zeit im Lösungsmittel (Pyridin- d_5) stabil (mehrere Monate im Kühlschrank unter Lichtausschluss) und konnten zufriedenstellend gemessen werden. Die Pyridin- d_5 - ^1H -Signale (z.B. Fraktion A3: δ_{H} 7,213 ppm, 7,580 ppm und 8,734 ppm, Abb. A26) überlagerten keine GlyCer-Signale. Allerdings lag der Satellit eines ^1H -Signals von Pyridin- d_5 (δ_{H} 8,734 ppm) bei der gleichen chemischen Verschiebung wie das NH-Signal der Phytosphingenin (t18:1)-GlyCer (Abb. A28, A). Bei ausreichender Stoffkonzentration und damit intensiven Signalen stellte dies für eine Auswertung kein Problem dar. Auch im ^{13}C -NMR-Spektrum stellte die Verwendung von Pyridin- d_5 als Lösungsmittel mit einer Ausnahme kein Problem für die Signaldetektion dar. Das Signal der C-9-Position ($\Delta 9$, δ_{C} 135,216 ppm) des neu identifizierten Apfeltrester-GlyCer 8-OH-d18:2 $^{\Delta 4\text{E},9\text{E}}$ h16:0 (**1**, Malusid II) lag unter einem intensiven Signal von Pyridin- d_5 (δ_{C} 135,522 ppm), wurde jedoch mittels HSQC-Analyse nachgewiesen (Tab. 38).

Ein nicht zu vernachlässigendes Problem der NMR-Experimente stellte ein breiter Wasserpeak bei δ_{H} ca. 4,9-5,0 ppm in allen Proben dar, da in diesem ppm-Bereich das zur Aufklärung wichtige H-1''-Signal des Zuckers lag (z.B. für GlyCer des d18:2-Typs: δ_{H} ca. 4,94 ppm; t18:1: δ_{H} ca. 4,97 ppm; vgl. Abb. A26 und A8). Dennoch wurden die H-Signale und Kopplungskonstanten bei ausreichender Konzentration der GlyCer ausgewertet (z.B. Abb. A26 und A28). Durch das Trocknen im Vakuum-Konzentrator und Nachtrocknen im Exsikkator unter evakuierter konz. KOH-Atmosphäre konnte das H-Signal des Wassers gering gehalten, jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eventuell liegt durch die hohe Anzahl an Hydroxygruppen (9-11) eine Hydratisierung der GlyCer vor, die mit diesen Trocknungsmethoden nicht überwunden werden kann.

Da die Fraktionen nach HPLC ein Gemisch aus GlyCer und darüber hinaus *E/Z*-Strukturisomere einer GlyCer-Spezies enthielten, wurde die absolute Konfiguration der GlyCer im Vergleich mit bereits publizierten ^{13}C -Verschiebungen der entsprechenden Signale der Stereozentren bestimmt. Die Konfiguration der Doppelbindungen (*E/Z*) wurde mithilfe der vicinalen Kopplungskonstanten ermittelt. Vicinale Kopplungen ($^3J_{\text{H,H}}$) sind vom Torsionswinkel φ zwischen den beteiligten C-H-Bindungen abhängig (Karplus, 1959). Diese als Karplus-Beziehung bezeichnete Abhängigkeit zeigt bei Torsionswinkeln um 0° und 180° große Kopplungskonstanten, Torsionswinkel um 90° dagegen kleine vicinale Kopplungskonstanten. *E*-Doppelbindungen zeigen aufgrund des Torsionswinkels φ von 180° demnach vicinale Kopplungskonstanten zwischen 12-16 Hz. Dagegen weisen *Z*-Doppelbindungen kleinere vicinale Kopplungskonstanten auf (8-10 Hz, bei $\varphi 0^\circ$) (Mitchell und Costisella, 2007). Doppelbindungen an Position H-4,5 des Sphingadienin (d18:2)-Typs wurden beispielsweise aufgrund der Kopplungskonstante von 15,4 Hz als *E* identifiziert (z.B. Abb. A26). Überlagerten sich ^1H -Signale der Doppelbindungen (z.B. Position H-8 und H-9 im Spektrum des Sphingadienin (d18:2)-Typs, Abb. A26), konnte keine Kopplungskonstante aus den ^1H -NMR-Spektren ermittelt werden. Die Kopplungskonstante wurde dann über ^{13}C -Verschiebungen benachbarter Kohlenstoffatome bestimmt. In langen Alkenketten haben Kohlenstoffatome in Nachbarschaft zu *Z*-olefinischen Molekülstrukturen chemische Verschiebungen von δ_{C} ca. 27-28 ppm. Dagegen sind ^{13}C -Signale in Nachbarschaft zu *E*-Isomeren tieffeldverschoben bei δ_{C} ca. 32-33 ppm (De Haan und Van De Ven, 1973). Dieser Umstand kann mit sterischen Effekten, dem sogenannten γ -gauche-Effekt, erklärt werden. Das Proton des *E*-Isomers interagiert stärker mit dem olefinischen Proton, wogegen das *Z*-Isomer aufgrund fehlender räumlicher Nähe keine Interaktionen zeigt (Abb. 47). Die Abschirmung des *Z*-Isomers ist daher niedriger als die des *E*-Isomers und erscheint hochfeldverschoben (niedrigere Frequenzen) (De Haan und Van De Ven, 1973; Kleinpeter und Seidl, 2004). Gleiche Ergebnisse wurden für die langen Alkanketten der Sphingolipide nachgewiesen und dienen der Konfigurationsbestimmung (Shibuya *et al.*, 1990; Inagaki *et al.*, 1998; Voutquenne *et al.*, 1999).

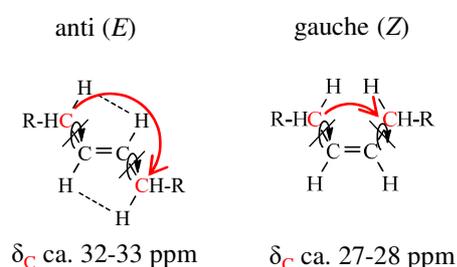


Abb. 47: Sterische Effekte bewirken Ab- und Entschirmung von benachbarten ^{13}C -Kernen

Zur Strukturaufklärung der GlyCer-Leitsubstanzen (**7**, **9**, **28**) und „Phyto“-Cer (**47-49**) wurden 2D-NMR-Experimente (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY und ROESY) durchgeführt. Während

der Untersuchungen wurden außerdem 1D-TOCSY-Experimente mit selektiver Anregung ausgewählter ^1H -Signale (z.B. NH) genutzt, um die wichtigsten Kopplungen dieser Spin-Systeme der GlyCer-Verbindung zu identifizieren (Abb. 48).

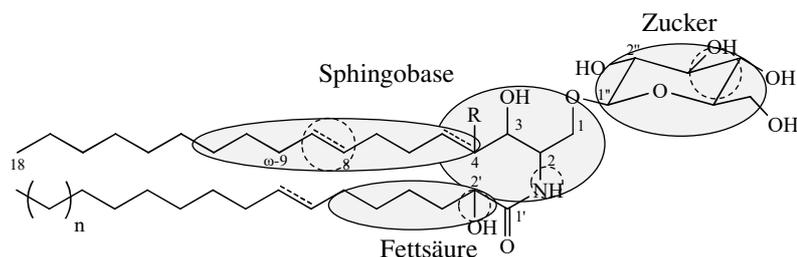


Abb. 48: Identifizierbare Molekülteile (grau) von Glycosylceramiden (R = H oder OH) mit 1D-TOCSY-Experimenten

Dafür wurden Bereiche innerhalb der Fettsäure (H-2'), des Zuckers (H-1'' und H-5'') und der Sphingobase (NH; H-8 und H-9, Signale liegen übereinander) ausgewählt (gestrichelte Linien, Abb. 48). Über die Kopplungen innerhalb dieser Spin-Systeme sind die wichtigsten Molekülstrukturen identifiziert worden. Es wurde jedoch keine Aussage über die Kettenlängen und die Lage einer Doppelbindung innerhalb der Fettsäure erhalten.

Während der NMR-Untersuchungen sind für die GlyCer-Spezies chemische ^1H -Verschiebungen für Schlüsselemente in allen Molekülteilen gefunden worden und ermöglichten eine Form des ^1H -NMR-Fingerprintings der GlyCer (Abb. 49). Dies ist für GlyCer bisher nicht beschrieben worden.

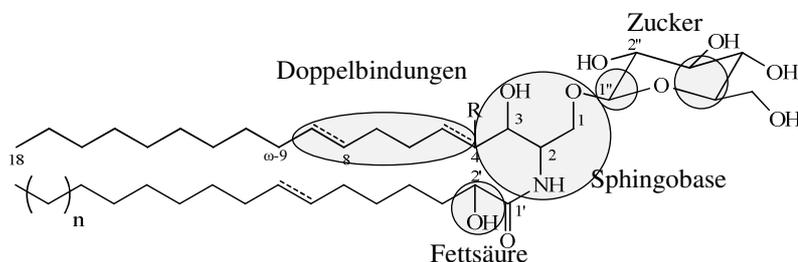


Abb. 49: Identifizierbare Molekülteile von Glycosylceramiden (R = H oder OH) mittels ^1H -NMR-Fingerprinting

Mit dieser Methode wurden die unterschiedlichen Molekülbereiche untersucht und Aussagen über die Sphingobase, die vorhandenen Doppelbindungen innerhalb der Sphingobase, den verknüpften Zucker und die amidartig verbundene Fettsäure getroffen (Abb. 49). Über die Kettenlängen der Sphingobasen und Fettsäuren sowie Doppelbindungen der Fettsäuren konnten keine Aussagen getroffen werden.

Zukünftige Untersuchungen können auf die hier vorgestellten Methoden und Ergebnisse (insbesondere 1D-TOCSY und ^1H -NMR-Fingerprinting) zurückgreifen. Abb. 50 zeigt die NMR-Experimente in Abhängigkeit zum Aufwand und den resultierenden Strukturinformationen.

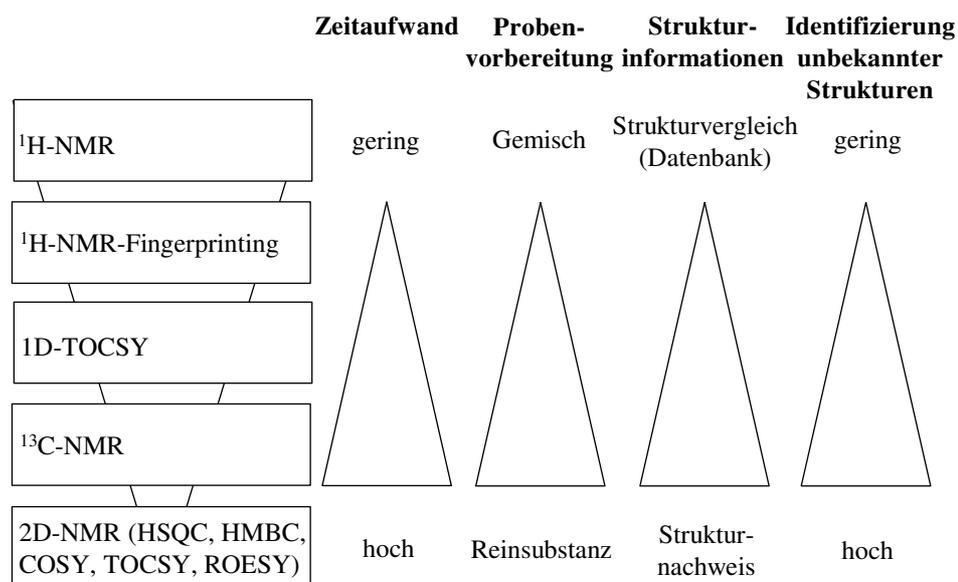


Abb. 50: Aufwand und Strukturinformationen der verwendeten NMR-Experimente

Bereits bekannte GlyCer können mit einfachen ¹H-NMR-Experimenten und dem ¹H-NMR-Fingerprinting detektiert werden. Mit zunehmender Unsicherheit über die Struktur sind weitere Experimente (1D-TOCSY, ¹³C-NMR) mit aufwändigeren Probenvorbereitungen und Messungen notwendig. Unbekannte Verbindungen können nur mit intensiven 2D-NMR-Experimenten identifiziert werden und bedürfen eines hohen Aufwands. Mit der Erkenntnis der NMR-Signale aus entsprechenden Leitsubstanzen (z.B. Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-d18:1 h16:0 (**9**) und Glc-t18:1 h22:0 (**28**)) wurden in dieser Arbeit viele GlyCer verglichen und ihre Kernstruktur identifiziert (Tab. 36, Abb. A45-A46). Zusammen mit massenspektrometrischen Daten war schließlich eine eindeutige Identifizierung inklusive Kettenlängen möglich. Unbekannte GlyCer (z.B. Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**), Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (**1**), Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (**2**)) wurden mit den vorgestellten 1D- und 2D-NMR-Experimenten strukturell aufgeklärt.

5.2.3 Identifizierte Glycosylceramide in Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz

Die identifizierten GlyCer in Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz sind in Tab. 51 aufgeführt. Haupt- und Spurenkomponenten wurden anhand der LC-MS-Daten (Abundanz) der GlyCer-angereicherten Fraktionen eingeteilt.

Insgesamt wurden 46 GlyCer in den Pflanzenmaterialien identifiziert. Dabei zeigte sich, dass bestimmte GlyCer die Hauptkomponenten in allen drei Pflanzenmaterialien darstellten: Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**). Sphingadienin (d18:2)-Basen waren vornehmlich mit kurzkettigen Fettsäuren (h16:0, h20:0) und Phytosphingenin (t18:1)-Typen eher mit langkettigen Fettsäuren (h22:0 und h24:0) verknüpft. Dies wurde bereits von Fujino *et al.*, 1985, in Weizenkörnern berichtet und scheint typisch für pflanzliche GlyCer

zu sein. Jedoch zeigten Apfeltrester und Weizenkeime Glc-d18:2 h24:0 (**39**) als eine weitere Hauptkomponente und Abweichung dieser Regel.

Tab. 51: Haupt- und Spurenkomponenten in Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz

Alle Verbindungen sind GlyCer (Glc-: Glucose). Die GlyCer mit dem größten Anteil der Gesamt-GlyCer sind **fett** gedruckt.

Apfeltrester		Weizenkeime		Kaffeesatz	
Hauptkomponente (Glc-)	Spurenkomponente (Glc-)	Hauptkomponente (Glc-)	Spurenkomponente (Glc-)	Hauptkomponente (Glc-)	Spurenkomponente (Glc-)
		d18:1 h16:0 (9)	d18:1 h18:0 (15)		
		d18:1 h20:0 (26)	d18:1 h24:0 (42)		
		d18:1 h22:0 (34)			
d18:2 h16:0 (7)	d18:2 h15:0 (5)	d18:2 h16:0 (7)	d18:2 h19:0 (16)	d18:2 h16:0 (7)	d18:2 h22:0 (31)
d18:2 h24:0 (39)	d18:2 h20:0 (22)	d18:2 h18:0 (11)	d18:2 h23:0 (35)		d18:2 h24:0 (39)
	d18:2 h22:0 (31)	d18:2 h20:0 (22)	d18:2 h25:0 (43)		
	d18:2 h23:0 (35)	d18:2 h21:0 (27)	d18:2 h26:0 (46)		
	d18:2 h25:0 (43)	d18:2 h22:0 (31)			
		d18:2 h24:0 (39)			
		d18:2 h24:1 (30)	d18:2 h18:1 (8)		
			d18:2 h20:1 (12)		
			d18:2 h22:1 (24)		
			d18:2 h25:1 (37)		
			d18:2 h26:1 (40)		
			d18:3 h20:0 (14)		
t18:1 h22:0 (28)	t18:1 h16:0 (6)	t18:1 h20:0 (17)	t18:1 h25:0 (41)	t18:1 h22:0 (28)	t18:1 h23:0 (32)
t18:1 h23:0 (32)	t18:1 h20:0 (17)	t18:1 h22:0 (28)	t18:1 h26:0 (44)	t18:1 h24:0 (36)	t18:1 h25:0 (41)
t18:1 h24:0 (36)	t18:1 h21:0 (23)	t18:1 h23:0 (32)			
t18:1 h25:0 (41)	t18:1 h26:0 (44)	t18:1 h24:0 (36)			
		t18:1 h22:1 (19)	t18:1 h23:1 (21)		
		t18:1 h24:1 (29)	t18:1 h28:1 (45)		
		t18:1 h25:1 (33)			
		t18:1 h26:1 (38)			
			t18:1 h24:2 (20)		
	8-OH-d18:2 h16:0 (1)				
	9-OH-d18:2 h16:0 (2)				
	8-keto-d18:2 h16:0 (4)				
	OH-t18:1 h22:0 (10)				
	OH-t18:1 h24:0 (18)				
	2OH-d18:2 h16:0 (3)				
	2OH-d18:2 h22:0 (13)				
	2OH-d18:2 h24:0 (25)				
Anzahl:	6	18	17	3	4
	23	35	7		

Elf Kombinationen aus Sphingobasen (insgesamt 8) und Fettsäurearten (insgesamt 3) wurden nachgewiesen. Die Sphingobasen vom Sphingadienin (d18:2)-, Sphingenin (d18:1) und Phytosphingenin (t18:1)-Typ waren die häufigsten, wobei nur in Weizenkeimen GlyCer vom Sphingenin (d18:1)-Typ identifiziert wurden. Dabei waren die Doppelbindungen an Position C-8,9 *Z*- oder *E*-konfiguriert, Doppelbindungen an Position C-4,5 dagegen ausschließlich *E*-konfiguriert. Alle neu entdeckten GlyCer des Apfeltresters mit zusätzlichen Hydroxy- oder Keto-Gruppen innerhalb der Sphingobase stellten Spurenkomponenten des Apfeltresters dar. Sie leiteten sich von den weitaus häufiger vorkommenden Sphingobasen Sphingadienin (d18:2 → 8/9OH-d18:2, 8-keto-d18:2, 2OH-d18:2) und Phytosphingenin (t18:1 → OH-t18:1) ab. Sie waren alle mit den häufigsten geradzahligten Fettsäuren (h16:0, h22:0 und h24:0) verknüpft. Alle Fettsäuren lagen α -hydroxyliert vor. Das wurde mit MS/MS-Experimenten (4.2.3), 2D-NMR-Experimenten (4.2.4) und ^1H -NMR-Fingerprinting (4.2.6) nachgewiesen.

Sperling *et al.*, 2004, gehen davon aus, dass ungefähr 95 % der in pflanzlichen GlyCer enthaltenen Fettsäuren α -hydroxyliert vorliegen. Obwohl die Hauptkomponenten aller Pflanzenmaterialien geradzahlige Fettsäurekettenlängen aufwiesen (h16:0, h22:0, h24:0), wurden einige ungeradzahlige Fettsäuren (z.B. h21:0, h23:0, h25:0) bestimmt. Die Kettenlängen der Fettsäuren reichten von C15 bis C28 (h15:0 (Apfeltrester), h28:1 (Weizenkeime)).

Alle GlyCer enthielten β -Glucose als Zucker. Dies wurde mithilfe von NMR-Daten (4.2.4) und einem zuckerspezifischen TLC-Nachweis nach der Hydrolyse von GlyCer in „Phyto“-Cer (Abb. 38) nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Monohexosyl-GlyCer bestimmt. Di-, Tri- und Tetra-GlyCer sind in Pflanzen in geringen Mengen vorhanden (z.B. in Weizen: Laine und Renkonen, 1974; Fujino und Ohnishi, 1983). Glucose wurde in Weizen als die häufigste Hexose gefunden (97,4 %), die an GlyCer geknüpft ist (Fujino und Ohnishi, 1983). Mannose machte nur einen kleinen Teil aus (2,6 %) und wurde auch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Jedoch muss gesagt werden, dass der viel kleinere Mannose-Anteil mit den hier beschriebenen Methoden bei gleichzeitiger Detektion von Glucose nicht nachweisbar wäre. Dafür müssten alternative Methoden (z.B. GC-MS, Itonori *et al.*, 2004) herangezogen werden.

Im untersuchten **Apfeltrester** wurden 23 GlyCer nachgewiesen, von denen 6 als Hauptkomponenten und 17 als Spurenkomponenten eingeschätzt worden sind (Tab. 51). Die Sphingobasen der GlyCer des Apfeltresters waren vom Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typ. Untersuchungen von Whitaker, 1997, beschrieben Glc-d18:2 h16:0 (**7**) und Glc-t18:1 h22/23/24:0 (**28/32/36**) als GlyCer-Hauptkomponenten des Apfels. Auch Takakuwa *et al.*, 2005, wiesen die Sphingobasen t18:1 und d18:2 (zusammen 98 %) mit *Z*- und *E*-Konfigurationen an Position C-8,9 der Sphingobase im Apfel nach. Die Doppelbindungen an Position C-4,5 waren alle *E*-konfiguriert (Takakuwa *et al.*, 2005). Die neu entdeckten Sphingobasen (8/9OH-d18:2, 8-keto-d18:2, 2OH-d18:2, OH-t18:1) waren Derivate des Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typs. Sie zeigten weitere Hydroxylierungen (z.B. an Position C-8 und C-9) und Doppelbindungspositionen (z.B. Δ^7 und Δ^9), die so noch nicht in Pflanzen nachgewiesen wurden (siehe auch 5.2.5). Andere Untersuchungen zeigten auch die Sphingobasen vom Dihydrosphingosin (d18:0)-, Sphingenin (d18:1)- (Takakuwa *et al.*, 2005) und Phytosphingosin (t18:0)-Typ (Takakuwa *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2014) in geringen Mengen. Diese konnten mit den hier vorgestellten Methoden nicht nachgewiesen werden. Unterschiedliche Apfelsorten zeigen teilweise eine andere Sphingobasen- und Fettsäurezusammensetzung (Ogawa *et al.*, 2014). Der untersuchte Apfeltrester stellt ein Gemisch unterschiedlicher Apfelsorten dar (Sorten: Remo, Rewena, Relinda, Reglindis, Retina und Greensleaves; Becker - Eislebener Fruchtsaft, 2016). Daher kann nicht genau gesagt werden, für welche Sorte die hier präsentierten Ergebnisse zutreffen.

Die nachgewiesenen Fettsäurekettenlängen reichten von C15 bis C26. Die Hauptkomponenten waren vornehmlich aus den Fettsäuren h16:0, h22:0, h23:0, h24:0 und h25:0 aufgebaut.

Takakuwa *et al.*, 2005, berichteten mit h16:0, h22:0, h23:0 und h24:0 die gleichen häufigsten Fettsäuren. Sie machten zusammen 98 % der Fettsäuren innerhalb der GlyCer aus (Takakuwa *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den Studien von Takakuwa *et al.*, 2005, und Ogawa *et al.*, 2014, wurden weitere Fettsäuren (h15:0, h26:0) nachgewiesen. Diese waren jedoch nur in Spuren vorhanden. Ein pflanzliches GlyCer mit einer kurzkettigen ungeradzahligen Fettsäure (hier: Glc-d18:2 h15:0 (5)) ist selten, wurde jedoch bereits im Gemüse Portulak (*Portulaca oleracea*) beschrieben (Glc-d18:1^{Δ8} h15:0, Glc-d17:1^{Δ4} h15:0, Lei *et al.*, 2015).

Das Spektrum der GlyCer-Spezies der **Weizenkeime** war komplexer als das des Apfeltresters. Während die GlyCer-Fraktion des Apfeltresters zum größten Teil aus sechs GlyCer zusammengesetzt war, machten bei den Weizenkeimen 18 GlyCer einen großen Anteil aus (Tab. 51). Weitere 17 GlyCer wurden in Spuren nachgewiesen (Gesamtanzahl 35, Tab. 51). Für Weizenkeim-GlyCer wurden drei Sphingobasen nachgewiesen, aus denen sich alle Verbindungen zusammengesetzt haben: Sphingadienin (d18:2), Sphingenin (d18:1) und Phytosphingenin (t18:1) (Carter *et al.*, 1961a; Macmurray und Morrison, 1970; Fujino und Ohnishi, 1983). Dihydrosphingosin (d18:0), ein weiteres Sphingosinderivat (d18:1) und Phytosphingosin (t18:0), welche von anderen Arbeitsgruppen identifiziert worden sind (Carter *et al.*, 1961a; Macmurray und Morrison, 1970; Fujino und Ohnishi, 1983; Goto *et al.*, 2012), konnten nicht bestimmt werden. Eine bisher in Weizen nicht beschriebene Sphingatrienin-Base (d18:3) wurde darüber hinaus nachgewiesen. Sie lag als Spurenkomponente und an eine h20:0-Fettsäure gebunden vor (Glc-d18:3 h20:0 (14)). Hierbei konnte die Lage der dritten Doppelbindung bisher nicht bestimmt werden. Es kann jedoch gesagt werden, dass sie sich nicht an Position C-1 und C-2 befindet, da sich dies in MS/MS-Experimenten auf das Fragment T (*m/z* 375,8 Da) ausgewirkt hätte. Obwohl sie selten vorkommen, wurden Cer und GlyCer mit einer Sphingobase vom Sphingatrienin (d18:3)-Typ (2-Amino-(4*E*,8*E*,10*E*)-octadeca-4,8,10-trien-1,3-diol) bisher in unterschiedlichen Organismen gefunden: Armfüßer (Brachiopoda) *Lingula unguiss* (Hayashi *et al.*, 1990), Invertebraten (Durán *et al.*, 1998; Díaz de Vivar *et al.*, 2002; Chludil *et al.*, 2003), Skeletonema-Microalgen (Zhao *et al.*, 2013) oder als verzweigte (9-Methyl-)Form (d19:3) in Pilzen (Shu *et al.*, 2004). In Höheren Pflanzen wurde die Sphingobase bisher nur in Tabakblättern (Sperling *et al.*, 2005) oder Reis und Mais (Sugawara *et al.*, 2010) nachgewiesen. In Anlehnung an die berichteten Sphingatrienin (d18:3)-GlyCer liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine ähnliche Anordnung der Doppelbindungen (^{Δ4,8,10}) handelt. Für die Bildung der Doppelbindungen innerhalb der Sphingobasen Sphingadienin (d18:2), Sphingenin (d18:1) und Phytosphingenin (t18:1) sind bereits die Enzyme Sphingolipid-Δ4- und Sphingolipid-Δ8-desaturase identifiziert worden (Warnecke und Heinz, 2003). Die Herkunft und Bedeutung der Sphingatrienin (d18:3)-Basen ist bisher nicht aufgeklärt worden.

In diesen Untersuchungen wurden ausschließlich α -hydroxylierte Fettsäuren identifiziert. Fujino und Ohnishi, 1983, haben jedoch auch nicht-hydroxylierte Fettsäuren nachgewiesen. Des Weiteren sind geradzahlige und ungeradzahlige Fettsäuren mit Kettenlängen von C16 bis C28 bestimmt worden. Andere Studien zeigten ebenso Kettenlängen zwischen C14 und C26 (Tab. 4-5). Die geradzahligen Kettenlängen stellten den größeren Anteil dar. Die Fettsäuren h16:0, h18:0 und h20:0 wurden sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Studien als häufigste Fettsäuren der GlyCer gefunden (Carter *et al.*, 1961a; Macmurray und Morrison, 1970; Fujino und Ohnishi, 1983). Einfach ungesättigte GlyCer-Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C18 und C28 wurden in Weizenkeimen nachgewiesen. Diese GlyCer mit ungesättigten Fettsäuren stellten zum Teil Hauptkomponenten dar (Glc-d18:2 h24:1 (**30**), Glc-t18:1 h22/24/25/26:1 (**19/29/33/38**)) und waren mit Sphingadienin (d18:2) und Phytosphingenin (t18:1) verknüpft. Imai *et al.*, 1995, wiesen Kettenlängen der ungesättigten Fettsäuren von h22:1, h24:1, h25:1 und h26:1 in Weizenblättern und Zhu *et al.*, 2013, die Fettsäure h24:1 in Weizenkleie nach. Eine einfach ungesättigte h28:1 (Glc-t18:1 h28:1 (**45**)) und eine zweifach ungesättigte h24:2 Fettsäure (Glc-t18:1 h24:2 (**20**)) sind in Weizen erstmals identifiziert worden. Über das Vorkommen einer kurzkettigen (allerdings nicht-hydroxylierten), zweifach ungesättigten Fettsäure (18:2) ist in Weizenkörnern berichtet worden (Bizot-Foulon *et al.*, 1995). Imai *et al.*, 1995, identifizierten die Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren von GlyCer in Weizenblättern als Z-Konfiguration und ω -9-Serien. Z-Konfigurationen von Doppelbindungen erscheinen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vorzugsweise in Triplett-Form (Rossi und Carpita, 1977; Inagaki *et al.*, 1998). Diese detektierte Triplett-Struktur ($J=6,0$ Hz) des $^1\text{H-NMR}$ -Signals führte zum Nachweis einer Z-Konfiguration der Fettsäuredoppelbindung (Abb. 23). Weiterhin wurde anhand der ^{13}C -chemischen Verschiebungen der benachbarten C-Atome (C-14' und C-17' bei Glc-t18:1 h24:1 (**29**), 27-28 ppm) auf die Z-Konfiguration der Doppelbindung geschlossen (Abb. 23). Die Lage der Doppelbindung ist als DMDS-Derivat in einer massenspektrometrischen MS/MS-Analyse nachgewiesen worden (Abb. 24). Die Lage der zweiten Doppelbindung in der zweifach ungesättigten Fettsäure von Glc-t18:1 h24:2 (**20**) konnte aufgrund der geringen Menge nicht bestimmt werden. Es wird aber von einer ω -6,9-Serie ausgegangen, da diese Positionen bereits in menschlichen Sphingolipiden nachgewiesen wurden (Pitas *et al.*, 1978). Eigentlich sind in amidartig gebundenen Verbindungen nur einfach ungesättigte ω -9-Fettsäuren (20:1-26:1), basierend auf der Elongation von Ölsäure ($18:1^{\omega Z}$), vorzufinden. Einfach oder mehrfach ungesättigte C18-Fettsäuren werden ausgeschlossen (Sperling *et al.*, 2004). Dennoch wurden in Weizenkeimen die Sphingolipid-Fettsäuren h18:1, h28:1 und h24:2 massenspektrometrisch in Spuren nachgewiesen (4.2.2, 4.2.3). Die Untersuchung zu Sphingolipiden der Hefe *Wickerhamomyces ciferri* (*Hansenula ciferri*) offenbarte ebenfalls das Vorkommen ein- und mehrfach ungesättigter Fettsäuren 18:1, 18:2 und 18:3 (Kaufman *et al.*, 1971).

Wenige Studien berichteten bisher vom Vorkommen intakter GlyCer in Weizen (Sullards *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2013). In Weizenkeimen wurden die GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-d18:2 h20:0 (**22**) und Glc-d18:1 h16:0 (**9**) als Hauptkomponenten nachgewiesen (Sullards *et al.*, 2000), was den hier vorgestellten Daten entspricht. Außerdem wurden GlyCer vom Phytosphingenin (t18:1)-Typ als weitere Hauptkomponenten ausgemacht. Zhu *et al.*, 2013, berichteten von insgesamt 12 GlyCer in Weizenkleie (Tab. 5), die nun ebenfalls in Weizenkeimen nachgewiesen worden sind.

Sieben GlyCer wurden erstmals im **Kaffeesatz** (*Coffea arabica*) nachgewiesen. Davon stellten drei GlyCer Hauptkomponenten dar (Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**)). Vier weitere Spurenkomponenten hatten gleiche Sphingobasen (d18:2 und t18:1), aber teilweise ungeradzahlige verknüpfte Fettsäuren (h23:0 und h25:0). Zudem wurden die Sphingolipide im Kaffeesatz nach entsprechender Röstung und Perkolation mit heißem Wasser als intakte Verbindungen nachgewiesen, was für die Stabilität von pflanzlichen GlyCer bei hohen Temperaturen spricht.

5.2.4 Funktion der Glycosylceramide in Pflanzen

GlyCer sollen einen Einfluss auf die Kryostabilität der pflanzlichen Membran haben (Pata *et al.*, 2010). Ein Aspekt kommt dabei der 8Z- oder 8E-Desaturierung der Sphingobase zu. 85-90 % der Sphingobasen in *Arabidopsis thaliana* besitzen eine 8Z- oder 8E-Desaturierung (Chen *et al.*, 2012). *Arabidopsis thaliana* verhält sich gegenüber niedrigen Temperaturen sensitiver, wenn Sphingobasen keine $\Delta 8$ -Doppelbindung enthalten (Chen *et al.*, 2012). Pflanzliche $\Delta 8$ -Desaturasen sind stereounspezifisch (Sperling *et al.*, 2004). Dennoch lagen die relativen Verhältnisse von 8Z- gegenüber 8E-Isomeren in 10 Polygonaceae (Blätter) (Watanabe *et al.*, 2011) und 33 Poaceae (Blätter) (Watanabe und Imai, 2011) auf Seiten der 8Z-Isomere. Es ist wahrscheinlich, dass das Verhältnis der Isomere zueinander in jeder Pflanzenfamilie unterschiedlich ist und auf Familienebene als chemotaxonomischer Marker verwendet werden kann (Imai *et al.*, 1997). Bei den hier untersuchten Cer des Apfeltresters, die nach Hydrolyse der GlyCer erhalten worden sind, hatte das Z-Isomer den größeren Mengenanteil (d18:2 ^{$\Delta 8E,8EZ$} h16:0 (**47**) \rightarrow E:Z 1:2,5; t18:1 ^{$\Delta 8EZ$} h22:0 (**48**) \rightarrow E:Z 1:2; t18:1 ^{$\Delta 8EZ$} h24:0 (**49**) \rightarrow E:Z 1:3, Abb. 40). In den Untersuchungen von Takakuwa *et al.*, 2005, übertraf die Z-Konfiguration von GlyCer die E-Konfiguration ebenfalls um das zwei- (d18:2) und dreifache (t18:1). Andere Untersuchungen zeigten sogar GlyCer-Verhältnisse von E:Z zwischen 1:5 bis 1:104 (d18:2) und 1:2 bis 1:37 (t18:1) (Ogawa *et al.*, 2014). Es wurde berichtet, dass 8Z-ungesättigte Sphingobasen niedrigere Phasenübergangstemperaturen für den Gel-zu-Flüssigkristall-Phasenübergang haben (Ohnishi *et al.*, 1988). Man geht davon aus, dass das Verhältnis von 8Z- zu 8E-ungesättigten Verbindungen in kälteresistenten und kältesensitiven Pflanzen unterschiedlich ist. Allerdings konnte keine Korrelation der Kälteresistenz mit 8Z-ungesättigten

Verbindungen nachgewiesen werden, wenn Di- und Trihydroxy-GlyCer zusammen in Betracht gezogen wurden (Imai *et al.*, 1997). Kälteresistente (8E:Z → 1:6 bis 4:1) und -sensitive (8E:Z → 1:4 bis 10:1) Pflanzen zeigten ähnliche Verhältnisse. Jedoch wurde für Trihydroxy-GlyCer (t18:1) ein anderes Verhältnis beobachtet. Alle kälteresistenten (8E:Z → 1:33 bis 1:1,1) Pflanzen zeigten in Bezug auf Trihydroxy-GlyCer größere Mengen des Z-Isomers gegenüber dem E-Isomer im Gegensatz zu kälteempfindlichen Vertretern (8E:Z → 1:17 bis 4:1) und könnten somit einen Vorteil in winterharten Zeiten haben (Imai *et al.*, 1997). Hohe Konzentrationen an 8Z-Isomeren waren auch bei kälteresistenten Weinreben zu finden (Kawaguchi *et al.*, 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass sich die Menge der 8Z-Isomere in jungen Blättern der (kälteresistenten) Sojabohne unter erniedrigten Temperaturen erhöhen ließ (Imai *et al.*, 1997). Der Kulturapfel (*Malus domestica*) ist wie der Saatweizen (*Triticum aestivum*) eine kälteresistente Pflanze, was die erhöhten 8Z-Anteile erklären könnte. In *Stylosanthes hamata* wurde eine $\Delta 8$ -Desaturase gefunden, die eine Z-Isomer-Präferenz von Phytosphingenin (t18:1^{Δ8Z}) hat (Ryan *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde bewiesen, dass erhöhte Anteile der Z-Isomere (t18:1^{8Z}) einen Schutz der Pflanze vor Aluminium-Stress darstellen kann (Ryan *et al.*, 2007). Dennoch gibt es bisher keine Beweise, dass die Pflanze einen Vorteil durch den höheren Anteil an 8Z-Isomeren hat.

Außerdem scheint die Fettsäure eines GlyCer für die Kryostabilität eines Pflanzengewebes von Bedeutung zu sein. Je länger die α -hydroxylierte Fettsäure ist, desto größer ist die Phasenübergangstemperatur der GlyCer (Imai *et al.*, 1997). Langkettige Fettsäuren (h22:0 und h24:0) sind vorzugsweise mit Trihydroxybasen (t18:1) verknüpft (Fujino *et al.*, 1985). ω -9-Z-ungesättigte, langkettige α -OH-Fettsäuren (z.B. h22:1, h24:1) treten bevorzugt in kälteresistenten Pflanzen wie Weizen, Hafer oder Roggen auf (Lynch und Steponkus, 1987; Cahoon und Lynch, 1991; Uemura und Steponkus, 1994; Imai *et al.*, 1995). Dagegen enthalten kältesensitive Pflanzen wie Reis oder Mais eher gesättigte Fettsäuren als GlyCer-Bestandteile (Imai *et al.*, 1995). Nur in Weizenkeimen wurden ungesättigte Fettsäuren nachgewiesen und bestätigten diese Hypothese. Obwohl auch der Kulturapfel eine kälteresistente Pflanze ist, konnten für ihn keine ungesättigten Fettsäuren nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass zusätzlich zur Kälteresistenz auch eine phylogenetische Zugehörigkeit entscheidend ist.

5.2.5 Neuartige Glycosylceramide des Apfeltresters

Während der Aufreinigung der GlyCer-angereicherten Fraktionen des Apfeltresters wurden acht neuartige, bisher nicht beschriebene GlyCer identifiziert. Diese waren in Spuren enthalten. Sie basierten auf den ebenfalls im Apfeltrester enthaltenen Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-GlyCer und besaßen β -Glucose als Zuckerkomponente sowie die gesättigten, α -hydroxylierten Fettsäuren h16:0, h22:0 und h24:0.

Drei GlyCer wurden als **Derivate des Sphingadienin (d18:2)**-Typs nachgewiesen: Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**4**, Malusid I), Glc-8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (**1**, Malusid II) und Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (**2**, Malusid III). Die GlyCer lagen in Fraktion A1 des Apfeltresters als Gemisch vor. Sie wurden mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 in die Fraktionen A1-1 (Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**)) und A1-2 (GlyCer Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (**1**) und Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (**2**)) aufgetrennt. Eine präparative Trennung der GlyCer Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (**1**) und Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (**2**) war nicht möglich. Sie wurden mithilfe von HPLC-MS getrennt (Abb. 25) und in Fraktion A1-2 nebeneinander vorliegend mittels NMR-Experimenten identifiziert.

Ähnliche Verbindungen wurden bisher nur in Pilzen gefunden (Qi *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2012) (Abb. 51).

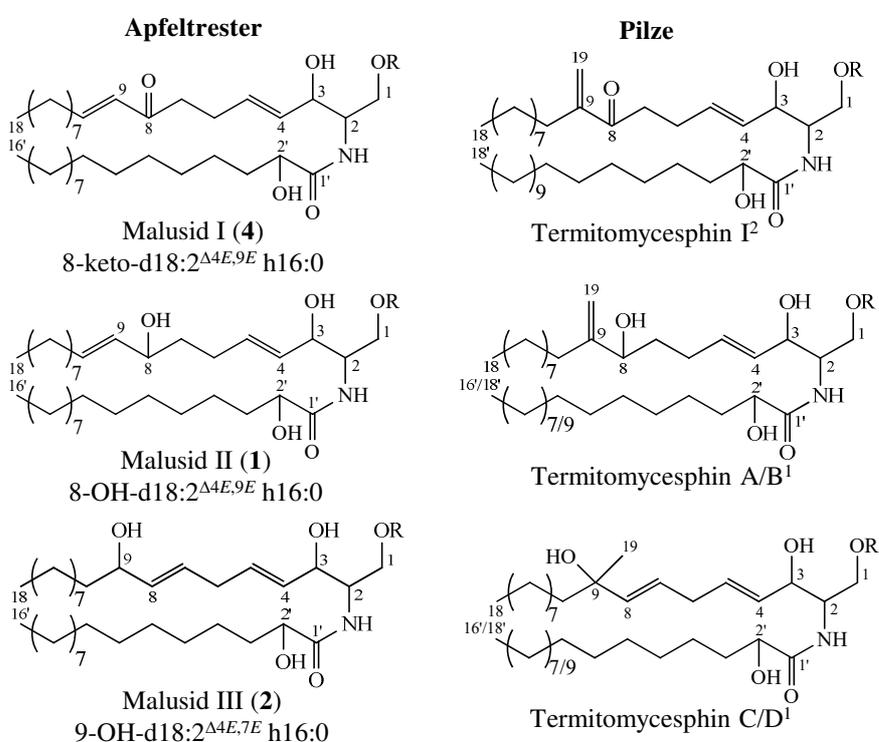


Abb. 51: Neue Glycosylceramide (Maluside I-III, **4**, **1**, **2**) und bekannte Pilz-Glycosylceramide

Die Pilz-GlyCer stammen aus den Pilzen *Termitomyces albuminosus* (¹ – Qi *et al.*, 2000) und *Termitomyces titanicus* (² – Choi *et al.*, 2012). R = Glucose

Die pilzlichen GlyCer wiesen jedoch neben der Ketogruppe an Position C-8 und der Hydroxygruppe an Position C-8/9 die für pilzliche Sphingobasen typische Verzweigung einer Methyl-/Methylengruppe an Position C-9 auf (Del Poeta *et al.*, 2014). Dadurch konnte es sich bei den in dieser Arbeit aufgereinigten GlyCer nicht um pilzliche Sphingolipide handeln. Die aus Pilzen isolierten GlyCer (Termitomycesphine) traten in Mengen zwischen 0,27 und 0,57 mg/100 g Trockengewicht auf (Qi *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit isolierten GlyCer

wiesen ähnliche Mengen von ca. 0,51 mg/100 g Trockengewicht (bei ca. 2,5 mg GlyCer) auf und legten nahe, dass es sich nicht um eine Verunreinigung durch einen anderen Organismus handelte, da für gleiche Mengen auch entsprechende pilzliche Ausgangsmengen (Apfeltrester: 750,0 g) notwendig gewesen wären. Außerdem ist bisher keines dieser GlyCer in anderen Organismen (wie Pilzen) nachgewiesen worden. Für einige pilzliche Sphingolipide (hier: Glc-9-methyl-d18:2^{Δ4,8} h16:1^{Δ3'}, Glc-9-methyl-d18:2^{Δ4,8} h18:1^{Δ3'}) wurden Fähigkeiten als Elicitoren in Pflanzen beschrieben (Koga *et al.*, 1998). Sphingolipide mit nicht methyliertem Sphingadienin (d18:2^{Δ4,8}) zeigten dagegen keine Elicitoren-Fähigkeiten (Koga *et al.*, 1998). Ob der strukturelle Unterschied der Hydroxy- und Ketogruppen an ähnlicher Stelle (C-8 und C-9) der neu entdeckten pflanzlichen GlyCer vergleichbare starke Auswirkungen haben kann, muss in zukünftigen Studien geprüft werden.

Eine weitere GlyCer-Klasse, die eine zweifach hydroxylierte Sphingadienin (2OH-d18:2)-Base enthält, wurde aufgrund der geringen Mengen massenspektrometrisch charakterisiert: Glc-2OH-d18:2 h16/22/24:0 (**3/13/25**). Bei der Sphingobase 2OH-d18:2 könnte es sich um ein Derivat der detektierten Sphingobasen 8-OH-d18:2^{Δ4,9} oder 9-OH-d18:2^{Δ4,7} handeln. Die Lage der Hydroxygruppen konnte nicht bestimmt werden.

Außerdem wurden **Derivate des Phytosphingenin (t18:1)**-Typs massenspektrometrisch nachgewiesen: Glc-OH-t18:1 h22/24:0 (**10/18**). Sie besitzen eine zusätzliche Hydroxygruppe innerhalb der Sphingobase, deren Position nicht bestimmt werden konnte. Im MS/MS-Massenspektrum wurde die zusätzliche OH-Gruppe nicht wie bei den Sphingadienin (d18:2)-basierten Vertretern durch eine weitere Wasserabspaltung (Z_0') nachgewiesen (Abb. A18). Ob das an der Lage der Hydroxygruppe lag oder an der abweichenden Phytosphingenin (t18:1)-Sphingobase, konnte nicht ermittelt werden. Die GlyCer verhielten sich auch bei der Detektion nach APCI (LC-MS) anders als die zuvor beschriebenen Verbindungen. Im Quadrupol-Massenspektrometer wurden sie bei den vorgegebenen Parametern nach APCI (+4,5 kV, 5 μ A, CID 150 V) unter Wasserabspaltung detektiert ($[M-H_2O+H]^+$, Tab. 32). Erst die massenspektrometrische Untersuchung nach Elektrosprayionisation (Ionenfalle und Orbitrap) offenbarte die m/z der Parentalionen (M, Tab. 31-32). Ein ähnliches Tetrahydroxy-Cer des menschlichen *Stratum corneums* wurde von t'Kindt *et al.*, 2012, massenspektrometrisch charakterisiert. Cer [NT] (OH-t18:0 18:0) bildet mit ca. 1,7 % nur einen kleinen Anteil der Haut-Cer (t'Kindt *et al.*, 2012). Die Position der zusätzlichen Hydroxygruppe konnte auch hier bisher nicht bestimmt werden (Rabionet *et al.*, 2014).

Pflanzliche GlyCer mit zusätzlichen Hydroxygruppen (als „Tetrahydroxy“-Typ) sind bisher nicht beschrieben worden. Der Metabolismus von Sphingolipiden in Tieren und Pflanzen ist größtenteils konserviert (vgl. Abb. A48, Pata *et al.*, 2010; Zauner *et al.*, 2010). Bioaktive Sphingolipide können einerseits durch den Abbau komplexer Verbindungen (Salvage-Pathway) und andererseits durch die *de novo*-Synthese entstehen (Abb. A48, Merrill *et al.*, 2001).

Desaturasen und Hydroxylasen sind für die Strukturvielfalt verantwortlich (Lynch und Dunn, 2004; Pata *et al.*, 2010). Die Hydroxylierungen und die Ketogruppe von Malusid I-III (**4**, **1**, **2**) befinden sich im Bereich der Positionen C-8 und C-9. An diesen Positionen setzt die $\Delta 8$ -Desaturase an. Es ist vorstellbar, dass es im Falle der neuartigen, zusätzlich hydroxylierten GlyCer zu einer fehlerhaften Desaturierung eines GlyCer an Position C-8 und C-9 durch die $\Delta 8$ -Desaturase gekommen ist. Eine unvollständige Bildung der Doppelbindung durch fehlende Dehydratisierung könnte ein Grund dafür sein. Ob eventuell weitere Hydroxylasen oder Desaturasen als die bisher bekannten $\Delta 4$ - und $\Delta 8$ -Desaturasen existieren, muss geprüft werden. Anlass dazu gibt auch die detektierte Sphingatrienin (d18:3)-Base, die ihre dritte Doppelbindung vermutlich an Position C-10 hat. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob die neuartigen, zusätzlich hydroxylierten GlyCer (Maluside I-III, **4**, **1**, **2**) besondere Eigenschaften wie z.B. eine hohe Wasserbindungskapazität besitzen und ob sie auch in anderen Pflanzenorganismen vorkommen.

5.3 Die Hydrolyse von Glycosylceramiden als limitierender Faktor

Die Hydrolyse der isolierten GlyCer stellt das Nadelöhr der präsentierten Gewinnungsmethode von „Phyto“-Cer dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden intensive Hydrolyseexperimente an drei ausgewählten GlyCer durchgeführt. Diese waren die GlyCer vom Sphingadienin (d18:2)- (Glc-d18:2 h16:0 (**7**)), Sphingenin (d18:1)- (Glc-d18:1 h16:0 (**9**)) und Phytosphingenin (t18:1)-Typ (Glc-t18:1 h22:0 (**28**)). Die Hydrolyse von GlyCer wird in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert und experimentell beschrieben. Prinzipiell kommen chemische und enzymatische Ansätze in Frage, wobei eine chemische Hydrolyse die vermeintlich billigste Variante zur Gewinnung eines Cer darstellt.

5.3.1 Mangelnde Effizienz der chemischen Hydrolyse

Die chemische Hydrolyse von GlyCer kann basisch oder sauer verlaufen. Dabei dienen aggressive basische Reaktionsbedingungen (z.B. $\text{Ba}(\text{OH})_2$, KOH) der Spaltung der Amidbindung (Morrison und Hay, 1970). Die Verwendung einer 0,1 M NaOH-Lösung (in Methanol) und das Aussetzen von Mikrowellen für 2 Minuten führte ebenfalls zur Spaltung der Amidbindung (Itonori *et al.*, 2004). Eine saure Hydrolyse (z.B. verdünnte HCl) bietet sich vor allem für O-Glycoside an (Brito-Arias, 2007), wie sie bei GlyCer in Form der O-glycosidischen Bindung an Position C-1 vorliegt. Die Amidbindung zwischen der Sphingobase und der Fettsäure ist gegenüber sauren Bedingungen sehr stabil. Dennoch sind saure Bedingungen gleichermaßen in der Lage, die Amidbindung zu spalten. Es wurden bereits einige Säuren zur Hydrolyse von GlyCer verwendet: Schwefelsäure (Levene und Meyer, 1917), Salzsäure (Carter *et al.*, 1961b; Sullards *et al.*, 2000), Trifluoressigsäure (Gunnarsson *et al.*, 1984) oder eine Mischung dieser Säuren (Biermann, 1988).

Die Parameter Zeit, Temperatur und Konzentration der Säure sind entscheidend für den Erfolg der Hydrolyse. Konzentrationen von 0,5-6 M (HCl, H₂SO₄), Temperaturen zwischen 50 und 100 °C und Reaktionszeiten von wenigen Minuten bis zu einigen Tagen wurden in der Literatur getestet. Jedoch wurde neben dem Zucker auch immer die Sphingobase freigesetzt (Maker *et al.*, 1974). Die Freisetzung von Hexosen aus neutralen Glycolipiden des menschlichen Gehirns wurde mit 1M HCl für 6-12 h bei 100 °C vollzogen (Kannan *et al.*, 1974). Jedoch führten auch bereits niedrigere Temperaturen (50 °C, 63 °C, 70 °C) sowie niedrigere Konzentrationen (0,5 M methanolische HCl) bei längeren Reaktionszeiten (16 h, 3-4 d) zur Totalhydrolyse von GlyCer (Aveldano und Horrocks, 1983; Bittman und Verbicky, 2000; Sullards *et al.*, 2000). Fujino und Ohnishi, 1983, hydrolysierten Cer-gebundene Oligosaccharide, in dem sie mit 0,1 M HCl (methanolisch, wasserfrei) unter Reflux für 10 min kochten. Allerdings konnten sie das Monohexosyl-GlyCer nicht spalten (Fujino und Ohnishi, 1983). Da bei den meisten Arbeitsgruppen die Strukturaufklärung im Vordergrund stand, wurden die GlyCer häufig vollständig hydrolysiert, inklusive der Amidbindung.

In dieser Arbeit wurde der Entwicklungsschwerpunkt während der Hydrolysen auf Salzsäure gelegt, nachdem Versuche mit anderen Säuren (Schwefel- und Salpetersäure, Konzentrationen: 0,1; 0,5; 1; 2 und 6 M) keine zufriedenstellende Hydrolyse der GlyCer bewirkten. Veränderung der Parameter Temperatur (35, 60, 95 °C) und Zeit (1, 6, 12 h) einer 1 M HCl brachten kein akzeptables Hydrolyseergebnis. Obwohl die GlyCer nach 12 h nicht mehr nachweisbar waren (TLC) und eine Umsetzung stattgefunden hatte, wurden auch keine Cer, dafür jedoch andere Derivate, nachgewiesen (Abb. 31-33). Ein Problem der sauren Hydrolyse sind Kondensationsprodukte (Karlsson, 1970a). Die verwendeten Säuren können vier Bereiche der GlyCer angreifen und Veränderungen hervorrufen. Das sind die Amidbindung und die glycosidische Bindung, aber auch die Hydroxygruppen (Oxidierung zu Carbonylgruppen) und Doppelbindungen (Spaltung durch Oxidierung) (Nardan, 2007). Selbst moderate saure Bedingungen (0,1-0,5 M HCl, Raumtemperatur, 3 h) führen zur Bildung von unterschiedlichen Derivaten. So kann es z.B. zur acyl-Migration innerhalb der Cer-Struktur kommen (Van Overloop *et al.*, 2005). Die saure Hydrolyse von Sphingomyelin in wässrigem Methanol unter Reflux führt zur Epimerisierung an der C-3-Position (Bittman und Verbicky, 2000). Außerdem kann Methanol, welches zum Lösen der GlyCer und als Reaktionsraum dient (Taketomi und Kawamura, 1972), die Bildung von Kondensationsprodukten fördern. Die Reaktionsprodukte wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Jedoch wurde anhand von (HP)TLC-Ergebnissen (Abb. 31-33) die Qualität der Hydrolyse beurteilt.

