

**UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTURELLEN UND
PHYSIKOCHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG VON STRATUM
CORNEUM LIPIDEN UND DEREN MISCHSYSTEMEN**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dipl.-Pharm. Steve Raudenkolb
geb. am 11.05.1975 in Rodewisch

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. habil. Siegfried Wartewig
3. Dr. habil. Gerald Brezesinski

Halle (Saale), den 19.12.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004627

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004627>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	4
Einleitung und Zielstellung	6
Theoretischer Teil.....	9
<i>Aufbau und Funktion der menschlichen Haut</i>	<i>9</i>
<i>Der Sphingolipid-Stoffwechsel</i>	<i>13</i>
<i>Ceramide des Stratum corneum</i>	<i>15</i>
<i>Strukturelle Eigenschaften der Stratum corneum Lipide.....</i>	<i>18</i>
Ceramide	18
Cholesterol-Lipid-Wechselwirkungen.....	20
<i>Grundlagen der eingesetzten Messmethoden</i>	<i>22</i>
Differential Scanning Calorimetry	22
IR- und Raman-Spektroskopie	23
Röntgenbeugung.....	28
Experimenteller Teil.....	31
<i>Verwendete Substanzen und Chemikalien</i>	<i>31</i>
Synthese und Analytik des deuterierten CER[NP]	34
<i>Methoden.....</i>	<i>36</i>
Kalorimetrische Messungen	36
FT-Raman-Spektroskopie.....	36
FT-IR-Spektroskopie	37
Röntgenpulverdiffraktometrie	39
Ergebnisse und Diskussion	41
<i>N-Docosan.....</i>	<i>41</i>
<i>Ceramid AS.....</i>	<i>45</i>
<i>Ceramid AS.....</i>	<i>46</i>
Ceramid AS und Wasser.....	47
<i>Ceramid NP.....</i>	<i>53</i>
Ceramid NP (mit d ₃₅ -Stearinsäureseitenkette).....	64
Ceramid NP und Wasser.....	68
Ceramide C _{18:1} CER[NP] und C _{18:2} CER[NP]	70
<i>Ceramid AP.....</i>	<i>74</i>
L-CER[AP].....	75
D-CER[AP]	80
Vergleichende Betrachtung von L-CER[AP] und D-CER[AP].....	83
<i>Ceramid-Ölsäure Mischsysteme.....</i>	<i>86</i>
<i>Ceramid- Cholesterol Mischsysteme</i>	<i>95</i>
Cholesterol + CER[NP] (50/50 mol%).....	96
Cholesterol + CER[AS] (50/50 mol%).....	98
<i>Untersuchungen zum Phasenverhalten hydratisierter Glycolipide</i>	<i>101</i>
Zusammenfassung	106

Ausblick	110
Literaturverzeichnis	111
Anhang	119

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

AFM	-	Atomic force microscopy (Rasterkraftmikroskopie)
ATR	-	Attenuated total reflection (Abgeschwächte Totalreflektion)
FT	-	Fourier Transformation
IR	-	Infrarot
LAM	-	Longitudinal akustische Moden
PAS	-	Photoakustische Spektroskopie
$v_{s;a}$	-	Streckschwingung (symmetrisch; a(anti)symmetrisch)
δ	-	Deformationsschwingung
DESY	-	Deutsches Elektronen Synchrotron
HASYLAB	-	Hamburger Synchrotron Strahlungslabor
PSD	-	Position sensitive detector (ortsempfindlicher Detektor)
SAXS	-	Small angle X-ray scattering (Röntgenkleinwinkelstreuung)
WAXS	-	Wide angle X-ray scattering (Röntgenweitwinkelstreuung)
λ	-	Wellenlänge der Röntgenstrahlung
d_{hkl}	-	Netzebenenabstand
hkl	-	<i>Miller'sche</i> Indices
s	-	reziproker Netzebenenabstand
θ	-	Beugungswinkel
L	-	lamellare Überstruktur (Bischichtlamellen)
H _I	-	(normale) hexagonale Phase, hydrophile Kopfgruppen am Röhrenaußenrand
H _{II}	-	invers hexagonale Phase, hydrophile Kopfgruppen im Röhreninneren
α	-	Phase mit fluiden Ketten
β'_H	-	Phase mit rigiden Ketten (geneigt), mit hexagonaler Kettenpackung
β'_{DH}	-	Phase mit rigiden Ketten (geneigt), mit deformiert hexagonaler Kettenpackung

DSC	-	Differential Scanning Calorimetry
HF	-	Heat flow (Wärmefluss)
T	-	Temperatur
t	-	Zeit
MG	-	molare Masse
MS	-	Massenspektrometrie
MS/MS	-	Tandem- Massenspektrometrie
MS ⁿ	-	Multiple mass spectrometry (Mehrfach- Massenspektrometrie)
m/z	-	Masse / Ladungsverhältnis
NMR	-	Nuclear magnetic resonance - Kernspinresonanz
CoA	-	Coenzym A
ER	-	Endoplasmatisches Retikulum
SC	-	Stratum corneum
SM	-	Sphingomyelin
TEWL	-	Trans epidermal water loss (Transepidermaler Wasserverlust)
CER	-	Ceramid
Chol	-	Cholesterol
EEDQ	-	N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
NaOl	-	Natriumoleat
OA	-	Ölsäure
SA	-	Stearinsäure
PBS	-	Phosphate buffered saline
THF	-	Tetrahydrofuran
X	-	Molenbruch

Einleitung und Zielstellung

„Alles, was wir unter Natur verstehen, ist die Großaufnahme eines Gänseblümchens.“

Frank Thiess

Für alle landlebenden Säugetiere einschließlich des menschlichen Organismus ist die Haut ein essentielles Organ. Ihre Bedeutung liegt in ihrer Schutz- und Barrierefunktion begründet. Des Weiteren dient die Haut als Sinnesorgan und spielt bei der Wärmeregulation des Körpers eine wesentliche Rolle. Als Applikationsort zur systemischen Gabe von Arzneistoffen gewinnt die Haut zunehmend an Bedeutung (Dittgen 1998). Das Hauptproblem bei der transdermalen Gabe von Pharmaka stellt die Haut selbst dar, da sie als Barriereorgan für eine Reihe von Substanzen nur schwer durchdringlich ist.

Es ist seit Jahren bekannt, dass das *Stratum corneum* (SC), die äußerste Schicht der Epidermis, von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut ist. Durch die im Säugetierorganismus einzigartige Struktur des SC, in dem verhornte Hautzellen (*Corneocyten*) in eine Lipidmatrix aus multiplen lamellaren Lipidschichten eingebettet sind, wird der effektive Schutz gegenüber exogenen Noxen sowie eine Minimierung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) ermöglicht (Schurer et al. 1991). Der Ansatzpunkt