Aufgrund der mangelhaften „klassischen“ sauren Hydrolyse führten Carter *et al.*, 1961b, eine sogenannte oxidative Reduktionshydrolyse durch. Dabei wurde der Zuckerring des GlyCer mit Periodat geöffnet und anschließend mit NaBH₄ direkt reduziert. Der Zuckerteil wurde dann mit Salzsäure in Form einer milden Hydrolyse abgetrennt. Diese Versuche von Carter *et al.*, 1961b,

wurden aufgegriffen und erfolgreich für die Herstellung von Cer aus Dihydroxy-basierten GlyCer herangezogen (Iga *et al.*, 2011). Trihydroxy-Sphingolipide (z.B. t18:1) wurden dagegen nicht hydrolysiert, da sie durch die Verwendung von Periodat an der 3,4-Diolstruktur gespalten wurden (Iga *et al.*, 2011). Die Wiederholung der Experimente in dieser Arbeit (4.3.1) bestätigte die Resultate von Iga *et al.*, 2011: nicht quantitative Hydrolyse und keine Detektion von „Phyto“-Cer aus Phytosphingenin (t18:1)-basierten GlyCer (Abb. 34). Diese Einschränkungen machten die genannte Form der Hydrolyse unbrauchbar. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit der chemischen Hydrolyse keine effektive Trennung der Zuckerkopfgruppe vom Cer-Teil der GlyCer möglich ist.

5.3.2 Enzymatische Hydrolyse zur Spaltung von Glycosylceramiden

Es wurden zwei Glucosidasen auf ihre Fähigkeit, pflanzliche GlyCer zu spalten, untersucht. Zum einen wurde eine unspezifische β -Glucosidase (aus Mandeln) und zum anderen eine spezifische Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®) herangezogen. Die Löslichkeit von Sphingolipiden spielte bei der chemischen Hydrolyse mit Methanol als Lösungsmittel eine untergeordnete Rolle. Mit der Verwendung von enzymatischen Reaktionen im wässrigen Milieu mussten die GlyCer in Wasser gelöst werden. Aufgrund ihrer lipophilen Struktur war dies mit einem Lösungsvermittler möglich. Es wurden bereits unterschiedliche Detergenzien wie Triton X-100 (Dawson und Sweeley, 1969) oder Gallensalze (Zhou *et al.*, 1989) zur Lösungsvermittlung von GlyCer beschrieben. Gallensalze stimulieren die Hydrolyse durch Endo-Glucoceramidase (Zhou *et al.*, 1989). Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Umsetzung auch unter Verwendung von Triton X-100 möglich war, ist in allen Experimenten mit Natrium-Taurocholat als Detergenz gearbeitet worden. Triton X-100 hatte bei der sich an die Reaktion anschließenden dünn-schichtchromatographischen Trennung einen ähnlichen R_f -Wert wie das Produkt (Cer) und war nur bedingt einsatzfähig. Dagegen konnte Natrium-Taurocholat klar von allen beteiligten Verbindungen abgegrenzt werden.

Für die unspezifische **β -Glucosidase** (aus Mandeln) ist keine Aktivität gegenüber den gewonnenen GlyCer nachgewiesen worden. Auch die Anpassung der Versuchsbedingungen wie Puffer, Konzentration und Detergenz generierten keine Substratumsetzung. Gowda *et al.*, 2016, berichteten von einer erfolgreichen enzymatischen Hydrolyse von GlyCer mit einer β -Glucosidase aus Mandeln nach alkalischer Hydrolyse. Die β -Glucosidase setzte das intakte GlyCer ebenfalls nicht um. Die deacylierte Form war dagegen der Hydrolyse zur freien Sphingobase zugänglich (Gowda *et al.*, 2016). Ob andere unspezifische β -Glucosidasen die Reaktion eines intakten GlyCer katalysieren können, wurde bisher nicht untersucht. Die β -Glucosidase-Präparation aus Mandeln kann für eine Hydrolyse von pflanzlichen GlyCer in „Phyto“-Cer nach der vorgestellten Methode bisher nicht verwendet werden. Die Suche nach

konnten Oligohexosen, jedoch nie Monohexosen, von der Cer-Einheit abspalten. GlyCer mit Monosacchariden wie Glucose sind wahrscheinlich aufgrund ihrer Lipophilie durch die meisten Endo-Glycoceramidasen nicht hydrolysierbar (Li und Li, 1999). Glucosylceramid-spezifische Glucosylceramididasen wurden in einem Bakterienstamm aus Hundekot (Furuya *et al.*, 2010) und in Pilzen (Ishibashi *et al.*, 2012) gefunden. Über den Abbau von GlyCer in Pflanzen ist bisher wenig bekannt, wenngleich Glucosylceramidase-Aktivitäten in Pflanzen nachgewiesen wurden (Lynch und Dunn, 2004). Es liegt daher nahe, dass sich ähnliche Enzyme in Pflanzen befinden. Zur Gewinnung von „Phyto“-Cer sind die drei häufigsten Apfeltrester-GlyCer (40,0 mg Glc-d18:2 h16:0 (**7**), 17,5 mg Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und 20,0 mg Glc-t18:1 h24:0 (**36**)) der enzymatischen Hydrolyse mit einer Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®) unterzogen worden. Bei den gewählten Bedingungen nach zwei Hydrolysedurchgängen wurde keine quantitative Umsetzung (insgesamt 73-83 %) beobachtet. Die enzymatische Hydrolyse von GlyCer mit Imiglucerase (Cerezyme®) ist substratkonzentrationsabhängig. Höhere Substratkonzentrationen im mM-Bereich (0,2-0,7 mM) wurden nicht quantitativ umgesetzt (4.3.2). Dagegen hydrolysierten die Assay-Ansätze mit absoluten Substratkonzentrationen im µM-Bereich (12-14 µM) die GlyCer. Dies ist mittels TLC nachgewiesen worden (4.3.1). Das gleiche wurde bereits bei der Untersuchung einer Endo-Glucosylceramidase (aus dem Blutegel) beobachtet (Wing *et al.*, 2001). Das Enzym setzte nur ca. 20 % des GlyCer (Substratkonzentration: 150 µM) um. Eine verringerte Substratkonzentration (37,5 µM) und ein anderes Detergenz (2,5 mg/ml Taurodeoxycholat) führten zu einer Steigerung der Umsetzung auf 34 % (Wing *et al.*, 2001). Neue Reaktionsbedingungen wie größere Endvolumina sowie niedrigere Substrat- und Produktkonzentrationen könnten daher eine quantitative Umsetzung der GlyCer bewirken.

Nachteile der beschriebenen enzymatischen Methode sind die Verfügbarkeit und die Kosten des notwendigen Enzyms. Während die Experimente für wissenschaftliche Fragestellungen durchführbar waren, ist eine wirtschaftliche Produktion in dieser Form (noch) nicht möglich. Daher muss eine Alternative zur rekombinanten Imiglucerase (Cerezyme®) gefunden werden. Die Produktion einer humanen Glucocerebrosidase in pflanzlichen Organismen ist möglich. So wurden bereits in Karottenzellen (Shaaltiel *et al.*, 2007), *Arabidopsis*-Samen (He *et al.*, 2012) und kürzlich in Tabakpflanzen (Limkul *et al.*, 2016) aktive, rekombinante, humane Glucocerebrosidasen produziert. Ob damit eine günstigere und vor allem leichter zugängliche Art der Enzymproduktion gegeben ist, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

5.4 Die Bedeutung von „Phyto“-Ceramiden im *Stratum corneum* und in der Dermatotherapie

Für die atopische Dermatitis (Neurodermitis), Psoriasis und gealterte Haut wurden verringerte Cer-Konzentrationen der Haut nachgewiesen (Motta *et al.*, 1993; Ghadially *et al.*, 1995; Lew *et*

al., 2006; Ishikawa *et al.*, 2010). Dabei scheint die Cer-Klasse für die Barrierefunktion von entscheidender Bedeutung zu sein. Besonders die Mengen der ultralangkettigen Cer [EOH], [EOP] und [EOS] sowie der Phytosphingosin (t18:0)-basierten Cer [NP] und [AP] sind reduziert (Motta *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 2010). Dagegen wurde bei Neurodermitis- und Psoriasis-erkrankter Haut ein Anstieg der Sphingosin (d18:1)-basierten Cer [NS] und [AS] bestimmt (Motta *et al.*, 1993; Ishikawa *et al.*, 2010). Cer [NP] und [AP] dienen in einer Formulierung mit anderen Hautlipiden (Cholesterol und Fettsäuren) der Reparatur geschädigter Haut (De Pera *et al.*, 2000; De Paepe *et al.*, 2002). Daher werden Cer-haltige Formulierungen als Behandlungskonzept für die beschriebenen Hauterkrankungen und gealterte, trockene Haut angesehen.

Es ist bekannt, dass die Cer-Klassen unterschiedliche Funktionen innerhalb der menschlichen Haut haben. Hannun und Obeid, 2011, wiesen bereits auf die Vielfalt von Cer-Strukturen und den damit veränderten Funktionen hin. Mit den bisher detektierten Sphingobasen- (S, DS, P, H und T) und assoziierten Fettsäureklassen (A, N, O und EO) sowie den darüber hinaus auftretenden individuellen Veränderungen (Kettenlängen, Doppelbindungen) ist ein breites Spektrum von Haut-Cer gegeben, dessen Bedeutung bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Einzelne Cer-Klassen sind besonders an der Integrität und Stabilität der Hautbarriere beteiligt. Für die Wirkung von Cer im Körper (z.B. Modulation des Zellwachstums und der Differenzierung) ist wohl die Stereospezifität, die Anzahl freier Hydroxygruppen sowie eine minimale Hydrophobizität (Länge der Alkylketten) von Bedeutung (Bielawska *et al.*, 1992). Haut-Cer mit sehr langen Alkylketten unterstützen dagegen die Barrierefunktion der Haut (Imokawa *et al.*, 1991b). Die Acylkettenlänge der Cer ist ein wichtiger Faktor der Lipidordnung im Aufbau der Hautbarriere (Mojumdar *et al.*, 2014). Die langkettigen Cer [EOS] und [EOP] verbinden die Lipidschichten innerhalb der Matrix miteinander, da sie über mehrere Lipidschichten hinausragen (Bouwstra *et al.*, 1998; Kessner *et al.*, 2008a). Cer und GlyCer mit einer Trihydroxybase (t18:0) und einer α -hydroxylierten Fettsäure (z.B. h24:0) erhöhen in Tierzellen die Stabilität der Plasmamembran und erniedrigen die Ionenpermeabilität. Für pflanzliche Cer und GlyCer wird das gleiche Verhalten vermutet, wurde jedoch bisher noch nicht nachgewiesen (Lynch *et al.*, 1992; Lynch und Dunn, 2004; Pata *et al.*, 2010). Die Hydroxygruppen der Cer (z.B. Cer [NP] und [AP]) können Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Lipiden ausbilden und so das Lipidnetzwerk des *Stratum corneums* stabilisieren (Pascher, 1976). Cer weisen aufgrund ihrer Hydroxygruppen auch eine natürliche Wasserbindungskapazität auf und sollen so den TEWL vorbeugen (Imokawa *et al.*, 1986; Imokawa *et al.*, 1991b; Imokawa und Ishida, 2014). Diese Ansichten werden durch das *Armature reinforcement*-Modell gestärkt, in dem Cer mit vielen Hydroxygruppen nach einer Konformationsänderung eine Wasserphase (von ca. 1 Å) binden können (Kiselev *et al.*, 2005). Zusammen bewirken die ultralangkettigen Cer und die Phytosphingosin (t18:1)-basierten Cer

mit ihren Hydroxygruppen eine optimale lamellare Packung der Hautlipide und damit eine intakte Hautbarriere (Pascher, 1976; Ghadially *et al.*, 1995; Bouwstra *et al.*, 1998; Mojumdar *et al.*, 2014). Ultralangkettige Cer (wie Cer [EOS], [EOP] und [EOH]) wurden in Pflanzen bisher nicht detektiert. Jedoch sind Phytosphingosin (t18:0)-Derivate in Form von Phytosphingenin (t18:1)-GlyCer (z.B. Glc-t18:1 h22/24:0 (**28/36**)) in größeren Mengen isolierbar. Sie besitzen jeweils vier Hydroxygruppen und könnten ein Mittel für die Wasserbindung und die Stabilisierung der *Stratum corneum*-Lipidmatrix innerhalb der Haut darstellen. Die neu entdeckten GlyCer-Klassen des Apfeltresters mit vier oder fünf Hydroxygruppen an anderen Positionen innerhalb der Sphingobasen (z.B. Glc-8/9-OH-d18:2 h16:0 (**1/2**), Glc-2OH-d18:2 h16/22/24:0 (**3/13/25**) und Glc-OH-t18:1 h22/24:0 (**10/18**)) könnten darüber hinaus weitere Vorteile der Wasserretention mit sich bringen. Mit dem „Phyto“-Cer-Upcycling-Konzept für industrielle Pflanzenabfälle könnte eine neue Behandlungsmöglichkeit in der Dermatotherapie geschaffen werden. Einzig die GlyCer-Gehalte der Pflanzen sind ein limitierender Faktor.

Ob „Phyto“-Cer tatsächlich ähnliche oder gar andere, vorteilhaftere Eigenschaften für das *Stratum corneum* aufgrund ihrer unterschiedlichen Strukturen (Kettenlängen, Doppelbindungen, Hydroxygruppen) besitzen, muss zukünftig herausgefunden werden. Die GlyCer-Hauptkomponenten der untersuchten Pflanzenmaterialien (Apfeltrester, Weizenkeime, Kaffeesatz) setzten sich aus den Sphingobasentypen Sphingadienin (d18:2), Sphingenin (d18:1) und Phytosphingenin (t18:1) sowie unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen (C15 bis C28) zusammen (4.2.10, 5.2.3). Die Strukturen der drei gewonnenen „Phyto“-Cer ähneln denen häufig vorkommender und essentieller Haut-Cer (Abb. 53).

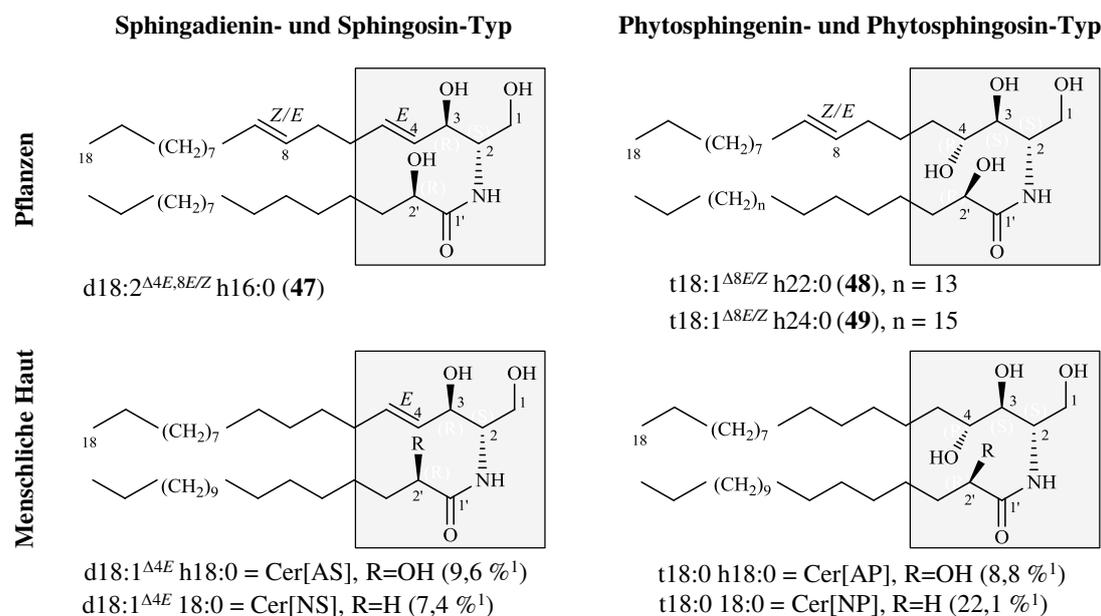


Abb. 53: Isolierte „Phyto“-Ceramide im Vergleich zu menschlichen Hautceramiden

Cer – Ceramid, S – Sphingosin (d18:1), P – Phytosphingosin (t18:0), A – α -hydroxylierte Fettsäure, N – nicht hydroxylierte Fettsäure, ¹ – t'Kindt *et al.*, 2012

Das „Phyto“-Cer d18:2 h16:0 (**47**) ähnelt den Cer [AS, d18:1 h18:0] und [NS, d18:1 18:0] der Haut, welche zusammen ca. 17 % der Haut-Cer ausmachen (t'Kindt *et al.*, 2012). Weiterhin stellen die „Phyto“-Cer t18:1 h22/24:0 (**48/49**) artverwandte Derivate der Haut-Cer [AP, t18:0 h18:0] und [NP, t18:0 18:0] dar. Letztere werden für die Integrität der Hautbarriere als besonders wichtig angesehen, weil sie einen großen Anteil (ca. 31 %) der Cer des *Stratum corneums* bilden (t'Kindt *et al.*, 2012). Dennoch bestehen Unterschiede der Struktur pflanzlicher und menschlicher Cer, wie z.B. die α -Hydroxylierung der Fettsäuren oder die Δ 8-Doppelbindung. Dass kleinste Molekülveränderungen (wie z.B. α -Hydroxylierung von Fettsäuren) große Auswirkungen haben können, ist von Engelbrecht *et al.*, 2012, gezeigt worden. Sie wiesen eine geringere lamellare Systemordnung der Nanostruktur des *Stratum corneums* für Cer [AP] gegenüber Cer [NP], die sich nur in der α -Hydroxylierung der Fettsäure unterschieden, in einer künstlich hergestellten Membran nach.

Es wird angenommen, dass *Z*-Isomere von Lipiden den Wassertransport durch das *Stratum corneum* beeinflussen, indem sie „Löcher“ in den Lipidschichten bilden, in die sich Wasser einlagern kann (Potts und Francoeur, 1990). Simulationsveränderungen der Desaturierung von Sphingomyelin bewirkten Unordnungen der lamellaren Packung, wenngleich die Auswirkungen nicht signifikant waren (Niemela *et al.*, 2006). Bei einer Simulationsstudie zur *E/Z*-Desaturierung von Phospholipiden (Phosphatidylcholin) ist kein Einfluss der Doppelbindung auf die Membran gefunden worden (Murzyn *et al.*, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten pflanzlichen Cer wiesen 8*E*- und 8*Z*-Isomere auf. Die 8*Z*-Isomere übertrafen die 8*E*-Isomere um das 2-3 fache (Abb. 40). *Z*-ungesättigte Fettsäuren (z.B. Ölsäure 18:1^{9Z}) verändern die *Stratum corneum*-Lipid-Ordnung durch Störung der lamellaren Ordnung (Ongpipattanakul *et al.*, 1991; Naik *et al.*, 1995) und können damit als Penetrationenhancer dienen (Engelbrecht *et al.*, 2011). Dagegen haben *E*-Isomere kaum einen Effekt (Golden *et al.*, 1987b). Ob sich die *Z*-Isomerie der pflanzlichen Cer auf die lamellare Ordnung auswirkt, muss untersucht werden. Dies könnte mithilfe von Neutronenstreuungsexperimenten erfolgen, bei denen die Anordnung und Lage der „Phyto“-Cer innerhalb künstlich hergestellter Membranen („Phyto“-Cer, Cholesterol und freie Fettsäuren) festgestellt werden kann (Eichner *et al.*, 2016). Zur Nutzung von „Phyto“-Cer in der Dermatotherapie muss ein ausreichendes Penetrationsverhalten in menschliche Haut sichergestellt werden. Das Penetrationsverhalten unterschiedlicher Cer (z.B. Cer [AP], [NS] und [NP]) in menschliche Haut ist bereits untersucht worden (Sahle *et al.*, 2013; Sahle *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Ob „Phyto“-Cer trotz oder wegen ihrer strukturellen Unterschiede ebenfalls dazu in Lage sind, wurde bisher nicht beschrieben. Deshalb sind mit den zwei hergestellten „Phyto“-Cer d18:2 h16:0 (**47**) und t18:1 h22:0 (**28**) erste Penetrationsversuche in menschliche Haut durchgeführt worden. Als Formulierung diente die Basiscreme DAC, eine amphiphile Creme, die einen O/W-Emulgator (Macrogol-20-glycerolmonostearat) und W/O-Emulgatoren (Glycerolmonostearat 60,

Cetylalkohol) enthält. Es können lipophile und hydrophile Stoffe eingearbeitet werden. Aufgrund des Anteils von Propylenglycol (10 %) ist die wässrige Phase mikrobiologisch stabil. Eingearbeitet in die halbfeste Grundlage (Cer 0,3 %, Basiscreme DAC) wurde eine 100 minütige Penetration der Cer in menschliche Haut des Rückens bei 32 °C durchgeführt. Die anschließende LC-MS-Untersuchung wies die Cer neben anderen Verbindungen in der Haut nach (Abb. 42). 16,9 und 10,3 % (n=1) der aufgetragenen Cer penetrierten in die Haut (Tab. 43). Jedoch wurde auch ein nicht unerheblicher Teil der Cer-Formulierung in den abgewischten Überresten wiedergefunden. Dies zeigt, wie wichtig eine schnelle Penetration von Stoffen in die Haut ist. Eventuell wurde recht früh ein *Steady state* (Fließgleichgewicht) erreicht, der eine weitere Penetration der Cer erschwert hat. Abhilfe bei zukünftigen Experimenten könnte die Franz-Diffusionszelle schaffen. Diese bietet ein gutes Modell für die Verfolgung der Penetration von Stoffen in menschliche Haut (Sahle *et al.*, 2014). Sie besitzt ein Akzeptorkompartiment (Wasser), das gerührt wird und so die Diffusionsschicht der Haut so klein wie möglich hält. Hiermit können die physiologischen Bedingungen realistischer dargestellt werden als mit dem gewählten statischen Aufbau. Für zukünftige Versuche sollte daher diese alternative Experimentieranordnung verwendet werden.

Die Bestimmung der Cer mithilfe von LC-MS ist eingehend beschrieben worden (4.4) und als Quantifizierungsmethode gut geeignet. Jedoch stellt die Probenaufbereitung eine gewisse Anforderung dar, da neben den Cer auch viele weitere konzentrierte Verbindungen (Hautlipide und Formulierungsrückstände) die HPLC-Säule passieren. Eine weitere Möglichkeit der Cer-Quantifizierung aus Hautpenetrationsversuchen kann mit der in dieser Arbeit bereits vorgestellten AMD-HPTLC-Densitometrie-Methode erfolgen (Abb. A25). Anhand von Referenzsubstanzen (R1, R2) können die Hautlipidklassen der Triglyceride, Sterole, Fettsäuren und Cer identifiziert werden. Da die „Phyto“-Ceramidklassen (hier: d18:2 h16:0 (47), t18:1 h22:0 (48)) im Unterschied zu den am häufigsten vorkommenden Haut-Ceramidklassen unterschiedliche R_f -Werte aufweisen (Abb. A25), könnten sie mithilfe der vorliegenden Methode getrennt voneinander identifiziert und quantifiziert werden.

Es ist bekannt, dass Formulierungen wie Mikroemulsionen sowohl bessere Penetrationserfolge erzielen als auch die Tiefe der Hautpenetration beeinflussen können (Sahle *et al.*, 2014). Zukünftig sollten alternative Formulierungsansätze getestet werden, um die Hautpenetration pflanzlicher Cer zu erhöhen und zu steuern, sodass sie im *Stratum corneum* in die Lipidmatrix aufgenommen werden können.

Bisher wurden „Phyto“-Cer als die Zielobjekte für eine Dermatotherapie betrachtet. Ein weiterer Aspekt ist die direkte Verwendung der GlyCer-angereicherten Fraktionen als „Phyto“-Cer-Quelle. Die perorale Einnahme von GlyCer (*Amorphophallus konjac*) senkte den TEWL bei Patienten mit atopischem Ekzem (Miyanishi *et al.*, 2005). GlyCer (aus Reis) verringerten nach peroraler Einnahme den Wasserverlust und verbesserten die Barrierefunktion der Haut

(Shimoda *et al.*, 2012). GlyCer und Sphingomyeline sind die Hauptausgangsstoffe für die Bildung von Cer für das menschliche *Stratum corneum* (Hamanaka *et al.*, 2002). Sie befinden sich zusammen mit den hydrolytischen Enzymen (Glucosylceramid- β -Glucosidase und Sphingomyelinase) in lamellären Granula und werden in den Interzellularraum zwischen *Stratum corneum* und *Stratum granulosum* sekretiert (Vielhaber *et al.*, 2001; Breiden und Sandhoff, 2014). Dass GlyCer essentielle Vorprodukte von Cer sind, die die epidermale Barrierefunktion aufrechterhalten, wurde bereits nachgewiesen (Jennemann *et al.*, 2007). Substituierte pflanzliche GlyCer könnten daher das Speicherdepot der *Stratum corneum*-Lipide erweitern. Eine Hydrolyse zu „Phyto“-Cer würde dann *in vivo* erfolgen, die aufwendige *in silico*-enzymatische Hydrolyse würde umgangen werden. Es ist auch bekannt, dass eine funktionierende GlyCer-Hydrolyse zu einem Metabolismusgleichgewicht und damit der epidermalen Barrierefunktion der Haut zuträglich ist (Holleran *et al.*, 1992). Ob dermal extern zugeführte pflanzliche GlyCer in den überlebenswichtigen Metabolismus eingeführt werden können, wurde bisher nicht untersucht. Ob jedoch die Penetration der pflanzlichen GlyCer in das *Stratum corneum* möglich ist, müsste analysiert werden. Auf der anderen Seite wurden in psoriatischer Haut niedrigere Konzentrationen von Glucocerebrosidasen nachgewiesen (Alessandrini *et al.*, 2004), was den erforderlichen Abbau beeinflussen würde. In Psoriasis erkrankter Haut wurden auch reduzierte Mengen Prosaposin (Vorstufe von Saposin, einem Sphingolipid-Aktivator-Protein), das der Stimulation der Glucocerebrosidase und sauren Sphingomyelinase dient, gefunden (Alessandrini *et al.*, 2001). Auch hier wäre die notwendige Hydrolyse zu Cer gestört. Gaucher-Kranke, die nicht über die Glucocerebrosidase verfügen, wären der Therapie mit pflanzlichen GlyCer gänzlich ausgeschlossen.

5.5 Screening und Quantifizierung von Glycosylceramiden mittels AMD-HPTLC

Die TLC stellt eine einfache, kostengünstige und effektive Trennungsmöglichkeit komplexer Matrices dar (Cheng *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollte neben den Methoden zur Isolierung und Strukturaufklärung auch eine Screeningmethode zur Quantifizierung pflanzlicher GlyCer entwickelt werden. Die Quantifizierung mit TLC war nicht möglich, da die geringen GlyCer-Konzentrationen innerhalb der Extrakte nach einfacher isokratischer Entwicklung keine scharfen Banden erkennen ließen (Abb. 44). Für die densitometrische Quantifizierung sind scharfe Banden jedoch eine Voraussetzung. Dies wurde mithilfe der AMD-HPTLC erreicht. Die Verwendung der AMD-HPTLC-Technik wurde bereits für andere pflanzliche Extrakte beschrieben (Olah *et al.*, 1998; Scholl *et al.*, 2001; Markowski *et al.*, 2006). Mit einem 25-Schritt-Gradienten aus Methanol, Ethylacetat, Toluol, Dichlorethan sowie Ammoniaklösung und wasserfreier Ameisensäure zur Modifikation wurden Pflanzenextrakte getrennt (Gocan *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde eine zur Haut-Cer-Analyse etablierte AMD-HPTLC-Methode (Farwanah *et al.*, 2002; Opitz *et al.*, 2011) adaptiert und modifiziert (3.2.4), um der Polarität der

Zielstruktur GlyCer Rechnung zu tragen. Der Austausch von Ethanol durch Methanol führte für GlyCer zu schärferen Banden. Außerdem wurde ein Methanol-reiches Plateau zu Beginn der Entwicklung für die Konzentrierung der Banden eingeführt. Farwanah *et al.*, 2002, nutzten ursprünglich Aceton als Mischungsvermittler für Chloroform und Ethanol. Der Zusatz von Aceton bewirkte keine chromatographische Veränderung nach dem Austausch von Ethanol durch Methanol und wurde entsprechend verworfen. Der Gradient wurde in Richtung einer polareren Chloroform-Methanol-Mischung verschoben, um die glycosylierten Verbindungen (GlyCer und Sterolglucoside) ausreichend aufzutrennen. Die AMD-HPTLC-Methode wurde mit einer Referenzsubstanz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen) validiert und GlyCer anhand einer Kalibrierfunktion quantifiziert. Es wurde gezeigt, dass die AMD-HPTLC eine effektive und reproduzierbare Methode zur Auftrennung eines pflanzlichen Lipidgemisches und zur Quantifizierung der darin enthaltenen pflanzlichen GlyCer ist (Tab. 52).

Tab. 52: Validierung der AMD-HPTLC-Methode

Parameter	Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen)
R _f	0,33 ± 0,003
Kalibrierbereich [ng/Bande]	25-1000
LOD [ng/Bande]	10
LOQ [ng/Bande]	25
Kalibrierfunktion	$y = -0,0069x^2 + 23,643x + 66,31$
Korrelationskoeffizient R ²	0,9999±0,0001

Nach einer einfachen Probenaufarbeitung (Extraktion und ein erster Trennungsschritt in organische und wässrige Bestandteile) wurden GlyCer mit der vorgestellten AMD-HPTLC-Densitometrie-Methode in den angereicherten Extrakten aller Pflanzenmaterialien nachgewiesen. Da drei Pflanzenmaterialien (Apfeltrester, Weizenkeime und Kaffeesatz) einer vollständigen GlyCer-Aufreinigung unterzogen wurden (n=1, Tab. 47), konnten die ermittelten Gehalte nach AMD-HPTLC-Quantifizierung mit diesen verglichen werden. Es wurden Wiederfindungsraten zwischen 93 % (Apfeltrester) und 117 % (Weizenkeime) nachgewiesen (Tab. 53).

Tab. 53: Glycosylceramid-Gehalte nach Aufreinigung und nach Quantifizierung mit AMD-HPTLC-Densitometrie

det. – detektiert, nicht quantifizierbar; WFR – Wiederfindungsrate

Pflanzenmaterial	m _{GlyCer} / 100 g Ausgangsmaterial [mg]		WFR [%]
	Extraktion und Isolierung	Quantifizierung mit AMD-HPTLC-Densitometrie	
Apfeltrester	28,9	26,8	92,7
Weizenkeime	33,7	39,5	117,2
Kaffeesatz	4,4	det.	-

GlyCer-Mengen des Apfeltresters und der Weizenkeime wurden mit 26,8 mg und 39,5 mg je 100 g Pflanzenmaterial bestimmt und waren mit den GlyCer-Gehalten nach einer vollständigen Aufreinigung vergleichbar.

Im äthiopischen Pflanzenmaterial wurden GlyCer-Mengen zwischen 9,4 und 23,1 mg je 100 g Pflanzenmaterial nachgewiesen. Sie stellen damit eine mögliche und vor allem interessante Quelle für die Gewinnung von „Phyto“-Cer dar. Aufgrund teils erheblicher Unterschiede der GlyCer-Gehalte einzelner Pflanzenarten der gleichen Familie, lässt sich die Notwendigkeit einer effizienten Screening-Methode erkennen. Mit den vorgestellten Methoden können GlyCer-Gehalte unterschiedlicher Pflanzenmaterialien nach einer einfachen Probenaufbereitung bestimmt werden. Diese Zeit- und Kostenersparnis des GlyCer-Nachweises im Gegensatz zur vollständigen Aufreinigung birgt neue Möglichkeiten auf der Suche nach Pflanzenmaterialien, die für eine „Phyto“-Cer-Gewinnung in Frage kommen.

Eine Quantifizierung der GlyCer in Kaffeesatz war aufgrund der Bestimmungsgrenze von 25 ng/Bande (LOQ, S/N=10) nicht mehr möglich. Dennoch, die Densitometrie ist eine effektive Detektionsmethode für dünnschichtchromatographische Trennungen komplexer Matrices (Farwanah *et al.*, 2002; Opitz *et al.*, 2011). Die Vorteile der verwendeten Densitometrie-Detektion gegenüber einer visuellen Detektion lagen in der Nachweisgrenze. Während im Kaffeesatz nach Lipid-Veraschung visuell (mit dem menschlichen Auge) keine GlyCer nachgewiesen wurden, war die Detektion bei 546 nm im Reflexionsmodus unter Lichtausschluss dazu in der Lage (LOD, S/N=3, 10 ng/Bande).

Die mithilfe der AMD-HPTLC quantifizierten Banden wurden auf enthaltene GlyCer untersucht. Die GlyCer-Banden wurden präparativ aufgereinigt (TLC) und mittels HPLC-MS erhaltene GlyCer identifiziert. Einige GlyCer traten familienübergreifend in Rosaceae, Poaceae und Fabaceae auf. Das Sphingadienin (d18:2)-basierte GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**) war in allen LC-MS-untersuchten Fabaceae-Arten, die Phytosphingenin (t18:1)-basierten GlyCer Glc-t18:1 h22/24:0 (**28/36**) ausschließlich in den *Albizia*-Arten nachweisbar. Ein phylogenetischer Zusammenhang von Sphingobasen und Fabaceae-Arten (z.B. *Vicia*, *Pisum*) ist bereits berichtet worden (Minamioka und Imai, 2009). Die Familie der Fabaceae besteht aus 31 Tribus (Lewis, 2005). Die hier untersuchten Pflanzenarten gehören drei Tribus an (*Acacia etbaica*: Acaciae, *Robinia pseudoacacia*: Robiniae, *Albizia*: Ingeae; Lewis, 2005), die auch unterschiedliche GlyCer-Zusammensetzungen aufwiesen, wenngleich die sehr kleine Fallzahl zu berücksichtigen ist. In Acaciae und Robiniae sind Sphingadienin (d18:2)-basierte GlyCer, in Ingeae Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-basierte GlyCer nachgewiesen worden.

Es war auffällig, dass die gleichen Sphingobasen (d18:2 und t18:1) und Fettsäuren (h16:0, h22:0 und h24:0) wie auch schon beim Apfeltrester, Weizenkeimen und Kaffeesatz die GlyCer bildeten (vgl. 5.2.3). In anderen Studien wurden diese Sphingobasen und Fettsäuren ebenfalls als Hauptbestandteile der GlyCer diverser Fabaceae identifiziert (Kojima *et al.*, 1991a; Minamioka und Imai, 2009). Für 30 Fabaceae-Arten sind die beiden Isomere t18:1^{ΔE} und t18:1^{ΔZ} als Hauptbestandteile der GlyCer bestimmt worden (Minamioka und Imai, 2009). Jedoch wurde in anderen Studien außerdem die Sphingobase Sphingenin (d18:1) nachgewiesen (Kojima *et al.*,

1991a). Fehlende Nachweise dieser Sphingobase in den hier untersuchten Fabaceae-Samen sind auf geringe Gehalte oder artspezifische Unterschiede zurückzuführen.

Glc-d18:2 h16:0 (7) wurde erstmals im Samen aller hier untersuchten *Albizia*-Arten nachgewiesen. In anderen Pflanzenteilen (Rinde und Blüten) von *Albizia*-Arten (*A. julibrissin* und *A. lebbek*) sind bisher Glc-d18:2 h16:0 (7) und Glc-t24:1 h16:0 detektiert worden (Jung *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2007; El-Gamal *et al.*, 2015). Darüber hinaus wurden die Phytosphingenin (t18:1)-GlyCer (Glc-t18:1 h22/24:0, (28/36)) im Samenmaterial der *Albizia*-Arten gefunden. Minamioka und Imai, 2009, fanden ebenfalls den Phytosphingenin (t18:1)-Typ in *A. julibrissin* als häufigste Sphingobase. Für *Acacia*-Arten sind bisher kaum Untersuchungen der GlyCer-Zusammensetzung bekannt. Minamioka und Imai, 2009, fanden hohe Gehalte der Sphingobasen d18:2 und t18:1 in den Blättern von *A. baileyana*. Dies ist der erste Bericht über ein GlyCer (Glc-d18:2 h16:0 (7)) in *A. etbaica*. *Robinia pseudoacacia* sollte als Vergleichsmaterial einer zugänglichen Pflanzenart aus Deutschland dienen. Für sie wurde das intakte GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (7) nachgewiesen, was sich mit den Untersuchungen von Minamioka und Imai, 2009, deckte, die den Sphingadienin (d18:2)- und Phytosphingenin (t18:1)-Typ als vorwiegende Sphingobasen nachgewiesen hatten. Die Detektion von Spurenverbindungen war mit den vorgestellten Methoden nicht möglich. Für weitergehende Untersuchungen stehen jedoch die Methoden der GlyCer-Isolierung (3.2.1) zur Verfügung.

GlyCer wurden mittels HPLC-MS an präparativ (TLC) gewonnenen Proben identifiziert. Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur Strukturaufklärung, die indirekt (durch Abkratzen und Aufarbeiten) oder mittlerweile auch direkt (auf der Platte) mit der TLC gekoppelt werden kann (Cheng *et al.*, 2011). Die indirekte Kopplung von TLC und MS wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich etabliert (4.5.4). Während mittels AMD-HPTLC die GlyCer-Klasse identifiziert und quantifiziert wurde, ist die Kopplung von präparativer TLC und HPLC-MS für eine Identifizierung der einzelnen Verbindungen innerhalb der GlyCer-Klasse genutzt worden. Die Probenaufbereitung mittels präparativer TLC war jedoch aufwendig. Mittlerweile ist die massenspektrometrische Detektion direkt auf einer TLC-Platte möglich. So sind per *Desorption Electrospray Ionization* (DESI)-MS bereits Lipide nach 2D-HPTLC (Paglia *et al.*, 2010) oder Sphingolipide nach TLC (Seng *et al.*, 2014) qualitativ bestimmt worden. Bei dieser Technik wird eine Elektrospray-Lösung (z.B. Methanol/Wasser) auf die TLC-Platte gerichtet und die darin befindlichen Verbindungen desorbiert und zugleich ionisiert (Takats *et al.*, 2004). Die Ionen gelangen dann über ein *Interface* direkt in das Massenspektrometer. Eine andere Technik ist die *Direct Analysis in Real Time* (DART). Hierbei wird ein geheizter ionisierter Gasstrom (z.B. Helium) zur thermischen Desorption und Ionisierung der Verbindungen auf der TLC-Oberfläche verwendet (Cody *et al.*, 2005). Bei beiden Techniken ist keine weitere Probenaufbereitung notwendig. Aufgrund der scharfen Banden der AMD-HPTLC-Methode könnten GlyCer direkt von der HPTLC-Platte nachgewiesen werden.

5.6 „Phyto“-Ceramid-Gewinnung durch *Upcycling* industrieller Abfallprodukte

Pflanzliche GlyCer werden z.B. aus Sojabohnen oder Reis gewonnen (Avanti Polar Lipids, 2016; Oryza, 2016). Es sind GlyCer-Gehalte von 20-35 mg in Sojabohnen (Gutierrez *et al.*, 2004; Takakuwa *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006b) und 19-41 mg je 100 g Trockengewicht in Weizen (Tab. 3, Sugawara und Miyazawa, 1999; Vesper *et al.*, 1999; Takakuwa *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2013) ermittelt worden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass industrielle Abfallprodukte zur Gewinnung von GlyCer genutzt werden können. Abfallprodukten wie Apfeltrester, die z.B. als Tierfutter dienen (Ajila *et al.*, 2015), wurde mithilfe der hier vorgestellten Methoden zu einem *Upcycling* verholfen. Teure und seltene Naturstoffe wie „Phyto“-Cer sind aus pflanzlichen GlyCer nach enzymatischer Hydrolyse mit einer humanen rekombinanten Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®) gewonnen worden. Die erhaltenen Mengen von GlyCer lagen bei 29 mg (Apfeltrester) und 34 mg (Weizenkeime) je 100 g Pflanzenmaterial. Fabaceae-Samen könnten ebenfalls als ergiebige Quelle pflanzlicher Cer dienen (9-23 mg/100 g Pflanzenmaterial). Kaffeesatz ist als Ausgangsstoff für eine „Phyto“-Cer-Gewinnung aufgrund der geringen Mengen an GlyCer nicht verwendbar. GlyCer-Mengen von bis zu 100 mg je 100 g Pflanzenmaterial sind in Apfeltrester bestimmt worden (Ogawa *et al.*, 2014). Ähnliche GlyCer-Gehalte sollten für eine ergiebige und effiziente „Phyto“-Cer-Gewinnung Ausgang sein, um eine Alternative der biotechnologischen Gewinnung von Haut-Cer darzustellen. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden ist eine weiterführende effiziente Suche nach dem passenden Pflanzenmaterial möglich. Neben dem Screening und der Quantifizierung von GlyCer in Pflanzenmaterialien sind Methoden zur Isolierung, Strukturaufklärung und Hydrolyse eingehend beschrieben worden.

Während die hier untersuchten Pflanzenmaterialien industriellen Abfall darstellen, kann auch eine Optimierung der Pflanzen hinsichtlich der pflanzeigenen GlyCer-Konzentration in Betracht gezogen werden. Es ist bekannt, dass man durch die Akklimatisierung von Kulturpflanzen (z.B. *Secale cereale*, *Avena sativa*) den Gehalt und die Zusammensetzung von Sphingolipiden beeinflussen kann. Durch die Gewöhnung an kaltes Klima konnte der GlyCer-Gehalt gesenkt werden (Lynch und Steponkus, 1987; Uemura und Steponkus, 1994). Für Aluminium-resistente Weizenkulturen ist nach Aluminium-Exposition dagegen eine Erhöhung des GlyCer-Gehaltes nachgewiesen worden (Zhang *et al.*, 1997). Es könnte sein, dass auch der Zeitpunkt der Ernte des jeweiligen Pflanzenmaterials für den GlyCer-Gehalt entscheidend ist. Die GlyCer-Gehalte von Sojabohnen sanken mit der zunehmenden Samenentwicklung, was mit der Abnahme des relativen Anteils von Membranen, die GlyCer enthalten, innerhalb des Samens zu erklären war (Wang *et al.*, 2006a). Ob derartige Beeinflussungen die GlyCer-Mengen in Pflanzen erhöhen können, muss geprüft werden. Dabei dürfen die vorherigen industriellen Prozesse nicht negativ beeinflusst werden, da die „Phyto“-Cer-Gewinnung nur in Form eines *Upcycling*-Prozesses aus pflanzlichen Überresten wirtschaftlich sinnvoll ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit präsentiert Methoden zur effizienten Gewinnung und Identifizierung von „Phyto“-Cer aus pflanzlichen Industrieabfallstoffen (Apfeltrester, Weizenkeime und Kaffeesatz). Die Gesamtlipide wurden extrahiert und die Sphingolipidklasse GlyCer säulenchromatographisch isoliert. Es wurden GlyCer-Mengen von 28,9 mg (Apfeltrester), 33,7 mg (Weizenkeime) und 4,4 mg (Kaffeesatz) je 100 g Pflanzenmaterial bestimmt. Während für *Malus domestica* (Apfel) und *Triticum aestivum* (Weizen) bereits GlyCer berichtet worden sind (Sullards *et al.*, 2000; Takakuwa *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2014), konnten in *Coffea arabica* (Kaffee) erstmals GlyCer nachgewiesen werden. Trotz des Röstvorgangs des Kaffees und der Perkolation mit heißem Wasser sind die GlyCer als intakte Verbindungen isoliert worden. Ein Vergleich mit ungerösteten Bohnen ist bisher nicht erfolgt.

Mithilfe einer präparativen HPLC-MS wurden die GlyCer-angereicherten Fraktionen aller Pflanzenmaterialien weiter aufgetrennt und analysiert. Ein Problem in der GlyCer-Analytik stellt die Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen dar (siehe 1.1.3). Die strukturelle Variabilität (siehe 1.1.1) und schlechte UV-Detektion (Farwanah *et al.*, 2003) erfordert besondere diskriminierende Analysetechniken. Mithilfe der vorgestellten Methoden (HPLC-MS, HRMS, MS/MS und NMR-Experimente) wurde die Strukturaufklärung an aufgereinigten Leitsubstanzen (Glc-d18:2 h16:0 (**7**), Glc-d18:1 h16:0 (**9**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**)) nachgewiesen und auf GlyCer-Mischfraktionen angewendet. Diese enthielten zwischen einem und sechs GlyCer. Von einer totalen Aufreinigung aller GlyCer konnte damit abgesehen werden. Die Praktikabilität und Effizienz der Methoden gegenüber anderen Techniken wurde erläutert.

Es wurden insgesamt 46 GlyCer nachgewiesen, die sich hauptsächlich aus drei Sphingobasen (d18:1^{Δ8E/Z}, d18:2^{Δ4E,8E/Z}, t18:1^{Δ8E/Z}) sowie gesättigten und einfach ungesättigten, α-hydroxylierten Fettsäuren (C15 bis C28) zusammensetzten. Alle GlyCer-Verbindungen waren mit β-Glucose assoziiert. Einfach ungesättigte Fettsäuren wurden nur in Weizenkeimen nachgewiesen. Eine ungewöhnliche, zweifach ungesättigte Fettsäure (Glc-t18:1 h24:2 (**20**)) wurde ebenfalls in Weizenkeimen massenspektrometrisch aufgeklärt. Drei GlyCer wurden als Hauptkomponenten artübergreifend bestimmt: Glc-d18:2 h6:0 (**7**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**). Dihydroxy (d)-Basen waren vorzugsweise mit kurzkettigen (C16-20), Trihydroxy (t)-Basen mit langkettigen Fettsäuren (C22-26) assoziiert. Eine Sphingatrienin (d18:3)-Base wurde erstmals in Weizenkeimen nachgewiesen (Glc-d18:3 h20:0 (**14**)). Außerdem wurden drei neuartige, bisher nicht bekannte GlyCer auf Basis des Sphingadienin (d18:2)-Typs aus dem Apfeltrester isoliert. Diese enthielten eine zusätzliche Hydroxy- (Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (**1**), Glc-9-OH-d18:2 h16:0 (**2**)) oder Ketogruppe (Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (**4**)). Ähnliche Verbindungen sind bisher nur in Pilzen nachgewiesen worden (Qi *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2012). Zwei weitere GlyCer-Klassen auf Basis des Sphingadienin (d18:2)-Typs mit zwei zusätzlichen Hydroxygruppen (Glc-2OH-d18:2 h16/22/24:0 (**3/13/25**)) und des Phytosphingenin

(t18:1)-Typs mit einer weiteren Hydroxygruppe (Glc-OH-t18:1 h22/24:0 (**10/18**)) wurden massenspektrometrisch nachgewiesen. Über die Bedeutung dieser besonderen GlyCer-Zusammensetzungen innerhalb der Pflanzen ist bisher nichts bekannt.

Neben den massenspektrometrischen Detektionsarten wurden umfangreiche NMR-Experimente an GlyCer und den „Phyto“-Cer durchgeführt. Anhand von Leitsubstanzen (Strukturaufklärung mit HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, ROESY) wurden chemische Verschiebungen festgestellt, die auf bestimmte GlyCer-Strukturen (NH, Zucker, α -Hydroxylierung, Doppelbindungen) hinwiesen. Anhand dieser Signale wurde ein ^1H -NMR-Fingerprinting auf alle Fraktionen (A1-12, W1-12, C1-5) angewendet, das die enthaltenen GlyCer-Komponenten nachweisen konnte. Mittels 1D-TOCSY-Experimenten bei selektiver Anregung von vier Protonensignalen im Molekül (NH; $\Delta 8,9$; 2'; 1'' und 5'') wurde die gesamte Grundstruktur der einzelnen GlyCer aufgeklärt. Die vorliegenden Daten (MS, MS/MS, HRMS, 1D- und 2D-NMR) vereinfachen zukünftige Untersuchungen bekannter und unbekannter GlyCer. Mit dem ^1H -NMR-Fingerprinting ist eine schnelle Methode zur Bestätigung von GlyCer in GlyCer-angereicherten Fraktionen beschrieben worden. Bei unbekanntem Verbindungen dienen weiterhin 2D-NMR-Experimente der Aufklärung.

Darüber hinaus wurde eine einfache und effektive Quantifizierungsmethode entwickelt, die ein Screening unterschiedlicher Pflanzenmaterialien auf GlyCer-Mengen erlaubt. Eine validierte AMD-HPTLC-Densitometrie-Methode identifizierte und quantifizierte erfolgreich GlyCer nach einfacher Aufarbeitung. Apfeltrester, Weizenkeime und Kaffeesatz wurden untersucht, um die Funktionalität der Methode nachzuweisen. Ein Screening wurde an sechs weiteren Pflanzenmaterialien äthiopischer und deutscher Herkunft (Samen von *Albizia grandibracteata*, *Albizia gummifera*, *Albizia lebbeck*, *Albizia schimperiana*, *Acacia etbaica* und *Robinia pseudoacacia*) durchgeführt. Sie zeigten Gehalte von 9,4 bis 23,1 mg/100 g Pflanzenmaterial. Apfeltrester und Weizenkeime stellen bisher die ertragreichsten industriellen Abfallgüter für eine „Phyto“-Cer-Gewinnung dar, wenngleich weitere Fabaceae-Samen zukünftig auf ihre GlyCer-Gehalte eingehend untersucht werden sollten.

Die Aussagekraft der AMD-HPTLC-Methode wurde mithilfe einer LC-MS-Untersuchung erweitert. Dafür wurden mit präparativer TLC jene Banden isoliert, die der GlyCer-Referenz innerhalb der AMD-HPTLC entsprachen. Auf diese Weise wurden ohne vollständige Aufreinigung der Extrakte erstmals GlyCer in *A. grandibracteata*, *A. gummifera*, *A. schimperiana* und *A. etbaica* nachgewiesen. Glc-d18:2 h16:0 (**7**) ist in allen Fabaceae, Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**) in allen *Albizia*-Arten nachgewiesen worden. Eine weitere und effiziente Möglichkeit der Identifizierung der Verbindungen innerhalb einer TLC-Bande stellt die direkte Kopplung zwischen TLC und MS dar. Eine vielversprechende Kopplung einer TLC mit einem hochauflösenden MS könnte in der *Desorption Electro Spray Ionisation* (DESI)-Technik gefunden werden, welche die Analyten aus der stationären Phase desorbiert und

zugleich ionisiert. Zukünftige Entwicklungen könnten eine effektive quantitative AMD-HPTLC-Methode mit direkter hochauflösender Analyten-Identifizierung (DESI-HRMS) vereinen.

Für die Gewinnung von „Phyto“-Cer aus GlyCer muss die hydrolytische Spaltung der Zuckerkopfgruppe vom Cer-Rest erfolgen. Im Rahmen der vorgestellten Arbeit wurden chemische und enzymatische Hydrolysemethoden für die Gewinnung von „Phyto“-Cer aus isolierten pflanzlichen GlyCer untersucht. Dabei wurde eine einfache saure (HCl-) Hydrolyse und eine oxidative Reduktionshydrolyse mit methanolischer HCl als ungeeignet bestimmt, weil der Zucker entweder nicht abgetrennt wurde oder es zu Fragmentierungen der GlyCer gekommen ist. Auch die enzymatische Hydrolyse mit unspezifischer β -Glucosidase (aus Mandeln) führte zu keiner Abtrennung der Zuckereinheit. Alle gewonnenen pflanzlichen GlyCer wurden schließlich mit einer rekombinanten humanen Glucocerebrosidase (Imiglucerase, Cerezyme®) quantitativ hydrolysiert. Drei GlyCer des Apfeltresters (Glc-d18:2 h6:0 (**9**), Glc-t18:1 h22:0 (**28**) und Glc-t18:1 h24:0 (**36**)) sind in „Phyto“-Cer (d18:2 h6:0 (**46**), t18:1 h22:0 (**47**) und t18:1 h24:0 (**49**)) umgesetzt worden. Nachteile der Hydrolyse mit Imiglucerase sind die Verfügbarkeit und Kosten des Enzyms für die Humantherapie. Eine wirtschaftlich effiziente Hydrolysetechnik muss daher erst noch gefunden werden. Jedoch wurde dieser Ansatz der enzymatischen Hydrolyse von GlyCer in „Phyto“-Cer erstmals nachgewiesen.

Hautkrankheiten wie Psoriasis und Neurodermitis sind mit verringerten Cer-Gehalten der *Stratum corneum*-Lipide assoziiert (Motta *et al.*, 1993; Motta *et al.*, 1994; Di Nardo *et al.*, 1998). Außerdem wurde ein Mangel bestimmter Cer-Klassen (ultralangkettige und hydroxyreiche Cer) in der Haut der Erkrankten nachgewiesen (Motta *et al.*, 1993; Ishikawa *et al.*, 2010). „Phyto“-Cer könnten mit ihren Hydroxygruppen und langkettigen Fettsäureresten positiv zur Wiederherstellung der krankhaften Hautbarriere beitragen. Dafür muss die Struktur von „Phyto“-Cer aufgeklärt und ihre Bedeutung für die Therapie verstanden werden. Während die Aufklärung der Struktur mit den vorgestellten Methoden (3.2.2) möglich ist, muss die Bedeutung der „Phyto“-Ceramide innerhalb der Lipidmatrix des *Stratum corneums* noch aufgezeigt werden. Dies könnte beispielsweise mittels Neutronenstreuung von künstlich zusammengesetzten, multilamellaren Membranen aus den Hauptbestandteilen der Lipidmatrix („Phyto“-Cer, Cholesterol und freie Fettsäuren) überprüft werden (Eichner *et al.*, 2016).

Die Nutzung von „Phyto“-Cer in der Dermatotherapie ist nur möglich, wenn sie in ausreichendem Maße in die Haut penetrieren können. Zum Nachweis wurden erste Penetrationsversuche von „Phyto“-Cer in menschliche Haut mit den gewonnenen „Phyto“-Cer d18:2 h16:0 (**46**) und t18:1 h22:0 (**47**) durchgeführt. 16,9 und 10,3 % der aufgetragenen „Phyto“-Cer wurden unabhängig von menschlichen Haut-Cer in der Haut massenspektrometrisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu „klassischen“ Emulsionen bieten

Mikroemulsionen eine effizientere Möglichkeit, Cer in die Hautschichten zu überführen (Sahle *et al.*, 2013; Sahle *et al.*, 2014). „Phyto“-Cer sollten in Mikroemulsionen eingearbeitet und in großen Mengen in das *Stratum corneum* eingeführt werden können. Versuche dahingehend sind noch nicht beschrieben und sollten angestrebt werden.

Für die Verwendung von Naturstoffen am Menschen z.B. in der Dermatotherapie muss sichergestellt werden, dass keine Gesundheitsgefährdungen durch sie oder den Aufreinigungsprozess vorliegen. Die GlyCer-Fractionen wurden mithilfe des kanzerogenen, gesundheitsschädlichen Chloroforms isoliert. Chloroform muss daher aus der Aufreinigung ausgeschlossen werden. Die Extraktion wurde bereits ohne Chloroform erfolgreich durchgeführt. Dichlormethan könnte Chloroform aufgrund der ähnlichen organischen, aber weniger gesundheitsgefährdenden Eigenschaften in Bezug auf die Lipidextraktion ersetzen (Cequier-Sanchez *et al.*, 2008). Ob dies für die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die säulenchromatographische Trennung an Kieselgel auch zutrifft, muss geprüft werden.

Zusammenfassend ist es mithilfe der vorgestellten Methoden möglich, unterschiedliches Pflanzenmaterial auf GlyCer und deren enthaltenen Mengen zu screenen (AMD-HPTLC). Aus entsprechenden Kandidaten können mittels Aufreinigungs- (Extraktion, SC, präparative HPLC-MS) und enzymatischer Hydrolysemethoden (Glucocerebrosidase-Assay) „Phyto“-Cer gewonnen werden. Diese können schließlich strukturell aufgeklärt (HPLC-MS, MS/MS, HRMS, NMR) werden und sollten in Vergleichsstudien zu menschlichen Haut-Cer auf ihr Penetrationsverhalten und physikochemische Eigenschaften im *Stratum corneum* der menschlichen Haut eingehend untersucht werden. Ob „Phyto“-Cer den Haut-Cer in der dermatologischen Therapie ebenbürtig oder vielleicht sogar aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede (Hydroxygruppen und Doppelbindungen) überlegen sind, muss zukünftig geklärt werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBOTT S. K., LI H., MUNOZ S. S., KNOCH B., BATTERHAM M., MURPHY K. E., HALLIDAY G. M. UND GARNER B.**, 2014: Altered ceramide acyl chain length and ceramide synthase gene expression in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 29 (4): 518-526.
- AJILA C. M., SARMA S. J., BRAR S. K., GODBOUT S., COTE M., GUAY F., VERMA M. UND VALERO J. R.**, 2015: Fermented apple pomace as a feed additive to enhance growth performance of growing pigs and its effects on emissions. *Agriculture*, 5 (2): 313-329.
- ALBRECHT S.**, 2005: Funktionsanalyse von Glycosphingolipiden durch gentechnologische Manipulation ihres Metabolismus in Pilzen und Pflanzen. *Dissertation*, Universität Hamburg, Hamburg.
- ALESSANDRINI F., PFISTER S., KREMMER E., GERBER J. K., RING J. UND BEHRENDT H.**, 2004: Alterations of glucosylceramide-beta-glucosidase levels in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, 123 (6): 1030-1036.
- ALESSANDRINI F., STACHOWITZ S., RING J. UND BEHRENDT H.**, 2001: The level of prosaposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, 116 (3): 394-400.
- ANN Q. UND ADAMS J.**, 1993: Structure-specific collision-induced fragmentations of ceramides cationized with alkali-metal ions. *Anal Chem*, 65 (1): 7-13.
- AVANTI POLAR LIPIDS**, 2016: Product information. Online verfügbar: <https://www.avantilipids.com/>, Stand: 06.07.2017.
- AVELDANO M. I. UND HORROCKS L. A.**, 1983: Quantitative release of fatty acids from lipids by a simple hydrolysis procedure. *J Lipid Res*, 24 (8): 1101-1105.
- AXELSSON M. UND GENTILI F.**, 2014: A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLoS One*, 9 (2): e89643.
- BANKEU J. J., MUSTAFA S. A., GOJAYEV A. S., LENTA B. D., TCHAMO N. D., NGOUELA S. A., ASAAD K., CHOUDHARY M. I., PRIGGE S., GULIYEV A. A., NKENGFACK A. E., TSAMO E. UND SHAIQ A. M.**, 2010: Ceramide and cerebroside from the stem bark of *Ficus mucuso* (Moraceae). *Chem Pharm Bull*, 58 (12): 1661-1665.
- BARNES P. J.**, 1982: Lipid-composition of wheat-germ and wheat-germ oil. *Fett Wiss Technol*, 84 (7): 256-269.
- BARON C. B. UND COBURN R. F.**, 1984: Comparison of two copper reagents for detection of saturated and unsaturated neutral lipids by charring densitometry. *J Liq Chromatogr*, 7 (14): 2793-2801.
- BARRY B. W.**, 1987: Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Control Release*, 6 (1): 85-97.
- BARTKE N., FISCHBECK A. UND HUMPF H. U.**, 2006: Analysis of sphingolipids in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by reversed phase high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). *Mol Nutr Food Res*, 50 (12): 1201-1211.
- BECKER - EISLEBENER FRUCHTSAFT**, 2016: Produktinformation. Online verfügbar: <http://www.becker-eisleben.de/produkte-03.html>, Stand: 06.07.2017.
- BELITZ H.-D., GROSCH W. UND SCHIEBERLE P.**, 2009: Coffee, tea, cocoa. In: BELITZ H.-D., GROSCH W., SCHIEBERLE P. (Hrsg.): Food chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg: 938-970.

- BERARDESCA E., FIDELI D., BORRONI G., RABBIOSI G. UND MAIBACH H.**, 1990: *In vivo* hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients. *Acta derm venereol*, 70 (5): 400-404.
- BERKEY R., BENDIGERI D. UND XIAO S.**, 2012: Sphingolipids and plant defense/disease: the "death" connection and beyond. *Front Plant Sci*, 3: 68.
- BHUSHAN S., KALIA K., SHARMA M., SINGH B. UND AHUJA P. S.**, 2008: Processing of apple pomace for bioactive molecules. *Crit Rev Biotechnol*, 28 (4): 285-296.
- BIEBER T.**, 2010: Atopic dermatitis. *Ann Dermatol*, 22 (2): 125-137.
- BIELAWSKA A., LINARDIC C. M. UND HANNUN Y. A.**, 1992: Ceramide-mediated biology. Determination of structural and stereospecific requirements through the use of N-acyl-phenylaminoalcohol analogs. *J Biol Chem*, 267 (26): 18493-18497.
- BIELAWSKI J., SZULC Z. M., HANNUN Y. A. UND BIELAWSKA A.**, 2006: Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods*, 39 (2): 82-91.
- BIERMANN C. J.**, 1988: Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides. In: TIPSON R. S., DEREK H. (Hrsg.): *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Academic Press, San Diego, 46: 251-271.
- BITTMAN R. UND VERBICKY C. A.**, 2000: Methanolysis of sphingomyelin: toward an epimerization-free methodology for the preparation of D-erythro-sphingosylphosphocholine. *J Lipid Res*, 41 (12): 2089-2093.
- BIZOT-FOULON V., GODEAU G., GUESSOUS F., LATI E., ROUSSET G., ROCH-ARVEILLIER M. UND HORNEBECK W.**, 1995: Inhibition of human neutrophil elastase by wheat ceramides. *Int J Cosmet Sci*, 17 (6): 255-264.
- BLANK I. H.**, 1952: Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 18 (6): 433-440.
- BLASCHEK W.**, 2010: Kohlenhydrate I: Chemie, wichtige Mono- und Oligosaccharide. In: HÄNSEL R., STICHER O. (Hrsg.): *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Springer, Berlin, Heidelberg: 425-459.
- BLIGH E. G. UND DYER W. J.**, 1959: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37 (8): 911-917.
- BORGEL D., VAN DEN BERG M., HULLER T., ANDREA H., LIEBISCH G., BOLES E., SCHORSCH C., VAN DER POL R., ARINK A., BOOGERS I., VAN DER HOEVEN R., KOREVAAR K., FARWICK M., KOHLER T. UND SCHAFFER S.**, 2012: Metabolic engineering of the non-conventional yeast *Pichia ciferrii* for production of rare sphingoid bases. *Metab Eng*, 14 (4): 412-426.
- BORNER G. H., SHERRIER D. J., WEIMAR T., MICHAELSON L. V., HAWKINS N. D., MACASKILL A., NAPIER J. A., BEALE M. H., LILLEY K. S. UND DUPREE P.**, 2005: Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol*, 137 (1): 104-116.
- BOUWSTRA J., PILGRAM G., GOORIS G., KOERTEN H. UND PONEC M.**, 2001: New aspects of the skin barrier organization. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 (Suppl 1): 52-62.
- BOUWSTRA J. A., DUBBELAAR F. E., GOORIS G. S. UND PONEC M.**, 2000: The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm-Venereol Suppl*, 208: 23-30.
- BOUWSTRA J. A. UND GOORIS G. S.**, 2010: The lipid organisation in human stratum corneum and model systems. *Open Dermatol J*, 4: 10-13.

- BOUWSTRA J. A., GOORIS G. S., DUBBELAAR F. E., WEERHEIM A. M., IJZERMAN A. P. UND PONEC M.**, 1998: Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res*, 39 (1): 186-196.
- BOUWSTRA J. A., GOORIS G. S., WEERHEIM A., KEMPENAAR J. UND PONEC M.**, 1995: Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. *J Lipid Res*, 36 (3): 496-504.
- BOUWSTRA J. A., HONEYWELL-NGUYEN P. L., GOORIS G. S. UND PONEC M.**, 2003: Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res*, 42 (1): 1-36.
- BRADFORD M. M.**, 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- BRAUNGART M. UND MCDONOUGH W.**, 2002: Cradle to cradle: remaking the way we make things. North Point Press, A division of Farrar, Straus and Giroux, New York.
- BREIDEN B. UND SANDHOFF K.**, 2014: The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim Biophys Acta*, 1841 (3): 441-452.
- BRITO-ARIAS M.**, 2007: Hydrolysis of glycosides. In: BRITO-ARIAS M. (Hrsg.): Synthesis and characterization of glycosides. Springer US, Boston: 304-313.
- BRODERSEN P., PETERSEN M., PIKE H. M., OLSZAK B., SKOV S., ODUM N., JORGENSEN L. B., BROWN R. E. UND MUNDY J.**, 2002: Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev*, 16 (4): 490-502.
- BROWN D. A. UND LONDON E.**, 2000: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 275 (23): 17221-17224.
- BURGER K.**, 1992: Pesticide residue analytical methods for water using the MD technique. In: THEIR H.-P., KIRCHHOFF J. (Hrsg.): Manual of pesticide residue analysis volume II. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim: 421-445.
- BYRDWELL W. C.**, 2001: Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, 36 (4): 327-346.
- CAHOON E. B. UND LYNCH D. V.**, 1991: Analysis of glucocerebrosides of rye (*Secale cereale* L. cv Puma) leaf and plasma membrane. *Plant Physiol*, 95 (1): 58-68.
- CALDER E. D., ZAED A. M. UND SUTHERLAND A.**, 2013: Preparation of anti-vicinal amino alcohols: asymmetric synthesis of D-erythro-sphinganine, (+)-spisulosine, and D-ribo-phytosphingosine. *J Org Chem*, 78 (14): 7223-7233.
- CALINA D., OLAH N. K., PATRU E., DOCEA A., POPESCU H. UND BUBULICA M.-V.**, 2013: Chromatographic analysis of the flavonoids from *robinia pseudoacacia* species. *Curr Health Sci J*, 39 (4): 232-236.
- CAMERA E., PICARDO M., PRESUTTI C., CATARCINI P. UND FANALI S.**, 2004: Separation and characterisation of sphingoceramides by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Sep Sci*, 27 (12): 971-976.
- CANDI E., SCHMIDT R. UND MELINO G.**, 2005: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (4): 328-340.
- CARPINTEIRO A., BECKER K. A., JAPTOK L., HESSLER G., KEITSCH S., POZGAJOVA M., SCHMID K. W., ADAMS C., MULLER S., KLEUSER B., EDWARDS M. J., GRASSME H., HELFRICH I. UND GULBINS E.**, 2015: Regulation of hematogenous tumor metastasis by acid sphingomyelinase. *EMBO Mol Med*, 7 (6): 714-734.
- CARTER H. E., GLICK F. J., NORRIS W. P. UND PHILLIPS G. E.**, 1947: Biochemistry of the sphingolipides: III. Structure of sphingosine. *J Biol Chem*, 170 (1): 285-294.

- CARTER H. E., HENDRY R. A., NOJIMA S., STANACEV N. Z. UND OHNO K., 1961a:** Biochemistry of the sphingolipids. XIII. Determination of the structure of cerebrosides from wheat flour. *J Biol Chem*, 236: 1912-1916.
- CARTER H. E., ROTHFUS J. A. UND GIGG R., 1961b:** Biochemistry of the sphingolipids: XII. conversion of cerebrosides to ceramides and sphingosine; structure of Gaucher cerebroside. *J Lipid Res*, 2 (3): 228-234.
- CATENI F., ZILIC J., FALSONE G., HOLLAN F., FRAUSIN F. UND SCARCIA V., 2003:** Preliminary biological assay on cerebroside mixture from *Euphorbia nicaeensis* All. Isolation and structure determination of five glucocerebrosides. *Farmaco*, 58 (9): 809-817.
- CATENI F., ZILIC J. UND ZACCHIGNA M., 2008:** Isolation and structure elucidation of cerebrosides from *Euphorbia platyphyllos* L. *Sci Pharm*, 76: 451-469.
- CATENI F., ZILIC J., ZACCHIGNA M. UND PROCIDA G., 2010:** Cerebrosides with antiproliferative activity from *Euphorbia peplis* L. *Fitoterapia*, 81 (2): 97-103.
- CAUSSIN J., GOORIS G. S., JANSSENS M. UND BOUWSTRA J. A., 2008:** Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (6): 1472-1482.
- CEQUIER-SANCHEZ E., RODRIGUEZ C., RAVELO A. G. UND ZARATE R., 2008:** Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J Agric Food Chem*, 56 (12): 4297-4303.
- CHAMLIN S. L., KAO J., FRIEDEN I. J., SHEU M. Y., FOWLER A. J., FLUHR J. W., WILLIAMS M. L. UND ELIAS P. M., 2002:** Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *J Am Acad Dermatol*, 47 (2): 198-208.
- CHANG C. W., CHEN Y. N., ADAK A. K., LIN K. H., TZOU D. L. M. UND LIN C. C., 2007:** Synthesis of phytosphingosine using olefin cross-metathesis: a convenient access to chain-modified phytosphingosines from D-lyxose. *Tetrahedron*, 63 (20): 4310-4318.
- CHEN J. H., CUI G. Y., LIU J. Y. UND TAN R. X., 2003:** Pinelloside, an antimicrobial cerebroside from *Pinellia ternata*. *Phytochemistry*, 64 (4): 903-906.
- CHEN L., LI H., SONG H. UND ZHANG G., 2009:** A new cerebroside from *Gynura divaricata*. *Fitoterapia*, 80 (8): 517-520.
- CHEN M., MARKHAM J. E. UND CAHOON E. B., 2012:** Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 69 (5): 769-781.
- CHEN M., MARKHAM J. E., DIETRICH C. R., JAWORSKI J. G. UND CAHOON E. B., 2008:** Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20 (7): 1862-1878.
- CHEN X., WU Y.-L. UND CHEN D., 2002:** Structure determination and synthesis of a new cerebroside isolated from the traditional Chinese medicine *Typhonium giganteum* Engl. *Tetrahedron Lett*, 43 (19): 3529-3532.
- CHENG S. C., HUANG M. Z. UND SHIEA J., 2011:** Thin layer chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218 (19): 2700-2711.
- CHLUDIL H. D., SELDES A. M. UND MAIER M. S., 2003:** Anasterocerebroside A, a new glucosylceramide from the Patagonian starfish *Anasterias minuta*. *Z Naturforsch C*, 58 (5-6): 433-440.

- CHOI J. H., MAEDA K., HIRAI H., HARADA E., KAWADE M., QI J., OJIKI M. UND KAWAGISHI H.**, 2012: Novel cerebroside, termitomycesphin I, from the mushroom, *Termitomyces titanicus*. *Biosci Biotech Bioch*, 76 (7): 1407-1409.
- CIERJACKS A., KOWARIK I., JOSHI J., HEMPEL S., RISTOW M., VON DER LIPPE M. UND WEBER E.**, 2013: Biological flora of the British Isles: *Robinia pseudoacacia*. *J Ecol*, 101 (6): 1623-1640.
- CLAUS R. A., BUNCK A. C., BOCKMEYER C. L., BRUNKHORST F. M., LOSCHE W., KINSCHERF R. UND DEIGNER H. P.**, 2005: Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB J*, 19 (12): 1719-1721.
- CODY R. B., LARAMEE J. A. UND DURST H. D.**, 2005: Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem*, 77 (8): 2297-2302.
- CORBE E., LAUGEL C., YAGOUBI N. UND BAILLET A.**, 2007: Role of ceramide structure and its microenvironment on the conformational order of model stratum corneum lipids mixtures: an approach by FTIR spectroscopy. *Chem Phys Lipids*, 146 (2): 67-75.
- COSTELLO C.**, 1993: Tandem mass spectrometry. In: JONES C., MULLOY B., THOMAS A. (Hrsg.): *Methods in molecular biology. Spectroscopic methods and analyses - NMR, mass spectrometry, and metalloprotein techniques*. Humana Press, Totowa, 17: 285-313.
- COUNCIL OF EUROPE**, 2016: Chromatographic separation techniques. In: COUNCIL OF EUROPE (Hrsg.): *European Pharmacopoeia Online 8.8. EDQM*, Strasbourg: Online verfügbar: <http://online6.edqm.eu/ep808/>, Stand: 06.07.2017.
- COURSOL S., FAN L. M., LE STUNFF H., SPIEGEL S., GILROY S. UND ASSMANN S. M.**, 2003: Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, 423 (6940): 651-654.
- DANY M. UND OGRETMEN B.**, 2015: Ceramide induced mitophagy and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta*, 1853 (10): 2834-2845.
- DAWSON G. UND SWEELEY C. C.**, 1969: New technique for enzymic hydrolysis of glycosphingolipids. *J Lipid Res*, 10 (4): 402-405.
- DE HAAN J. W. UND VAN DE VEN L. J. M.**, 1973: Configurations and conformations in acyclic, unsaturated-hydrocarbons - ¹³C NMR study. *Org Magn Resonance*, 5 (3): 147-153.
- DE PAEPE K., ROSEEUW D. UND ROGIERS V.**, 2002: Repair of acetone- and sodium lauryl sulphate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 16 (6): 587-594.
- DE PERA M., CODERCH L., FONOLLOSA J., DE LA MAZA A. UND PARRA J. L.**, 2000: Effect of internal wool lipid liposomes on skin repair. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 13 (3-4): 188-195.
- DE VASCONCELOS M. C. B. M., BENNETT R., CASTRO C., CARDOSO P., SAAVEDRA M. J. UND ROSA E. A.**, 2013: Study of composition, stabilization and processing of wheat germ and maize industrial by-products. *Ind Crop Prod*, 42: 292-298.
- DEL POETA M., NIMRICHTER L., RODRIGUES M. L. UND LUBERTO C.**, 2014: Synthesis and biological properties of fungal glucosylceramide. *PLoS Pathog*, 10 (1): e1003832.
- DENDA M., KOYAMA J., HORI J., HORII I., TAKAHASHI M., HARA M. UND TAGAMI H.**, 1993: Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Arch Dermatol Res*, 285 (7): 415-417.
- DI NARDO A., WERTZ P., GIANNETTI A. UND SEIDENARI S.**, 1998: Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta dermat venereol*, 78 (1): 27-30.

- DÍAZ DE VIVAR M., SELDES A. UND MAIER M.**, 2002: Two novel glucosylceramides from gonads and body walls of the patagonian starfish *Allostichaster inaequalis*. *Lipids*, 37 (6): 597-603.
- DICKSON R. C. UND LESTER R. L.**, 2002: Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1583 (1): 13-25.
- DOMON B. UND COSTELLO C.**, 1988: A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J*, 5 (4): 397-409.
- DRAELOS Z. D.**, 2008: The effect of ceramide-containing skin care products on eczema resolution duration. *Cutis*, 81 (1): 87-91.
- DUNN T. M., LYNCH D. V., MICHAELSON L. V. UND NAPIER J. A.**, 2004: A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 93 (5): 483-497.
- DURÁN R., ZUBÍA E., ORTEGA M. J., NARANJO S. UND SALVÁ J.**, 1998: Phallusides, new glucosphingolipids from the ascidian *Phallusia fumigata*. *Tetrahedron*, 54 (48): 14597-14602.
- EICHNER A., SONNENBERGER S., DOBNER B., HAUSS T., SCHROETER A. UND NEUBERT R. H. H.**, 2016: Localization of methyl-branched ceramide [EOS] species within the long-periodicity phase in stratum corneum lipid model membranes: A neutron diffraction study. *BBA-Biomembranes*, 1858 (11): 2911-2922.
- EL-GAMAL A. A., ABD-EL-HALIM M. F., KALIL A. T., BASUDAN O. A., AL-REHAILY A. J., AHMAD M. S., EL-TAHIR K. H., AL-MASSARANI S. M. UND ABDEL-MAGEED W. M.**, 2015: A novel beta-lactam derivative, albactam from the flowers of *Albizia lebbek* with platelets anti-aggregatory activity *in vitro*. *Pak J Pharm Sci*, 28 (2 Suppl): 745-753.
- ELIAS P. M.**, 1983: Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*, 80 (Suppl 1): S44-S49.
- ELIAS P. M., GOERKE J. UND FRIEND D. S.**, 1977a: Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J Invest Dermatol*, 69 (6): 535-546.
- ELIAS P. M., MCNUTT N. S. UND FRIEND D. S.**, 1977b: Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: a freeze-fracture, tracer, and thin-section study. *Anat Rec*, 189 (4): 577-594.
- ENGELBRECHT T. N., SCHROETER A., HAUSS T., DEME B., SCHEIDT H. A., HUSTER D. UND NEUBERT R. H. H.**, 2012: The impact of ceramides NP and AP on the nanostructure of stratum corneum lipid bilayer. Part I: neutron diffraction and H-2 NMR studies on multilamellar models based on ceramides with symmetric alkyl chain length distribution. *Soft Matter*, 8 (24): 6599-6607.
- ENGELBRECHT T. N., SCHROETER A., HAUSS T. UND NEUBERT R. H. H.**, 2011: Lipophilic penetration enhancers and their impact to the bilayer structure of stratum corneum lipid model membranes: Neutron diffraction studies based on the example Oleic Acid. *BBA-Biomembranes*, 1808 (12): 2798-2806.
- EUROPEAN CHEMICALS AGENCY**, Committee for Risk Assessment, 2011: Background document to the opinion proposing harmonised classification and labelling at community level of chloroform. Online verfügbar: http://echa.europa.eu/documents/10162/13641/adopted_annex_1_bd_chloroform_en.pdf, Stand: 06.07.2017.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY**, 2016: Cerezyme®: Product information, Annex I - Summary of product characteristics. Online verfügbar: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000157/WC500024112.pdf, Stand: 06.07.2017.

- FAHY E., SUBRAMANIAM S., BROWN H. A., GLASS C. K., MERRILL A. H., JR., MURPHY R. C., RAETZ C. R., RUSSELL D. W., SEYAMA Y., SHAW W., SHIMIZU T., SPENER F., VAN M. G., VANNIEUWENHZE M. S., WHITE S. H., WITZTUM J. L. UND DENNIS E. A., 2005:** A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*, 46 (5): 839-861.
- FANG F., HO C.-T., SANG S. UND ROSEN R. T., 2005:** Determination of sphingolipids in nuts and seeds by a single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry method. *J Food Lipids*, 12 (4): 327-343.
- FARWANAH H., NEUBERT R., ZELLMER S. UND RAITH K., 2002:** Improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 780 (2): 443-450.
- FARWANAH H., NUHN P., NEUBERT R. UND RAITH K., 2003:** Normal-phase liquid chromatographic separation of stratum corneum ceramides with detection by evaporative light scattering and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 492 (1–2): 233-239.
- FARWANAH H., PIERSTORFF B., SCHMELZER C. E., RAITH K., NEUBERT R. H., KOLTER T. UND SANDHOFF K., 2007:** Separation and mass spectrometric characterization of covalently bound skin ceramides using LC/APCI-MS and Nano-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 852 (1-2): 562-570.
- FARWANAH H., WIRTZ J., KOLTER T., RAITH K., NEUBERT R. H. UND SANDHOFF K., 2009:** Normal phase liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for separation, detection and mass spectrometric profiling of neutral sphingolipids and cholesterol. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (27): 2976-2982.
- FEINGOLD K. R., 2007:** Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res.*, 48 (12): 2531-2546.
- FEWSTER M. E., BURNS B. J. UND MEAD J. F., 1969:** Quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. *J Chromatogr*, 43 (1): 120-126.
- FILIPPOV V., SONG M. A., ZHANG K., VINTERS H. V., TUNG S., KIRSCH W. M., YANG J. UND DUERKSEN-HUGHES P. J., 2012:** Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*, 29 (3): 537-547.
- FOLCH J., LEES M. UND SLOANE STANLEY G. H., 1957:** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226 (1): 497-509.
- FOLSTAR P., 1985:** Lipids. In: CLARKE R. J., MACRAE R. (Hrsg.): Coffee: Volume 1: Chemistry. Springer Netherlands, Dordrecht: 203-222.
- FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, United States Department of Agriculture, 2016a:** Coffee: World markets and trade. Online verfügbar: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>, Stand: 06.07.2017.
- FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, United States Department of Agriculture, 2016b:** Fresh deciduous fruit: World markets and trade (apples, grapes & pears). Online verfügbar: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/fruit.pdf>, Stand: 06.07.2017.
- FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, United States Department of Agriculture, 2016c:** Wheat: World markets and trade. Online verfügbar: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf>, Stand: 06.07.2017.
- FORSLIND B., 1994:** A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta derm venereol*, 74 (1): 1-6.

- FOSTER L. J., DE HOOG C. L. UND MANN M.**, 2003: Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10): 5813-5818.
- FRANZ G. UND KOEHLER H.**, 1992: Kohlenhydrate. In: FRANZ G., KOEHLER H. (Hrsg.): Drogen und Naturstoffe: Grundlagen und Praxis der chemischen Analyse. Springer, Berlin, Heidelberg: 255-283.
- FUJINO Y. UND OHNISHI M.**, 1976: Constituents of ceramide and ceramide monohexoside in rice bran. *Chem Phys Lipids*, 17 (2-3): 275-289.
- FUJINO Y. UND OHNISHI M.**, 1982: Structural characterization of sphingolipids in wheat grain. *P Jpn Acad B-Phys*, 58 (2): 32-35.
- FUJINO Y. UND OHNISHI M.**, 1983: Sphingolipids in wheat-grain. *J Cereal Sci*, 1 (2): 159-168.
- FUJINO Y., OHNISHI M. UND ITO S.**, 1985: Further studies on sphingolipids in wheat grain. *Lipids*, 20 (6): 337-342.
- FURUYA H., IDE Y., HAMAMOTO M., ASANUMA N. UND HINO T.**, 2010: Isolation of a novel bacterium, *Blautia glucerasei* sp. nov., hydrolyzing plant glucosylceramide to ceramide. *Arch Microbiol*, 192 (5): 365-372.
- FUTERMAN A. H. UND HANNUN Y. A.**, 2004: The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep*, 5 (8): 777-782.
- GANGOITI P., CAMACHO L., ARANA L., OURO A., GRANADO M. H., BRIZUELA L., CASAS J., FABRIAS G., ABAD J. L., DELGADO A. UND GOMEZ-MUNOZ A.**, 2010: Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Prog Lipid Res*, 49 (4): 316-334.
- GAO J. M., HU L., DONG Z. J. UND LIU J. K.**, 2001: New glycosphingolipid containing an unusual sphingoid base from the basidiomycete *Polyporus ellisii*. *Lipids*, 36 (5): 521-527.
- GARROD D. UND CHIDGEY M.**, 2008: Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (3): 572-587.
- GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S. E., WILKINS M., APPEL R. UND BAIROCH A.**, 2005: Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: WALKER J. (Hrsg.): The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press, Totowa: 571-607.
- GE HEALTHCARE**, 2016: Produktinformation. Online verfügbar: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314735988470/litdoc56119097AD_20110830235244.pdf, Stand: 14.03.2016.
- GHADIALLY R., BROWN B. E., SEQUEIRA-MARTIN S. M., FEINGOLD K. R. UND ELIAS P. M.**, 1995: The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest*, 95 (5): 2281-2290.
- GOCAN S., CIMPAN G. UND MURESAN L.**, 1996: Automated multiple development thin layer chromatography of some plant extracts. *J Pharm Biomed Anal*, 14 (8-10): 1221-1227.
- GOLDEN G. M., GUZEK D. B., KENNEDY A. E., MCKIE J. E. UND POTTS R. O.**, 1987a: Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties. *Biochemistry*, 26 (8): 2382-2388.
- GOLDEN G. M., MCKIE J. E. UND POTTS R. O.**, 1987b: Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. *J Pharm Sci*, 76 (1): 25-28.
- GOLDEN R. J., HOLM S. E., ROBINSON D. E., JULKUNEN P. H. UND REESE E. A.**, 1997: Chloroform mode of action: implications for cancer risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*, 26 (2): 142-155.

- GOTO H., NISHIKAWA K., SHIONOYA N., TANIGUCHI M. UND IGARASHI T., 2012:** Determination of sphingoid bases from hydrolyzed glucosylceramide in rice and wheat by online post-column high-performance liquid chromatography with O-phthalaldehyde derivatization. *J Oleo Sci*, 61 (12): 681-688.
- GOWDA S. G., USUKI S., HAMMAM M. A., MURAI Y., IGARASHI Y. UND MONDE K., 2016:** Highly efficient preparation of sphingoid bases from glucosylceramides by chemoenzymatic method. *J Lipid Res*, 57 (2): 325-331.
- GRASSME H., CARPINTEIRO A., EDWARDS M. J., GULBINS E. UND BECKER K. A., 2014:** Regulation of the inflammasome by ceramide in cystic fibrosis lungs. *Cell Physiol Biochem*, 34 (1): 45-55.
- GROEN D., POOLE D. S., GOORIS G. S. UND BOUWSTRA J. A., 2011:** Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *BBA-Biomembranes*, 1808 (6): 1529-1537.
- GUNNARSSON A., LUNDSTEN J. UND SVENSSON S., 1984:** Specific cleavage of the glycosidic bond between the carbohydrate and ceramide portions in glycosphingolipids using trifluoroacetylation. *Acta Chem Scand B*, 38 (7): 603-609.
- GUO S., DUAN J.-A., TANG Y.-P., QIAN D.-W. UND TAO W.-W., 2014:** A new cerebroside from the fruit of *Ziziphus jujuba* var. *spinosa*. *Chem Nat Compd*, 50 (1): 109-111.
- GUTIERREZ E., WANG T. UND FEHR W. R., 2004:** Quantification of sphingolipids in soybeans. *J Am Oil Chem Soc*, 81 (8): 737-742.
- HAMANAKA S., HARA M., NISHIO H., OTSUKA F., SUZUKI A. UND UCHIDA Y., 2002:** Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol*, 119 (2): 416-423.
- HANNUN Y. A. UND NEWCOMB B., 2015:** A new twist to the emerging functions of ceramides in cancer: novel role for platelet acid sphingomyelinase in cancer metastasis. *EMBO Mol Med*, 7 (6): 692-694.
- HANNUN Y. A. UND OBEID L. M., 2002:** The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*, 277 (29): 25847-25850.
- HANNUN Y. A. UND OBEID L. M., 2008:** Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (2): 139-150.
- HANNUN Y. A. UND OBEID L. M., 2011:** Many ceramides. *J Biol Chem*, 286 (32): 27855-27862.
- HÄNSEL R., 2010:** Lipide. In: HÄNSEL R., STICHER O. (Hrsg.): *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Springer, Berlin, Heidelberg: 667-735.
- HÄNSEL R. UND PERTZ H., 2010:** Alkaloide. In: HÄNSEL R., STICHER O. (Hrsg.): *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Springer, Berlin, Heidelberg: 1217-1386.
- HARA A. UND RADIN N. S., 1978:** Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem*, 90 (1): 420-426.
- HARA J., HIGUCHI K., OKAMOTO R., KAWASHIMA M. UND IMOKAWA G., 2000:** High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 115 (3): 406-413.
- HATTA I., OHTA N., INOUE K. UND YAGI N., 2006:** Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum. *Biochim Biophys Acta*, 1758 (11): 1830-1836.
- HAUGHEY N. J., BANDARU V. V., BAE M. UND MATTSON M. P., 2010:** Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1801 (8): 878-886.

- HAYASHI A., MISHIMA Y. UND MATSUBARA T.,** 1990: Occurrence and structural determination of octadecasphinga-4,8,10-trienine. *Chem Phys Lipids*, 52 (3): 171-178.
- HE X., GALPIN J. D., TROPAK M. B., MAHURAN D., HASELHORST T., VON ITZSTEIN M., KOLARICH D., PACKER N. H., MIAO Y., JIANG L., GRABOWSKI G. A., CLARKE L. A. UND KERMODE A. R.,** 2012: Production of active human glucocerebrosidase in seeds of *Arabidopsis thaliana* complex-glycan-deficient (cgl) plants. *Glycobiology*, 22 (4): 492-503.
- HEILMANN J.,** 2010: Einführung in die Analytik sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe anhand ausgewählter Beispiele. In: HÄNSEL R., STICHER O. (Hrsg.): Pharmakognosie - Phytopharmazie. Springer, Berlin, Heidelberg: 31-59.
- HEUSCHKEL S., GOEBEL A. UND NEUBERT R. H.,** 2008: Microemulsions - modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *J Pharm Sci*, 97 (2): 603-631.
- HIRABAYASHI Y., IGARASHI Y. UND MERRILL A. H. J.,** 2006: Sphingolipid biology. Springer, Tokyo.
- HOFFMAN C.,** 1925: Production and nutritional value of commercial wheat germ extract. *Ind Eng Chem*, 17 (5): 498-503.
- HOLBROOK K. A. UND ODLAND G. F.,** 1974: Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis. *J Invest Dermatol*, 62 (4): 415-422.
- HOLLAND W. L. UND SUMMERS S. A.,** 2008: Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from *in vivo* manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev*, 29 (4): 381-402.
- HOLLERAN W. M., LEE J., TAKAGI Y., MAN M. Q., FEINGOLD K. R. UND ELIAS P. M.,** 1992: Inhibition of glucosylceramide hydrolysis interferes with epidermal permeability barrier recovery. *Clin Res*, 40 (1): A74-A74.
- HORIBATA Y., OKINO N., ICHINOSE S., OMORI A. UND ITO M.,** 2000: Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel acidic endoglycoceramidase from the jellyfish, *Cyanea nozakii*. *J Biol Chem*, 275 (40): 31297-31304.
- HUANG H. C. UND CHANG T. M.,** 2008: Ceramide 1 and ceramide 3 act synergistically on skin hydration and the transepidermal water loss of sodium lauryl sulfate-irritated skin. *Int J Dermatol*, 47 (8): 812-819.
- HUANG W. C., CHEN C. L., LIN Y. S. UND LIN C. F.,** 2011: Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *J Lipids*, 2011: 565316.
- HUI A., MARRAFFA J. M. UND STORK C. M.,** 2004: A rare ingestion of the Black Locust tree. *J Toxicol Clin Toxicol*, 42 (1): 93-95.
- HUNG W. C., LEE M. T., CHEN F. Y. UND HUANG H. W.,** 2007: The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J*, 92 (11): 3960-3967.
- IBRAHIM S. A. UND LI S. K.,** 2010: Chemical enhancer solubility in human stratum corneum lipids and enhancer mechanism of action on stratum corneum lipid domain. *Int J Pharm*, 383 (1-2): 89-98.
- IGA S., IGA D. P., NIGOLESCU A., FLORENTINA D. UND CÎMPEANU G.,** 2011: Preparation of ceramide and sphingosine by chemical and biochemical methods – An instrument for the evaluation of compatibility between sphinganine and fatty acids. *Rom Biotechnol Lett*, 16 (6): 6841-6846.
- IMAI H., OHNISHI M., HOTSUBO K., KOJIMA M. UND ITO S.,** 1997: Sphingoid base composition of cerebroside from plant leaves. *Biosci Biotech Bioch*, 61 (2): 351-353.

- IMAI H., OHNISHI M., KINOSHITA M., KOJIMA M. UND ITO S.**, 1995: Structure and distribution of cerebroside containing unsaturated hydroxy fatty acids in plant leaves. *Biosci Biotech Bioch*, 59 (7): 1309-1313.
- IMOKAWA G., ABE A., JIN K., HIGAKI Y., KAWASHIMA M. UND HIDANO A.**, 1991a: Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*, 96 (4): 523-526.
- IMOKAWA G., AKASAKI S., HATTORI M. UND YOSHIZUKA N.**, 1986: Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol*, 87 (6): 758-761.
- IMOKAWA G. UND ISHIDA K.**, 2014: Role of ceramide in the barrier function of the stratum corneum, implications for the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Clin Exp Dermatol Res*, 5: 206.
- IMOKAWA G., KUNO H. UND KAWAI M.**, 1991b: Stratum-corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Dermatol*, 96 (6): 845-851.
- INAGAKI M., HARADA Y., YAMADA K., ISOBE R., HIGUCHI R., MATSUURA H. UND ITAKURA Y.**, 1998: Isolation and structure determination of cerebrosides from garlic, the bulbs of *Allium sativum* L. *Chem Pharm Bull*, 46 (7): 1153-1156.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION**, 2016: The current state of the global coffee trade. Online verfügbar: http://www.ico.org/monthly_coffee_trade_stats.asp, Stand: 06.07.2017.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION**, 2005: Q2 (R1), Validation of analytical procedures: text and methodology, ICH harmonised tripartite guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Chicago.
- ISHIBASHI Y., IKEDA K., SAKAGUCHI K., OKINO N., TAGUCHI R. UND ITO M.**, 2012: Quality control of fungus-specific glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* by endoglycoceramidase-related protein 1 (EGCrP1). *J Biol Chem*, 287 (1): 368-381.
- ISHIBASHI Y., NAKASONE T., KIYOHARA M., HORIBATA Y., SAKAGUCHI K., HIJIKATA A., ICHINOSE S., OMORI A., YASUI Y., IMAMURA A., ISHIDA H., KISO M., OKINO N. UND ITO M.**, 2007: A novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides. *J Biol Chem*, 282 (15): 11386-11396.
- ISHIKAWA J., NARITA H., KONDO N., HOTTA M., TAKAGI Y., MASUKAWA Y., KITAHARA T., TAKEMA Y., KOYANO S., YAMAZAKI S. UND HATAMOUCHI A.**, 2010: Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol*, 130 (10): 2511-2514.
- ISHIKAWA T. UND YOSHIKAWA M.** (Erfinder), DNA Bank K. K., Bio Venture Bank Co., Ltd. (Antragssteller), 2005: Apple-derived ceramides and manufacture thereof. Patentschrift: JP 2005060323, Anmeldedatum: 10.03.2005.
- ITO M. UND YAMAGATA T.**, 1989: Purification and characterization of glycosphingolipid-specific endoglycosidases (endoglycoceramidases) from a mutant strain of *Rhodococcus* sp. Evidence for three molecular species of endoglycoceramidase with different specificities. *J Biol Chem*, 264 (16): 9510-9519.
- ITONORI S., TAKAHASHI M., KITAMURA T., AOKI K., DULANEY J. T. UND SUGITA M.**, 2004: Microwave-mediated analysis for sugar, fatty acid, and sphingoid compositions of glycosphingolipids. *J Lipid Res*, 45 (3): 574-581.
- IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE**, 1978: The nomenclature of lipids (IUPAC Recommendations 1976). *Biochem J*, 171 (1): 21-35.
- IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE**, 1997: The nomenclature of glycolipids (IUPAC Recommendations 1997). *Pure Appl Chem*, 69 (12): 2475-2487.

- IVERSON S. J., LANG S. L. UND COOPER M. H.**, 2001: Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36 (11): 1283-1287.
- IWAI I., HAN H. M., DEN HOLLANDER L., SVENSSON S., OFVERSTEDT L. G., ANWAR J., BREWER J., BLOKSGAARD M., LALOEUF A., NOSEK D., MASICH S., BAGATOLLI L. A., SKOGLUND U. UND NORLÉN L.**, 2012: The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety. *J Invest Dermatol*, 132 (9): 2215-2225.
- IWAMORI M., COSTELLO C. UND MOSER H. W.**, 1979: Analysis and quantitation of free ceramide containing nonhydroxy and 2-hydroxy fatty acids, and phytosphingosine by high-performance liquid chromatography. *J Lipid Res*, 20 (1): 86-96.
- JACOBS DOUWE EGBERTS**, 2016: Produktinformation. Online verfügbar: <http://www.jacobs.de/>, Stand: 06.07.2017.
- JÄGER E. J.**, 2011: Rothmaler - Exkursionsflora von Deutschland. Gefäßpflanzen: Grundband. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- JANSSENS M., VAN SMEDEN J., GOORIS G. S., BRAS W., PORTALE G., CASPERS P. J., VREEKEN R. J., HANKEMEIER T., KEZIC S., WOLTERBEEK R., LAVRIJSEN A. P. UND BOUWSTRA J. A.**, 2012: Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res*, 53 (12): 2755-2766.
- JENNEMANN R., SANDHOFF R., LANGBEIN L., KADEN S., ROTHERMEL U., GALLALA H., SANDHOFF K., WIEGANDT H. UND GRONE H. J.**, 2007: Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis. *J Biol Chem*, 282 (5): 3083-3094.
- JI H., DU A., ZHANG L., XU C., YANG M. UND LI F.**, 2012: Effects of drying methods on antioxidant properties in *Robinia pseudoacacia* L. flowers. *J Med Plants Res*, 6 (16): 3233-3239.
- JIA A. Q., YANG X., WANG W. X. UND JIA Y. H.**, 2010: Glycocerebroside bearing a novel long-chain base from *Sagina japonica* (Caryophyllaceae). *Fitoterapia*, 81 (6): 540-545.
- JORK H., FUNK W., FISCHER W. UND WIMMER H.**, 1989: Dünnschicht-Chromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden, Band 1a, Physikalische und chemische Nachweismethoden: Grundlagen, Reagenzien. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- JUNG M. J., KANG S. S., JUNG H. A., KIM G. J. UND CHOI J. S.**, 2004: Isolation of flavonoids and a cerebroside from the stem bark of *Albizia julibrissin*. *Arch Pharm Res*, 27 (6): 593-599.
- KALB O.**, 2010: Mikroemulsionen zur peroralen Anwendung. In: MÄDER K., WEIDENAUER U. (Hrsg.): Innovative Arzneiformen - Ein Lehrbuch für Studium und Praxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 67-88.
- KANG J., HUO C. H., LI Z. UND LI Z. P.**, 2007: New ceramides from the flower of *Albizia julibrissin*. *Chinese Chem Lett*, 18 (2): 181-184.
- KANNAN R., SENG P. N. UND DEBUCH H.**, 1974: Evaluation of a gas chromatographic method for the quantitative estimation of hexoses from neutral glycolipids. *J Chromatogr A*, 92 (1): 95-103.
- KARLSSON K. A.**, 1970a: On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chain bases. *Chem Phys Lipids*, 5 (1): 6-43.
- KARLSSON K. A.**, 1970b: Sphingolipid long chain bases. *Lipids*, 5 (11): 878-891.
- KARPLUS M.**, 1959: Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J Chem Phys*, 30 (1): 11-15.

- KAUFMAN B., BASU S. UND ROSEMAN S.**, 1971: Isolation of glucosylceramides from yeast (*Hansenula cifferri*). *J Biol Chem*, 246 (13): 4266-4271.
- KAWAGUCHI M., IMAI H., NAOE M., YASUI Y. UND OHNISHI M.**, 2000: Cerebrosides in grapevine leaves: distinct composition of sphingoid bases among the grapevine species having different tolerances to freezing temperature. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (6): 1271-1273.
- KAY T.**, 1994: Reiner Pilz. In: Kay T. (Hrsg.): *Salvo*, Manois, Frankreich, 11-14, Online verfügbar: <http://www.salvoweb.com/files/salvonews/sn99v3.pdf>, Stand: 06.07.2017.
- KERSCHER M.**, 2009: Funktionen und Aufbau der Haut. In: KERSCHER M., WILIAMS S., TRÜB E. M. (Hrsg.): *Dermatocosmetik*. Steinkopff Verlag, Heidelberg: 1-26.
- KESSNER D., KISELEV M., DANTE S., HAUSS T., LERSCH P., WARTEWIG S. UND NEUBERT R. H.**, 2008a: Arrangement of ceramide [EOS] in a stratum corneum lipid model matrix: new aspects revealed by neutron diffraction studies. *Eur Biophys J*, 37 (6): 989-999.
- KESSNER D., RUETTINGER A., KISELEV M. A., WARTEWIG S. UND NEUBERT R. H.**, 2008b: Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure. Part 2: stratum corneum lipid model systems. *Skin Pharmacol Physiol*, 21 (2): 58-74.
- KIM S. K., NOH Y. H., KOO J. R. UND YUN H. S.**, 2010: Effect of expression of genes in the sphingolipid synthesis pathway on the biosynthesis of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol*, 20 (2): 356-362.
- KIM S. Y., CHOI Y. H., HUH H., KIM J., KIM Y. C. UND LEE H. S.**, 1997: New antihepatotoxic cerebroside from *Lycium chinense* fruits. *J Nat Prod*, 60 (3): 274-276.
- KIRCIK L. H. UND DEL ROSSO J. Q.**, 2011: Nonsteroidal treatment of atopic dermatitis in pediatric patients with a ceramide-dominant topical emulsion formulated with an optimized ratio of physiological lipids. *J Clin Aesthet Dermatol*, 4 (12): 25-31.
- KIRCIK L. H., DEL ROSSO J. Q. UND AVERSA D.**, 2011: Evaluating clinical use of a ceramide-dominant, physiologic lipid-based topical emulsion for atopic dermatitis. *J Clin Aesthet Dermatol*, 4 (3): 34-40.
- KISELEV M. A.**, 2007: Conformation of ceramide 6 molecules and chain-flip transitions in the lipid matrix of the outermost layer of mammalian skin, the stratum corneum. *Crystallogr Rep*, 52 (3): 525-528.
- KISELEV M. A., RYABOVA N. Y., BALAGUROV A. M., DANTE S., HAUSS T., ZBYTOVSKA J., WARTEWIG S. UND NEUBERT R. H. H.**, 2005: New insights into the structure and hydration of a stratum corneum lipid model membrane by neutron diffraction. *Eur Biophys J*, 34 (8): 1030-1040.
- KLEINPETER E. UND SEIDL P. R.**, 2004: The gamma- and the delta-effects in ¹³C NMR spectroscopy in terms of nuclear chemical shielding (NCS) analysis. *J Phys Org Chem*, 17 (8): 680-685.
- KNOWLES J., WATKINSON C. UND JOHNSTONE I.**, 2014: Extraction of wheatgerm: The production of wheatgerm oil and de-fatted stabilised wheatgerm. *Lipid Technol*, 26 (7): 157-161.
- KOGA J., YAMAUCHI T., SHIMURA M., OGAWA N., OSHIMA K., UMEMURA K., KIKUCHI M. UND OGASAWARA N.**, 1998: Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem*, 273 (48): 31985-31991.
- KOJIMA M., NAGASAWA T., FURUKAWA N., MOURI H., OHNISHI M. UND ITO S.**, 1991a: Chemical characterization of glycerolipids, sterolipids and sphingolipids in Leguminosae seeds. *J Jpn Soc Food Sci*, 38 (12): 1076-1085.

- KOJIMA M., OHNISHI M. UND ITO S.**, 1991b: Composition and molecular species of ceramide and cerebroside in scarlet runner beans (*Phaseolus coccineus* L.) and kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem*, 39 (10): 1709-1714.
- KRUEGER G. UND ELLIS C. N.**, 2005: Psoriasis - recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. *J Am Acad Dermatol*, 53 (1): S94-S100.
- KUMAR A. UND CHAUHAN G. S.**, 2010: Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydr Polym*, 82 (2): 454-459.
- KWUN K. H., LEE J. H., RHO K. H. UND YUN H. S.**, 2006: Production of ceramide with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 133 (3): 203-210.
- LAHIRI S. UND FUTERMAN A. H.**, 2007: The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci*, 64 (17): 2270-2284.
- LAINÉ R. A. UND RENKONEN O.**, 1974: Ceramide di- and trihexosides of wheat flour. *Biochemistry*, 13 (14): 2837-2843.
- LAMPE M. A., BURLINGAME A. L., WHITNEY J., WILLIAMS M. L., BROWN B. E., ROITMAN E. UND ELIAS P. M.**, 1983: Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res*, 24 (2): 120-130.
- LEI X., LI J., LIU B., ZHANG N. UND LIU H.**, 2015: Separation and identification of four new compounds with antibacterial activity from *Portulaca oleracea* L. *Molecules*, 20 (9): 16375-16387.
- LEROUX J., LANGENDORFF V., SCHICK G., VAISHNAV V. UND MAZOYER J.**, 2003: Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloid*, 17 (4): 455-462.
- LEUNG D. Y., BOGUNIEWICZ M., HOWELL M. D., NOMURA I. UND HAMID Q. A.**, 2004: New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 113 (5): 651-657.
- LEVENE P. A. UND MEYER G. M.**, 1917: Cerebrosides: III. Conditions for hydrolysis of cerebrosides. *J Biol Chem*, 31 (3): 623-626.
- LEW B. L., CHO Y., KIM J., SIM W. Y. UND KIM N. I.**, 2006: Ceramides and cell signaling molecules in psoriatic epidermis: reduced levels of ceramides, PKC-alpha, and JNK. *J Korean Med Sci*, 21 (1): 95-99.
- LEWIS G. P.**, 2005: Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond.
- LI X., BECKER K. A. UND ZHANG Y.**, 2010: Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. *Cell Physiol Biochem*, 26 (1): 41-48.
- LI Y. T. UND LI S. C.**, 1989: Ceramide glycanase from leech, *Hirudo medicinalis*, and earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Methods Enzymol*, 179: 479-487.
- LI Y. T. UND LI S. C.**, 1999: Enzymatic hydrolysis of glycosphingolipids. *Anal Biochem*, 273 (1): 1-11.
- LIANG H., YAO N., SONG J. T., LUO S., LU H. UND GREENBERG J. T.**, 2003: Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev*, 17 (21): 2636-2641.
- LIMKUL J., IIZUKA S., SATO Y., MISAKI R., OHASHI T., OHASHI T. UND FUJIYAMA K.**, 2016: The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Biotechnol J*: doi: 10.1111/pbi.12529.
- LING T., XIA T., WAN X., LI D. UND WEI X.**, 2006: Cerebrosides from the roots of *Serratula chinensis*. *Molecules*, 11 (9): 677-683.
- LINGWOOD D. UND SIMONS K.**, 2010: Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327 (5961): 46-50.

- LIU Z., BYUN H. S. UND BITTMAN R.**, 2010: Asymmetric synthesis of D-ribo-phytosphingosine from 1-tetradecyne and (4-methoxyphenoxy)acetaldehyde. *J Org Chem*, 75 (13): 4356-4364.
- LOMBARDO M., CAPDEVILA M. G., PASI F. UND TROMBINI C.**, 2006: An efficient high-yield synthesis of D-ribo-phytosphingosine. *Org Lett*, 8 (15): 3303-3305.
- LOOMANS M. E. UND HANNON D. P.**, 1970: An electron microscopic study of the effects of subtilisin and detergents on human stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 55 (2): 101-114.
- LUGER T., SEITE S., HUMBERT P., KRUTMANN J., TRILLER R. UND DRENO B.**, 2014: Recommendations for adjunctive basic skin care in patients with psoriasis. *Eur J Dermatol*, 24 (2): 194-200.
- LYNCH D. V., CAFFREY M., HOGAN J. L. UND STEPONKUS P. L.**, 1992: Calorimetric and x-ray diffraction studies of rye glucocerebroside mesomorphism. *Biophys J*, 61 (5): 1289-1300.
- LYNCH D. V. UND DUNN T. M.**, 2004: An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist*, 161 (3): 677-702.
- LYNCH D. V. UND PHINNEY A. J.**, 1995: The transbilayer distribution of glucosylceramide in plant plasma membrane. In: KADER J.-C., MAZLIAK P. (Hrsg.): *Plant Lipid Metabolism*. Springer, Dordrecht: 239-241.
- LYNCH D. V. UND STEPONKUS P. L.**, 1987: Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiol*, 83 (4): 761-767.
- LYNDE C. W. UND ANDRIESEN A.**, 2014: A cohort study on a ceramide-containing cleanser and moisturizer used for atopic dermatitis. *Cutis*, 93 (4): 207-213.
- MACHELEIDT O., KAISER H. W. UND SANDHOFF K.**, 2002: Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 119 (1): 166-173.
- MACMURRAY T. A. UND MORRISON W. R.**, 1970: Composition of wheat-flour lipids. *J Sci Food Agr*, 21 (10): 520-528.
- MADISON K. C., SWARTZENDRUBER D. C., WERTZ P. W. UND DOWNING D. T.**, 1987: Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 88 (6): 714-718.
- MAISTER H. G., ROGOVIN S. P., STODOLA F. H. UND WICKERHAM L. J.**, 1962: Formation of extracellular sphingolipids by microorganisms: IV. Pilot-plant production of tetraacetylphytosphingosine by *Hansenula ciferrii*. *Appl Microbiol*, 10 (5): 401-406.
- MAKER H. S., LEHRER G. M., WEISS C. UND LEVINE L.**, 1974: Microchemical assay of galactose containing cerebrosides. *Anal Biochem*, 61 (2): 471-478.
- MARKHAM J. E. UND JAWORSKI J. G.**, 2007: Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21 (7): 1304-1314.
- MARKHAM J. E., LI J., CAHOON E. B. UND JAWORSKI J. G.**, 2006: Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*, 281 (32): 22684-22694.
- MARKHAM J. E., LYNCH D. V., NAPIER J. A., DUNN T. M. UND CAHOON E. B.**, 2013: Plant sphingolipids: function follows form. *Curr Opin Plant Biol*, 16 (3): 350-357.
- MARKOWSKI W., LUDWICZUK A. UND WOLSKI T.**, 2006: Analysis of ginsenosides from *Panax quinquefolium* L. by automated multiple development. *JPC-J Planar Chromat*, 19 (108): 115-117.

- MASUKAWA Y., NARITA H., SHIMIZU E., KONDO N., SUGAI Y., OBA T., HOMMA R., ISHIKAWA J., TAKAGI Y., KITAHARA T., TAKEMA Y. UND KITA K., 2008: Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res*, 49 (7): 1466-1476.
- MATSUMOTO M., UMEMOTO N., SUGIURA H. UND UEHARA M., 1999: Difference in ceramide composition between "dry" and "normal" skin in patients with atopic dermatitis. *Acta derm venereol*, 79 (3): 246-247.
- MAYOR S. UND RIEZMAN H., 2004: Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (2): 110-120.
- MCINTOSH T. J., 1978: The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 513 (1): 43-58.
- MEIDAN V. M., BONNER M. C. UND MICHNIAK B. B., 2005: Transfollicular drug delivery - is it a reality? *Int J Pharm*, 306 (1-2): 1-14.
- MERRILL A. H., JR., STOKES T. H., MOMIN A., PARK H., PORTZ B. J., KELLY S., WANG E., SULLARDS M. C. UND WANG M. D., 2009: Sphingolipidomics: a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease. *J Lipid Res*, 50 (Suppl): S97-102.
- MERRILL A. H., JR., SULLARDS M. C., WANG E., VOSS K. A. UND RILEY R. T., 2001: Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect*, 109 (Suppl 2): 283-289.
- MICHAELSON L. V., NAPIER J. A., MOLINO D. UND FAURE J. D., 2016: Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *BBA-Mol Cell Biol L*, 1861 (9): 1329-1335.
- MINAMI A., FURUTO A. UND UEMURA M., 2010: Dynamic compositional changes of detergent-resistant plasma membrane microdomains during plant cold acclimation. *Plant Signal Behav*, 5 (9): 1115-1118.
- MINAMIOKA H. UND IMAI H., 2009: Sphingoid long-chain base composition of glucosylceramides in Fabaceae: a phylogenetic interpretation of Fabaceae. *J Plant Res*, 122 (4): 415-419.
- MITCHELL T. N. UND COSTISELLA B., 2007: NMR - From spectra to structures. Springer, Berlin, Heidelberg.
- MIYANISHI K., SHIONO N., SHIRAI H., DOMBO M. UND KIMATA H., 2005: Reduction of transepidermal water loss by oral intake of glucosylceramides in patients with atopic eczema. *Allergy*, 60 (11): 1454-1455.
- MIYAZAWA T., ITO S. UND FUJINO Y., 1974: Isolation of cerebroside from pea seeds. *Agr Biol Chem*, 38 (7): 1387-1391.
- MOJUMDAR E. H., KARIMAN Z., VAN KERCKHOVE L., GOORIS G. S. UND BOUWSTRA J. A., 2014: The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1838 (10): 2473-2483.
- MONGRAND S., MOREL J., LAROCHE J., CLAVEROL S., CARDE J. P., HARTMANN M. A., BONNEU M., SIMON-PLAS F., LESSIRE R. UND BESSOULE J. J., 2004: Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem*, 279 (35): 36277-36286.
- MORRISON W. R. UND HAY J. D., 1970: Polar lipids in bovine milk. II. Long-chain bases, normal and 2-hydroxy fatty acids, and isomeric cis and trans monoenoic fatty acids in the sphingolipids. *Biochim Biophys Acta*, 202 (3): 460-467.

- MOTTA S., MONTI M., SESANA S., CAPUTO R., CARELLI S. UND GHIDONI R., 1993: Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*, 1182 (2): 147-151.
- MOTTA S., MONTI M., SESANA S., MELLES L., GHIDONI R. UND CAPUTO R., 1994: Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Arch Dermatol*, 130 (4): 452-456.
- MSANNE J., CHEN M., LUTTGEHARM K. D., BRADLEY A. M., MAYS E. S., PAPER J. M., BOYLE D. L., CAHOON R. E., SCHRICK K. UND CAHOON E. B., 2015: Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in Arabidopsis. *Plant J*, 84 (1): 188-201.
- MULLEN T. D. UND OBEID L. M., 2012: Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. *Anticancer Agents Med Chem*, 12 (4): 340-363.
- MURAKAMI S., SHIMAMOTO T., NAGANO H., TSURUNO M., OKUHARA H., HATANAKA H., TOJO H., KODAMA Y. UND FUNATO K., 2015: Producing human ceramide-NS by metabolic engineering using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*, 5: 16319.
- MURZYN K., ROG T., JEZIERSKI G., TAKAOKA Y. UND PASENKIEWICZ-GIERULA M., 2001: Effects of phospholipid unsaturation on the membrane/water interface: a molecular simulation study. *Biophys J*, 81 (1): 170-183.
- NAIK A., PECHTOLD L. A. R. M., POTTS R. O. UND GUY R. H., 1995: Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement *in vivo* in humans. *J Control Release*, 37 (3): 299-306.
- NAPOLITANO A., BENAVIDES A., PIZZA C. UND PIACENTE S., 2011: Qualitative on-line profiling of ceramides and cerebrosides by high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry: the case of *Dracontium lorentense*. *J Pharm Biomed Anal*, 55 (1): 23-30.
- NARDAN D., 2007: Acid hydrolysis of neutral glycosphingolipids. *Dissertation*, Auckland University of Technology, Auckland.
- NEHDI I., 2011: Characteristics, chemical composition and utilisation of *Albizia julibrissin* seed oil. *Ind Crop Prod*, 33 (1): 30-34.
- NESTLE F. O., KAPLAN D. H. UND BARKER J., 2009: Psoriasis. *N Engl J Med*, 361 (5): 496-509.
- NEUBERT R. H. H. UND WEPF R., 2007: Stratum corneum - Struktur und Morphologie einer Barriere. In: (Hrsg.): *Pharmazeutische Zeitung online*, Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn, Online verfügbar: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=2957>, Stand 06.07.2017.
- NG C. K., CARR K., MCAINSH M. R., POWELL B. UND HETHERINGTON A. M., 2001: Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410 (6828): 596-599.
- NGUYEN X. C., CHAU V. M., PHAN V. K., HOANG T. H., NINH K. B., NGUYEN X. N., NGUYEN H. T., JUNG J. W., KIM H. J., KIM S. Y., KIM J. A. UND KIM Y. H., 2009: Inhibitors of osteoclast formation from rhizomes of *Cibotium barometz*. *J Nat Prod*, 72 (9): 1673-1677.
- NIEMELA P. S., HYVONEN M. T. UND VATTULAINEN I., 2006: Influence of chain length and unsaturation on sphingomyelin bilayers. *Biophys J*, 90 (3): 851-863.
- NORBERG P. UND LILJENBERG C., 1991: Lipids of plasma membranes prepared from oat root cells: effects of induced water-deficit tolerance. *Plant Physiol*, 96 (4): 1136-1141.

- NORLÉN L.**, 2001: Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J Invest Dermatol*, 117 (4): 830-836.
- NOVOTNY J., JANUSOVA B., NOVOTNY M., HRABALEK A. UND VAVROVA K.**, 2009: Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol Physiol*, 22 (1): 22-30.
- OGAWA T., MIGITA H., SHIMADA S., ICHIDA J. UND OSADA K.**, 2014: The structure and level of glucosylceramide in apple pomace. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 61 (6): 251-257.
- OGURI M., GOORIS G. S., BITO K. UND BOUWSTRA J. A.**, 2014: The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1838 (7): 1851-1861.
- OHNISHI M. UND FUJINO Y.**, 1981: Chemical composition of ceramide and cerebroside in azuki bean seeds. *Agr Biol Chem*, 45 (5): 1283-1284.
- OHNISHI M. UND FUJINO Y.**, 1982: Sphingolipids in immature and mature soybeans. *Lipids*, 17 (11): 803-810.
- OHNISHI M., IMAI H., KOJIMA M., YOSHIDA S., MURATA N., FUJINO Y. UND ITO S.**, 1988: Separation of cerebroside species in plants by reversed-phase HPLC and their phase transition temperature. *Proc ISF-JOCS World Congress II*: 930-935.
- OHNISHI M., ITO S. UND FUJINO Y.**, 1985: Sphingolipid classes and their molecular species in wheat flour. *Agr Biol Chem*, 49 (12): 3609-3611.
- OLAH N. K., MURESAN L., CIMPAN G. UND GOCAN S.**, 1998: Normal-phase high-performance thin-layer chromatography and automated multiple development of hydroalcoholic extracts of *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium*, *Artemisia vulgaris* and *Artemisia cina*. *JPC-J Planar Chromat*, 11 (5): 361-364.
- ONGPIPATTANAKUL B., BURNETTE R. R., POTTS R. O. UND FRANCOEUR M. L.**, 1991: Evidence that oleic-acid exists in a separate phase within stratum-corneum lipids. *Pharm Res*, 8 (3): 350-354.
- OPITZ A., WIRTZ M., MELCHIOR D., MEHLING A., KLING H.-W. UND NEUBERT R. H.**, 2011: Improved method for stratum corneum lipid analysis by automated multiple development HPTLC. *Chromatographia*, 73 (5-6): 559-565.
- ORYZA**, 2016: Product information. Online verfügbar: <http://www.oryza.co.jp/>, Stand: 07.02.2016.
- PAGLIA G., IFA D. R., WU C., CORSO G. UND COOKS R. G.**, 2010: Desorption electrospray ionization mass spectrometry analysis of lipids after two-dimensional high-performance thin-layer chromatography partial separation. *Anal Chem*, 82 (5): 1744-1750.
- PARISI R., SYMMONS D. P., GRIFFITHS C. E., ASHCROFT D. M. UND IDENTIFICATION MANAGEMENT OF PSORIASIS AND ASSOCIATED COMORBIDITY (IMPACT) PROJECT TEAM**, 2013: Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol*, 133 (2): 377-385.
- PARK C., BENNION B., FRANCOIS I. E. J. A., FERKET K. K. A., CAMMUE B. P. A., THEVISSEN K. UND LEVERY S. B.**, 2005: Neutral glycolipids of the filamentous fungus *Neurospora crassa*: altered expression in plant defensin-resistant mutants. *J Lipid Res*, 46 (4): 759-768.
- PASCHER I.**, 1976: Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta*, 455 (2): 433-451.
- PATA M. O., HANNUN Y. A. UND NG C. K.**, 2010: Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol*, 185 (3): 611-630.

- PATINY L. UND BOREL A.**, 2013: ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure. *J Chem Inf Mod*, 53 (5): 1223-1228.
- PATRA J. K., KIM E. S., OH K., KIM H. J., DHAKAL R., KIM Y. UND BAEK K. H.**, 2015: Bactericidal effect of extracts and metabolites of *Robinia pseudoacacia* L. on *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* causing dental plaque and periodontal inflammatory diseases. *Molecules*, 20 (4): 6128-6139.
- PATTINGRE S., BAUVY C., LEVADE T., LEVINE B. UND CODOGNO P.**, 2009: Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells? *Autophagy*, 5 (4): 558-560.
- PEI D., LIU J. X. UND DI D. L.**, 2010: Cerebroside and ceramide from the pollen of *Brassica napus* L. *Fitoterapia*, 81 (7): 838-843.
- PESKAN T., WESTERMANN M. UND OELMULLER R.**, 2000: Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur J Biochem*, 267 (24): 6989-6995.
- PETRACHE I., NATARAJAN V., ZHEN L., MEDLER T. R., RICHTER A., BERDYSHEV E. V. UND TUDER R. M.**, 2006: Ceramide causes pulmonary cell apoptosis and emphysema: a role for sphingolipid homeostasis in the maintenance of alveolar cells. *Proc Am Thorac Soc*, 3 (6): 510.
- PETRACHE I., NATARAJAN V., ZHEN L., MEDLER T. R., RICHTER A. T., CHO C., HUBBARD W. C., BERDYSHEV E. V. UND TUDER R. M.**, 2005: Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat Med*, 11 (5): 491-498.
- PIKE L. J.**, 2006: Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, 47 (7): 1597-1598.
- PILGRAM G. S., ENGELSMA-VAN PELT A. M., BOUWSTRA J. A. UND KOERTEN H. K.**, 1999: Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J Invest Dermatol*, 113 (3): 403-409.
- PILGRAM G. S., VISSERS D. C., VAN DER MEULEN H., PAVEL S., LAVRIJSEN S. P., BOUWSTRA J. A. UND KOERTEN H. K.**, 2001: Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol*, 117 (3): 710-717.
- PITAS R. E., NELSON G. J., JAFFE R. M. UND MAHLEY R. W.**, 1978: Delta 15,18-tetracosadienoic acid content of sphingolipids from platelets and erythrocytes of animals fed diets high in saturated or polyunsaturated fats. *Lipids*, 13 (8): 551-556.
- POINCELOT R. P.**, 1973: Isolation and lipid composition of spinach chloroplast envelope membranes. *Arch Biochem Biophys*, 159 (1): 134-142.
- PONNUSAMY S., MEYERS-NEEDHAM M., SENKAL C. E., SADDOUGH S. A., SENTELLE D., SELVAM S. P., SALAS A. UND OGRETMEN B.**, 2010: Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol*, 6 (10): 1603-1624.
- POTTS R. O. UND FRANCOEUR M. L.**, 1990: Lipid biophysics of water-loss through the skin. *P Natl Acad Sci USA*, 87 (10): 3871-3873.
- PRINZ VAVRICKA B. M. UND GUITART J.**, 2005: Psoriasis. In: GORDON K. B., RUDERMAN E. M. (Hrsg.): Psoriasis and psoriatic arthritis: An integrated approach. Springer, Berlin, Heidelberg: 83-94.
- PRUETT S. T., BUSHNEV A., HAGEDORN K., ADIGA M., HAYNES C. A., SULLARDS M. C., LIOTTA D. C. UND MERRILL A. H., JR.**, 2008: Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols. *J Lipid Res*, 49 (8): 1621-1639.
- PUFF C.**, 2003: Rubiaceae. In: HEDBERG I., EDWARDS S., NEMOMISSA S. (Hrsg.): Flora of Ethiopia and Eritrea, Volume 4, Part 1: Apiaceae to Dipsacaceae. The National Herbarium,

Addis Ababa University und Department of Systematic Botany, Uppsala University, Addis Abeba, Äthiopien und Uppsala, Schweden: 194-282.

PYNE N. J., OHOTSKI J., BITTMAN R. UND PYNE S., 2014: The role of sphingosine 1-phosphate in inflammation and cancer. *Adv Biol Regul*, 54: 121-129.

QI J. H., OJIKI M. UND SAKAGAMI Y., 2000: Termitomycesphins A-D, novel neuritogenic cerebrosides from the edible Chinese mushroom *Termitomyces albuminosus*. *Tetrahedron*, 56 (32): 5835-5841.

QUARTACCI M. F., COSI E. UND NAVARI-IZZO F., 2001: Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J Exp Bot*, 52 (354): 77-84.

RABIONET M., BAYERLE A., MARSCHING C., JENNEMANN R., GRONE H. J., YILDIZ Y., WACHTEN D., SHAW W., SHAYMAN J. A. UND SANDHOFF R., 2013: 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *J Lipid Res*, 54 (12): 3312-3321.

RABIONET M., GORGAS K. UND SANDHOFF R., 2014: Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochim Biophys Acta*, 1841 (3): 422-434.

RAITH K., 1999: Beiträge zur Anwendung der Massenspektrometrie in der Lipidanalytik. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).

RAITH K., DARIUS J. UND NEUBERT R. H., 2000: Ceramide analysis utilizing gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 876 (1-2): 229-233.

RATNAYAKE W. M. N., HOLLYWOOD R., OGRADY E. UND STAVRIC B., 1993: Lipid-content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food Chem Toxicol*, 31 (4): 263-269.

REIFENBERGER J. UND RUZICKA T., 2010: Haut und Hautanhangsorgane. In: ZILLES K., TILLMANN B. N. (Hrsg.): Anatomie. Springer, Berlin, Heidelberg: 587-597.

REISBERG M., 2012: Extraktion und Identifizierung von Glycosylceramiden aus Weizenkeimen. *Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).

ROBSON K. J., STEWART M. E., MICHELSEN S., LAZO N. D. UND DOWNING D. T., 1994: 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res*, 35 (11): 2060-2068.

ROCHLIN E. (Erfinder), Lipiderm Ltd. (Antragssteller), 2004: Verfahren zur Herstellung von Sphingosinen und Ceramiden im Großmaßstab. Patentschrift: DE60005513, Anmeldedatum: 15.07.2004.

ROGERS J., HARDING C., MAYO A., BANKS J. UND RAWLINGS A., 1996: Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res*, 288 (12): 765-770.

ROMANIK G., GILGENAST E., PRZYJAZNY A. UND KAMINSKI M., 2007: Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *J Biochem Biophys Methods*, 70 (2): 253-261.

ROSLUND M. U., SAWEN E., LANDSTROM J., RONNOLS J., JONSSON K. H. M., LUNDBORG M., SVENSSON M. V. UND WIDMALM G., 2011: Complete H-1 and C-13 NMR chemical shift assignments of mono-, di-, and trisaccharides as basis for NMR chemical shift predictions of polysaccharides using the computer program CASPER. *Carbohydr Res*, 346 (11): 1311-1319.

ROSSI R. UND CARPITA A., 1977: Insect pheromones : Synthesis of chiral sex pheromone components of several species of trogoderma (coleoptera: dermestidae). *Tetrahedron*, 33 (18): 2447-2450.

ROSU A. F., BITA A., CALINA D., ROSU L., ZLATIAN O. UND CALINA V., 2012: Synergic antifungal and antibacterial activity of alcoholic extract of the species *Robinia pseudoacacia* L. (Fabaceae). *Eur J Hosp Pharm*, 19 (2): 216-216.

- ROZEMA E., POPESCU R., SONDEREGGER H., HUCK C. W., WINKLER J., KRUPITZA G., URBAN E. UND KOPP B.**, 2012: Characterization of glucocerebrosides and the active metabolite 4,8-sphingadienine from *Arisaema amurense* and *Pinellia ternata* by NMR and CD spectroscopy and ESI-MS/CID-MS. *J Agric Food Chem*, 60 (29): 7204-7210.
- RUPCIC J., GEORGIU K. UND MARIC V.**, 2004: Isolation and characterization of cerebrosides of the hydrocarbon-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Basic Microbiol*, 44 (2): 114-121.
- RYAN P. R., LIU Q., SPERLING P., DONG B., FRANKE S. UND DELHAIZE E.**, 2007: A higher plant $\Delta 8$ sphingolipid desaturase with a preference for (Z)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. *Plant Physiol*, 144 (4): 1968-1977.
- SAHLE F. F., METZ H., WOHLRAB J. UND NEUBERT R. H.**, 2012: Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: formulation, characterisation, *in vitro* release and penetration investigation. *Eur J Pharm Biopharm*, 82 (1): 139-150.
- SAHLE F. F., METZ H., WOHLRAB J. UND NEUBERT R. H.**, 2013: Lecithin-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: formulation, characterizations, and *in vitro* release and penetration studies. *Pharm Res*, 30 (2): 538-551.
- SAHLE F. F., WOHLRAB J. UND NEUBERT R. H.**, 2014: Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies. *Eur J Pharm Biopharm*, 86 (2): 244-250.
- SAKAI K., TANAKA K., KAKINAMI H., ITOKU K., KATAYAMA H., YAMANO Y., ICHITA J. UND OSADA K.** (Erfinder), Tsugaru Ringo Ceramides Kabushiki Kaisha (Antragssteller), 2015: Method of extracting ceramide and/or pectin from whole apples or apple juice residue. Patentschrift: WO2015020051, Anmeldedatum: 12.02.2015.
- SALAS J. J., MARKHAM J. E., MARTINEZ-FORCE E. UND GARCES R.**, 2011: Characterization of sphingolipids from sunflower seeds with altered fatty acid composition. *J Agric Food Chem*, 59 (23): 12486-12492.
- SCHINOR E. C., SALVADOR M. J., TURATTI I. C., ZUCCHI O. L. UND DIAS D. A.**, 2004: Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. *Ultrason Sonochem*, 11 (6): 415-421.
- SCHMITZ G. UND MULLER G.**, 1991: Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res*, 32 (10): 1539-1570.
- SCHNEIDER J., ANDREA H., BLOM J., JAENICKE S., RUCKERT C., SCHORSCH C., SZCZEPANOWSKI R., FARWICK M., GOESMANN A., PUHLER A., SCHAFFER S., TAUCH A., KOHLER T. UND BRINKROLF K.**, 2012: Draft genome sequence of *Wickerhamomyces ciferrii* NRRL Y-1031 F-60-10. *Eukaryot Cell*, 11 (12): 1582-1583.
- SCHOLL Y., ASANO N. UND DRAGER B.**, 2001: Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors. *J Chromatogr A*, 928 (2): 217-224.
- SCHORSCH C., KOHLER T., ANDREA H. UND BOLES E.**, 2012: High-level production of tetraacetyl phytosphingosine (TAPS) by combined genetic engineering of sphingoid base biosynthesis and L-serine availability in the non-conventional yeast *Pichia ciferrii*. *Metab Eng*, 14 (2): 172-184.
- SCRIBE P., GUEZENNEC J., DAGAUT J., PEPE C. UND SALIOT A.**, 1988: Identification of the position and the stereochemistry of the double bond in monounsaturated fatty acid methyl esters by gas chromatography/mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal Chem*, 60 (9): 928-931.

- SENG J. A., ELLIS S. R., HUGHES J. R., MACCARONE A. T., TRUSCOTT R. J., BLANKSBY S. J. UND MITCHELL T. W.**, 2014: Characterisation of sphingolipids in the human lens by thin layer chromatography-desorption electrospray ionisation mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, 1841 (9): 1285-1291.
- SHAALTIEL Y., BARTFELD D., HASHMUELI S., BAUM G., BRILL-ALMON E., GALILI G., DYM O., BOLDIN-ADAMSKY S. A., SILMAN I., SUSSMAN J. L., FUTERMAN A. H. UND AVIEZER D.**, 2007: Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J*, 5 (5): 579-590.
- SHALINI R. UND GUPTA D. K.**, 2010: Utilization of pomace from apple processing industries: a review. *J Food Sci Technol*, 47 (4): 365-371.
- SHANER R. L., ALLEGOOD J. C., PARK H., WANG E., KELLY S., HAYNES C. A., SULLARDS M. C. UND MERRILL A. H., JR.**, 2009: Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. *J Lipid Res*, 50 (8): 1692-1707.
- SHAPIRO D.**, 1965: Chemical synthesis of sphingolipids. *J Am Oil Chem Soc*, 42: 267-269.
- SHAPIRO D., SEGAL H. UND FLOWERS H. M.**, 1958: The total synthesis of sphingosine¹. *J Am Chem Soc*, 80 (5): 1194-1197.
- SHI L., BIELAWSKI J., MU J., DONG H., TENG C., ZHANG J., YANG X., TOMISHIGE N., HANADA K., HANNUN Y. A. UND ZUO J.**, 2007: Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 17 (12): 1030-1040.
- SHIBUYA H., KAWASHIMA K., SAKAGAMI M., KAWANISHI H., SHIMOMURA M., OHASHI K. UND KITAGAWA I.**, 1990: Sphingolipids and glycerolipids. I. : Chemical structures and ionophoretic activities of Soyacerebrosides I and II from soybean. *Chem Pharm Bull*, 38 (11): 2933-2938.
- SHIMODA H., TERAZAWA S., HITOE S., TANAKA J., NAKAMURA S., MATSUDA H. UND YOSHIKAWA M.**, 2012: Changes in ceramides and glucosylceramides in mouse skin and human epidermal equivalents by rice-derived glucosylceramide. *J Med Food*, 15 (12): 1064-1072.
- SHU R. G., WANG F. W., YANG Y. M., LIU Y. X. UND TAN R. X.**, 2004: Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. *Lipids*, 39 (7): 667-673.
- SIMANSHU D. K., ZHAI X., MUNCH D., HOFIUS D., MARKHAM J. E., BIELAWSKI J., BIELAWSKA A., MALININA L., MOLOTKOVSKY J. G., MUNDY J. W., PATEL D. J. UND BROWN R. E.**, 2014: *Arabidopsis* accelerated cell death 11, ACD11, is a ceramide-1-phosphate transfer protein and intermediary regulator of phytoceramide levels. *Cell Rep*, 6 (2): 388-399.
- SIMONS K. UND IKONEN E.**, 1997: Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387 (6633): 569-572.
- SIMONS K. UND TOOMRE D.**, 2000: Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1 (1): 31-39.
- SNADA S., UCHIDA Y., ANRAKU Y., IZAWA A., IWAMORI M. UND NAGAI Y.**, 1987: Analysis of ceramide and monohexaosyl glycolipid derivatives by high-performance liquid chromatography and its application to the determination of the molecular species in tissues. *J Chromatogr*, 400: 223-231.
- SPASSIEVA S. UND HILLE J.**, 2003: Plant sphingolipids today - Are they still enigmatic? *Plant Biology*, 5 (2): 125-136.

- SPERLING P., FRANKE S., LUTHJE S. UND HEINZ E., 2005:** Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol Biochem*, 43 (12): 1031-1038.
- SPERLING P. UND HEINZ E., 2003:** Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *BBA-Mol Cell Biol L*, 1632 (1-3): 1-15.
- SPERLING P., WARNECKE D. UND HEINZ E., 2004:** Plant sphingolipids. In: DAUM G. (Hrsg.): *Lipid Metabolism and Membrane Biogenesis*. Springer, Berlin, Heidelberg, 6: 337-381.
- SPIEGEL S. UND MILSTIEN S., 2003:** Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (5): 397-407.
- STEVENS W. C. UND HILL D. C., 2009:** General methods for flash chromatography using disposable columns. *Mol Divers*, 13 (2): 247-252.
- STILL W. C., KAHN M. UND MITRA A., 1978:** Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem*, 43 (14): 2923-2925.
- SUGAWARA T., DUAN J., AIDA K., TSUDUKI T. UND HIRATA T., 2010:** Identification of glucosylceramides containing sphingatrienine in maize and rice using ion trap mass spectrometry. *Lipids*, 45 (5): 451-455.
- SUGAWARA T. UND MIYAZAWA T., 1999:** Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Lipids*, 34 (11): 1231-1237.
- SUGIURA A., NOMURA T., MIZUNO A. UND IMOKAWA G., 2014:** Reevaluation of the non-lesional dry skin in atopic dermatitis by acute barrier disruption: an abnormal permeability barrier homeostasis with defective processing to generate ceramide. *Arch Dermatol Res*, 306 (5): 427-440.
- SULLARDS M. C., LYNCH D. V., MERRILL A. H., JR. UND ADAMS J., 2000:** Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 35 (3): 347-353.
- SUMMERS S. A., 2006:** Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*, 45 (1): 42-72.
- SWARTZENDRUBER D. C., WERTZ P. W., KITKO D. J., MADISON K. C. UND DOWNING D. T., 1989:** Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 92 (2): 251-257.
- SWARTZENDRUBER D. C., WERTZ P. W., MADISON K. C. UND DOWNING D. T., 1987:** Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol*, 88 (6): 709-713.
- T'KINDT R., JORGE L., DUMONT E., COUTURON P., DAVID F., SANDRA P. UND SANDRA K., 2012:** Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*, 84 (1): 403-411.
- TADESSE W., DESALEGN G. UND ALIA R., 2007:** Natural gum and resin bearing species of Ethiopia and their potential applications. *Inv Agrar-Sist Rec F*, 16 (3): 211-221.
- TAKAGI S., TOJO H., TOMITA S., SANO S., ITAMI S., HARA M., INOUE S., HORIE K., KONDOH G., HOSOKAWA K., GONZALEZ F. J. UND TAKEDA J., 2003:** Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function. *J Clin Invest*, 112 (9): 1372-1382.
- TAKAKUWA N., SAITO K., OHNISHI M. UND ODA Y., 2005:** Determination of glucosylceramide contents in crop tissues and by-products from their processing. *Bioresour Technol*, 96 (9): 1089-1092.

- TAKATS Z., WISEMAN J. M., GOLOGAN B. UND COOKS R. G.**, 2004: Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, 306 (5695): 471-473.
- TAKETOMI T. UND KAWAMURA N.**, 1972: Degradation of sphingosine bases during acid-hydrolysis of sphingomyelin, cerebroside or psychosine. *J Biochem*, 72 (1): 189-193.
- TANJI M., KINOSHITA M., YADA H., YAMANE M., KAKUTA Y., MOTOSHIMA H., ODA Y. UND OHNISHI M.**, 2004: Effects of growth temperature on cerebroside content and chemical composition in *Kluyveromyces lactis*. *J Oleo Sci*, 53 (3): 127-133.
- TELLIER F., MAIA-GRONDARD A., SCHMITZ-AFONSO I. UND FAURE J. D.**, 2014: Comparative plant sphingolipidomic reveals specific lipids in seeds and oil. *Phytochemistry*, 103: 50-58.
- TERNES P., WOBBE T., SCHWARZ M., ALBRECHT S., FEUSSNER K., RIEZMAN I., CREGG J. M., HEINZ E., RIEZMAN H., FEUSSNER I. UND WARNECKE D.**, 2011: Two pathways of sphingolipid biosynthesis are separated in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem*, 286 (13): 11401-11414.
- THE PLANT LIST**, 2013: The Plant List (2013). Version 1.1. Online verfügbar: <http://www.theplantlist.org/>, Stand: 06.07.2017.
- THUDICHUM J. L. W.**, 1884: A treatise on the chemical constitution of brain. Bailliere, Tindall and Cox, London.
- THULIN M.**, 1989: Fabaceae. In: HEDBERG I., EDWARDS S. (Hrsg.): Flora of Ethiopia, Volume 3: Pittosporaceae to Araliaceae. The National Herbarium, Addis Ababa University und Department of Systematic Botany, Uppsala University, Addis Abeba und Asmara, Äthiopien und Uppsala, Schweden: 49-251.
- TIEN N. Q., NGOC P., MINH P. H., VAN K. P., VAN M. C. UND KIM Y. H.**, 2004: New ceramide from *Alocasia macrorrhiza*. *Arch Pharm Res*, 27 (10): 1020-1022.
- TOWNLEY H. E., McDONALD K., JENKINS G. I., KNIGHT M. R. UND LEAVER C. J.**, 2005: Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol Chem*, 386 (2): 161-166.
- TROMMER H. UND NEUBERT R. H.**, 2006: Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol*, 19 (2): 106-121.
- UEMURA M. UND STEPONKUS P. L.**, 1994: A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol*, 104 (2): 479-496.
- VAN OVERLOOP H., VAN DER HOEVEN G. UND VAN VELDHOVEN P. P.**, 2005: N-acyl migration in ceramides. *J Lipid Res*, 46 (4): 812-816.
- VAN SMEDEN J., HOPPEL L., VAN DER HEIJDEN R., HANKEMEIER T., VREEKEN R. J. UND BOUWSTRA J. A.**, 2011: LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res*, 52 (6): 1211-1221.
- VAN SMEDEN J., JANSSENS M., KAYE E. C., CASPERS P. J., LAVRIJSEN A. P., VREEKEN R. J. UND BOUWSTRA J. A.**, 2014: The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp Dermatol*, 23 (1): 45-52.
- VARELA A. R., GONCALVES DA SILVA A. M., FEDOROV A., FUTERMAN A. H., PRIETO M. UND SILVA L. C.**, 2013: Effect of glucosylceramide on the biophysical properties of fluid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1828 (3): 1122-1130.
- VEITCH N. C., ELLIOTT P. C., KITE G. C. UND LEWIS G. P.**, 2010: Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). *Phytochemistry*, 71 (4): 479-486.

- VENDRUSCOLO F., ALBUQUERQUE P. M., STREIT F., ESPOSITO E. UND NINOW J. L., 2008: Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol*, 28 (1): 1-12.
- VESPER H., SCHMELZ E. M., NIKOLOVA-KARAKASHIAN M. N., DILLEHAY D. L., LYNCH D. V. UND MERRILL A. H., JR., 1999: Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J Nutr*, 129 (7): 1239-1250.
- VIELHABER G., PFEIFFER S., BRADE L., LINDNER B., GOLDMANN T., VOLLMER E., HINTZE U., WITTERN K. P. UND WEPF R., 2001: Localization of ceramide and glucosylceramide in human epidermis by immunogold electron microscopy. *J Invest Dermatol*, 117 (5): 1126-1136.
- VOUTQUENNE L., LAVAUD C., MASSIOT G., SEVENET T. UND HADI H. A., 1999: Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. *Phytochemistry*, 50 (1): 63-69.
- WANG L., WANG T. UND FEHR W. R., 2006a: Effect of seed development stage on sphingolipid and phospholipid contents in soybean seeds. *J Agric Food Chem*, 54 (20): 7812-7816.
- WANG L., WANG T. UND FEHR W. R., 2006b: HPLC quantification of sphingolipids in soybeans with modified palmitate content. *J Agric Food Chem*, 54 (20): 7422-7428.
- WANG R. F., WU X. W. UND GENG D., 2013: Two cerebrosides isolated from the seeds of *Sterculia lychnophora* and their neuroprotective effect. *Molecules*, 18 (1): 1181-1187.
- WARNECKE D. UND HEINZ E., 2003: Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cell Mol Life Sci*, 60 (5): 919-941.
- WATANABE M. UND IMAI H., 2011: Characterization of glucosylceramides in leaves of the grass family (Poaceae): Pooideae has unsaturated hydroxy fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75 (9): 1838-1841.
- WATANABE M., MIYAGI A., NAGANO M., KAWAI-YAMADA M. UND IMAI H., 2011: Characterization of glucosylceramides in the Polygonaceae, *Rumex obtusifolius* L. injurious weed. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75 (5): 877-881.
- WEERHEIM A. UND PONEC M., 2001: Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res*, 293 (4): 191-199.
- WEINSTEIN G. D., MCCULLOUGH J. L. UND ROSS P. A., 1985: Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 85 (6): 579-583.
- WELLS G. B., DICKSON R. C. UND LESTER R. L., 1998: Heat-induced elevation of ceramide in *Saccharomyces cerevisiae* via de novo synthesis. *J Biol Chem*, 273 (13): 7235-7243.
- WERTZ P. W., 2000: Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm-Venereol Suppl*, 208: 7-11.
- WERTZ P. W., 2013: Current understanding of skin biology pertinent to skin penetration: skin biochemistry. *Skin Pharmacol Physiol*, 26 (4-6): 217-226.
- WERTZ P. W. UND DOWNING D. T., 1983: Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res*, 24 (6): 759-765.
- WERTZ P. W., MADISON K. C. UND DOWNING D. T., 1989: Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 92 (1): 109-111.
- WERTZ P. W., MIETHKE M. C., LONG S. A., STRAUSS J. S. UND DOWNING D. T., 1985: The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol*, 84 (5): 410-412.

- WERTZ P. W., SWARTZENDRUBER D. C., MADISON K. C. UND DOWNING D. T.,** 1987: Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J Invest Dermatol*, 89 (4): 419-425.
- WERTZ P. W. UND VAN DEN BERGH B.,** 1998: The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids*, 91 (2): 85-96.
- WHITAKER B. D.,** 1996: Cerebrosides in mature-green and red-ripe bell pepper and tomato fruits. *Phytochemistry*, 42 (3): 627-632.
- WHITAKER B. D.,** 1997: Analysis of plant cerebrosides by C₁₈ and C₆ HPLC. In: WILLIAMS J., KHAN M., LEM N. (Hrsg.): Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids. Springer Netherlands, Dordrecht: 143-145.
- WICKERHAM L. J. UND STODOLA F. H.,** 1960: Formation of extracellular sphingolipides by microorganisms. I. Tetraacetylphyto-sphingosine from *Hansenula ciferri*. *J Bacteriol*, 80: 484-491.
- WING D. R., GARNER B., HUNNAM V., REINKENSMEIER G., ANDERSSON U., HARVEY D. J., DWEK R. A., PLATT F. M. UND BUTTERS T. D.,** 2001: High-performance liquid chromatography analysis of ganglioside carbohydrates at the picomole level after ceramide glycanase digestion and fluorescent labeling with 2-aminobenzamide. *Anal Biochem*, 298 (2): 207-217.
- WOLFF I. A. UND KWOLEK W. F.,** 1971: Lipids of the Leguminosae. In: HARBONE J. B., BOULTER D., TURNER B. L. (Hrsg.): Chemotaxonomy of the Leguminosae. London Academic, London: 231-235.
- WOLLENWEBER U. UND FARWICK M.,** 2006: Application of skin-identical ceramide 3 for enhanced skin moisturization and smoothness: latest results. *Euro Cosmetics*, (Special Issue): 1-5.
- YA-XIAN Z., SUETAKE T. UND TAGAMI H.,** 1999: Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res*, 291 (10): 555-559.
- YAMAUCHI R., AIZAWA K., INAKUMA T. UND KATO K.,** 2001: Analysis of molecular species of glycolipids in fruit pastes of red bell pepper (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 49 (2): 622-627.
- YANG H. UND LIEBESKIND L. S.,** 2007: A concise and scalable synthesis of high enantiopurity (-)-D-erythro-sphingosine using peptidyl thiol ester-boronic acid cross-coupling. *Org Lett*, 9 (16): 2993-2995.
- YOSHIDA S. UND UEMURA M.,** 1990: Responses of the plasma membrane to cold acclimation and freezing stress. In: LARSSON C., MØLLER I. M. (Hrsg.): The Plant Plasma Membrane: Structure, Function and Molecular Biology. Springer, Berlin, Heidelberg: 293-319.
- YOSHIDA S., WASHIO K., KENRICK J. UND ORR G.,** 1988: Thermotropic properties of lipids extracted from plasma-membrane and tonoplast isolated from chilling-sensitive mung bean (*Vigna-Radiata* [L] Wilczek). *Plant Cell Physiol*, 29 (8): 1411-1416.
- ZAUNER S., TERNES P. UND WARNECKE D.,** 2010: Biosynthesis of sphingolipids in plants (and some of their functions). *Adv Exp Med Biol*, 688: 249-263.
- ZHANG G., SLASKI J. J., ARCHAMBAULT D. J. UND TAYLOR G. J.,** 1997: Alternation of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiol Plantarum*, 99 (2): 302-308.
- ZHANG Q., FLACH C. R., MENDELSON R., MAO G., PAPPAS A., MACK M. C., WALTERS R. M. UND SOUTHALL M. D.,** 2015: Topically applied ceramide accumulates in skin glymphs. *Clin Cosmet Invest Dermatol*, 8: 329-337.

ZHANG W. K., XU J. K., ZHANG X. Q., YAO X. S. UND YE W. C., 2007: Sphingolipids with neuritogenic activity from *Euphorbia sororia*. *Chem Phys Lipids*, 148 (2): 77-83.

ZHAO F., XU J., CHEN J., YAN X., ZHOU C., LI S., XU X. UND YE F., 2013: Structural elucidation of two types of novel glycosphingolipids in three strains of *Skeletonema* by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 27 (13): 1535-1547.

ZHOU B., LI S. C., LAINE R. A., HUANG R. T. UND LI Y. T., 1989: Isolation and characterization of ceramide glycanase from the leech, *Macrobdella decora*. *J Biol Chem*, 264 (21): 12272-12277.

ZHU Y. D., SOROKA D. N. UND SANG S. M., 2013: Structure elucidation and chemical profile of sphingolipids in wheat bran and their cytotoxic effects against human colon cancer cells. *J Agric Food Chem*, 61 (4): 866-874.

8 ANHANG

Referenzsubstanzen

Abb. A1: TLC der Referenzlösung 1 (A), 2 (B) und 3 (C)

R1 – Referenzlösung 1 (Lipide): CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen); R2 – Referenzlösung 2 (Ceramide): Cer – Ceramid, S – Sphingosin (d18:1), P – Phytosphingosin (t18:0), A – α -hydroxyliert, N – nicht hydroxyliert; R3 – Referenzlösung 3 (Hydrolyse): Cer – Ceramid (d18:2 h16:0 (47)), LS – Linolsäure, GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), Sph – Sphingosin (d18:1)

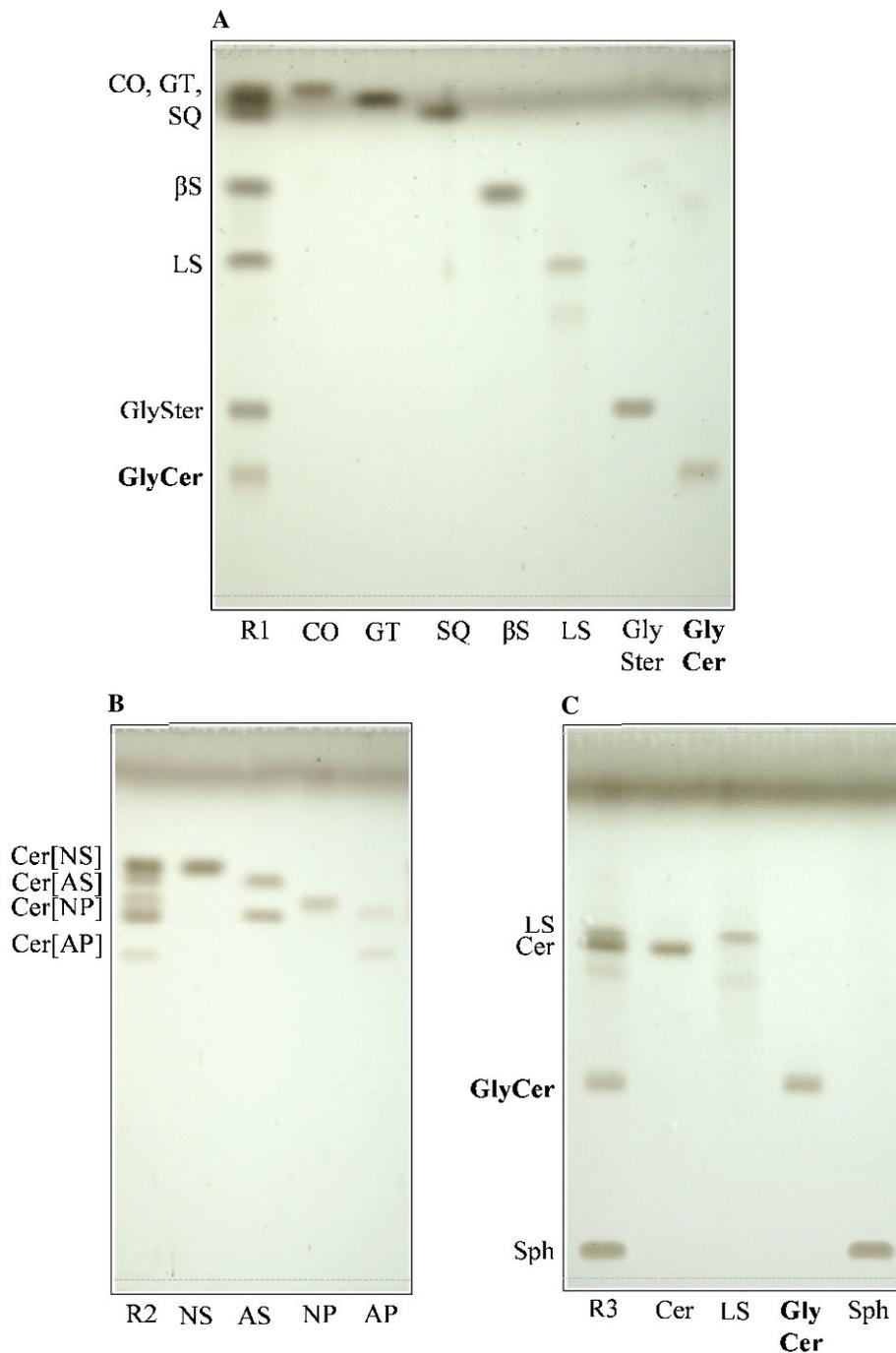
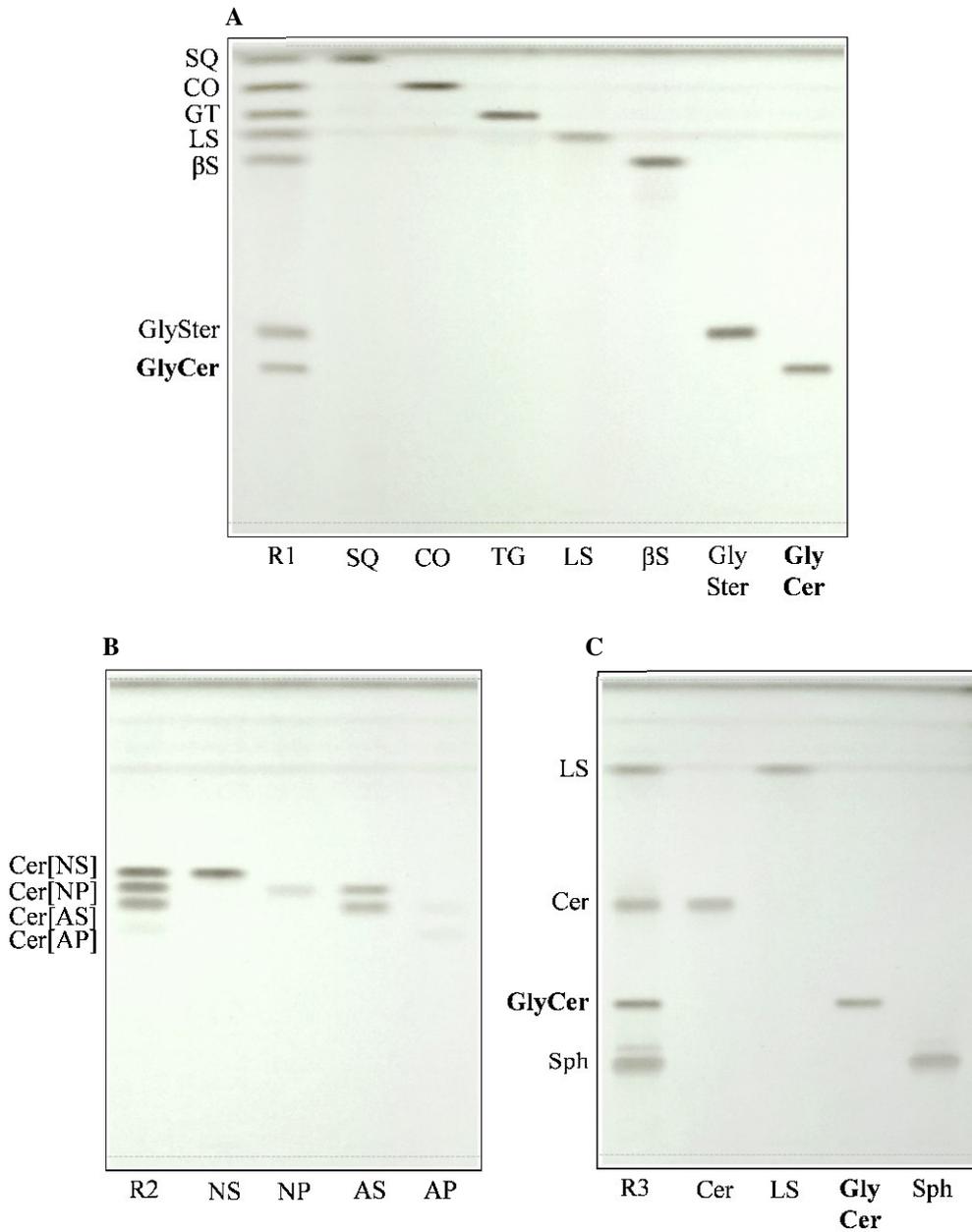


Abb. A2: AMD-HPTLC der Referenzlösung 1 (A), 2 (B) und 3 (C)

R1 – Referenzlösung 1 (Lipide): CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltriolateat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen); R2 – Referenzlösung 2 (Ceramide): Cer – Ceramid, S – Sphingosin (d18:1), P – Phytosphingosin (t18:0), A – α -hydroxyliert, N – nicht hydroxyliert; R3 – Referenzlösung 3 (Hydrolyse): Cer – Ceramid (d18:2 h16:0 (47)), LS – Linolsäure, GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), Sph – Sphingosin (d18:1)



Extraktions- und Isolierungsverläufe

Abb. A3: Lipidextraktions- und Isolierungsverlauf der Weizenkeime

SC – Säulenchromatographie, Referenzen: CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)

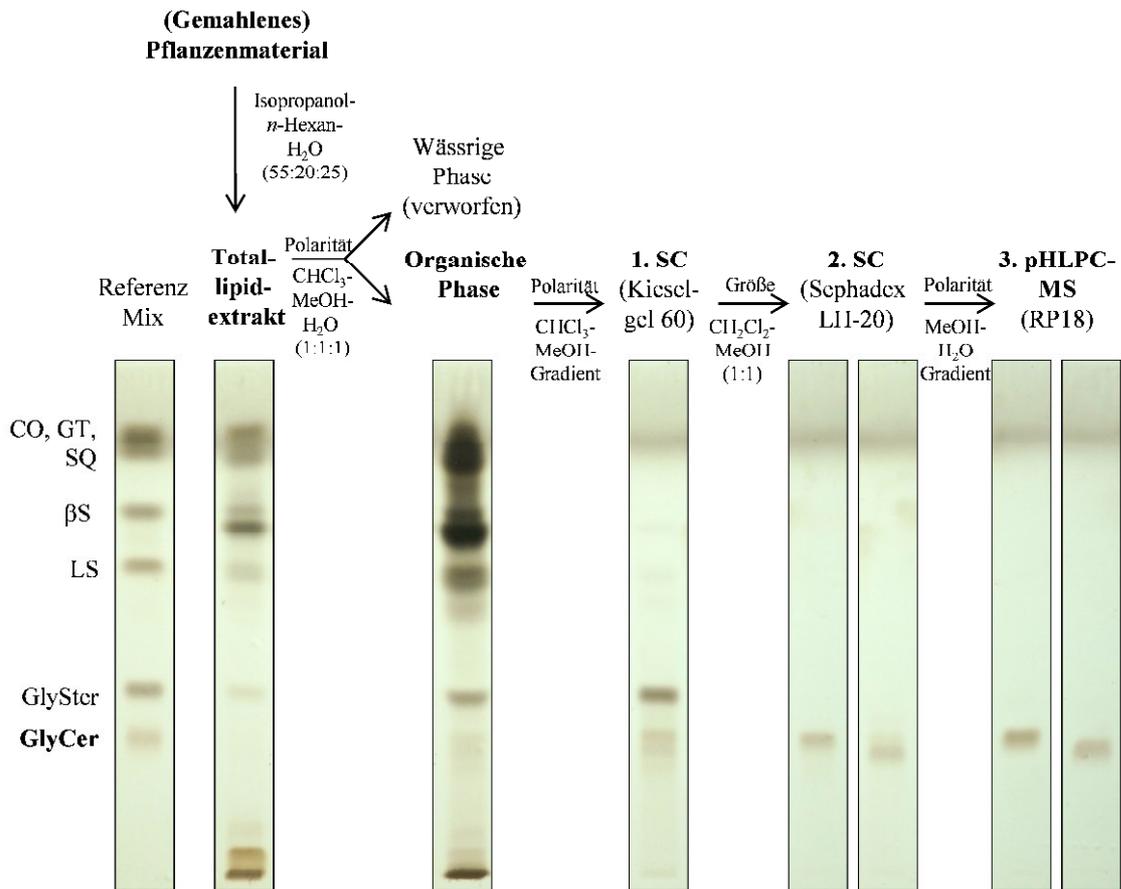


Abb. A4: Lipidextraktions- und Isolierungsverlauf des Kaffeesatzes

SC – Säulenchromatographie, Referenzen: CO – Cholesteroleat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)

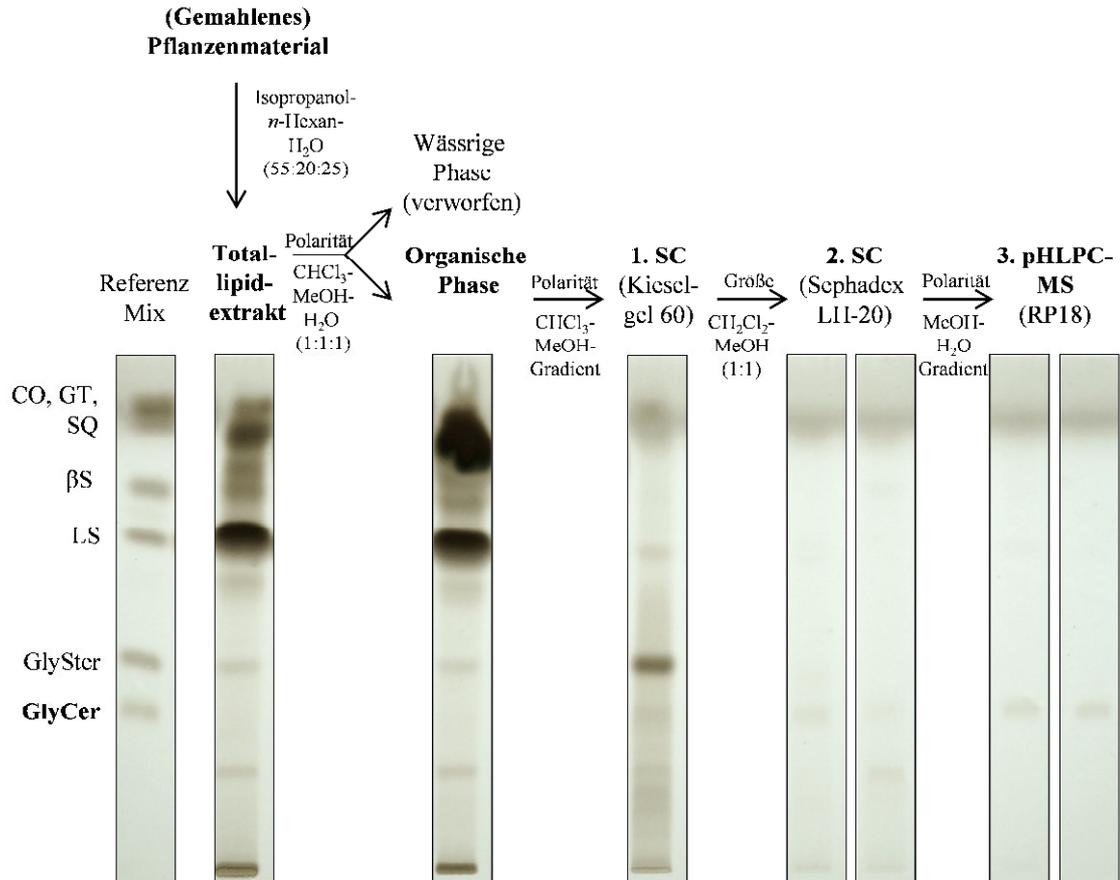


Abb. A5: Lipidextraktion der Fabaceae-Samen

R1 – Referenzlösung 1: CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen); AGr – *Albizia grandibracteata*, AGu – *Albizia gummifera*, AL – *Albizia lebbeck*, AS – *Albizia schimperiana*, AE – *Acacia etbaica*, RP – *Robina pseudoacacia*

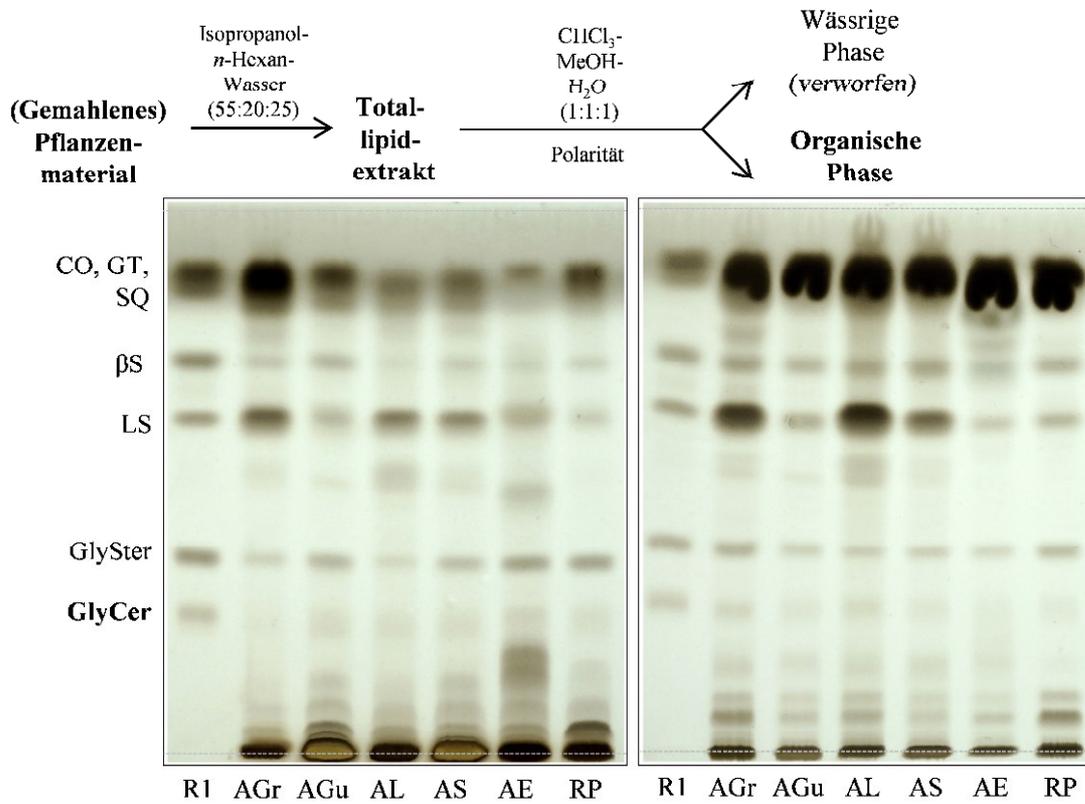
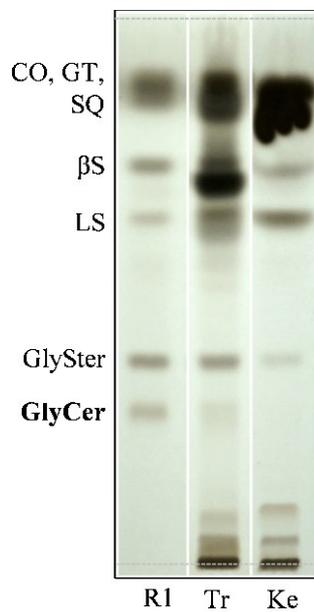


Abb. A6: TLC der angereicherten Extrakte von Apfeltrester und -kernen

R1 – Referenzlösung 1: CO – Cholesteroleat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), Tr – Trester, Ke – Kerne



Reinheit isolierter Fraktionen

Abb. A7: TLC der Apfeltresterfraktionen (A1-12)

R1 – Referenzlösung 1: CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)

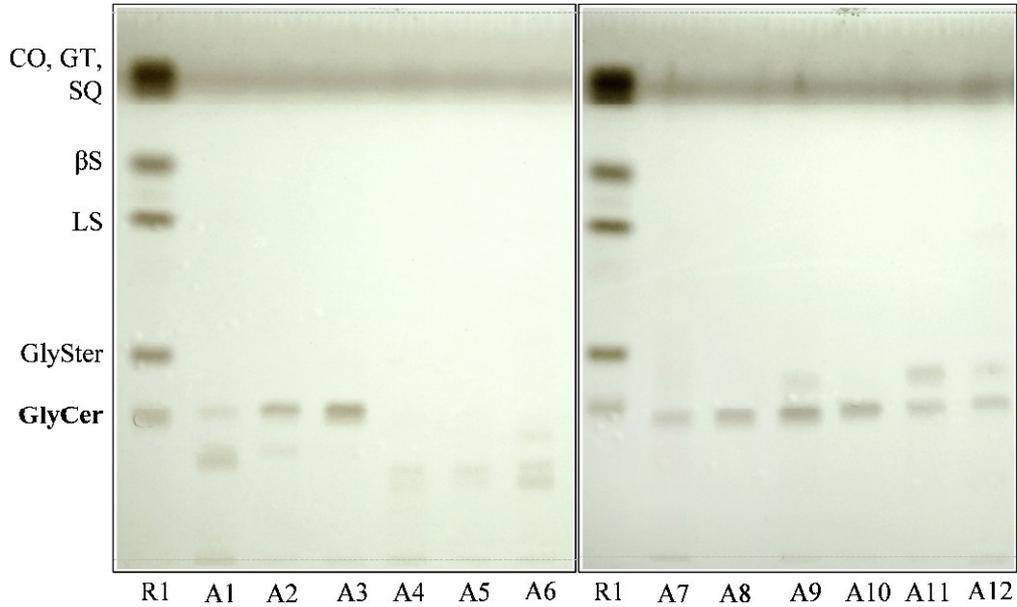


Abb. A8: TLC der Weizenkeimfraktionen (W1-12)

R1 – Referenzlösung 1: CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)

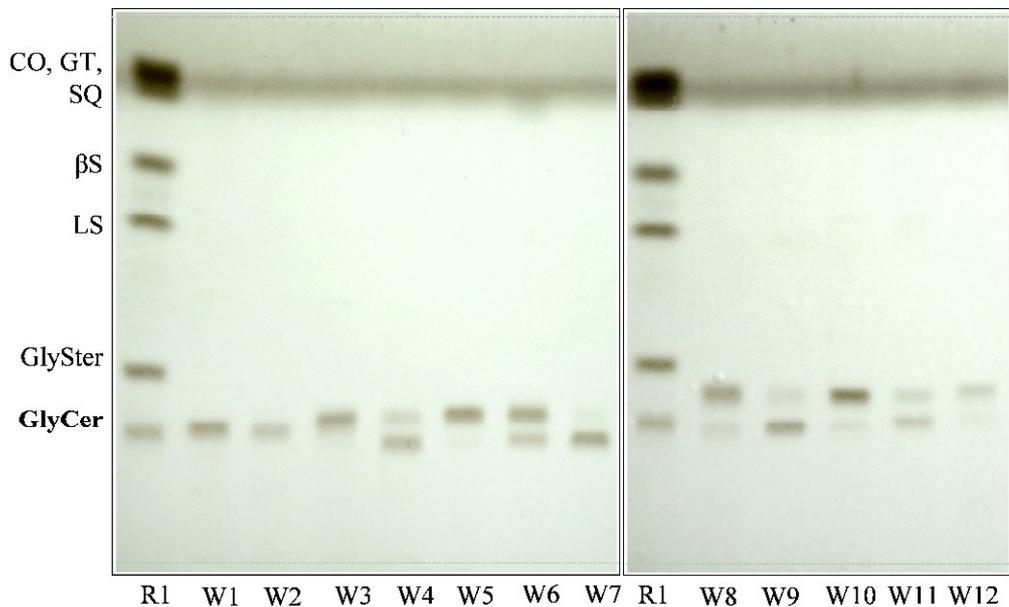


Abb. A9: TLC der Kaffeesatzfraktionen (C1-5)

R1 – Referenzlösung 1: CO – Cholesteroleat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)

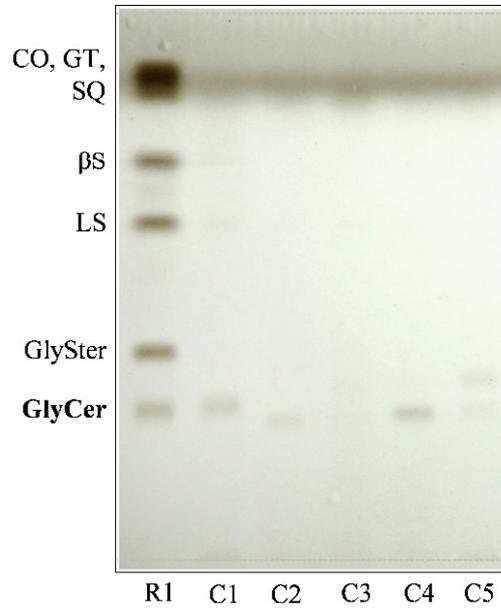


Abb. A10: HPLC-MS der Apfeltresterfraktionen (A1-12)

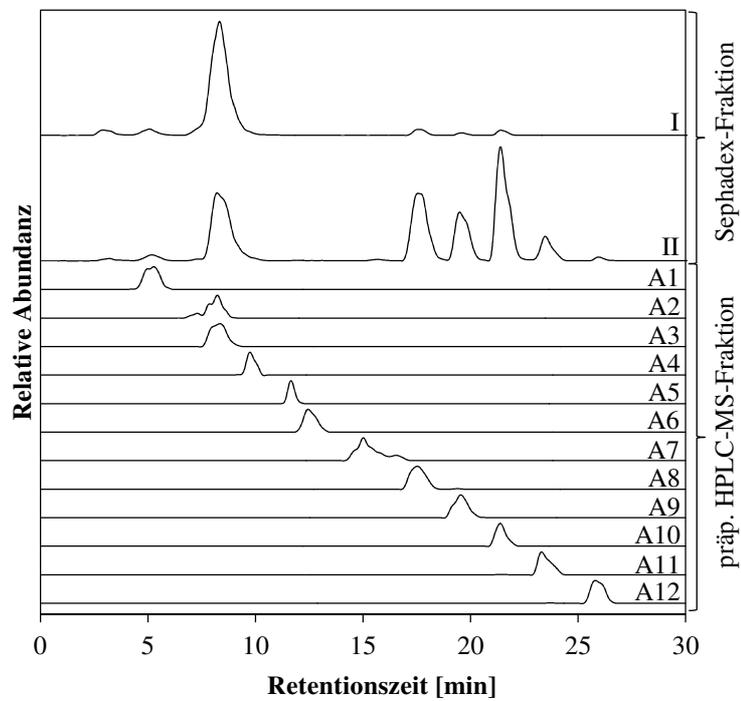


Abb. A11: HPLC-MS der Weizenkeimfraktionen (W1-12)

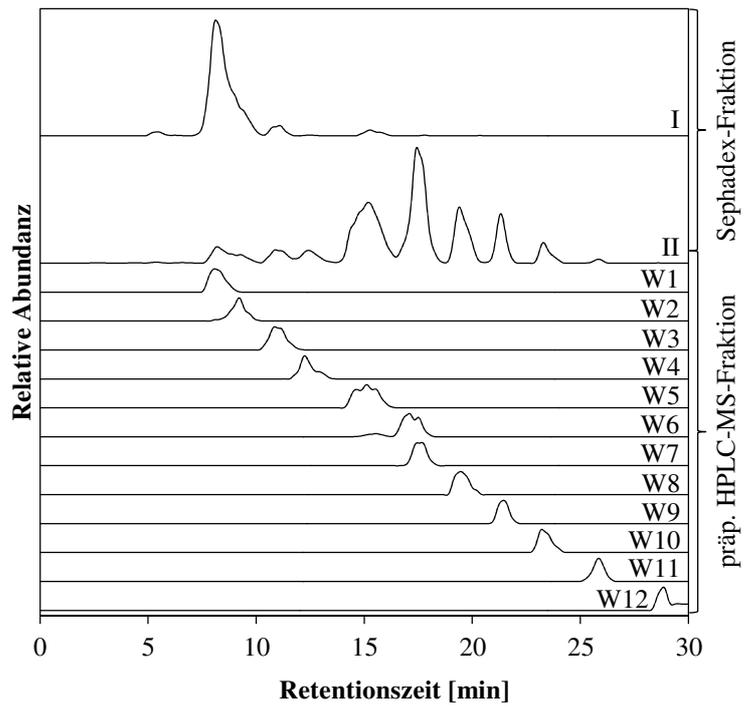
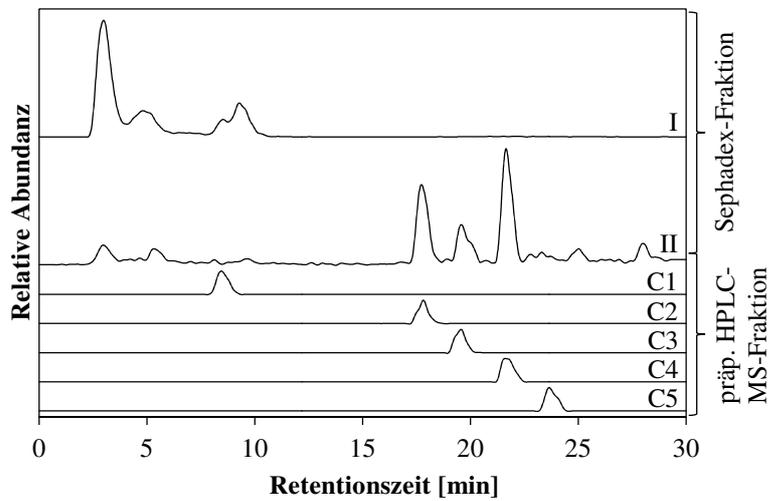


Abb. A12: HPLC-MS der Kaffeesatzfraktionen (C1-5)



Identifizierung der Glycosylceramide (HPLC-MS)

Abb. A13: TIC und extrahierte Ionen ($[M+H]^+$) der Apfeltresterfraktionen (A1-12)

Es ist die Cer-Grundstruktur der GlyCer bezeichnet. Alle GlyCer haben Glucose als Kopfgruppe (Glc-). ^a - Strukturvorschlag

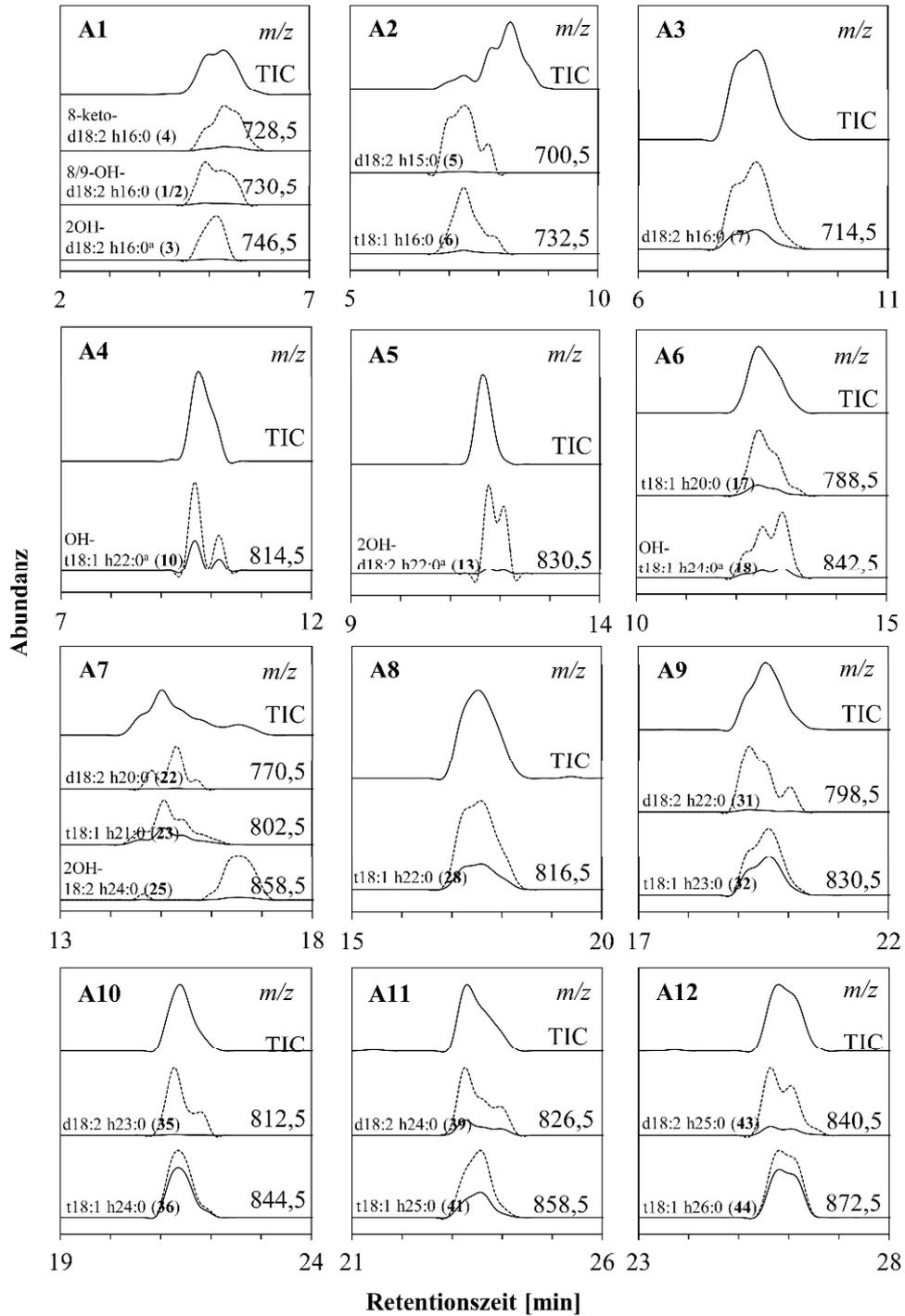


Abb. A14: TIC und extrahierte Ionen ($[M+H]^+$) der Weizenkeimfraktionen (W1-12)

Es ist die Cer-Grundstruktur der GlyCer bezeichnet. Alle GlyCer haben Glucose als Kopfgruppe (Glc-).

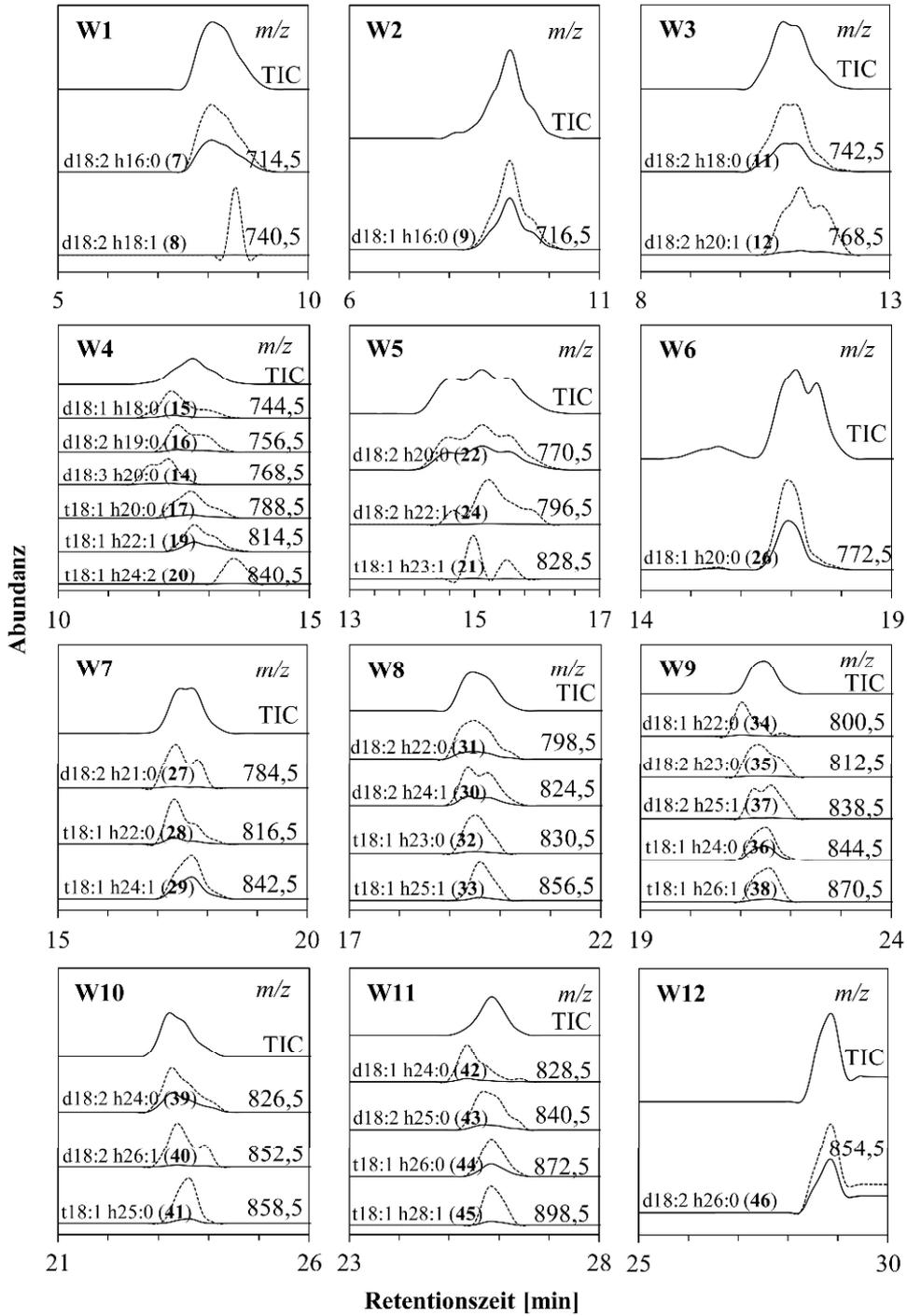
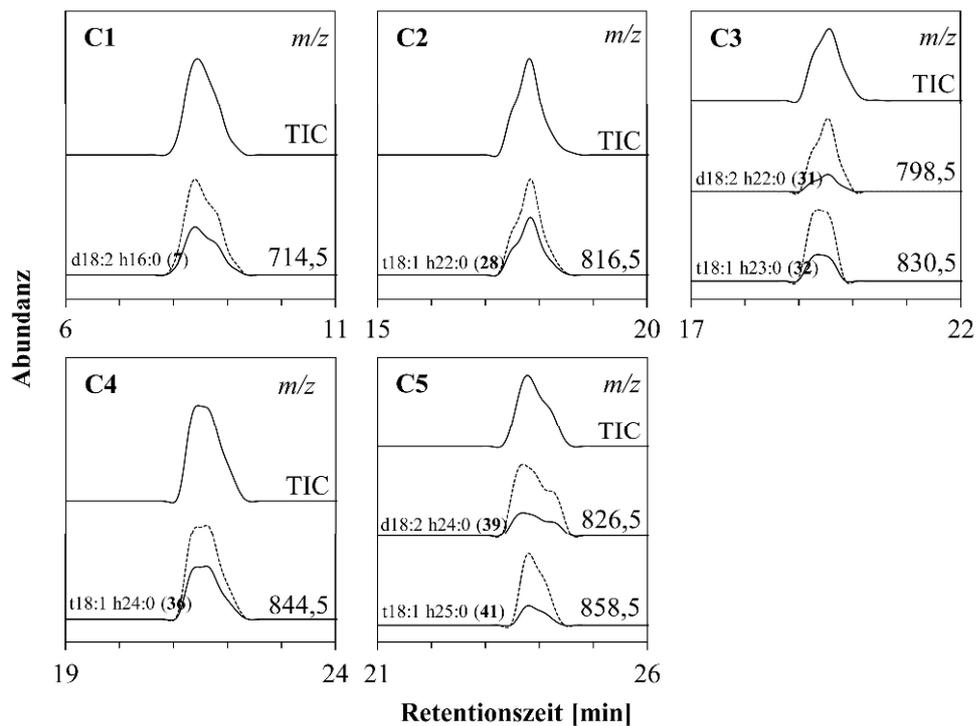


Abb. A15: TIC und extrahierte Ionen ($[M+H]^+$) der Kaffeesatzfraktionen (C1-5)

Es ist die Cer-Grundstruktur der GlyCer bezeichnet. Alle GlyCer haben Glucose als Kopfgruppe (Glc-).



Fragmentierung der Glycosylceramid-Klassen (MS/MS)

Abb. A16: MS/MS-Spektren von Glc-d18:1 h16:0 (9) und Glc-d18:3 h20:0 (14)

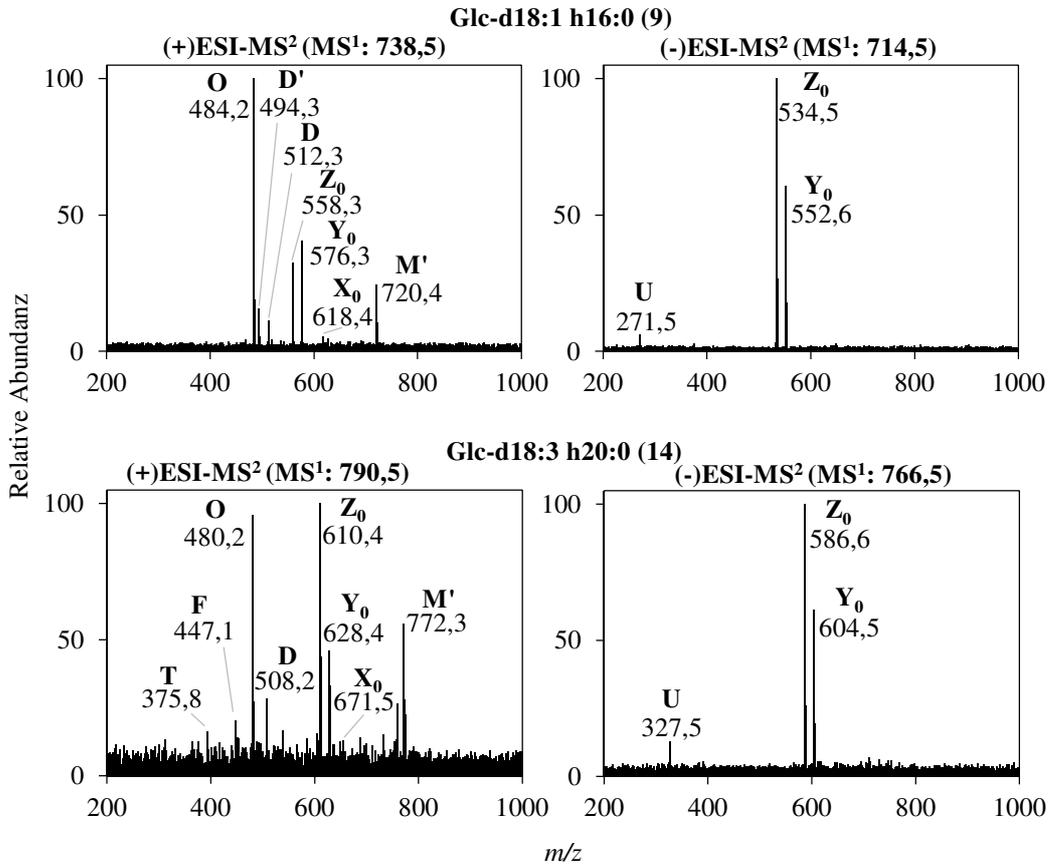


Abb. A17: MS/MS-Spektren von Glc-d18:2 h20:1 (12), Glc-t18:1 h24:1 (29) und Glc-t18:1 h24:2 (20)

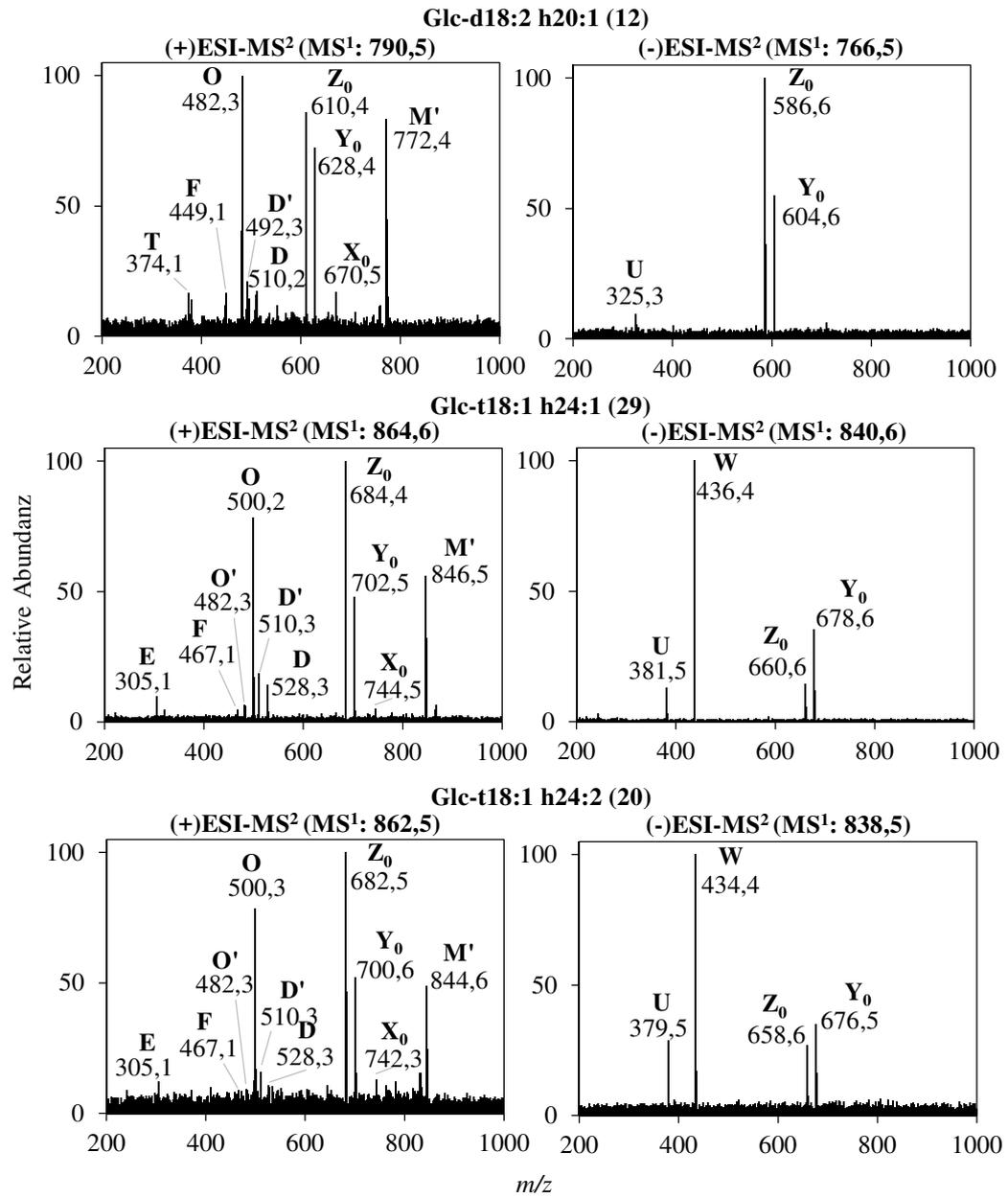
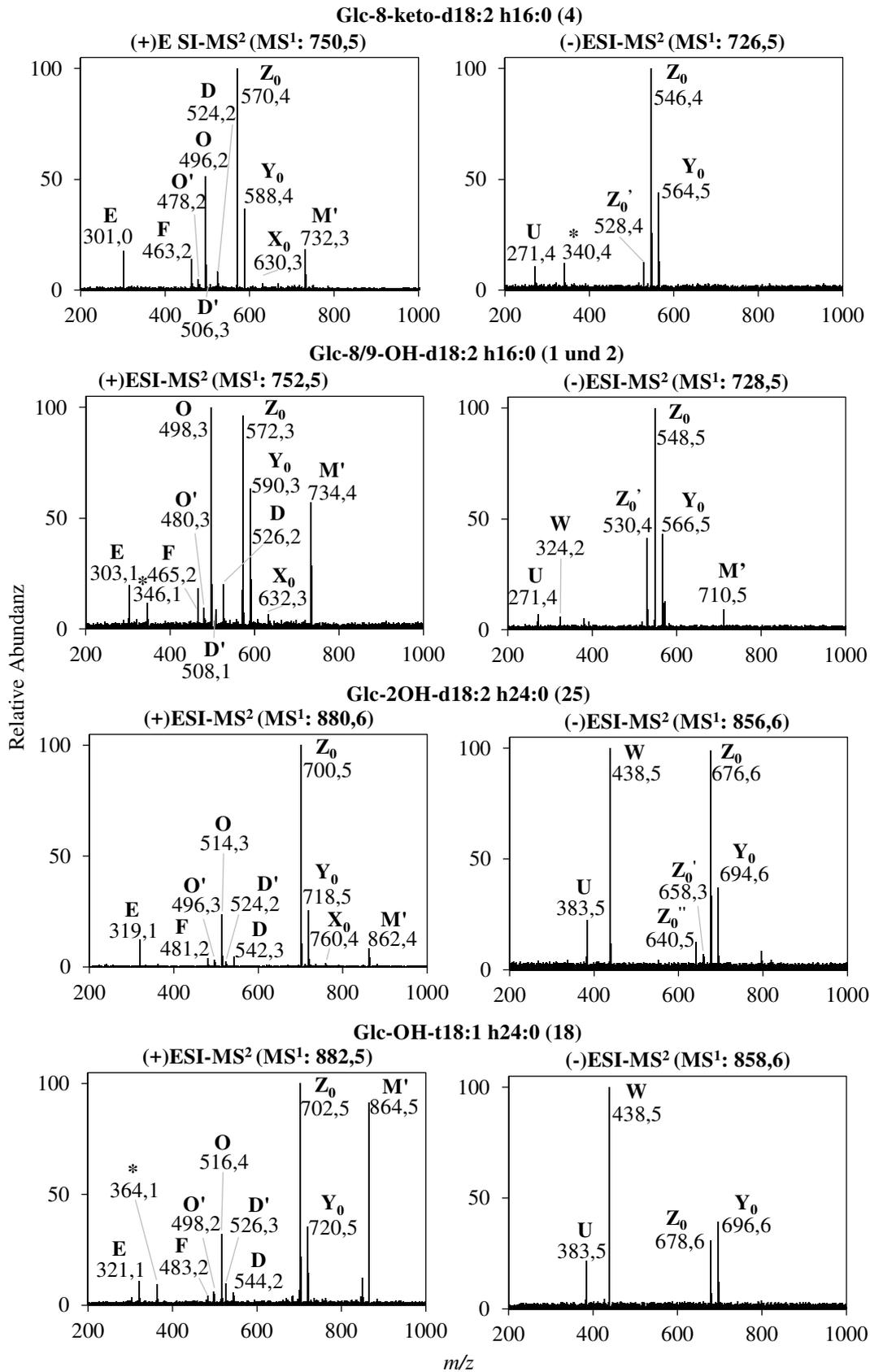


Abb. A18: MS/MS-Spektren von Glc-8-keto-d18:2 h16:0 (4), Glc-8/9-OH-d18:2 h16:0 (1/2), Glc-2OH-d18:2 h24:0 (25) und Glc-OH-t18:1 h24:0 (18)

* – Fragmente konnten nicht zugeordnet werden.

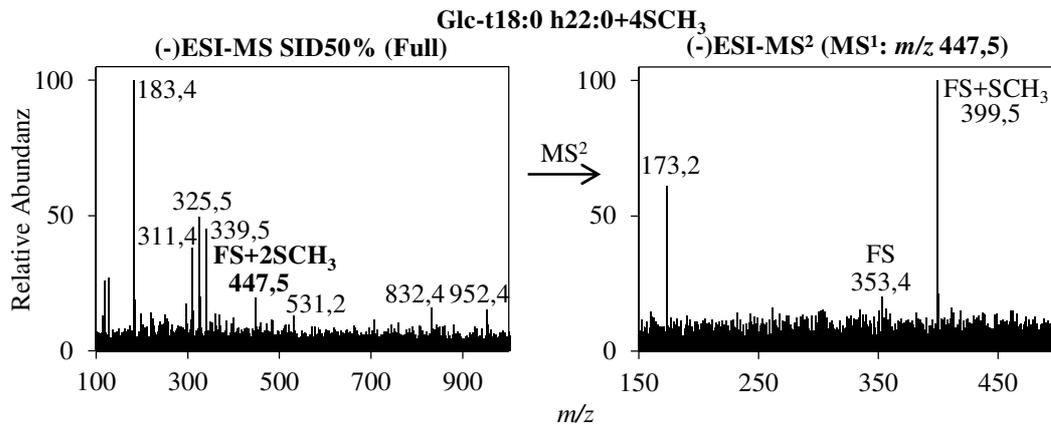


Tab. A1: ESI-MS/MS von Glycosylceramiden

^a – Strukturvorschlag, ^b – Ionen nicht detektiert in MS¹, aber indirekt in MS/MS; A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, C – Kaffee, Glc – Glucose, Zuc – Zuckereinheit, acyl – Acylkette (Fettsäure), LCB – Sphingobase

Pflanzenmaterial	GlyCer	m/z																	
		MS ¹ [M+Na] ⁺	M ⁺ (M-H ₂ O)	Y ₀ (M-Zuc)	Z ₀ (M-Zuc-H ₂ O)	D ⁺ (D-H ₂ O)	MS ² O (M-acyl)	O ⁺ (O-H ₂ O)	X ₀ (O-120)	T (O-Zuc)	E (M-180-acyl)	F (M-acyl)	MS ¹ IM-HI	Y ₀ (M-Zuc)	Z ₀ (M-Zuc-H ₂ O)	(-)ESI MS ² Z ₀ (M-Zuc-2H ₂ O)	Z ₀ (M-Zuc-3H ₂ O)	U (M-Zuc-LCB)	W (M-Zuc-LCB)
X		738.6	720.4	576.3	558.3	512.3	494.3	484.2	618.4	-	-	714.5	552.6	534.5	-	271.5	-	-	-
X	Glc-d18:1 h16:0 (9)	766.6	748.5	604.4	586.4	512.2	494.2	484.3	646.2	-	-	742.6	580.7	562.7	-	299.5	-	-	-
X	Glc-d18:1 h18:0 (15)	794.6	776.4	632.4	614.4	512.3	494.2	484.2	674.4	-	-	770.6	608.6	590.6	-	327.4	-	-	-
X	Glc-d18:1 h20:0 (26)	822.6	804.7	660.5	642.3	512.4	494.2	484.2	702.6	-	-	798.6	636.7	618.6	-	355.4	-	-	-
X	Glc-d18:1 h22:0 (34)	850.7	832.6	688.5	670.4	512.3	494.2	484.2	730.4	-	-	826.6	664.7	646.6	-	383.5	-	-	-
X	Glc-d18:1 h24:0 (42)	878.5	860.4	716.5	698.4	512.3	494.2	484.2	758.4	-	-	854.6	692.7	674.6	-	411.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h15:0 (5)	722.5	704.7	560.5	542.3	510.2	493.2	482.2	602.3	320.0	n.d.	698.5 ^a	536.5	518.5	-	257.4	-	-	-
X	Glc-d18:2 h16:0 (7)	736.6	718.4	574.3	556.2	510.3	492.2	482.2	616.3	320.1	n.d.	712.6	550.5	532.5	-	271.3	-	-	-
X	Glc-d18:2 h18:0 (11)	764.6	746.4	602.4	584.3	510.3	492.2	482.2	644.2	348.1	n.d.	740.6	578.6	560.6	-	299.4	-	-	-
X	Glc-d18:2 h19:0 (16)	778.6	760.4	616.3	598.3	510.3	492.2	482.2	658.4	348.1	n.d.	754.6	592.6	574.6	-	313.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h20:0 (22)	792.6	774.4	630.4	612.3	510.4	492.3	482.2	672.3	376.2	n.d.	768.6	606.6	588.6	-	327.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h21:0 (27)	806.6	788.5	644.4	626.4	510.3	492.0	482.3	686.6	390.3	n.d.	782.6	620.7	602.5	-	341.4	-	-	-
X	Glc-d18:2 h22:0 (31)	820.6	802.5	658.4	640.4	510.3	492.2	482.2	700.4	404.2	n.d.	796.6	634.6	616.6	-	355.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h23:0 (35)	834.7	816.6	672.5	654.4	510.2	492.1	482.3	714.6	418.2	n.d.	810.3	648.6	630.7	-	369.6	-	-	-
X	Glc-d18:2 h24:0 (39)	848.6	830.5	686.4	668.5	510.2	492.2	482.2	728.5	432.2	n.d.	824.6	662.6	644.6	-	383.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h25:0 (43)	862.7	844.5	700.6	682.4	510.1	492.2	482.2	742.5	446.2	n.d.	838.7	676.6	658.6	-	397.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h26:0 (46)	876.6	858.5	714.5	696.4	510.3	492.3	482.2	756.4	460.1	n.d.	852.7	690.6	672.7	-	411.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h18:1 (8)	762.7	744.4	600.3	582.3	510.3	492.2	482.2	661.5	n.d.	n.d.	738.6 ^b	576.5	558.6	-	297.4	-	-	-
X	Glc-d18:2 h20:1 (12)	790.6	772.5	628.4	610.4	510.2	492.3	482.3	670.5	374.1	n.d.	766.6	604.6	586.6	-	325.3	-	-	-
X	Glc-d18:2 h22:1 (24)	818.5	800.4	656.5	638.5	510.4	n.d.	482.2	684.5	402.3	n.d.	794.5	632.6	614.5	-	353.4	-	-	-
X	Glc-d18:2 h24:1 (30)	846.6	828.5	684.5	666.4	510.2	492.2	482.3	698.5	431.3	n.d.	822.6	660.6	642.6	-	381.5	-	-	-
X	Glc-d18:2 h25:1 (37)	860.7	842.6	698.3	680.2	510.1	492.2	482.2	712.5	444.3	n.d.	836.6	674.6	656.6	-	395.6	-	-	-
X	Glc-d18:2 h26:1 (40)	874.5	856.5	712.5	694.4	510.1	492.0	482.2	726.5	458.2	n.d.	850.6	688.6	670.7	-	409.6	-	-	-
X	Glc-d18:3 h20:0 (14)	790.6	772.3	628.4	610.4	508.3	-	480.2	671.5	375.8	n.d.	766.6	604.6	586.5	-	327.5	-	-	-
X	Glc-d18:1 h16:0 (6)	754.6	736.4	592.4	574.4	528.3	510.3	500.3	633.7	-	-	730.6	568.6	550.4	-	271.4	-	-	326.4
X	Glc-d18:1 h20:0 (17)	810.6	792.5	648.4	630.4	528.2	510.2	500.3	690.5	-	-	786.6	624.6	606.4	-	327.6	-	-	382.4
X	Glc-d18:1 h21:0 (23)	824.5	806.4	662.4	644.4	528.3	510.2	500.3	705.4	-	-	800.6	638.6	620.4	-	341.6	-	-	396.4
X	Glc-d18:1 h22:0 (28)	838.7	820.6	676.5	658.5	528.3	510.3	500.3	718.4	-	-	814.7	652.7	634.6	-	355.5	-	-	410.5
X	Glc-d18:1 h23:0 (32)	852.7	834.4	690.4	672.5	528.2	510.2	500.2	732.6	-	-	828.6	666.7	648.2	-	369.7	-	-	424.5
X	Glc-d18:1 h24:0 (36)	866.7	848.6	704.5	686.4	528.2	510.2	500.3	746.5	-	-	842.6	680.7	662.5	-	383.5	-	-	438.5
X	Glc-d18:1 h25:0 (41)	880.6	862.5	718.4	700.5	528.3	510.3	500.3	760.6	-	-	856.6	694.8	676.2	-	397.6	-	-	452.5
X	Glc-d18:1 h26:0 (44)	894.7	876.5	732.5	714.5	528.2	510.2	500.2	774.5	-	-	870.7	708.8	690.5	-	411.6	-	-	466.5
X	Glc-d18:1 h22:1 (19)	836.6	818.5	674.5	656.4	528.3	510.2	500.3	716.3	-	-	802.6	650.6	632.4	-	353.5	-	-	408.4
X	Glc-d18:1 h23:1 (21)	850.5	832.5	688.4	670.4	528.4	510.2	500.3	730.4	-	-	826.5	664.8	646.8	-	367.5	-	-	422.4
X	Glc-d18:1 h24:1 (29)	864.6	846.5	702.5	684.4	528.3	510.3	500.2	744.5	-	-	840.6	678.6	660.6	-	381.5	-	-	436.4
X	Glc-d18:1 h25:1 (33)	878.6	860.5	716.5	698.5	528.2	510.3	500.3	758.4	-	-	854.8	692.6	674.5	-	395.5	-	-	450.5
X	Glc-d18:1 h26:1 (38)	892.6	874.5	730.4	712.5	528.2	510.3	500.2	772.4	-	-	868.6	706.6	688.5	-	409.5	-	-	464.5
X	Glc-d18:1 h28:1 (45)	920.7	902.5	758.5	740.5	528.3	510.4	500.3	800.4	-	-	896.4	734.4	716.4	-	437.7	-	-	492.5
X	Glc-d18:1 h24:2 (20)	862.6	844.6	700.6	682.5	528.5	510.2	500.3	742.3	-	-	838.6	676.5	658.6	-	379.5	-	-	434.4
X	Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (1/2)	752.5	734.4	590.3	572.3	526.2	508.1	498.2	632.3	-	-	728.5	566.5	548.5	-	271.4	-	-	-
X	Glc-8-OH-d18:2 h16:0 (4)	750.5	732.3	588.4	570.4	524.2	506.3	496.3	630.3	-	-	726.5	564.5	546.4	-	271.4	-	-	-
X	Glc-OH-18:1 h22:0 (10)	854.7	836.6	692.5	674.4	544.3	526.2	516.3	734.4	-	-	830.7	668.6	650.5	-	355.6	-	-	410.4
X	Glc-OH-18:2 h16:0 (3)	768.4	750.4	606.3	588.3	542.5	524.3	514.3	648.4	-	-	744.4	582.6	564.5	-	383.5	-	-	438.5
X	Glc-2OH-18:2 h22:0 (13)	852.6	834.5	690.4	672.4	542.2	524.3	514.3	732.8	-	-	828.6	666.5	648.5	-	355.5	-	-	410.6
X	Glc-2OH-d18:2 h24:0 (25)	880.6	862.4	718.5	700.5	542.2	524.3	514.3	760.4	-	-	856.6	694.6	676.6	-	383.5	-	-	438.5

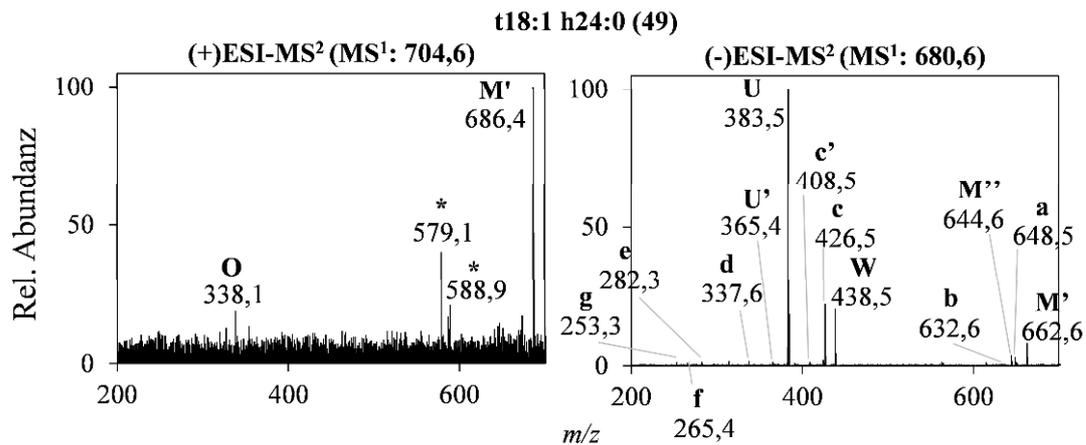
Abb. A19: MS/MS-Spektren zum Doppelbindungsnachweis der Fettsäure (FS, DMDS-Derivate)



Fragmentierung der „Phyto“-Ceramide (MS/MS)

Abb. A20: MS/MS-Spektren von t18:1 h24:0 (49)

* – Fragmente konnten nicht zugeordnet werden.



Tab. A2: ESI-MS/MS von Ceramiden
acyl – Acylkette (Fettsäure), LCB – Sphingobase

Cer	(+ESI)		(-ESI)															
	MS ¹ [M+ Na] ⁺	MS ² M ⁺ (M- H ₂ O)	MS ¹ [M- H] ⁻	O (M- acyl)	M ⁺ (M- H ₂ O)	M'' (M- 2H ₂ O)	a (M- 32)	b (M- 48)	U (M- LCB)	U' (M- LCB- H ₂ O)	W (M- LCB)	MS ² c (M- LCB)	c' (M- LCB- H ₂ O)	d (M- LCB)	e (M- acyl)	f (M- acyl)	g (M- acyl)	O (M- acyl)
d18:2-h16:0 (47)	574,5	556,4	550,6	320,2	532,5	514,5	518,5	507,5	271,5	253,4	-	312,4	-	225,7	-	-	-	296,4
t18:1-h22:0 (48)	676,6	658,4	652,6	338,1	634,6	616,6	620,6	604,5	355,5	337,6	410,5	398,4	380,4	309,5	282,3	265,3	253,4	314,2
t18:1-h24:0 (49)	704,6	686,4	680,6	338,1	662,6	644,6	648,5	632,6	383,5	365,4	438,5	426,5	408,5	337,6	282,3	265,4	253,3	314,3

Hydrolyse von Glycosylceramiden

Abb. A21: Proteinsequenz von Imiglucerase (DB00053)

DrugBank Version 5.0 (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00053>, Stand: 06.07.2017)

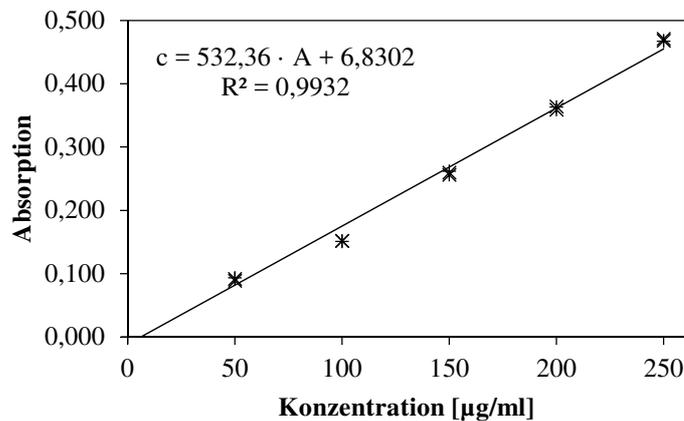
ARPCIPKSFQYSSVVCVCNATYCDFDPPTFPALGTFSTRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLL
 LTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDIFSIRT
 YTYADTPDDFQLHNFSPLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGS
 KGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQDFIA
 RDLGPTLANSTHNNVRLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKAT
 LGETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSDWRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALN
 PEGGNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNLDVAVALM
 HPDGSVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ

Tab. A3: BSA-Verdünnungsreihe (Bradford-Test)

SL – Stammlösung (20 mg/ml)

Konzentration	Verdünnungen der SL	Herstellung
2000 µg/ml	1:10	100 µl SL + 900 µl H ₂ O
250 µg/ml		125 µl 1:10 + 875 µl H ₂ O
200 µg/ml	1:100	100 µl 1:10 + 900 µl H ₂ O
150 µg/ml		75 µl 1:10 + 925 µl H ₂ O
100 µg/ml	1:200	500 µl 1:100 + 500 µl H ₂ O
50 µg/ml	1:400	500 µl 1:200 + 500 µl H ₂ O

Abb. A22: Kalibriergerade mit BSA (Bradford-Test)



Tab. A4: Ergebnisse der Bradford- und der photometrischen (280 nm) Proteinbestimmung

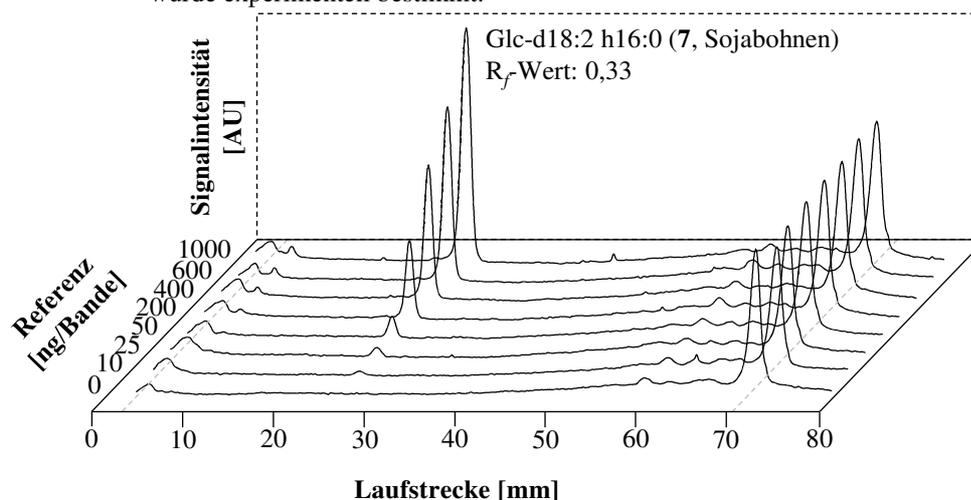
Probe	Bradford-Bestimmung		Photometrische Proteinbestimmung (280 nm)	
	Absorption (1:20 Verd.)	Konzentration [mg/ml]	Absorption (1:20 Verd.)	Konzentration [mg/ml]
1	0,098	1,18	0,085	1,00
2	0,084	1,03	0,094	1,10
3	0,076	0,95	0,088	1,03
Mittelwert	-	1,05	-	1,04

Quantifizierung von Glycosylceramiden (AMD-HPTLC)**Tab. A5: Elutionsgradient der AMD-HPTLC (AMD 2)**

Schritt	Methanol [%]	Chloroform [%]	<i>n</i> -Hexan [%]	Ethylacetat [%]	Laufstrecke [mm]	Trocknungszeit [min]	Vorkonditionierung
1	30	70	0	0	11	1,5	Ja
2	30	70	0	0	14	1,5	Ja
3	30	70	0	0	17	1,5	Ja
4	30	70	0	0	20	1,5	Ja
5	27	73	0	0	23	1,5	Ja
6	24	76	0	0	26	1,5	Ja
7	21	79	0	0	29	1,5	Ja
8	18	82	0	0	32	1,5	Ja
9	15	85	0	0	35	1,5	Ja
10	12	88	0	0	38	1,5	Ja
11	9	91	0	0	41	1,5	Ja
12	6	94	0	0	44	1,5	Ja
13	3	97	0	0	47	1,5	Ja
14	1	99	0	0	50	1,5	Ja
15	0	100	0	0	53	1,5	Ja
16	0	0	70	30	59	1,5	Ja
17	0	0	90	10	65	1,5	Ja
18	0	0	100	0	71	1,5	Ja

Abb. A23: HPTLC-Densitogramm der Kalibrierung (25-1000 ng/Bande Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen)

Der LOD (S/N=3) von 10 ng/Bande für Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen) wurde experimentell bestimmt.

**Tab. A6: Reproduzierbarkeit der Laufstrecke der eingesetzten Lipidreferenzen**

Drei HPTLC-Platten wurden nach AMD-Densitometrie ausgewertet (n=3). CO – Cholesterololeat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sito-sterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sito-sterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), RSD – relative Standardabweichung

Substanz	R _f -Wert			$\bar{x} \pm \text{RSD}$	RSD [%]
	1	2	3		
GlyCer	0,329	0,332	0,335	0,332 \pm 0,003	0,96
GlySter	0,394	0,397	0,394	0,395 \pm 0,002	0,46
β S	0,760	0,760	0,779	0,767 \pm 0,011	1,43
LS	0,819	0,822	0,830	0,824 \pm 0,006	0,69
GT	0,863	0,867	0,873	0,868 \pm 0,005	0,56
CO	0,927	0,932	0,930	0,930 \pm 0,002	0,26
SQ	0,987	0,992	0,989	9,89 \pm 0,002	0,25

Tab. A7: Kalibrierfunktion von Glc-d18:2 h16:0 (7, Sojabohnen, AMD-HPTLC-Densitometrie)

Ref. – Referenz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), RSD – relative Standardabweichung, LOD (S/N=3): 10 ng/Bande, Quantifizierbarer Bereich \geq LOQ (S/N=10): 25-1000 ng/Bande

Probe	m _{Ref} /Bande [ng]	Signalintensität [AU]				RSD [%]
		1	2	3	$\bar{x} \pm \text{RSD}$	
Ref.	25	640,9	624,50	586,0	617,1 \pm 28,2	4,6
Ref.	50	1287,3	1200,4	1156,1	1214,6 \pm 66,7	5,5
Ref.	200	4766,0	4482,2	4522,3	4590,17 \pm 153,59	3,35
Ref.	400	8708,8	8296,4	8373,1	8459,4 \pm 219,3	2,6
Ref.	600	11859,8	11338,0	11804,5	11667,4 \pm 286,6	2,5
Ref.	1000	16786,1	16580,5	17014,20	16793,6 \pm 216,9	1,3

Tab. A8: Wiederholpräzision des LOQ (n=6) einer HPTLC-Platte

Ref. – Referenz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), LOQ (S/N=10), RSD – relative Standardabweichung

Probe	m _{Ref} /Bande [ng]	m _{GlyCer} /Bande [ng/10 μ l]						RSD [%]	
		1	2	3	4	5	6		$\bar{x} \pm \text{RSD}$
Ref.	25	25,4	25,2	24,4	24,3	23,9	24,2	24,57 \pm 0,60	2,4

Tab. A9: Quantifizierung des pflanzlichen Materials mit AMD-HPTLC-Densitometrie

^a – Detektiert, aber außerhalb des quantifizierbaren Bereiches; RSD – relative Standardabweichung (n=3), A – Apfeltrester, W – Weizenkeime, C – Kaffeesatz, AGr – *Albizia grandibracteata*, AGu – *Albizia gummifera*, AL – *Albizia lebbeck*, AS – *Albizia schimperiana*, AE – *Acacia etbaica*, RP – *Robina pseudoacacia*, Extr. – angereicherter Extrakt (2 mg/ml), Ausg. – Ausgangsmaterial

Probe	m _{GlyCer} /Bande				RSD[%]	m _{GlyCer} /1 mg Extr. [μ g]	m _{Extr.} [g]	m _{GlyCer} /gesamt Extr. [mg]	m _{Ausg.} [g]	m _{GlyCer} /100 g Ausg. [mg]	Anteil/100 g Ausg. [%]
	1	2	3	$\bar{x} \pm \text{RSD}$ [ng/10 μ l]							
A	133,9	133,7	126,0	131,2 \pm 4,5	3,4	6,6	30,42	200,6	750,0	26,8	0,027
W	76,7	75,8	80,8	77,8 \pm 2,7	3,4	3,9	30,37	118,6	300,0	39,5	0,040
C	det. ^a	det. ^a	det. ^a	-	-	-	30,44	-	300,0	-	-
AGr	93,1	95,1	101,8	96,7 \pm 4,6	4,7	4,8	2,1	10,1	100,0	10,1	0,010
AGu	65,4	68,1	68,9	67,5 \pm 1,8	2,7	3,4	6,8	23,1	100,0	23,1	0,023
AL	93,5	93,8	93,8	93,7 \pm 0,2	0,2	4,7	2,0	9,4	100,0	9,4	0,009
AS	69,6	67,4	71,6	69,5 \pm 2,1	3,0	3,5	5,2	18,2	100,0	18,2	0,018
AE	43,8	44,7	40,8	43,1 \pm 2,0	4,7	2,2	8,3	18,3	100,0	18,3	0,018
RP	66,4	72,9	67,3	68,9 \pm 3,5	5,1	3,4	5,6	19,6	100,0	19,6	0,019

Tab. A10: Richtigkeit und Präzision der AMD-HPTLC-Quantifizierung

Die Präzision innerhalb einer Analyse wurde bestimmt als RSD (n=3 je Platte), die Präzision zwischen Analysen als WFR und RSD (n=3 je Platte an 5 Tagen). Die Richtigkeit wurde bestimmt nach dem Standard-Additionsverfahren und ausgedrückt als WFR und RSD. Pr. – Probe, Ref. – Referenz (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen), AGu – *Albizia gummifera*, WFR – Wiederfindungsrate, RSD – relative Standardabweichung

n	Pr.	m _{Ref} / Bande [ng/10µl]	m _{GlyCer} /Bande [ng/10µl]				RSD Mittel- wert [%]	Differenz [ng]	RSD Differenz [%]	WFR [%]	RSD WFR [%]
			1	2	3	σ±RSD					
1	Ref.	25	25,4	25,6	24,9	25,3±0,4	1,4			101,2±1,4	
2			25,5	26,3	26,1	26,0±0,4	1,6			103,9±1,7	
3			26,8	26,5	25,7	26,3±0,6	2,2			105,3±2,3	
4			26,2	27,3	25,8	26,4±0,8	2,9			105,7±3,1	
5			25,3	25,9	25,1	25,4±0,4	1,6			101,7±1,7	
∅					25,9±0,5	2,0			103,6±2,1	2,0	
1	Ref.	400	394,8	378,0	419,1	397,3±20,7	5,2			99,3±5,2	
2			396,5	386,2	406,8	396,5±10,3	2,6			99,1±2,6	
3			436,7	421,2	453,9	437,3±16,4	3,7			109,3±4,1	
4			444,1	436,6	441,4	440,7±3,8	0,9			110,2±0,9	
5			433,9	410,9	417,9	420,9±11,8	2,8			105,2±2,9	
∅					418,5±21,1	5,0			104,6±5,3	5,0	
1	Ref.	1000	945,3	909,2	982,8	945,8±36,8	3,9			94,6±3,7	
2			938,8	883,1	982,8	934,9±50,0	5,3			93,5±5,0	
3			1049,5	1064,7	1038,7	1051,0±13,1	1,2			105,1±1,3	
4			974,1	951,7	1062,8	996,2±58,8	5,9			99,6±5,9	
5			1006,9	977,6	946,4	977,0±30,3	3,1			97,7±3,0	
∅					981,0±46,1	4,7			98,1±4,6	4,7	
1	AGu	0	64,5			64,5					
2			+	63,8			63,8				
3	Ref.		58,9			58,9					
4			59,5			59,5					
5			62,7			62,7					
∅					61,9±2,5	4,1					
1	AGu	25	88,9			88,9		24,4		97,6	
2			+	92,6			92,6		28,8		115,2
3	Ref.		88,5			88,5		29,6		118,4	
4			86,1			86,1		26,6		106,4	
5			90,3			90,3		27,6		110,4	
∅					89,3±2,4	2,7	27,4±2,0	7,3	109,6±8,1	7,4	
1	AGu	100	166,7			166,7		102,2		102,2	
2			+	177,1			177,1		113,3		113,3
3	Ref.		176,2			176,2		117,3		117,3	
4			176,2			176,2		116,7		116,7	
5			173,7			173,7		111,0		111,0	
∅					174,4±3,4	1,9	112,1±6,1	5,4	112,1±6,1	5,4	
1	AGu	400	484,2			484,2		419,7		104,9	
2			+	469,0			469,0		405,2		101,3
3	Ref.		508,5			508,5		449,6		112,4	
4			512,9			512,9		453,4		113,4	
5			464,8			464,8		402,1		100,5	
∅					487,9±22,1	4,5	426,0±24,2	5,7	106,5±6,1	5,7	

Abb. A24: LC-MS-Identifizierung der Glycosylceramide nach präparativer TLC

* – Verunreinigungen (Sitosterolglucosid und Weichmacher)

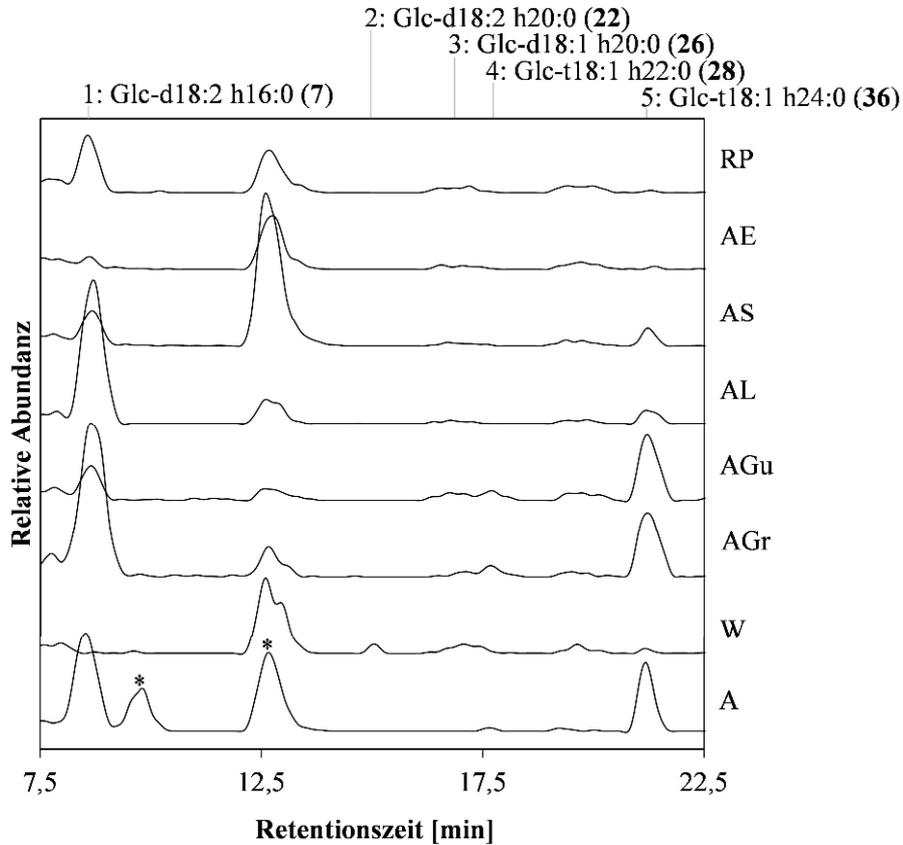
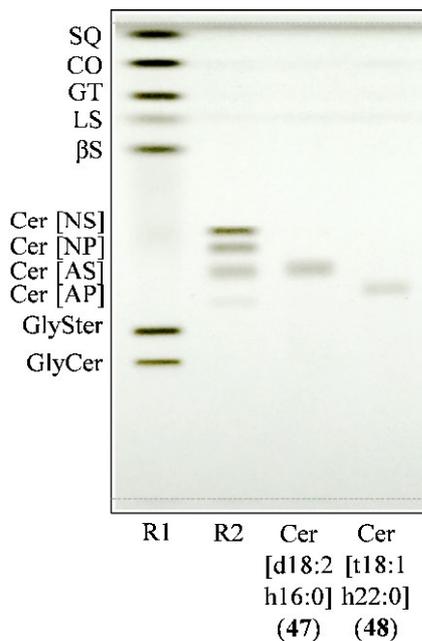


Abb. A25: AMD-HPTLC zur Quantifizierung von „Phyto“-Ceramiden

R1 – Referenzlösung 1: CO – Cholesteroleat, GT – Glyceroltrioleat, SQ – Squalen, β S – β -Sitosterol, LS – Linolsäure, GlySter – Glycosylsterol (β -Sitosterolglucosid), GlyCer – Glycosylceramid (Glc-d18:2 h16:0 (7), Sojabohnen). R2 – Referenzlösung 2: Cer – Ceramid, S – Sphingosin (d18:1), P – Phytosphingosin (t18:0), A – α -hydroxyliert, N – nicht hydroxyliert



NMR-Experimente – Glycosylceramide**Glc-d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (7)****Abb. A26: ¹H-NMR-Spektrum von Glc-d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (7, Pyridin-d₅)**

Ausschnitte A-I, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz]

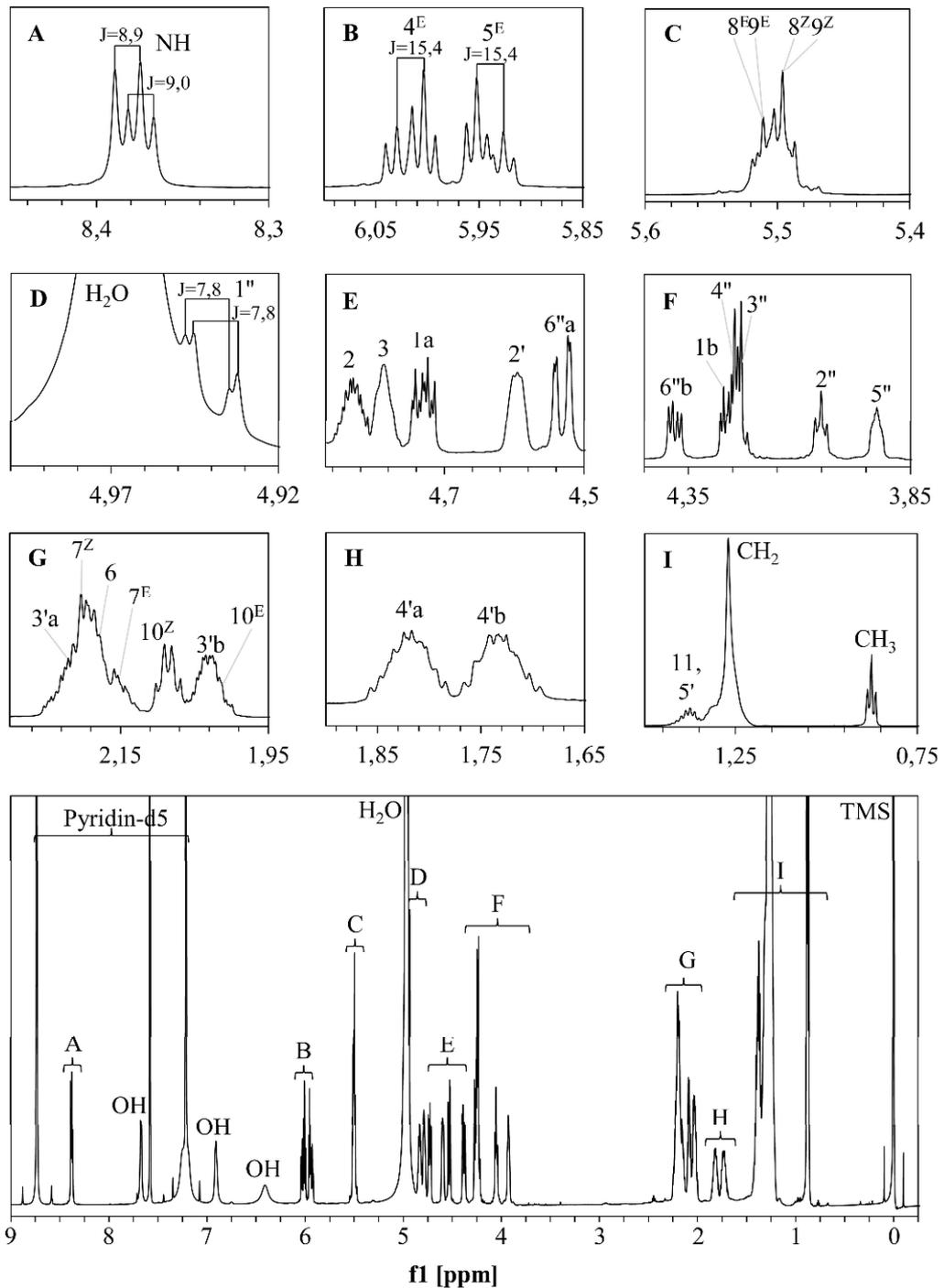
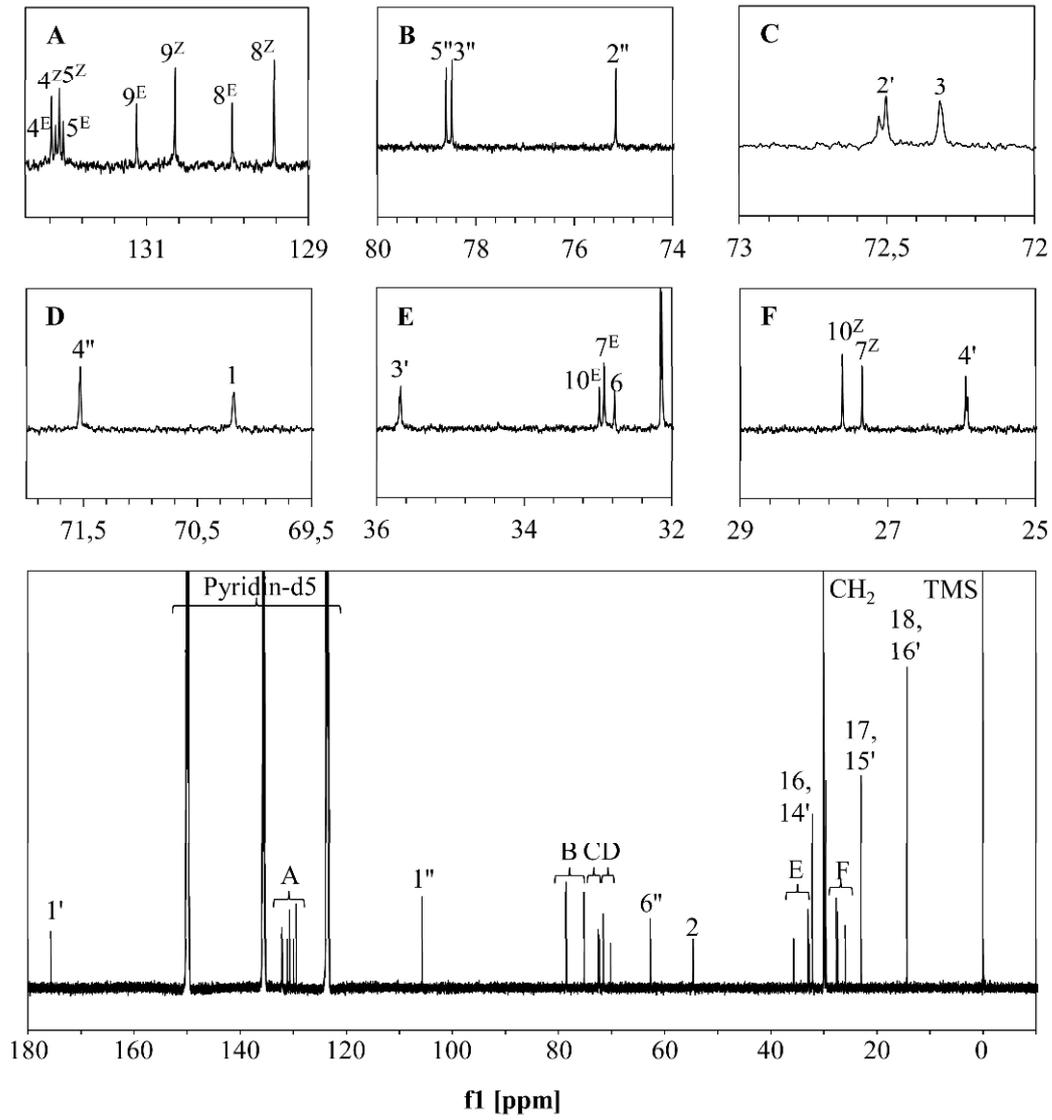


Abb. A27: ^{13}C -NMR-Spektrum von $\text{Glc-d18:2}^{\Delta\text{4E,8E/Z}} \text{h16:0}$ (7, Pyridin- d_5)

Ausschnitte A-F, referenziert auf TMS (0 ppm)



Tab. A11: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (7)

^a – Signale liegen übereinander, *E/Z*-Isomere zusammengefasst

Pos.	COSY	TOCSY	ROESY	HSQC	HMBC	1D-TOCSY NH	1D-TOCSY H-8/9	1D-TOCSY H-4, H-3 ^a , H-4 ^a	1D-TOCSY H-2 ^a
Sphingosäure									
1a	H-1b, H-2	H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5b, NH	H-1b, H-2, H-3, H-4, H-11, NH	C-1	C-2, C-3, C-11	H-1a	H-1a	H-1a	H-1a
1b	H-1a, H-2	H-1a, H-2, H-3, H-4, H-5b, NH	H-1a, H-2, H-3, H-4, H-11, NH	C-1	C-2, C-3, C-11	H-1b	H-1b	H-1b	H-1b
2	H-1a, H-1b, H-3, NH	H-1a, H-1b, H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	C-2	C-1, C-3, C-11	H-2	H-2	H-2	H-2
3	H-2, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, NH	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	C-3	C-1, C-2, C-4, C-5	H-3	H-3	H-3	H-3
4	H-3, H-5a, H-5b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	C-4	C-2, C-3, C-5, C-6	H-4	H-4	H-4	H-4
5a	H-4, H-5b, H-6a, H-6b	H-2, H-3, H-4, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9	C-5	C-6, C-7	H-5a	H-5a	H-5a	H-5a
5b	H-4, H-5a, H-6a, H-6b	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-6a, H-6b, H-7, H-8	C-5	C-4, C-6, C-7	H-5b	H-5b	H-5b	H-5b
6a	H-5a, H-6b, H-7	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6b, H-7, H-8	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8	H-6a	H-6a	H-6a	H-6a
6b	H-5b, H-6a, H-7	H-3, H-4, H-5b, H-6a, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5b, H-6a, H-7, H-8	C-6	C-4, C-3, C-7, C-8	H-6b	H-6b	H-6b	H-6b
7	H-6a, H-6b, H-8	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-8, H-9, H-10	H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-8, H-9, H-10	C-7	C-5, C-6, C-8; C-9 ^a	H-7	H-7	H-7	H-7
8	H-7, H-9	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	H-3a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-8	C-6, C-7, C-10	H-8	H-8	H-8	H-8
9	H-8, H-10	H-4, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	H-7, H-8, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-9	C-7, C-10, C-11	H-9	H-9	H-9	H-9
10	H-8, H-9, H-11 (CH ₂)	H-7, H-8, H-9, H-11, H-12 (CH ₂)	H-8, H-9, H-11 (CH ₂), C-CH ₂	C-10	C-8 ^a , C-9 ^a , C-11 (CH ₂)	H-10	H-10	H-10	H-10
11	H-10, H-12 (CH ₂)	H-7, H-8, H-9, H-10, H-12 (CH ₂)	H-9, H-10, C-CH ₂ , C-18 (CH ₃)	C-11 (CH ₂)	C-10, C-12 (CH ₂)	H-11	H-11	H-11	H-11
12-16	H-11, H-18 (CH ₃)	H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-18 (CH ₃)	H-9, H-10, H-11 (CH ₂), C-18 (CH ₃)	C-CH ₂	C-16 (CH ₂), C-18 (CH ₃)	H-CH ₂	H-CH ₂	H-CH ₂	H-CH ₂
17	-	H-17 (CH ₂)	-	C-CH ₂	C-17 (CH ₂), C-18 (CH ₃)	-	-	-	-
18	H-2 (CH ₂)	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5a, H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-1', H-2', H-6'a	C-18 (CH ₂)	C-17 (CH ₂)	NH	NH	NH	NH
NH	-	-	-	-	C-1, C-2, C-3, C-11	-	-	-	-
Fettsäure									
1'	-	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', NH	C-2'	-	-	-	-	H-2'
2'	H-3'a, H-3'b	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', NH	C-3'	C-1', C-3', C-4'	-	-	-	H-3' a
3'a	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, NH	C-3'	C-1', C-2', C-4'	-	-	-	H-3' b
4'a	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5', NH	C-4'	C-3', C-5' (CH ₂)	-	-	-	H-4' a
4'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5', NH	C-4'	C-3', C-5' (CH ₂)	-	-	-	H-4' b
5'	H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	C-5' (CH ₂)	C-4', C-6' (CH ₂)	-	-	-	H-5'
6'-20'	-	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-22' (CH ₃)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', C-22' (CH ₃)	C-CH ₂	C-20' (CH ₂), C-22' (CH ₃)	-	-	-	H-CH ₂
21'	-	-	-	C-CH ₂	C-20' (CH ₂), C-22' (CH ₃)	-	-	-	-
22'	H-21' (CH ₂)	H-21' (CH ₂)	C-CH ₂	C-22' (CH ₃)	C-21' (CH ₂)	-	-	-	-
Zucker									
1''	H-2''	H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-2', H-3'', H-5'', NH	C-1''	C-1, C-3''	H-1''	H-1''	H-1''	H-1''
2''	H-1'', H-3''	H-1'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	H-1a, H-1b, H-2, H-1'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	C-2''	C-1'', C-3''	H-2''	H-2''	H-2''	H-2''
3''a	H-2'', H-4''	H-1'', H-2'', H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	H-1'', H-2'', H-4'', H-5'', H-6''a, H-6''b, NH	C-3''	C-2'', C-4''	H-3''	H-3''	H-3''	H-3''
4''a	H-3'', H-5''	H-1'', H-2'', H-3''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	H-1'', H-2'', H-3''a, H-5'', H-6''a, H-6''b, NH	C-4''	C-3'', C-6''	H-4''	H-4''	H-4''	H-4''
5''	H-1'', H-2'', H-6''a, H-6''b	H-1'', H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	H-1a, H-1b, H-1'', H-2'', H-3''a, H-4''a, H-6''a, H-6''b	C-5''	C-3'', C-4''	H-5''	H-5''	H-5''	H-5''
6''a	H-5'', H-6''b	H-1'', H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b, NH	C-6''	C-4'', C-5''	H-6''a	H-6''a	H-6''a	H-6''a
6''b	H-5'', H-6''a	H-1'', H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a	H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a	C-6''	C-4'', C-5''	H-6''b	H-6''b	H-6''b	H-6''b

Glc-t18:1^{Δ8E/Z} h22:0 (28)

Abb. A28: ¹H-NMR-Spektrum von Glc-t18:1^{Δ8E/Z} h22:0 (28, Pyridin-d₅)

Ausschnitte A-I, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz]

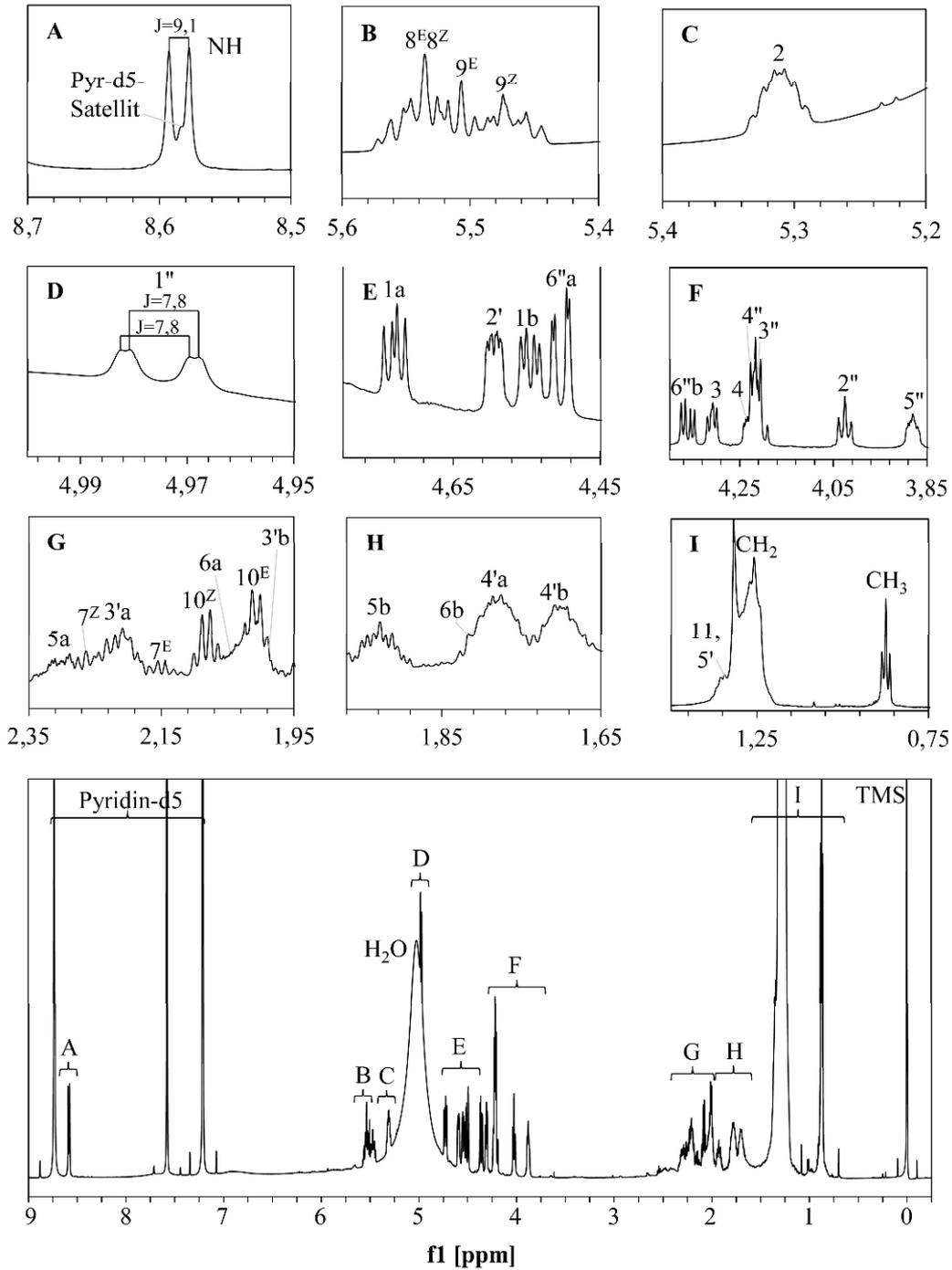
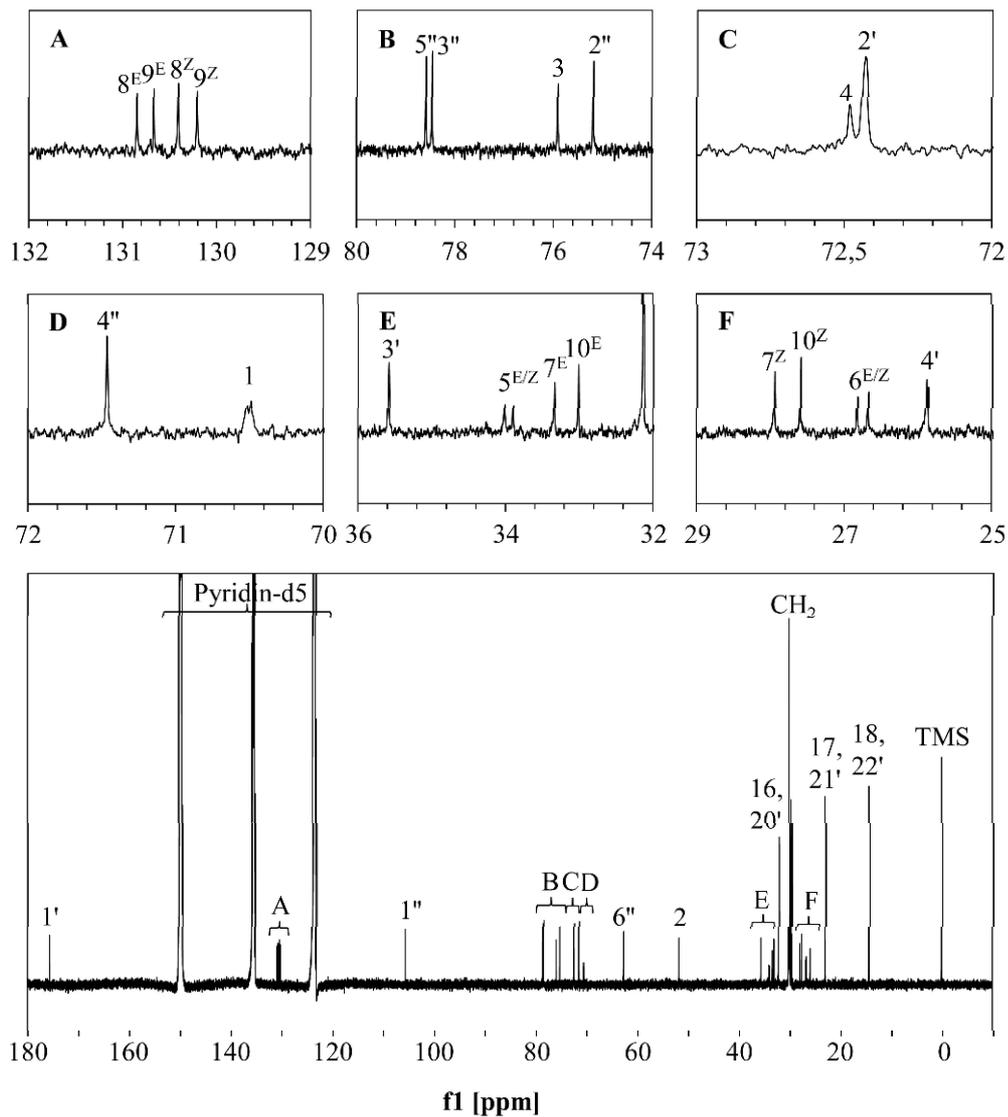


Abb. A29: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (28, Pyridin- d_5)

Ausschnitte A-F, referenziert auf TMS (0 ppm)



Tab. A12: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-t18:1^{A8E/Z} h22:0 (28)

^a – Signale liegen übereinander, *E/Z*-Isomere zusammengefasst

Pos.	COSY	TOCSY	ROESY	HSQC	HMBC	1D-TOCSY NH 8,585 ppm, ±20Hz	1D-TOCSY H-8/9 5,508 ppm, ±45 Hz	1D-TOCSY H-4, H-3', H-4'' 4,217 ppm, ±20 Hz	1D-TOCSY H-2' 4,595 ppm, ±15 Hz
Sphingobase									
1a	H-1b, H-2	H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5b, NH	H-1b, H-2, H-3, H-4, H-11, NH	C-1	C-2, C-3, C-1'	H-1a	H-1a	H-1a	
1b	H-1a, H-2	H-1a, H-2, H-3, H-4, H-5b, NH	H-1a, H-2, H-3, H-4, H-11, NH	C-1	C-2, C-3, C-1'	H-1b	H-1b	H-1b	
2	H-1a, H-1b, H-3, NH	H-1a, H-1b, H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	H-1a, H-1b, H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	C-2	C-1, C-3, C-1'	H-2	H-2	H-2	
3	H-2, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, NH	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	C-3	C-1, C-2, C-4, C-5	H-3	H-3	H-3	
4	H-3, H-5a, H-5b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, NH	C-4	C-2, C-3, C-5, C-6	H-4	H-4	H-4	
5a	H-4, H-5b, H-6a, H-6b	H-2, H-3, H-4, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9	C-5	C-6, C-7	H-5a	H-5a	H-5a	
5b	H-4, H-5a, H-6a, H-6b	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9	C-5	C-4, C-6, C-7	H-5b	H-5b	H-5b	
6a	H-5a, H-5b, H-6b, H-7	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6b, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6b, H-7, H-8, H-9	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8	H-6a	H-6a	H-6a	
6b	H-5a, H-5b, H-6a, H-7	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-7, H-8, H-9, NH	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6b, H-7, H-8, H-9	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8	H-6b	H-6b	H-6b	
7	H-6a, H-6b, H-8	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-7	C-5, C-6, C-8', C-9'	H-7	H-7	H-7	
8	H-7, H-9	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-8	C-6, C-7, C-10	H-8	H-8	H-8	
9	H-8, H-10	H-4, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	H-7, H-8, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-9	C-7, C-10, C-11	H-9	H-9	H-9	
10	H-8, H-9, H-11 (CH ₂)	H-7, H-8, H-9, H-11, H-12 (CH ₂)	H-8, H-9, H-11 (CH ₂), C-CH ₂	C-10	C-8', C-9', C-11 (CH ₂)	H-10	H-10	H-10	
11	H-10, H-12 (CH ₂)	H-7, H-8, H-9, H-10, H-12 (CH ₂)	H-9, H-10, C-CH ₂ , C-18 (CH ₃)	C-10 (CH ₂)	C-10, C-12 (CH ₂)	H-11	H-11	H-11	
12-16	H-11, H-18 (CH ₂)	H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-18 (CH ₂)	H-9, H-10, H-11 (CH ₂), C-18 (CH ₃)	C-CH ₂	C-16 (CH ₂), C-18 (CH ₃)	H-CH ₂	H-CH ₂	H-CH ₂	
17	-	-	-	C-CH ₂	C-16 (CH ₂), C-18 (CH ₃)	-	-	-	
18	H-17 (CH ₂)	H-17 (CH ₂)	C-CH ₂	C-18 (CH ₃)	C-17 (CH ₂)	NH	NH	NH	
NH	H-2	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5a, H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-1', H-2', H-6'a	-	C-1, C-2, C-3, C-1'	-	-	-	
Fettsäure									
1'	-	-	-	-	-	-	-	-	H-2'
2'	H-3'a, H-3'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', NH	C-2'	C-1', C-3', C-4'	-	-	-	H-3'a
3'a	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', NH	C-3'	C-1', C-2', C-4'	-	-	-	H-3'b
3'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, NH	C-3'	C-1', C-2', C-4'	-	-	-	H-3'b
4'a	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5', NH	C-4'	C-3', C-5' (CH ₂)	-	-	-	H-4'a
4'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5', NH	C-4'	C-3', C-5' (CH ₂)	-	-	-	H-4'a
5'	H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5', H-6' (CH ₂)	C-5' (CH ₂)	C-4, C-6 (CH ₂)	-	-	-	H-5'
6'-20'	-	-	-	C-CH ₂	C-20' (CH ₂), C-22' (CH ₂)	-	-	-	H-CH ₂
21'	-	-	-	C-CH ₂	C-20' (CH ₂), C-22' (CH ₂)	-	-	-	-
22'	H-21' (CH ₂)	H-21' (CH ₂)	C-CH ₂	C-22' (CH ₂)	C-21' (CH ₂)	-	-	-	-
Zucker									
1''	H-2''	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5', H-6'a, H-6'b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5', NH	C-1''	C-1, C-3''	H-1''	H-1''	H-1''	
2''	H-1'', H-3''	H-1'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'a, H-6'b	H-1a, H-1b, H-2, H-1'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'a, H-6'b	C-2''	C-1'', C-3''	H-2''	H-2''	H-2''	
3''a	H-2'', H-4''	H-1'', H-2'', H-4'', H-5'', H-6'a, H-6'b	H-1'', H-2'', H-4'', H-5'', H-6'a, H-6'b, NH	C-3''	C-2'', C-4''	H-3''	H-3''	H-3''	
3''b	H-2'', H-5''	H-1'', H-2'', H-3'', H-5'', H-6'a, H-6'b	H-1'', H-2'', H-3'', H-5'', H-6'a, H-6'b, NH	C-4''	C-2'', C-4''	H-4''	H-4''	H-4''	
5''	H-4'', H-6'b	H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'b	H-1a, H-1b, H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-6'a, H-6'b	C-4''	C-3'', C-6''	H-5''	H-5''	H-5''	
6'a	H-5'', H-6'b	H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'b	H-3'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'a, H-6'b, NH	C-6''	C-3'', C-4''	H-6'a	H-6'a	H-6'a	
6'b	H-5'', H-6'a	H-1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'a	H-2'', H-3'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'a	C-6''	C-4'', C-5''	H-6'b	H-6'b	H-6'b	

Glc-d18:1^{ΔZ} h16:0 (9)Abb. A30: ¹H-NMR-Spektrum von Glc-d18:1^{ΔZ} h16:0 (9, Pyridin-d₅)

Da mehr als ein GlyCer innerhalb der Fraktion vorlagen, wurden zum Vergleich die Daten der GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (7, rot) und Glc-t18:1 h22:0 (28, blau) ebenfalls dargestellt. So erfolgte eine Unterscheidung der relevanten Signale. Ausschnitte A-I, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz]

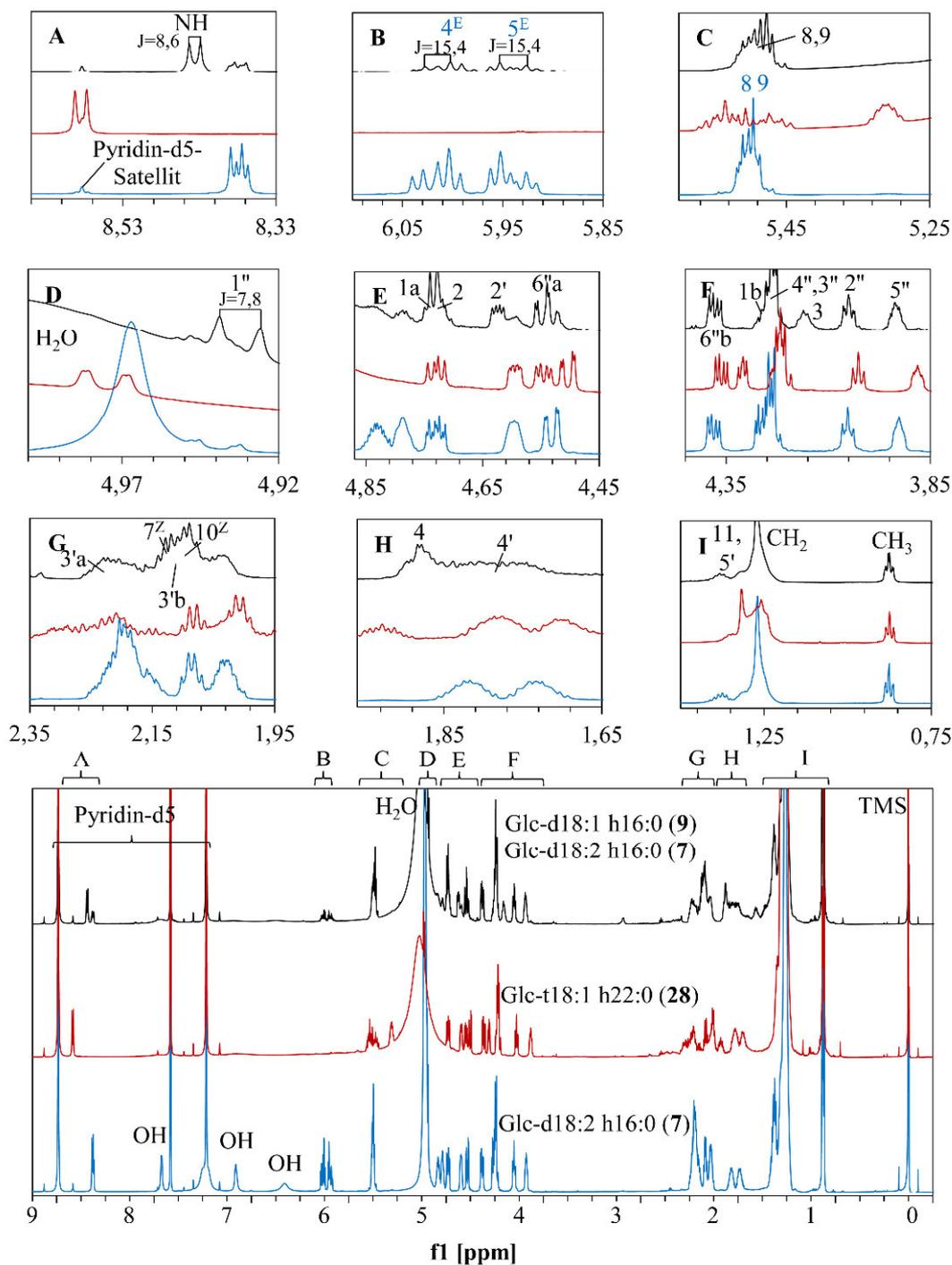
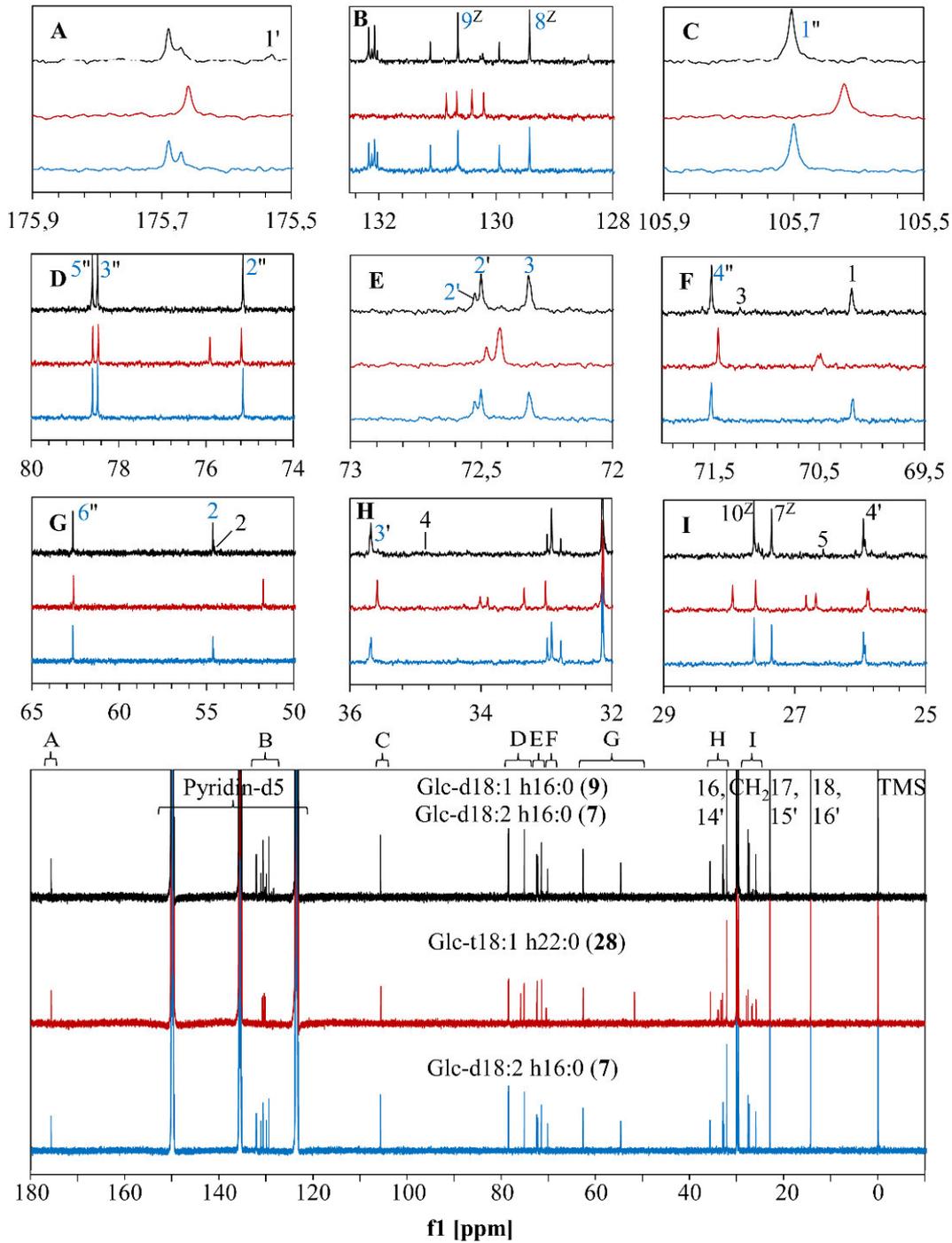


Abb. A31: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-d18:1 $^{\Delta 8\text{Z}}$ h16:0 (**9**, Pyridin- d_5)

Da mehr als ein GlyCer innerhalb der Fraktion vorlagen, wurden zum Vergleich die Daten der GlyCer Glc-d18:2 h16:0 (**7**, rot) und Glc-t18:1 h22:0 (**28**, blau) ebenfalls dargestellt. Die ^{13}C -NMR-Signale von Glc-d18:1 h16:0 (**9**) wurden in einer Fraktion nachgewiesen, in der Glc-d18:2 h16:0 (**7**) eine weitere Hauptkomponente war. Die Zuordnung der Signale erfolgte teilweise über 2D-NMR (HSQC, HMBC). Ausschnitte A-I, referenziert auf TMS (0 ppm)



Tab. A13: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-d18:1^{ΔZ} h16:0 (9)

n.d. – nicht detektiert (weitere GlyCer mit ähnlichen chemischen Verschiebungen, Zuordnung nicht eindeutig möglich), ^a – Signale liegen übereinander

Pos.	COSY	TOCSY	HSQC	HMBC	ID-TOCSY NH 8,448 ppm, ±12,5Hz
Sphingobase					
1a	H-1b, H-2	H-3, H-4, H-5, NH	n.d.	n.d.	H-1a
1b	H-1a, H-2	H-3, H-4, NH	n.d.	n.d.	H-1b
2	H-1a, H-1b, H-3, NH	H-3, H-4, H-5, H-6, NH	C-2	C-3	H-2
3	H-2, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5, H-6 (CH ₂), NH	C-3	n.d.	H-3
4	H-3, H-5	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5, H-6 (CH ₂), H-7, H-8, NH	C-4	C-3, C-5	H-4
5	H-4	H-2, H-3, H-4, H-6 (CH ₂), H-7, NH	C-5	C-4, C-6	H-5
6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
7	H-8	H-3, H-4, H-5, H-6 (CH ₂), H-8, H-9	C-7	C-8, C-9	
8 ^a	H-7	H-7, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-8	C-7, C-10	
9 ^a	H-10	H-7, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-9	C-7, C-10	
10	H-9, H-11 (CH ₂)	H-8, H-9	C-10	C-8, C-9, C-11 (CH ₂)	
11	n.d.	H-8, H-9	n.d.	C-10	
12-16	n.d.	H-8, H-9	n.d.	n.d.	
17	-	-	n.d.	n.d.	
18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
NH	H-2	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5	-	C-1, C-2, C-1 ^a	NH
Fettsäure					
1 ^a	-	-	n.d.	-	
2 ^a	H-3 ^a , 3 ^b	H-3 ^a , H-3 ^b , H-4 ^a , H-5 ^a , H-6 (CH ₂)	C-2 ^a	C-1 ^a , C-3 ^a , C-4 ^a	
3 ^a	H-2 ^a , H-3 ^b , H-4 ^a	H-2 ^a	C-3 ^a	n.d.	
3 ^b	H-2 ^a , H-3 ^a , H-4 ^a	H-2 ^a , H-4 ^a	C-3 ^a	n.d.	
4 ^a	H-3 ^a , H-3 ^b	H-2 ^a , H-3 ^b	C-4 ^a	C-2 ^a , C-3 ^a , C-5 ^a (CH ₂)	
5 ^a	n.d.	H-2 ^a	n.d.	n.d.	
6-14 ^a	n.d.	H-2 ^a	n.d.	n.d.	
15 ^a	-	-	n.d.	n.d.	
16 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Zucker					
1 ^a	n.d.	H-6 ^a	n.d.	n.d.	
2 ^a	n.d.	H-6 ^a	n.d.	n.d.	
3 ^a	n.d.	H-6 ^a	n.d.	n.d.	
4 ^a	n.d.	H-6 ^a	n.d.	n.d.	
5 ^a	H-6 ^a	H-6 ^a	n.d.	n.d.	
6 ^a	H-5 ^a , H-6 ^b	H-3 ^a , H-4 ^a , H-5 ^a , H-6 ^b	C-6 ^a	C-4 ^a , C-5 ^a	
6 ^b	H-6 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	

Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (4)

Abb. A32: ¹H-NMR-Spektrum von Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (4, Pyridin-d₅)

Ausschnitte A-I, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz]

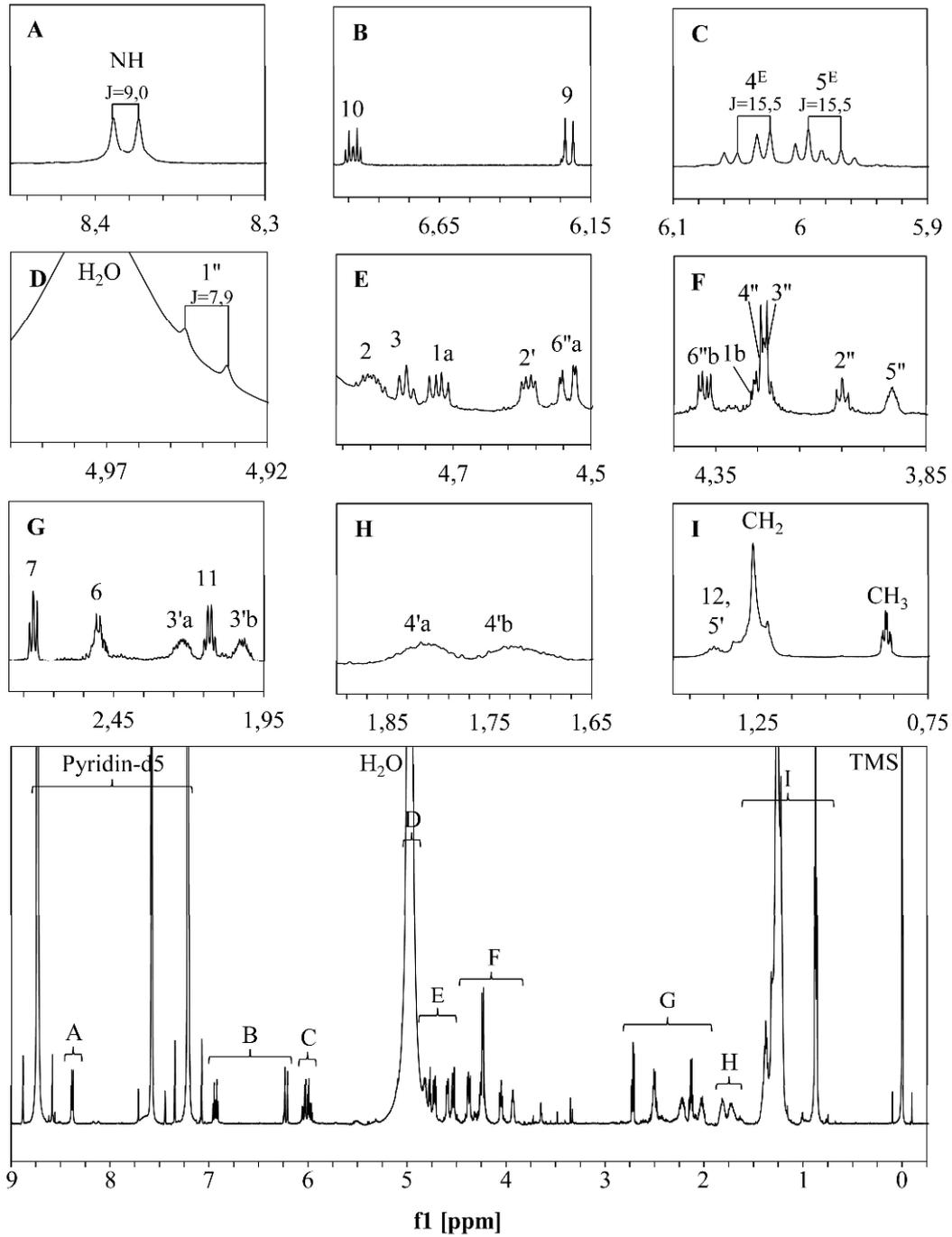
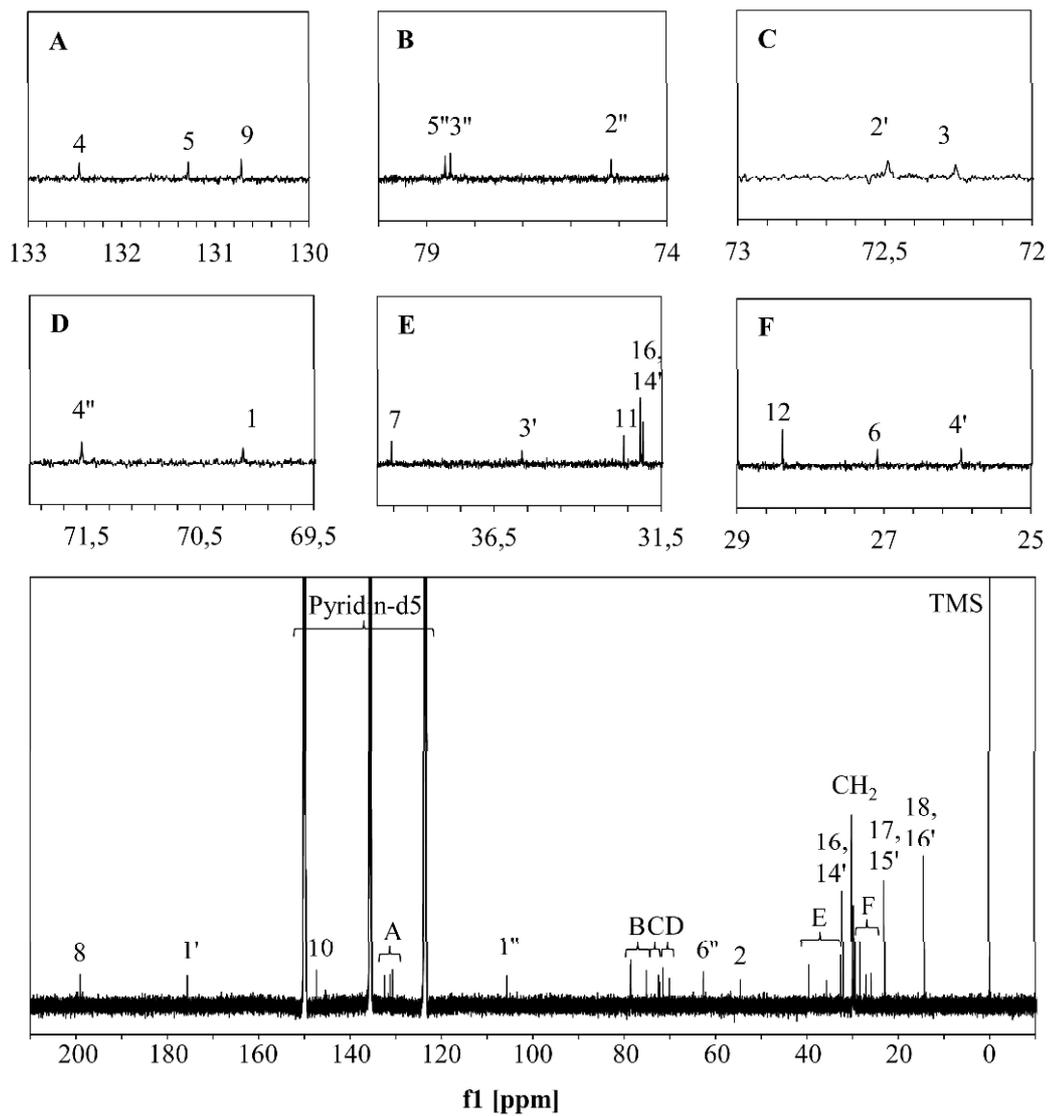


Abb. A33: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-8-keto-d18:2 $^{\Delta 4E,9E}$ h16:0 (4, Pyridin- d_5)

Ausschnitte A-F, referenziert auf TMS (0 ppm)



Tab. A14: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-8-keto-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (4)

^a – Signale liegen übereinander

Pos.	COSY	TOCSY	ROESY	HSQC	HMBC	ID-TOCSY NH 8,383 ppm, ±25Hz	ID-TOCSY H-7 2,719 ppm, ±15 Hz	ID-TOCSY H-10 6,936 ppm, ±20 Hz
Sphingobase								
1a	H-1b, H-2	H-1b, H-2, H-3, NH	H-1b, H-2, H-3, H-4, H-11, NH	C-1	C-2, C-3, C-1"	H-1a		
1b	H-1a, H-2	H-1a, H-2, H-3, NH	H-1a, H-2, H-3, H-4, H-5, H-11, NH	C-1	C-3, C-1"	H-1b		
2	H-1a, H-1b, H-3, NH	H-1a, H-1b, H-3, H-4, H-5, H-6, NH	H-1a, H-1b, H-3, H-5, H-7, NH	C-2	C-1, C-3	H-2		
3	H-2, H-4	H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, NH	H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, NH	C-3	C-1, C-2, C-4, C-5	H-3		
4	H-3, H-5	H-3, H-4, H-6, H-7, NH	H-3, H-4, H-6, H-7, NH	C-4	C-3, C-5, C-6	H-4		
5	H-4, H-6	H-3, H-4, H-5, H-7	H-3, H-4, H-6, H-7, NH	C-5	C-3, C-4, C-6, C-7	H-5		
6	H-5, H-7	H-3, H-4, H-5, H-6	H-4, H-5, H-7, H-9	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8	H-6		
7	H-6	H-3, H-4, H-5, H-6	H-4, H-5, H-6, H-9, H-10	C-7	C-5, C-6, C-8	H-7		
8								
9	H-10	H-10, H-11, H-12, H-13 (CH ₂)	H-6, H-7, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-9	C-8, C-11	H-9		
10	H-9, H-11	H-9, H-11, H-12, H-13 (CH ₂)	H-7, H-9, H-11, H-12 (CH ₂)	C-10	C-8, C-11, C-12	H-10		
11	H-10, H-12	H-9, H-10, H-12, H-13 (CH ₂)	H-9, H-10, H-12, H-13 (CH ₂)	C-11	C-9, C-10, C-12, C-13 (CH ₂)	H-11		
12	H-11, H-13 (CH ₂)	H-9, H-10, H-11, H-13 (CH ₂)	H-9, H-10, H-11, H-13 (CH ₂)	C-12	C-10, C-11, C-13 (CH ₂)	H-12		
13-16	H-11, H-18 (CH ₂)	H-9, H-10, H-11, H-12, H-18 (CH ₂)	H-11, H-12 (CH ₂), C-18 (CH ₂)	C-CH ₂	C-12, C-16 (CH ₂), C-18 (CH ₂)			
17								
18	17 (CH ₂)	H-17 (CH ₂)	C-CH ₂	C-18 (CH ₂)	C-16 (CH ₂), C-18 (CH ₂)			
NH	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-2', H-3'a, H-3' b, H-11"		C-17 (CH ₂)	NH		
Fettsäure								
1'								
2'	H-3'a, H-3'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', NH	C-2'	C-1', C-3', C-4'			
3'a	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', NH	C-3'	C-4'			
3'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, H-5', NH	C-3'	C-2', C-4'			
4'a	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'b, H-5'	C-4'	C-3', C-5' (CH ₂)			
4'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'b, H-5'	C-4'	C-3', C-5' (CH ₂)			
5'	H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	C-5' (CH ₂)	C-3', C-4', C-6' (CH ₂)			
6'-14'	H-5', H-16' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-16' (CH ₂)	H-4'a, H-4'b, H-5', C-16' (CH ₂)	C-CH ₂	C-14' (CH ₂), C-16' (CH ₂)			
15'								
16'	H-15' (CH ₂)	H-16' (CH ₂)	C-CH ₂	C-16' (CH ₂)	C-15' (CH ₂)			
Zucker								
1''								
2''	H-2''	H-2'', H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-5''	H-1a, H-1b, H-2'', H-3'', H-5'', NH	C-1''	C-1, C-3''			
3'' ^{aa}	H-1'', H-3''	H-1'', H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-5''	H-1'', H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-5''	C-2''	C-1'', C-3''			
4'' ^{aa}	H-2'', H-4''	H-1'', H-2'', H-4'' ^{aa} , H-5'', H-6'' ^{aa} , H-6'' ^b	H-1'', H-2'', H-4'', H-5'', H-6'' ^{aa} , H-6'' ^b	C-3''	C-2'', C-4''			
5''	H-3'', H-5''	H-1'', H-2'', H-3'' ^{aa} , H-5'', H-6'' ^{aa} , H-6'' ^b	H-2'', H-3'', H-5'', H-6'' ^{aa} , H-6'' ^b	C-4''	C-3'', C-6''			
6'' ^{aa}	H-4'', H-6'' ^{aa} , H-6'' ^b	H-1'', H-2'', H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-6'' ^{aa} , H-6'' ^b	H-1'', H-2'', H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-6'' ^{aa} , H-6'' ^b	C-5''	C-2'', C-4''			
6'' ^b	H-5'', H-6'' ^b	H-2'', H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-5'', H-6'' ^b	H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-5'', H-6'' ^b	C-6''	C-4'', C-5''			
6'' ^b	H-5'', H-6'' ^a	H-2'', H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-5'', H-6'' ^a	H-3'' ^{aa} , H-4'' ^{aa} , H-5'', H-6'' ^a	C-6''	C-4'', C-5''			

Glc-8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (2)

Abb. A34: ¹H-NMR-Spektrum von Glc-8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (2, Pyridin-d₅)

Ausschnitte A-I, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz], grün: 8-OH-d18:2^{Δ4E,9E} h16:0 (1), blau: 9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (2)

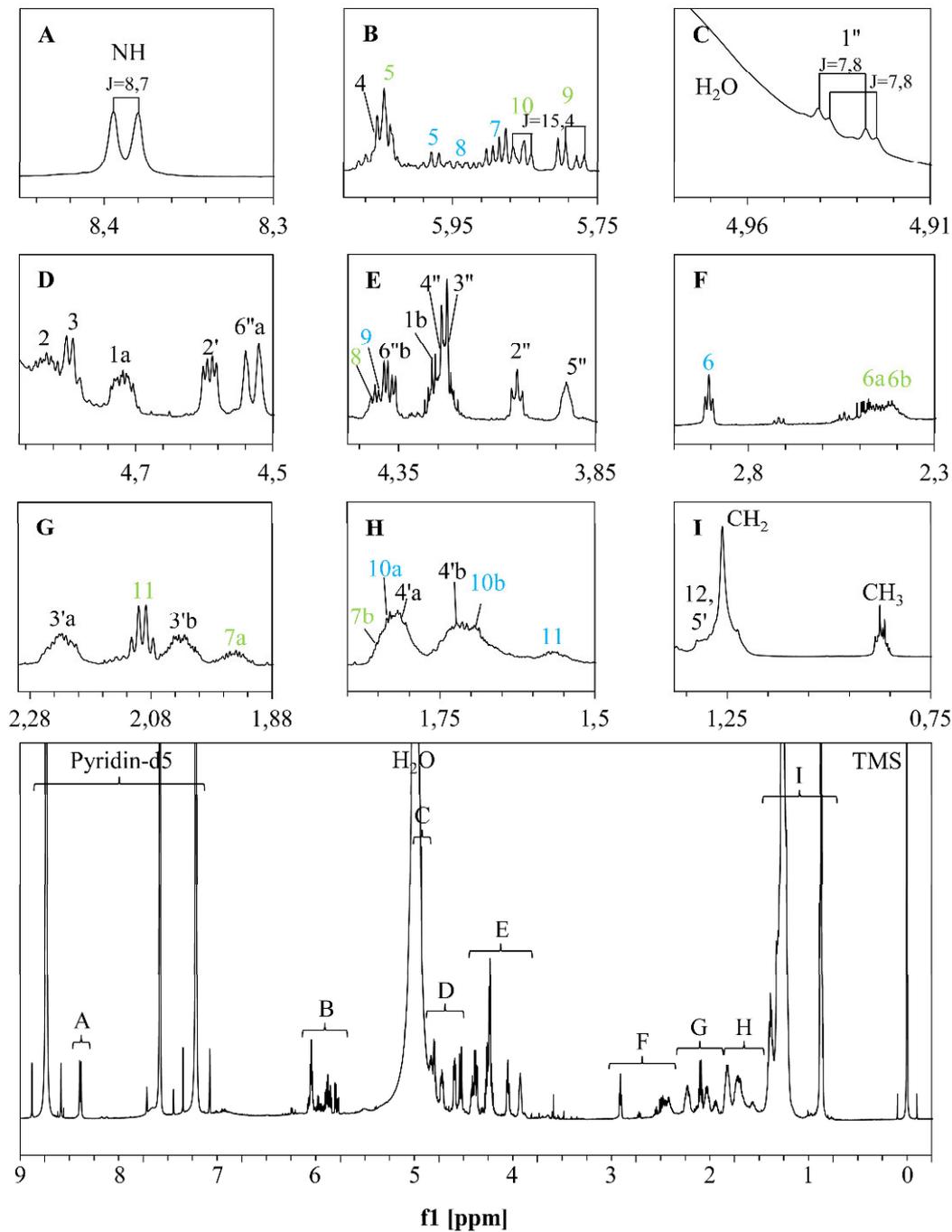
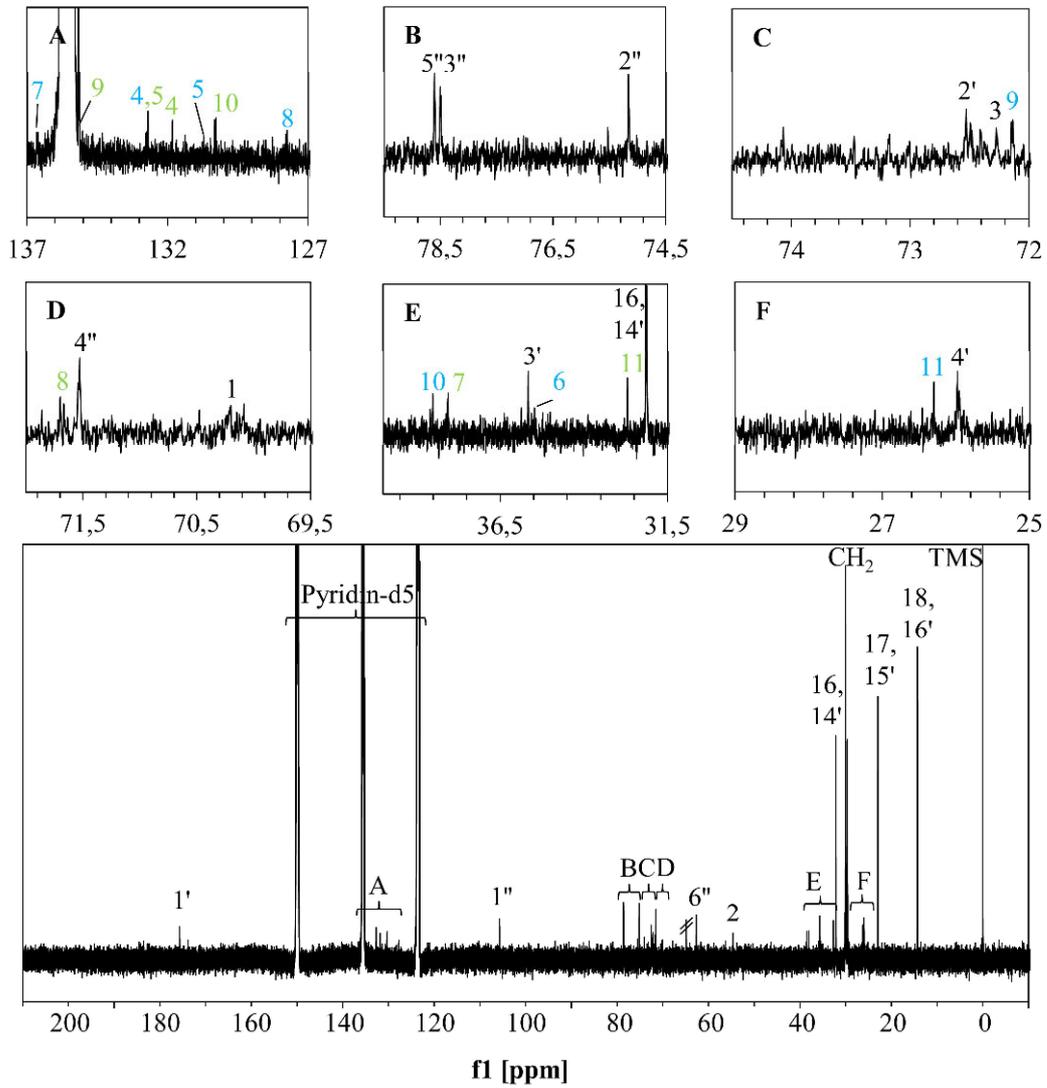


Abb. A35: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glc-8-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,9E}$ h16:0 (1) und Glc-9-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,7E}$ h16:0 (2, Pyridin- d_5)

Ausschnitte A-F, referenziert auf TMS (0 ppm), grün: 8-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,9E}$ h16:0 (1), blau: 9-OH-d18:2 $^{\Delta 4E,7E}$ h16:0 (2)



Tab. A15: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-8-OH-d18:2^{A4E,9E} h16:0 (1)

^a – Signale liegen übereinander

Pos.	COSY	TOCSY	HSQC	HMBC	ID-TOCSY NH 8,391 ppm, ±20MHz	ID-TOCSY H-8 4,430 ppm, ±20 Hz	ID-TOCSY H-9 5,787 ppm, ±20 Hz	ID-TOCSY H-11 2,093 ppm, ±13 Hz
Spillingolase								
1a	H-1b, H-2	H-1b, H-2, H-3, NH	C-1	C-2, C-3, C-1"	H-1a			
1b	H-1a, H-2	H-1a, H-2, H-3, NH	C-1	C-2, C-3, C-1"	H-1b			
2	H-1a, H-1b, H-3, NH	H-1a, H-1b, H-3, H-4, NH	C-2	C-1, C-3	H-2			
3	H-2, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5, H-6, NH	C-3	C-1, C-2, C-4, C-5, C-1"	H-3			
4	H-3, H-5	H-3, H-5, H-6a, H-6b, H-7a, H-7b, NH	C-4	C-3, C-5, C-6	H-4			
5	H-4, H-6a, H-6b	H-3, H-4, H-5, H-6b, H-7a, H-7b, H-8, NH	C-5	C-3, C-4, C-6, C-7	H-5	H-5		
6a	H-5, H-7a, H-7b	H-3, H-4, H-5, H-6b, H-7a, H-7b, H-8, H-9, H-10	C-6 (CH ₂)	C-4, C-5, C-7	H-6a	H-6a		
6b	H-5, H-7a, H-7b	H-3, H-4, H-5, H-6a, H-7a, H-7b, H-8, H-9, H-10	C-6 (CH ₂)	C-4, C-5, C-7	H-6b	H-6b		
7a	H-6a, H-6b, H-8	H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-7a, H-8, H-9, H-10	C-7	C-5, C-6, C-8, C-9	H-7a	H-7a	H-7a	
7b	H-6a, H-6b, H-8	H-3, H-4, H-5, H-6a, H-6b, H-7a, H-8, H-9, H-10	C-7	C-5, C-6, C-8, C-9	H-7b	H-7b	H-7b	
8	H-7a, H-7b, H-9	H-5, H-6, H-7a, H-7b, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-8	C-7, C-9, C-10	H-8	H-8	H-8	
9	H-8, H-10	H-6a, H-6b, H-7a, H-7b, H-8, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-9	C-7, C-8, C-11, C-12 (CH ₂)	H-9	H-9	H-9	
10	H-9, H-11	H-8, H-9, H-10, H-12 (CH ₂)	C-10	C-7, C-8, C-10, C-11	H-10	H-10	H-10	
11	H-10, H-12	H-9, H-10, H-12 (CH ₂)	C-11	C-9, C-10, C-12 (CH ₂)	H-11	H-11	H-11	
12	H-11, H-13 (CH ₂)	H-9, H-10, H-11	C-12	C-10, C-11, C-13 (CH ₂)	H-12	H-12	H-12	
13-16	H-12, H-18 (CH ₃)	H-12, H-18 (CH ₃)	C-CH ₂	C-16 (CH ₃), C-17 (CH ₃), C-18 (CH ₃)	H-13 (CH ₂)	H-13 (CH ₂)	H-13 (CH ₂)	
17	-	-	C-CH ₂	C-16 (CH ₃), C-17 (CH ₂)				
18	H-2	H-17 (CH ₂)	C-18 (CH ₃)	C-1, C-2, C-3, C-1"				
Fettsäure								
NH	H-2	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4	-	-	NH			
1'	H-3 ^a , H-3 ^b	H-3 ^a , H-3 ^b , H-4 ^a , H-4 ^b , H-5 ^a , H-6 ^a (CH ₂)	C-2'	C-1, C-1', C-3', C-4'				
3'a	H-2', H-3 ^b , H-4 ^a , H-4 ^b	H-2', H-3 ^b , H-4 ^a , H-4 ^b , H-5 ^a , H-6 ^a (CH ₂)	C-3'	C-1', C-2', C-4', C-5' (CH ₂)				
3'b	H-2', H-3 ^a , H-4 ^a , H-4 ^b	H-2', H-3 ^a , H-4 ^a , H-4 ^b , H-5 ^a , H-6 ^a (CH ₂)	C-3'	C-1', C-2', C-4', C-5' (CH ₂)				
4'a	H-3 ^a , H-3 ^b , H-4 ^a , H-5 ^a	H-2', H-3 ^a , H-3 ^b , H-5 ^a , H-6 ^a (CH ₂)	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)				
4'b	H-3 ^a , H-3 ^b , H-4 ^a , H-5 ^a	H-2', H-3 ^a , H-3 ^b , H-5 ^a , H-6 ^a (CH ₂)	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)				
5'	H-4 ^a , H-4 ^b , H-6 ^a (CH ₂)	H-2', H-3 ^a , H-3 ^b , H-4 ^a , H-4 ^b , H-5 ^a , H-6 ^a (CH ₂)	C-5' (CH ₂)	C-3', C-4', C-6' (CH ₂)				
6'-14'	H-5', H-16' (CH ₃)	H-2', H-3 ^a , H-3 ^b , H-4 ^a , H-4 ^b , H-5 ^a , H-16' (CH ₃)	C-CH ₂	C-14' (CH ₃), C-15' (CH ₃), C-16' (CH ₃)				
15'	-	-	C-CH ₂	-				
16'	H-15' (CH ₂)	H-16' (CH ₂)	C-16' (CH ₃)	C-14' (CH ₃), C-15' (CH ₃)				
Zucker								
1''	H-2''	H-2'', H-3 ^{aa} , H-4 ^{aa} , H-5''	C-1''	C-1, C-2, C-3''				
2''	H-1'', H-3''	H-1'', H-3 ^{aa} , H-4 ^{aa} , H-5'', H-6 ^{aa} , H-6 ^{bb}	C-2''	C-1'', C-3''				
3 ^{aa}	H-2'', H-4''	H-1'', H-2'', H-4 ^{aa} , H-5'', H-6 ^{aa} , H-6 ^{bb}	C-3''	C-2'', C-4''				
4 ^{aa}	H-3'', H-5''	H-1'', H-2'', H-3 ^{aa} , H-5'', H-6 ^{aa} , H-6 ^{bb}	C-4''	C-3'', C-6''				
5''	H-4'', H-6 ^{aa} , H-6 ^{bb}	H-1'', H-2'', H-3 ^{aa} , H-4 ^{aa} , H-5'', H-6 ^{aa} , H-6 ^{bb}	C-5''	C-2'', C-3'', C-4''				
6'a	H-5'', H-6 ^{bb}	H-2'', H-3 ^{aa} , H-4 ^{aa} , H-5'', H-6 ^{bb}	C-6''	C-4'', C-5''				
6'b	H-5'', H-6 ^{aa}	H-2'', H-3 ^{aa} , H-4 ^{aa} , H-5'', H-6 ^{aa}	C-6''	C-4'', C-5''				

Tab. A16: 2D- und 1D-TOCSY-NMR-Korrelationen von Glc-9-OH-d18:2^{Δ4E,7E} h16:0 (2)

^a – Signale liegen übereinander

Pos.	COSY	TOCSY	HSQC	HMBC	1D-TOCSY NH 8,391 ppm, ±20Hz	1D-TOCSY H-9 4,430 ppm, ±20 Hz	1D-TOCSY H-6 2 ppm, ±20 Hz
Sphingolipase							
1a	H-1b, H-2	H-1b, H-2, H-3, NH	C-1	C-2, C-3, C-1'	H-1a		
1b	H-1a, H-2	H-1a, H-2, H-3, NH	C-1	C-2, C-3, C-1'	H-1b		
2	H-1a, H-1b, H-3, NH	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5, H-6, NH	C-2	C-1, C-3	H-2		H-3
3	H-2, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5, H-6, NH	C-3	C-1, C-2, C-4, C-5, C-1''	H-3		H-4
4	H-3, H-5	H-3, H-5, H-6, H-7, NH	C-4	C-3, C-6	H-4		H-5
5	H-4, H-6	H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-9	C-5	C-3, C-4, C-6, C-8	H-5		H-6
6	H-5, H-7	H-3, H-4, H-5, H-7, H-8, H-9	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8	H-6		H-7
7	H-6, H-8	H-5, H-6, H-8, H-9, H-10a, H-10b	C-7	C-6, C-8, C-9	H-7		H-8
8	H-7, H-9	H-6, H-7, H-9, H-10a, H-10b	C-8	C-5, C-6, C-7, C-9	H-8		H-9
9	H-8, H-10a, H-10b	H-6, H-7, H-8, H-10a, H-10b, H-11, H-12	C-9	C-8, C-10, C-11	H-9		H-10a
10a	H-9, H-11	H-7, H-8, H-9, H-10a, H-11, H-12, H-13 (CH ₂)	C-10	C-9, C-11, C-12 (CH ₂)	H-10a		H-10b
10b	H-9, H-11	H-7, H-8, H-9, H-10a, H-11, H-12, H-13 (CH ₂)	C-10	C-9, C-11, C-12 (CH ₂)	H-10b		H-10a
11	H-10a, H-10b, H-12	H-9, H-10a, H-10b, H-12, H-13 (CH ₂)	C-11	C-9, C-10, C-12 (CH ₂)	H-11		H-12
12	H-11, H-13 (CH ₂)	H-9, H-10a, H-10b, H-11, H-13 (CH ₂)	C-12	C-10, C-11, C-13 (CH ₂)	H-12		H-13 (CH ₂)
13-16	H-12, H-18 (CH ₃)	H-12, H-18 (CH ₃)	C-CH ₂	C-16 (CH ₂), C-17 (CH ₂)	H-13 (CH ₂)		
17	-	-	C-CH ₂	-			
18	17 (CH ₂)	H-17 (CH ₂)	C-18 (CH ₃)	C-16 (CH ₂), C-17 (CH ₂)			
NH	H-2	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4	-	C-1, C-2, C-3, C-1'	NH		
Fettsäure							
1'	-	-	-	-			
2'	H-3'a, H-3'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-2'	C-1, C-1', C-3', C-4'			
3'a	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-3'	C-1', C-2', C-4', C-5' (CH ₂)			
3'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-3'	C-1', C-2', C-4', C-5' (CH ₂)			
4'a	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)			
4'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)			
5'	H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	C-5' (CH ₂)	C-3', C-4', C-6' (CH ₂)			
6'-14'	H-5', H-16' (CH ₃)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-16' (CH ₃)	C-CH ₂	C-14' (CH ₃), C-15' (CH ₃)			
15'	-	-	C-CH ₂	-			
16'	H-15' (CH ₃)	H-16' (CH ₃)	C-16' (CH ₃)	C-14' (CH ₃), C-15' (CH ₃)			
Zucker							
1''	H-2''	H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5''	C-1''	C-1, C-2, C-3''			
2''	H-1'', H-3''	H-1'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	C-2''	C-1'', C-3''			
3''a	H-2'', H-4''	H-1'', H-2'', H-4''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	C-3''	C-2'', C-4''			
3''b	H-3''a, H-5''	H-1'', H-2'', H-3''a, H-5'', H-6''a, H-6''b	C-4''	C-3'', C-6''			
4''	H-4'', H-6''a, H-6''b	H-1'', H-2'', H-3''a, H-4''a, H-6''a, H-6''b	C-5''	C-2'', C-3'', C-4''			
5''	H-5'', H-6''b	H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''b	C-6''	C-4'', C-5''			
6''a	H-5'', H-6''b	H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''b	C-6''	C-4'', C-5''			
6''b	H-5'', H-6''a	H-2'', H-3''a, H-4''a, H-5'', H-6''a	C-6''	C-4'', C-5''			

1D-TOCSY-NMR-Experimente – Glycosylceramide

Abb. A36: 1D-TOCSY-NMR-Spektren ausgewählter Glycosylceramide (Pyridin- d_5)

A: Glc-d18:2 $^{\Delta E,8EZ}$ h16:0 (7), B: Glc-d18:1 $^{\Delta SZ}$ h16:0 (9) und C: Glc-t18:1 $^{\Delta EZ}$ h22:0 (28); Signale (fett), deren Spin-System aufgeklärt werden sollte, sind selektiv angeregt worden.

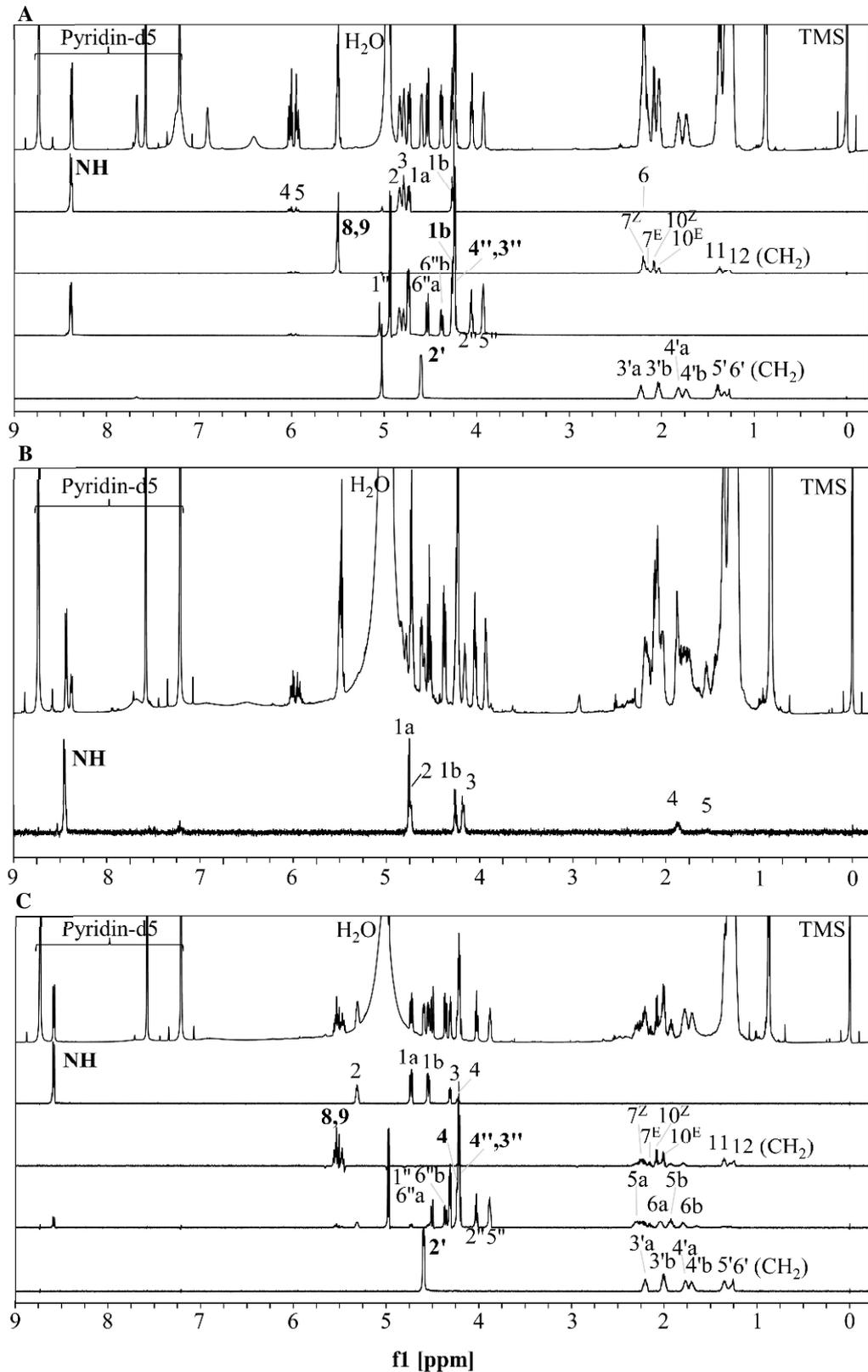
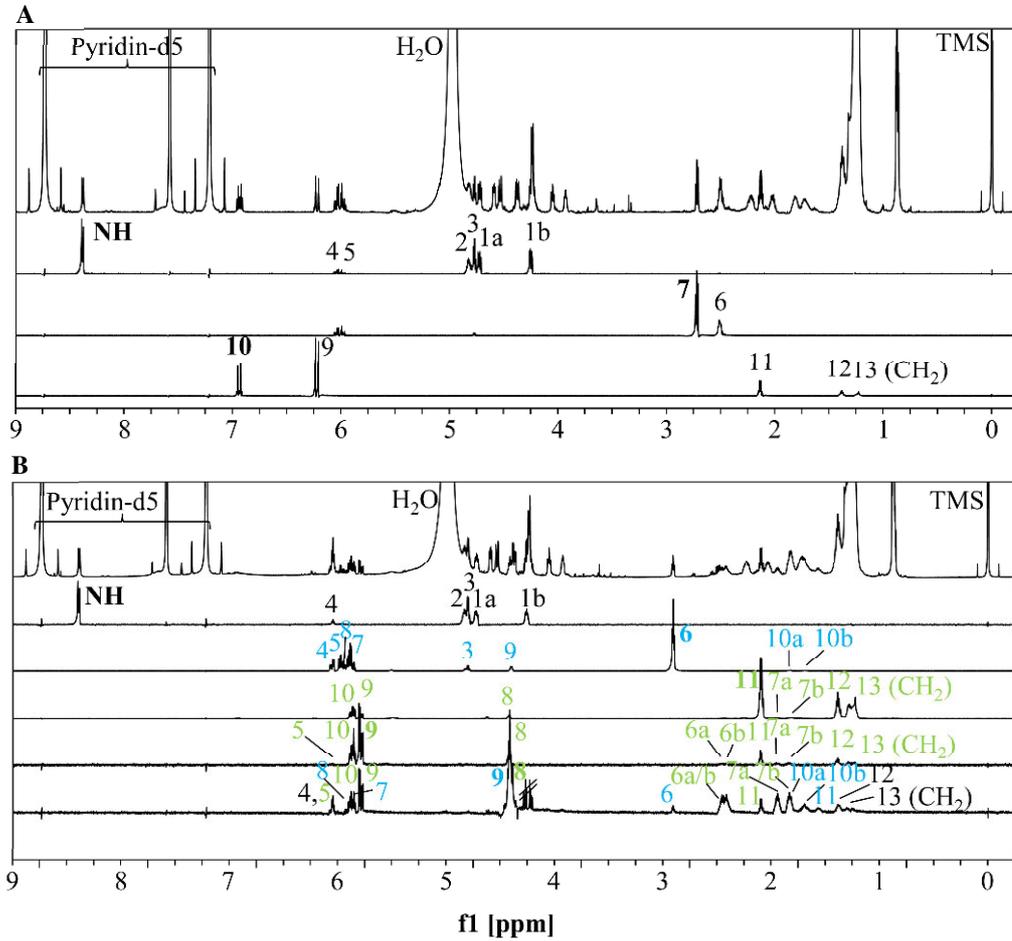


Abb. A37: 1D-TOCSY-NMR-Spektren der neuartigen Glycosylceramide (Pyridin- d_5)

A: Glc-8-keto-d18:2 ^{$\Delta^{4E,9E}$} (4), B: Glc-8-OH-d18:2 ^{$\Delta^{4E,9E}$} h16:0 (1, grün) und Glc-9-OH-d18:2 ^{$\Delta^{4E,7E}$} h16:0 (2, blau); Signale (fett), deren Spin-System aufgeklärt werden sollte, sind selektiv angeregt worden.



NMR-Experimente – „Phyto“-Ceramide**d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47)****Abb. A38: ¹H-NMR-Spektrum von d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47, Pyridin-d₅)**

Ausschnitte A-F, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz]

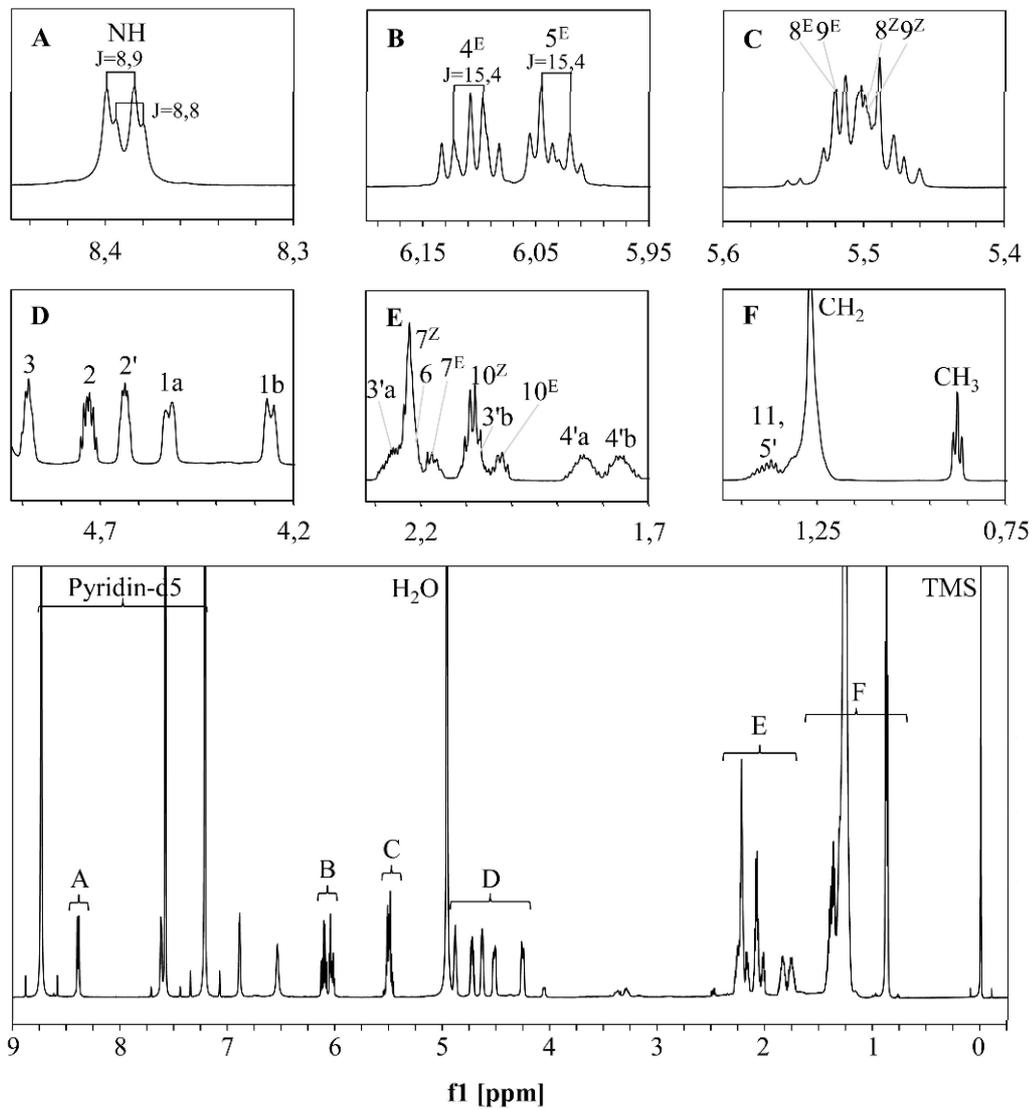
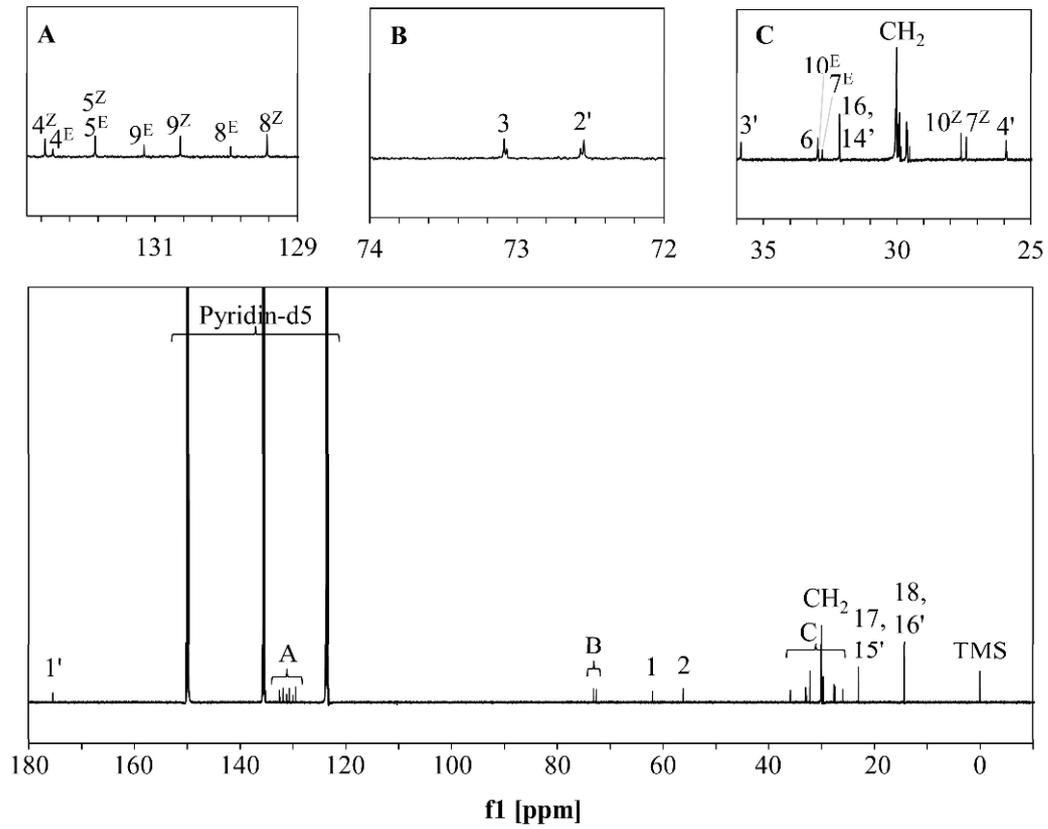


Abb. A39: ^{13}C -NMR-Spektrum von $\text{d18:2}^{\text{A4E,8E/Z}} \text{h16:0}$ (47, Pyridin- d_5)

Ausschnitte A-C, referenziert auf TMS (0 ppm)



Tab. A17: 2D-NMR-Korrelationen von d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (47)

^a – Signale liegen übereinander, *E/Z*-Isomere zusammengefasst

Pos.	COSY	TOCSY	HSQC	HMBC
Sphingolipase				
1a	H-1b, H-2	H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5, NH	C-1	C-2, C-3
1b	H-1a, H-2	H-1a, H-2, H-3, H-4, H-5, NH	C-1	C-2, C-3
2	H-1a, H-1b, H-3, NH	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5, H-6, H-7, NH	C-2	C-1, C-3, C-4, C-1'
3	H-2, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5, H-6, H-7, H-8', H-9', NH	C-3	C-1, C-2, C-4, C-5
4	H-3, H-5	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-6, H-7, H-8', H-9', NH	C-4	C-2, C-3, C-5, C-6
5	H-4, H-6	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-6, H-7, H-8', H-9', NH	C-5	C-3, C-4, C-6, C-7
6	H-5, H-7	H-3, H-4, H-5, H-7, H-8', H-9'	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8', C-9'
7	H-6, H-8	H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8', H-9'	C-7	C-5, C-6, C-8, C-9
8 ^a	H-7	H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-8	C-6, C-7, C-10
9 ^a	H-10	H-4, H-5, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-9	C-7, C-10, C-11 (CH ₂)
10	H-8, H-9, H-11 (CH ₂)	H-6, H-7, H-8', H-9', H-10, H-11, H-12 (CH ₂)	C-10	C-8, C-9, C-11 (CH ₂)
11	H-10, H-12 (CH ₂)	H-7, H-8', H-9', H-10, H-12 (CH ₂)	C-11 (CH ₂)	C-10, C-12 (CH ₂)
12-16	H-11, H-18 (CH ₃)	H-7, H-8', H-9', H-10, H-11, H-18 (CH ₃)	C-CH ₂	C-16 (CH ₂), C-18 (CH ₃)
17	-	-	C-18 (CH ₃)	C-17 (CH ₃)
18	17 (CH ₂)	H-17 (CH ₂)	-	C-1, C-2, C-3, C-1'
NH	H-2	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6	-	-
1-OH	H-1a, H-1b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, NH	-	-
3-OH	H-3	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, NH	-	-
Fettsäure				
1'	-	-	-	C-2, C-3, C-4
2'	H-3'a, H-3'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂), 2'-OH	C-2'	C-1, C-1', C-3', C-4'
3'a	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂), 2'-OH	C-3'	C-1', C-2', C-4'
3'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂), 2'-OH	C-3'	C-1', C-2', C-4'
4'a	H-3'a, H-3'b, H-4'b, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂), 2'-OH	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)
4'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂), 2'-OH	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)
5'	H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	C-5' (CH ₂)	C-3', C-4', C-6' (CH ₂)
6'-14'	H-5', H-16' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-16' (CH ₂)	C-CH ₂	C-14' (CH ₂), C-16' (CH ₂)
15'	-	-	C-CH ₂	C-14' (CH ₂), C-16' (CH ₂)
16'	H-15' (CH ₂)	H-16' (CH ₂)	C-16' (CH ₂)	C-15' (CH ₂)
2'-OH	H-2'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b	-	C-2', C-3'

t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48)

Abb. A40: ¹H-NMR-Spektrum von t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48, Pyridin-d₅)

Ausschnitte A-F, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz]

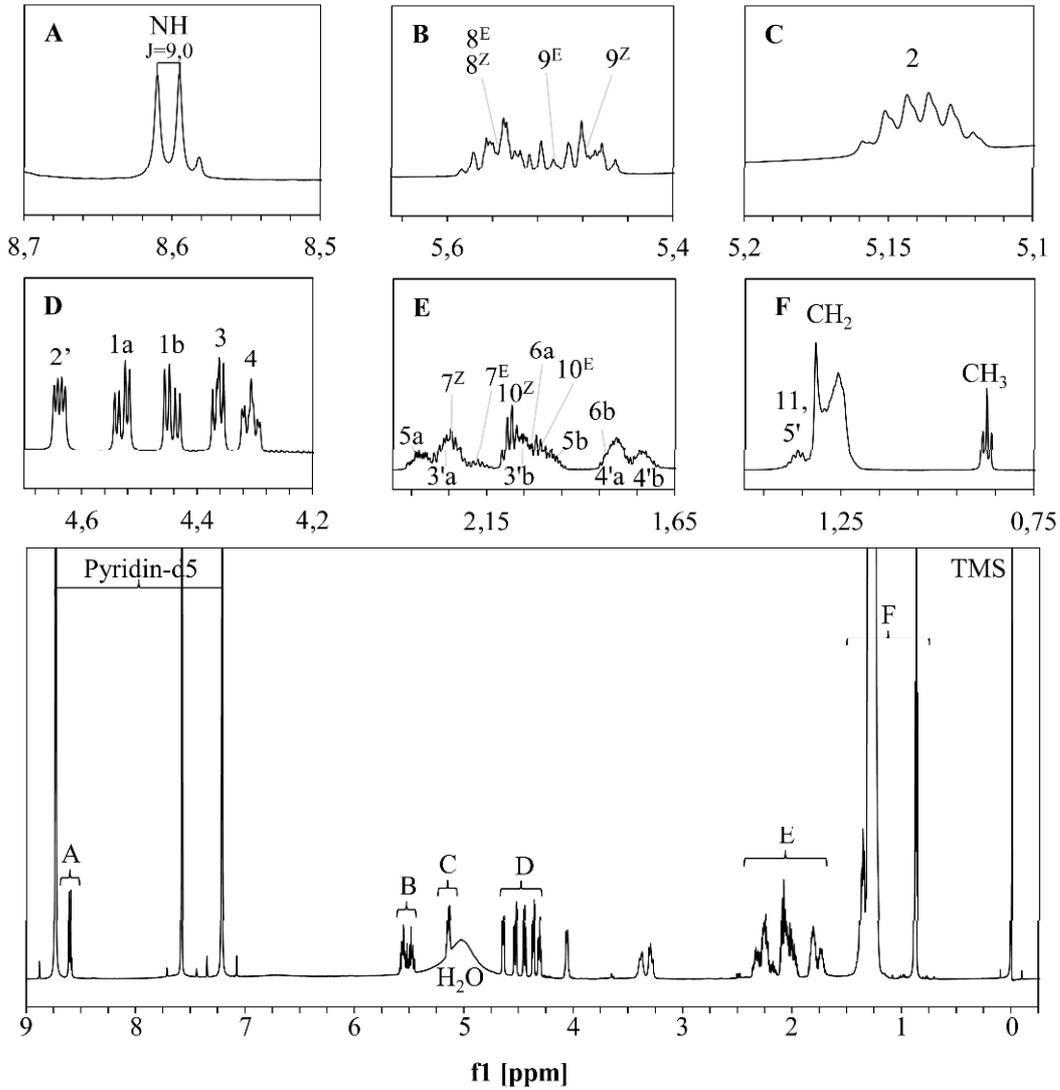
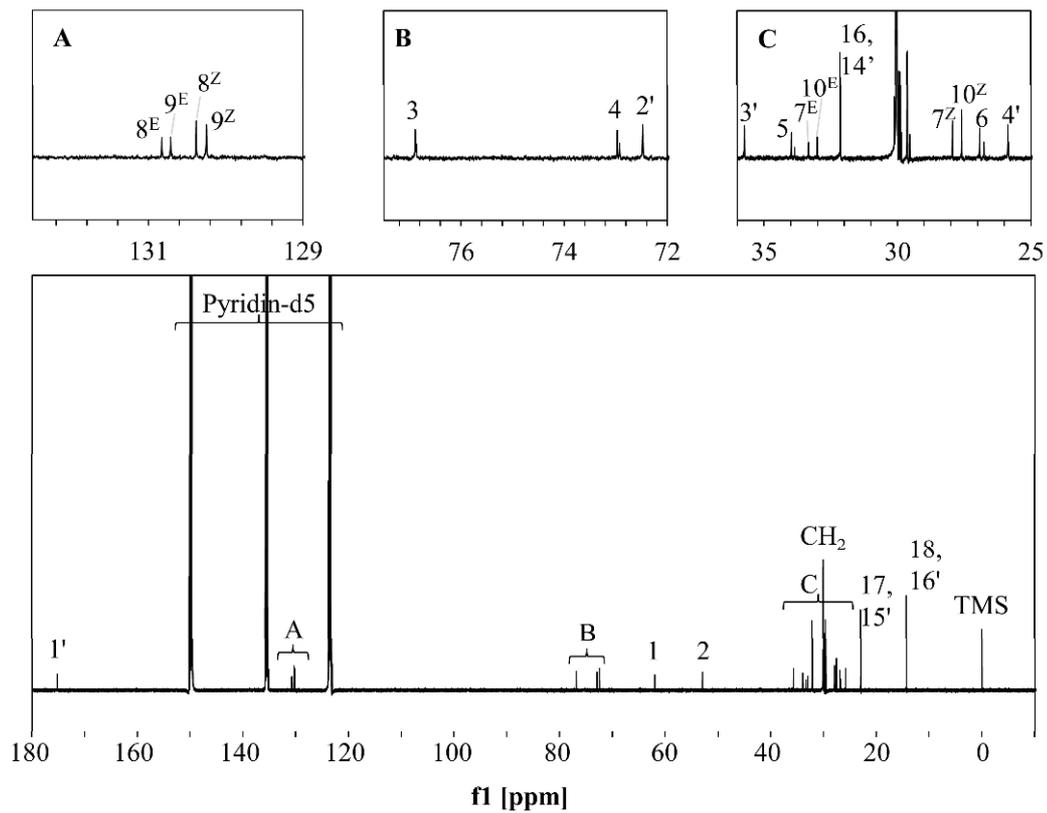


Abb. A41: ^{13}C -NMR-Spektrum von t18:1 $^{\Delta 8E/Z}$ h22:0 (48, Pyridin- d_5)

Ausschnitte A-C, referenziert auf TMS (0 ppm)



t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49)**Abb. A42: ¹H-NMR-Spektrum von t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49, Pyridin-d₅)**

Ausschnitte A-F, referenziert auf TMS (0 ppm), J – Kopplungskonstante [Hz], Signale, die nicht dem Cer zugeordnet wurden, sind durchgestrichen.

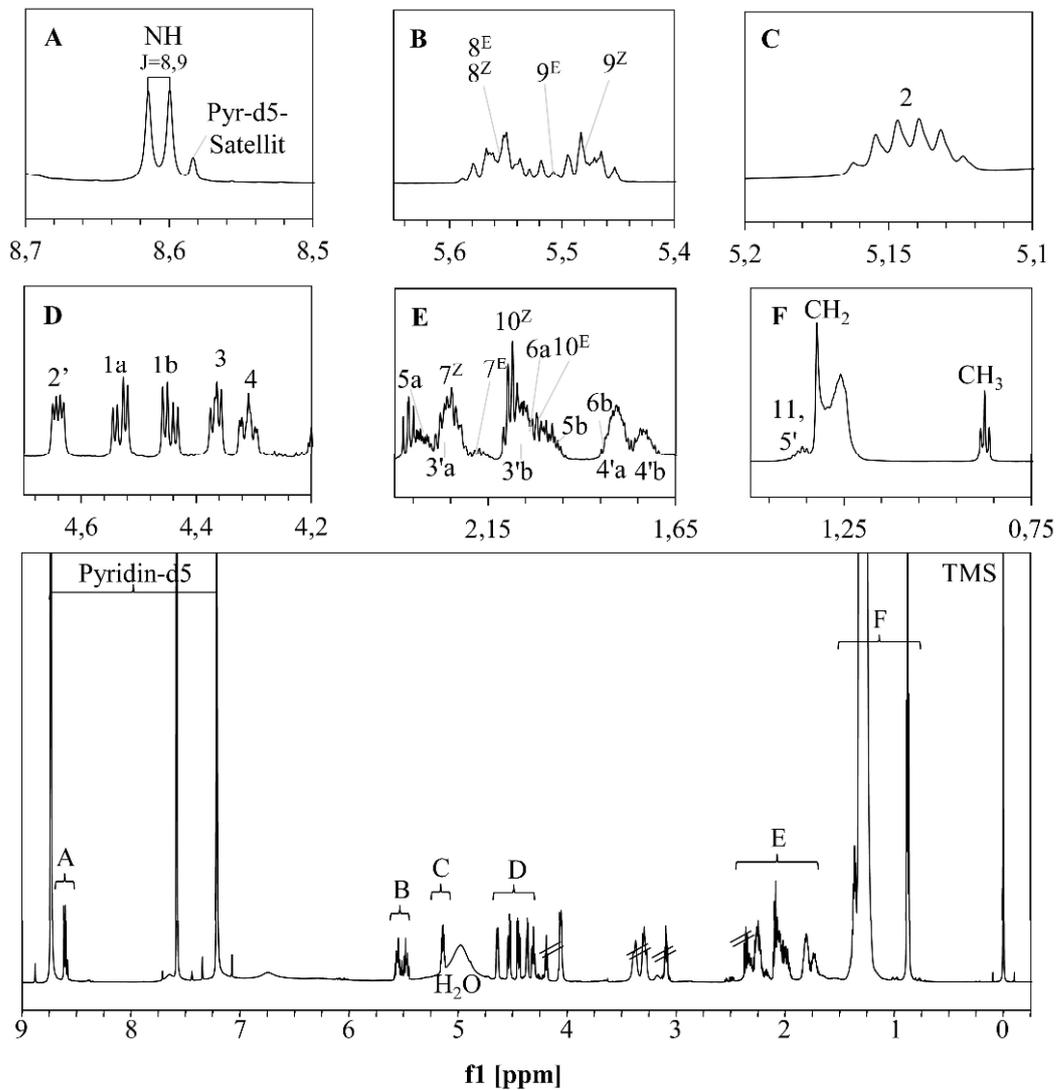
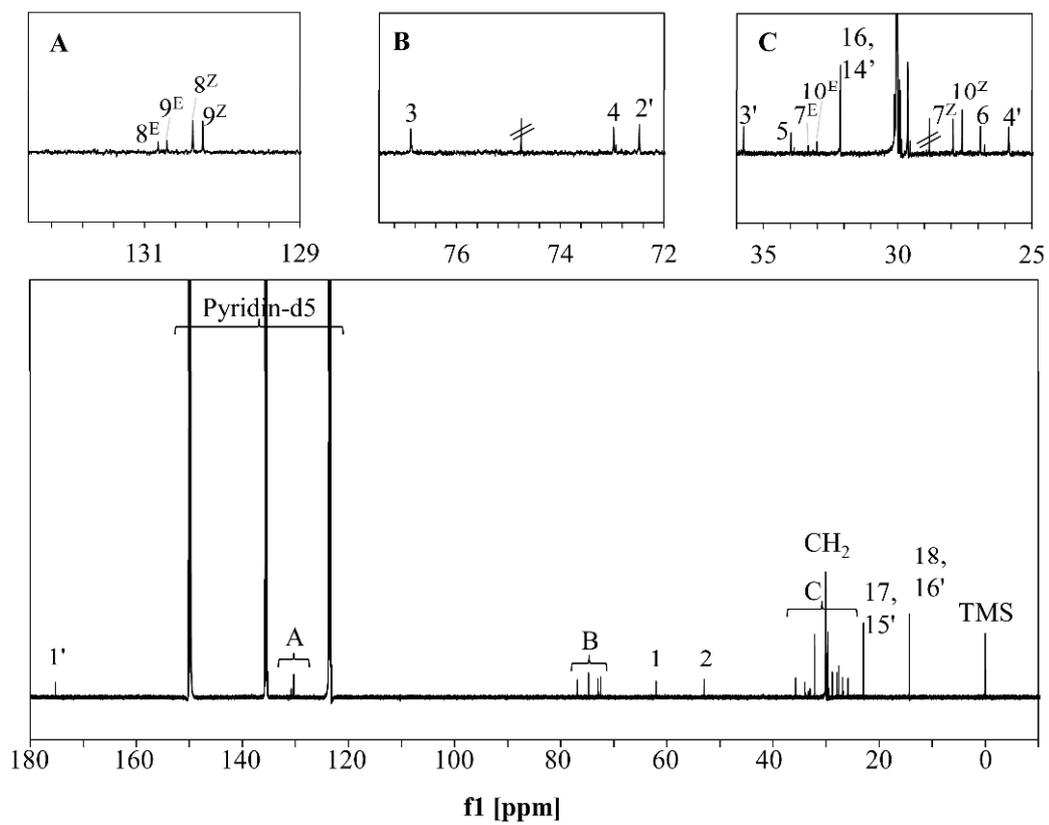


Abb. A43: ^{13}C -NMR-Spektrum von t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49, Pyridin-d₅)

Ausschnitte A-C, referenziert auf TMS (0 ppm)



Tab. A18: 2D-NMR-Korrelationen von t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48) und t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49)

Die 2D-Korrelationen für t18:1^{ΔE/Z} h22:0 (48) und t18:1^{ΔE/Z} h24:0 (49) waren identisch. Daher sind sie gemeinsam aufgeführt. n.best. – nicht bestimmt (Aufnahme: 0-8,5 ppm), ^a – Signale liegen übereinander, *E/Z*-Isomere zusammengefasst

Pos.	COSY	TOCSY	HSQC	HMBC
<i>Sphingobase</i>				
1a	H-1b, H-2	H-1b, H-2, H-3, H-4, H-5	C-1	C-2, C-3
1b	H-1a, H-2	H-1a, H-2, H-3, H-4, H-5	C-1	C-2, C-3
2	H-1a, H-1b, H-3	H-1a, H-1b, H-2, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8	C-2	C-1, C-3, C-4, C-1'
3	H-2, H-4	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8	C-3	C-1, C-2, C-4, C-5
4	H-3, H-5a, H-5b	H-1a, H-1b, H-2, H-3, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8	C-4	C-2, C-3, C-5, C-6
5a	H-4, H-5a, H-6a, H-6b	H-2, H-3, H-4, H-5a, H-6a, H-6b, H-7, H-8	C-5	C-4, C-6, C-7
5b	H-4, H-5a, H-6a, H-6b	H-3, H-4, H-5a, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-9	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8
6a	H-5a, H-5b, H-6a, H-7	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-7, H-8, H-9	C-6	C-4, C-5, C-7, C-8
6b	H-5a, H-5b, H-6a, H-7	H-4, H-5, H-6, H-8, H-9, H-10	C-7	C-5, C-6, C-8, C-9
7	H-6a, H-6b, H-8	H-3, H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12 (CH ₃)	C-8	C-6, C-7, C-10, C-11 (CH ₃),
8	H-7, H-9	H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12 (CH ₃)	C-9	C-7, C-8, C-10, C-11 (CH ₃),
9	H-8, H-10	H-4, H-5a, H-5b, H-6a, H-6b, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12 (CH ₃)	C-10	C-8, C-9, C-11 (CH ₃)
10	H-9, H-11 (CH ₃)	H-8, H-9, H-11, H-12 (CH ₃)	C-11 (CH ₃)	C-9, C-10, C-12 (CH ₂)
11	H-10, H-12 (CH ₃)	H-7, H-8, H-9, H-10, H-12 (CH ₃)	C-12 (CH ₂)	C-16 (CH ₂), C-18 (CH ₃)
12-16	H-11, H-18 (CH ₃)	H-8, H-9, H-10, H-11, H-18 (CH ₃)	C-CH ₂	C-17 (CH ₂), C-18 (CH ₃)
17	-	-	C-18 (CH ₃)	n.best.
18	17 (CH ₃)	H-17 (CH ₃)	-	-
NH	n.best.	n.best.	-	-
1-OH	-	-	-	-
3-OH	-	-	-	-
4-OH	-	-	-	-
<i>Fettsäure</i>				
1'	-	-	-	-
2'	H-3'a, H-3'b	H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-2'	C-1, C-1', C-3', C-4'
3'a	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-3'	C-2', C-4'
3'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b	H-2', H-3'a, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)
4'a	H-3'a, H-3'b, H-4'b, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-4'	C-2', C-3', C-5' (CH ₂)
4'b	H-3'a, H-3'b, H-4'b, H-5'	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-5' (CH ₂)	C-3', C-4', C-6' (CH ₂)
5'	H-4'a, H-4'b, H-6' (CH ₂)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-CH ₂	C-21' (CH ₂), C-22' (CH ₃)
6'-22'/24'	H-5', H-22' (CH ₃)	H-2', H-3'a, H-3'b, H-4'a, H-4'b, H-5', H-6' (CH ₂)	C-CH ₂	-
21'/22'	-	-	C-22' (CH ₃)	-
22'/23'	H-21' (CH ₃)	H-21' (CH ₃)	-	-
2'-OH	-	-	-	-

Tab. A19: *E/Z*-Isomerenverhältnisse der hydrolysierten „Phyto“-Ceramide

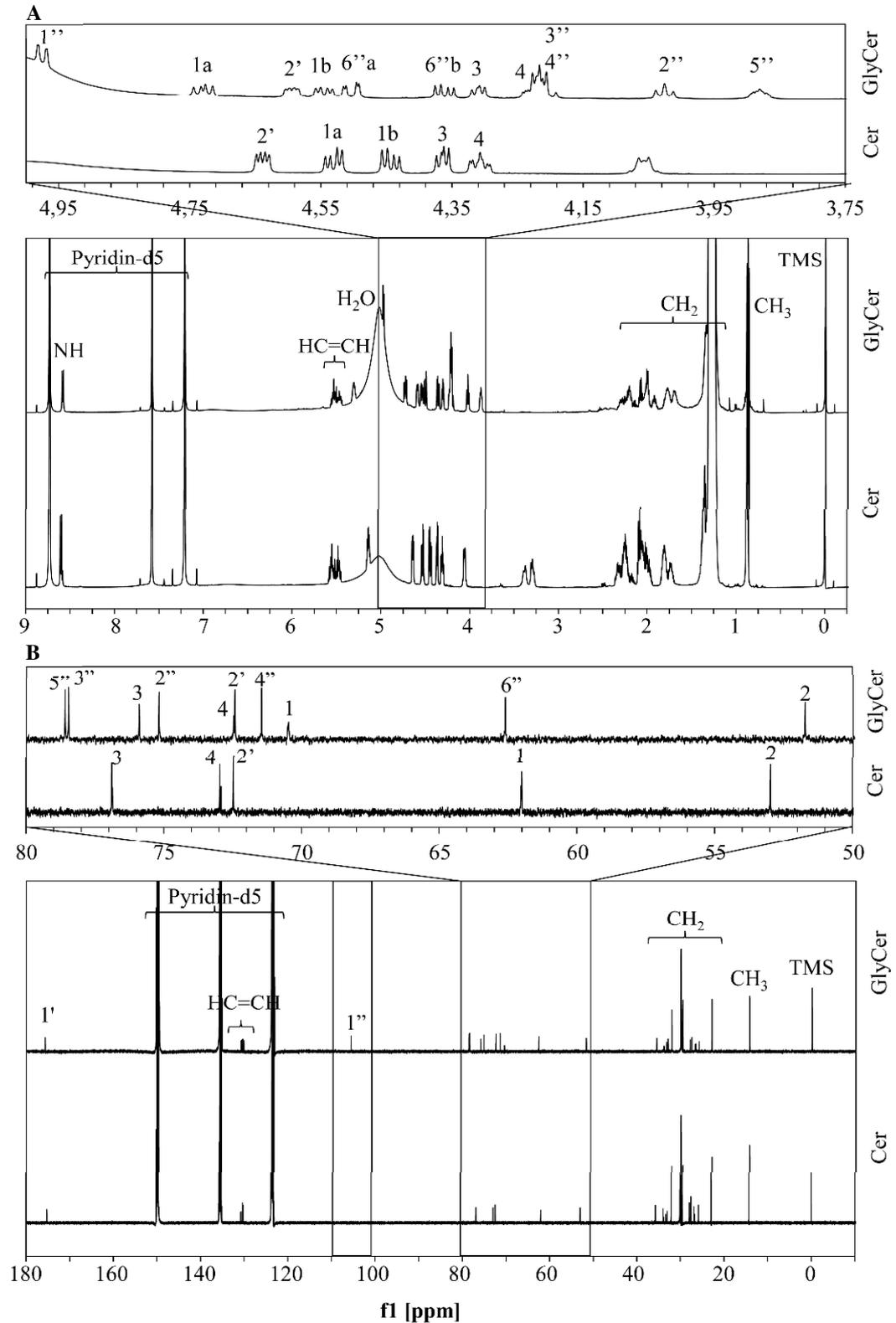
^a – ¹³C-Signale liegen übereinander; Das Verhältnis *E/Z* wurde über die Flächenverhältnisse der ¹³C-NMR-Signale bestimmt (Breiten und Höhen der Signale waren vergleichbar).

Ceramid	Pos.	Z-Isomer			E-Isomer			Verhältnis der Signalfächen der <i>E/Z</i> -Isomere		
		ppm	Höhe	Breite	Fläche	ppm	Höhe		Breite	Fläche
d18:2 ^{ΔE,ZE/Z} h16:0 (47)	4	132,54	1,5	1,21	39,28	132,43	0,6	1,21	16,19	2,5:1
	5 ^a	131,84	1,7	1,76	59,40	131,84	1,7	1,76	59,40	- ^a
	8	129,43	1,9	1,07	42,98	129,94	0,9	0,88	17,30	2,5:1
t18:1 ^{ΔE/Z} h22:0 (48)	9	130,64	1,7	1,12	41,55	131,15	1,0	0,82	16,01	2,5:1
	8	130,38	44,6	1,14	1100,01	130,83	24,7	0,93	514,40	2:1
t18:1 ^{ΔE/Z} h24:0 (49)	9	130,25	40,1	1,21	1063,53	130,71	25,3	1,05	594,79	2:1
	8	130,38	34,4	1,14	844,30	130,83	11,6	1,07	275,38	3:1
	9	130,25	33,7	1,14	800,15	130,71	12,5	1,07	286,54	3:1

Vergleich NMR-Spektren – Glycosylceramide und „Phyto“-Ceramide

Abb. A44: Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von Glc-t18:1 $^{\Delta E/Z}$ h22:0 (28) und t18:1 $^{\Delta E/Z}$ h22:0 (48, Pyridin- d_5)

A: ^1H -NMR-Spektrum, B: ^{13}C -NMR-Spektrum, Cer – Ceramid, GlyCer – Glycosylceramid, referenziert auf TMS (0 ppm)



¹H-NMR-Fingerprinting

Abb. A45: ¹H-NMR-Fingerprinting der Apfeltresterfraktionen (A1-12, Pyridin-d₅)

Referenziert auf TMS (0 ppm)

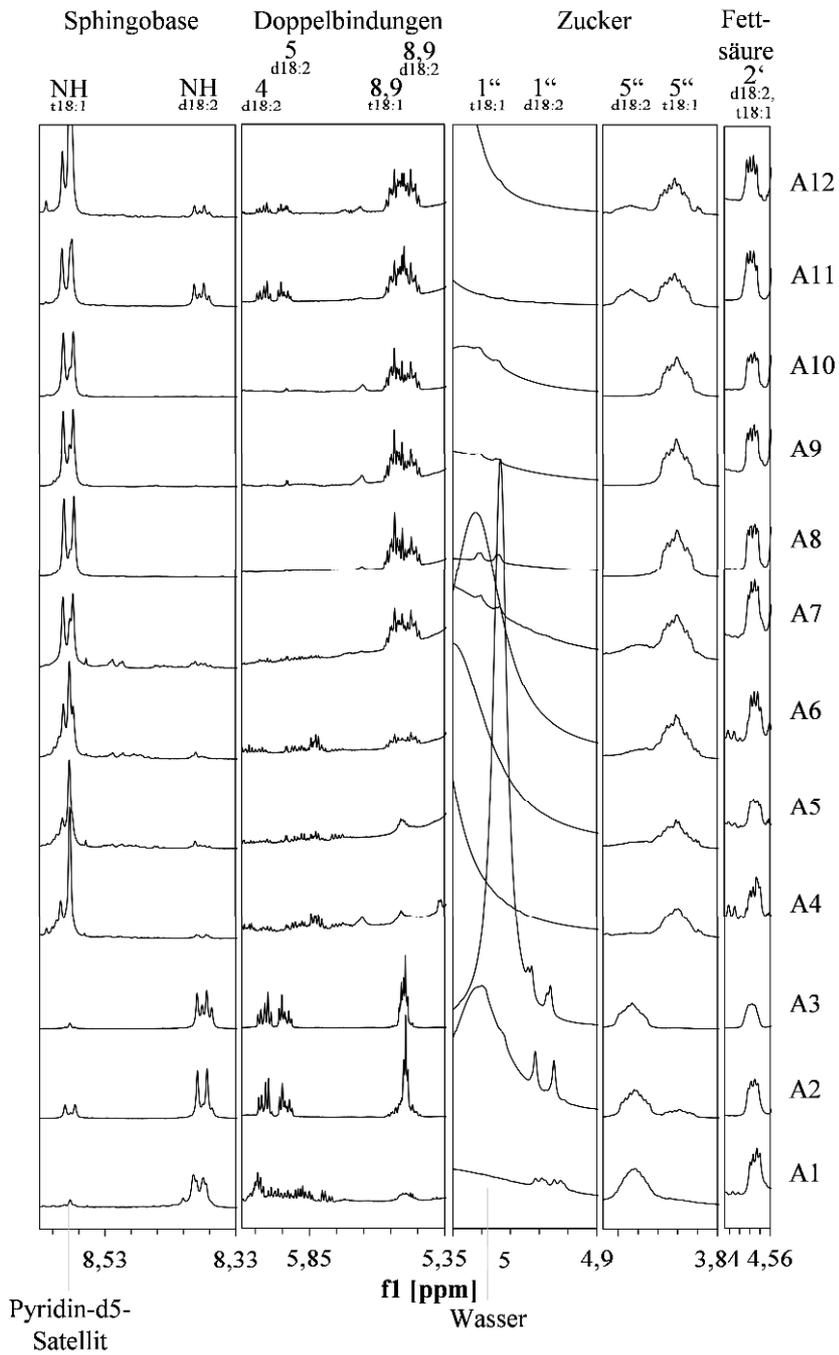


Abb. A46: ¹H-NMR-Fingerprinting der Weizenkeimfraktionen (W1-12, Pyridin-d₅)

Referenziert auf TMS (0 ppm), ^a – Lage nicht bestätigt, da keine Referenzsubstanz vorlag.

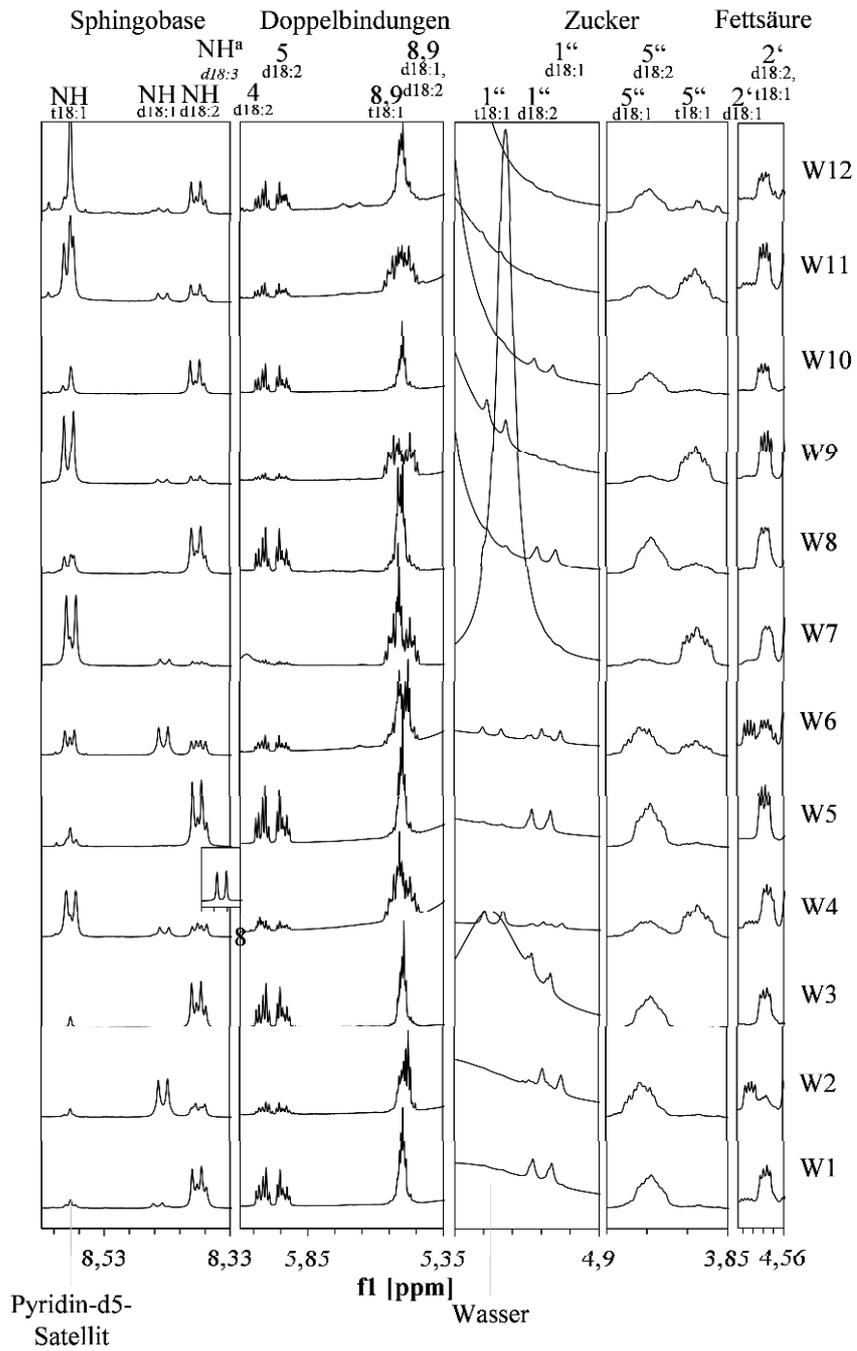
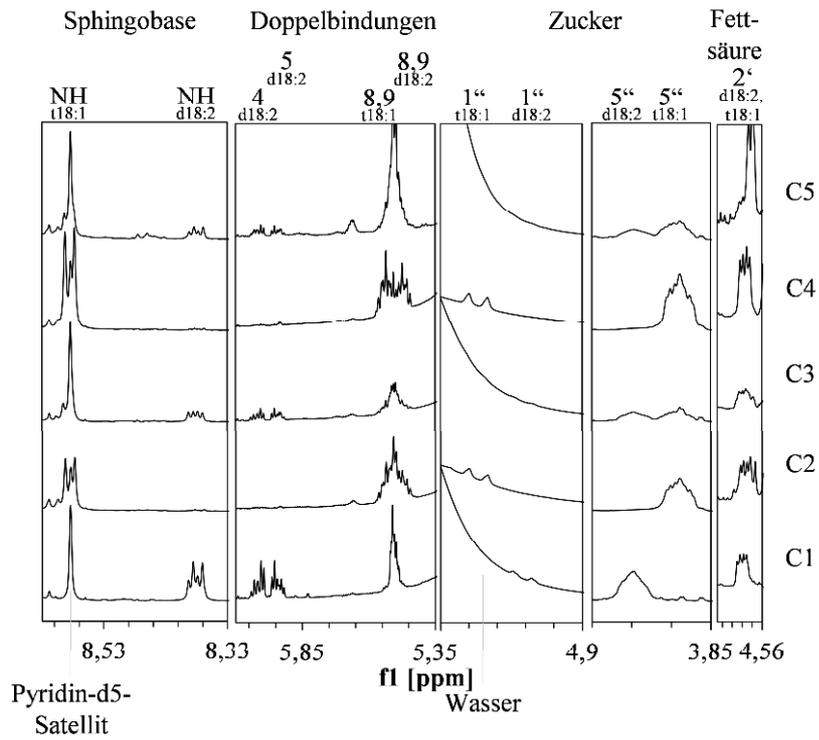


Abb. A47: $^1\text{H-NMR}$ -Fingerprinting der Kaffeesatzfraktionen (C1-5, Pyridin- d_5)

Referenziert auf TMS (0 ppm)



Tab. A20: Identifizierung von „Phyto“-Ceramiden

UV-Spektren wurden mit einem Jasco V-560 UV/Vis Spectrophotometer, IR (ATR) Spektren mit einem Thermo Nicolet 5700 FT-IR Spektrometer aufgenommen. Schmelzpunkte wurden über einen Boetius-Apparat ermittelt. Optische Rotationen sind mit einem Jasco P-2000 Polarimeter, CD-Spektren mit einem Jasco J-815 CD Spektrophotometer gemessen worden.

(2S,3R,4E,8E/Z)-2N-[(2'R)-2'-hydroxyhexadecanoylamino]-4(E), 8(E/Z)-octadecadien-1,3-diol, d18:2^{Δ4E,8E/Z} h16:0 (**47**): 25,5 mg, weißes amorphes Pulver, Smp. 77-80 °C. – TLC R_f 0,62 (CHCl₃-MeOH 85:15 V/V). – $[\alpha]_D^{24} = +12,6$ (c = 3,14; CHCl₃/MeOH 1:1 V/V). – UV (MeOH) λ_{\max} a (log ϵ): 261 (2,55). – IR ν_{\max} (MeOH): 3332 (breit, O–H, N–H), 2919 (C–H), 2850 (C–H), 1633 (C=O, C=C), 1536 (C=C, N–H), 1467 (C–H), 1378 (C–H, C–N), 1316 (C–O), 1177 (C–O), 1048 (C–O), 721 (=C–H) cm⁻¹.

(2S,3S,4R,8E/Z)-2N-[(2'R)-2'-hydroydocosanoylamino]-8(E/Z)-octadecan-1,3,4-triol, t18:1^{Δ8E/Z} h22:0 (**48**): 11,3 mg, weißes amorphes Pulver, Smp. 108-112 °C. – TLC R_f 0,58 (CHCl₃-MeOH 85:15 V/V). – $[\alpha]_D^{24} = +17,5$ (c = 3,57; CHCl₃/MeOH 1:1 V/V). – UV (MeOH) λ_{\max} a (log ϵ): 260 (2,62). – IR ν_{\max} (MeOH): 3332 (breit, O–H, N–H), 2917 (C–H), 2850 (C–H), 1643 (C=O, C=C), 1537 (C=C, N–H), 1467 (C–H), 1378 (C–H, C–N), 1258 (C–O), 1043 (C–O), 720 (=C–H) cm⁻¹.

(2S,3S,4R,8E/Z)-2N-[(2'R)-2'-hydroxytetracosanoylamino]-8(E/Z)-octadecan-1,3,4-triol, t18:1^{Δ8E/Z} h24:0 (**49**): 11,8 mg, weißes amorphes Pulver, Smp. 128-133 °C. – TLC R_f 0,58 (CHCl₃-MeOH 85:15 V/V). – $[\alpha]_D^{24} = +13,3$ (c = 3,6; CHCl₃/MeOH 1:1 V/V). – UV (MeOH) λ_{\max} a (log ϵ): 259 (2,90). – IR ν_{\max} (MeOH): 3320 (broad, O–H, N–H), 2916 (C–H), 2849 (C–H), 1653 (C=O, C=C), 1541 (C=C, N–H), 1471 (C–H), 1376 (C–H, C–N), 1253 (C–O), 1047 (C–O), 717 (=C–H) cm⁻¹.

Tab. A21: Identifizierung von neuartigen Glycosylceramiden: Malusid I-III (4, 1, 2)

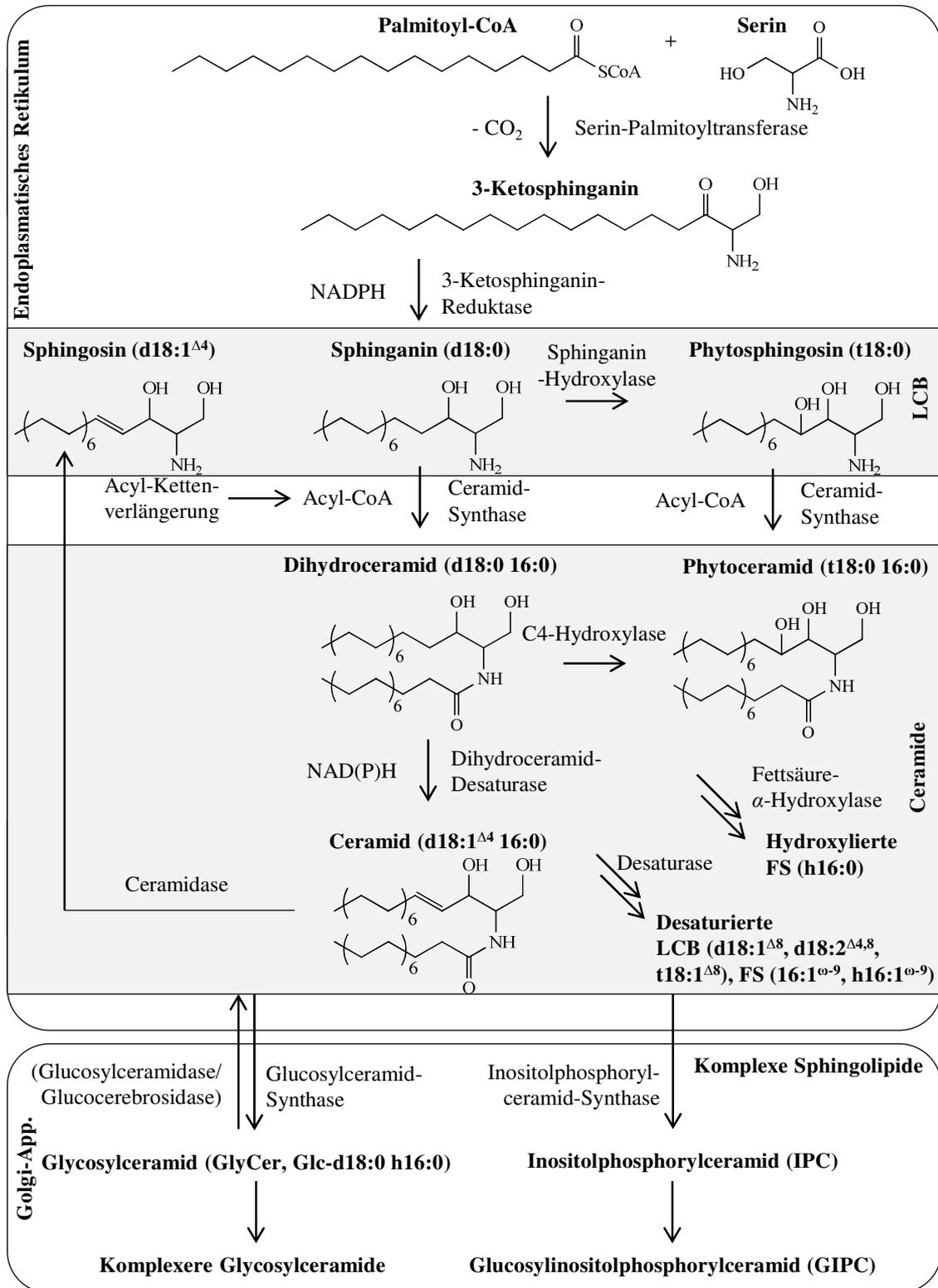
UV-Spektren wurden mit einem Jasco V-560 UV/Vis Spectrophotometer, IR (ATR) Spektren mit einem Thermo Nicolet 5700 FT-IR Spektrometer aufgenommen. Schmelzpunkte wurden über einen Boetius-Apparat ermittelt. Optische Rotationen sind mit einem Jasco P-2000 Polarimeter, CD-Spektren mit einem Jasco J-815 CD Spektrophotometer gemessen worden.

1-O-(β -D-glucopyranosyl)-(2*S*,3*R*,4*E*,9*E*)-2*N*-[(2'*R*)-2'-hydroxyhexadecanoylamino]-8-oxo-4(*E*), 9(*E*)-octadecadien-1,3-diol, Glc-8-keto-d18:2 ^{Δ 4*E*,9*E*} h16:0, Malusid I (**4**): 2,5 mg, weißes amorphes Pulver, Smp. 154-157 °C. – TLC R_f 0,27 (CHCl₃-MeOH 85:15 V/V). – $[\alpha]_D^{24} = +8,3$ ($c = 1,00$, CHCl₃/MeOH 1:1 V/V). – UV (MeOH) λ_{\max} a ($\log \epsilon$): 222 (4,00). – CD (MeOH) $[\theta]_{216} +2131 \text{ deg cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. – IR ν_{\max} (MeOH): 3348 (breit, O–H, N–H), 2921 (C–H), 2852 (C–H), 1700-1720 (C=O), 1635 (C=O, C=C), 1540 (C=C, N–H), 1457 (C–H), 1375 (C–H, C–N), 1166 (C–O), 1076 (C–O), 1037 (C–O), 721 (=C–H) cm^{-1} .

1-O-(β -D-glucopyranosyl)-(2*S*,3*R*,4*E*,9*E*)-2*N*-[(2'*R*)-2'-hydroxyhexadecanoylamino]-8-hydroxy-4(*E*), 9(*E*)-octadecadien-1,3-diol, Glc-8-OH-d18:2 ^{Δ 4*E*,9*E*} h16:0, Malusid II (**1**) und **1-O-(β -D-glucopyranosyl)-(2*S*,3*R*,4*E*,7*E*)-2*N*-[(2'*R*)-2'-hydroxyhexadecanoylamino]-9-hydroxy-4(*E*), 7(*E*)-octadecadien-1,3-diol**, Glc-9-OH-d18:2 ^{Δ 4*E*,7*E*} h16:0, Malusid III (**2**) (Gemisch aus **1** und **2**, molekulares Verhältnis ca. 2:3): 2,7 mg, weißes amorphes Pulver – TLC R_f 0,17 (CHCl₃-MeOH 85:15 V/V). – UV (MeOH) λ_{\max} a ($\log \epsilon$): 264 (3,14). – IR ν_{\max} (MeOH): 3336 (breit, O–H, N–H), 2921 (C–H), 2852 (C–H), 1646 (C=O, C=C), 1541 (C=C, N–H), 1457 (C–H), 1376 (C–H), 1165 (C–O), 1074 (C–O), 1033 (C–O), 720 (=C–H) cm^{-1} .

Abb. A48: Schematische Darstellung der Glycosylceramid-Synthese in Pflanzen

Modifiziert nach: Lynch und Dunn, 2004, Pata *et al.*, 2010 und Berkey *et al.*, 2012. Sphingolipide stellen durch vielfältige Sphingobasen- und Fettsäuremodifikationen eine variable Stoffgruppe dar. Diese Modifikationen werden nach der Cer-Synthese vollzogen. Die meisten enzymatischen Schritte sind bisher nur *in vitro* nachgewiesen worden. LCB – Sphingobase, FS – Fettsäure



PUBLIKATIONEN UND WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE

Publikationen:

REISBERG M., ARNOLD N., PORZEL A., NEUBERT R. H. und DRÄGER B., 2017: Production of rare phyto-ceramides from abundant food plant residues. *J Agric Food Chem*, 65 (8): 1507-1517.

REISBERG M., ARNOLD N., PORZEL A., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2017: Malusides, novel glucosylceramides isolated from apple pomace (*Malus domestica*). *Z Naturforsch C*, Online erschienen: <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0059>, im Druck.

REISBERG M., ARNOLD N., BISLAT D., ASRES K., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2017: Quantification of glycosylceramides in plants by automated multiple development (AMD)-HPTLC. *JPC-J Planar Chromat*, 30 (6): 460-466.

REISBERG M., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2014: Analysis of plant glycosylceramides by automated multiple development. *CBS*, 113: 13-15.

REISBERG M., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2013: Exploitation of plant residues: extraction, separation and characterisation of glycosylceramides. *Planta Med*, 79: 1156-1157 (Abstract).

Poster:

REISBERG M., CHLEBOWSKI P., BISLAT D., ARNOLD N., ASRES K., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2014: Quantitative Screening for Glycosylceramides in Ethiopian Plants. *Workshop on African Phytopharmaceuticals*, 6.-7. Oktober 2014, Addis Abeba, Äthiopien.

REISBERG M., CHLEBOWSKI P., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2014: Evaluation of Glycosylceramides in Wheat germ by Automated Multiple Development (AMD)-HPTLC. *HPTLC 2014. (22nd) International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography*, 2.-4. Juli 2014, Lyon, Frankreich.

REISBERG M., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2013: Exploitation of plant residues: extraction, separation and characterisation of glycosylceramides. *61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research*, 1.-5. September 2013, Münster, Deutschland.

Vorträge:

REISBERG M., ARNOLD N., NEUBERT R. H. H. und DRÄGER B., 2015: Glycosylceramide Supply from Ethiopian Plants – Screening and Quantification Methods. *International Ceramide Conference - Sphingolipid Club - Joint Meeting*, 6.-10. Mai 2015, Çeşme, Türkei.

REISBERG M., NEUBERT R. H. und DRÄGER B., 2012: The Extraction, Separation and Identification of Glycosylceramides from Plants. *Kick off meeting DAAD project "Welcome to Africa: Research based capacity building"*. 11. Dezember 2012, Halle (Saale), Deutschland.

CURRICULUM VITAE
Angaben zur Person

Name: Dipl.-Pharm. Mathias Reisberg
Geburtsdatum: 21. September 1986
Geburtsort: Kyritz
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Angaben zur Ausbildung**Berufliche Laufbahn**

- seit 08/2016 Angestellter Apotheker Pharmazeutische Entwicklung / Projektleiter /
 Stellvert. Leiter der Herstellung Klinische Prüfpräparate
 ▪ mibe GmbH Arzneimittel, Brehna
- 07/2012 – 07/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Doktorand
 ▪ Pharmazeutische Biologie / Biopharmazie, Institut für Pharmazie,
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
 ▪ Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie, Leibniz-Institut für
 Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)
- 04/2013 – 05/2013 Forschungsaufenthalt Äthiopien, „Welcome to Africa“ (DAAD)
 ▪ Addis Ababa University, Addis Abeba, Äthiopien
- 01/2013 – 12/2015 Angestellter Apotheker
 ▪ Apotheke am Rathenauplatz, Halle (Saale)

Akademische Ausbildung

- 06/2012 Approbation als Apotheker
- 05/2012 Diplompharmazeut (Dipl.-Pharm.)
 ▪ „Extraktion und Isolierung von Glycosylceramiden aus Weizenkeimen“,
 Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-
 Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- 11/2011 – 04/2012 Pharmazeut im Praktikum
 ▪ Apotheke am Rathenauplatz, Halle (Saale)
- 05/2011 – 10/2011 Pharmazeut im Praktikum
 ▪ Selbstmedikationsbetrieb Europa (SME), Bayer Bitterfeld GmbH,
 Bitterfeld-Wolfen
- 11/2010 – 04/2011 Pharmazeut im Praktikum / Diplomand
 ▪ Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-
 Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- 10/2006 – 09/2010 Studium der Pharmazie
 ▪ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)

Schulische Ausbildung

- 08/1999 – 04/2006 Allgemeine Hochschulreife
 ▪ Gymnasium Ascaneum, Aschersleben

Halle (Saale), 10. Juli 2017

Mathias Reisberg

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt allen Menschen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Dies ist auf direktem fachlichen oder manchmal auch indirektem sozialen Wege geschehen.

Prof. Dr. Birgit Dräger danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die uneingeschränkte Unterstützung in der Arbeitsgruppe Biogene Arzneistoffe am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die Arbeit ist in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biopharmazie des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg um **Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert** und dem Institut für Pflanzenbiochemie (IPB) Halle (Saale) um **Prof. Dr. Ludger Wessjohann** entstanden. Vielen Dank für die Bereitstellung der notwendigen Mittel, die fortwährende Diskussionsbereitschaft und fachliche Unterstützung in allen Dingen. Die Arbeit profitierte sehr vom Forscherdrang und den vielen Fachgesprächen mit **Dr. Norbert Arnold** und **Dr. Andrea Porzel** des IPB Halle (Saale). Ihre hilf- und aufschlussreiche Unterstützung hat maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt auch **Anja Ehrlich** vom IPB Halle (Saale), deren tatkräftiger Unterstützung ich mir in Hinsicht auf LC-MS-Methodenentwicklung und -durchführung stets sicher sein konnte. Vielen Dank auch für die technische Unterstützung von **Manuela Woigk** im Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und **Anke Nies** von der Skinomics GmbH. Sie haben mir stets ihre Hilfe zur Verfügung gestellt und viele meiner Messungen ermöglicht. Die Kooperation mit **Annegret Laub** während der hochauflösenden massenspektrometrischen Messungen war äußerst wertvoll. **Nicole Neitzke** und **Lisa Hadlich** (Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) möchte ich für eine hervorragende Probenaufbereitung sowie spannende und lustige Diskussionsrunden während des Wahlpflichtfaches danken. Vielen Dank an **Adina Eichner** aus der Arbeitsgruppe Biopharmazie und **Stefan Sonnenberger** aus der Arbeitsgruppe Biochemische Pharmazie des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die aufschlussreichen Gespräche zur Neutronenstreuung.

Großer Dank gebührt **Prof. Dr. Konrad Sandhoff** vom Life & Medical Sciences Institute (LIMES) des Kekulé-Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, der mir mit seinen Gesprächen und Tipps die Hydrolyse pflanzlicher Glycosylceramide nähergebracht hat. Er hatte damit maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch **Prof. Dr. Christoph Baerwald** aus der Sektion Rheumatologie der Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Universitätsklinikum Leipzig für die großzügige Bereitstellung der Imiglucerase (Cerezyme®) danken. Außerdem danke ich **Prof. Dr. Johannes Wohlrab** und **Claudia Bruhne** von der Universitätsklinik und

Poliklinik für Dermatologie und Venerologie Halle (Saale) für die Bereitstellung der Hautproben.

Die vorliegende Arbeit lebte von Fachgesprächen mit Kollegen auf diversen Konferenzen. Daher möchte ich dem **Arbeitskreis Separation Science** der Fachgruppe Analytische Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) für ihr Stipendium für die Teilnahme an einer internationalen Konferenz danken. Weiterer Dank gilt der Firma **Camag** und **BioSolutions Halle GmbH** für ihre großzügige finanzielle Unterstützung.

Prof. Dr. Jörg Degenhardt (Arbeitsgruppe Pharmazeutische Biotechnologie des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) gehört mein besonderer Dank für die Unterstützung während der letzten Züge dieser Arbeit.

Ich möchte mich weiterhin beim **Deutschen Akademischen Austauschdienst e.V.** (DAAD) bedanken, der mir im Rahmen des *Welcome to Africa*-Projektes die Forschung und die mehrmaligen Aufenthalte in Äthiopien ermöglicht hat. An dieser Stelle möchte ich auch gerne auf **Prof. Dr. Kaleab Asres**, **Prof. Dr. Tsige Gebre-Mariam**, **Prof. Dr. Teferi Gedif**, **Dr. Daniel Bisrat** und **Solomon Tadesse** von der Addis Ababa University (AAU, Addis Abeba, Äthiopien) hinweisen, die mich jederzeit bei meinen Aufenthalten am Institut für Pharmazie der AAU unterstützt und mir die äthiopischen Gepflogenheiten sowie Köstlichkeiten nähergebracht haben. Den **Kollegen vom Forestry Research Center Addis Ababa** (Addis Abeba, Äthiopien) gilt mein herzlichster Dank für ihre uneigennützig Hilfe während der Feldexkursion in Westäthiopien.

Ralph Coppi möchte ich für die fachlichen und die weitaus wichtigeren freundschaftlichen Gespräche danken. Unser Kaffeegenuss hat mich auf die Idee gebracht, Glycosylceramide in Kaffee nachzuweisen – eine schöne Art das Vergnügen mit dem Nützlichen zu verbinden. Vielen Dank für die wundervolle Freundschaft und eine unvergessliche Doktorandenzeit. Vielen Dank auch meiner **Familie** und meinen **Freunden** für ihre moralische Unterstützung, Motivationsreden und ihr fortwährendes Interesse an meiner Forschung. Zu guter letzt möchte ich **Diana Reisberg** für ihre grenzenlose Unterstützung und ihr aufmunterndes liebevolles Wesen danken.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Herr Mathias Reisberg, geboren am 21.09.1986 in Kyritz, an Eides statt, dass ich die dem Institut für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Phyto“-Ceramide aus pflanzlichen Ressourcen zur Nutzung in der Dermatotherapie

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), 10. Juli 2017



Mathias Reisberg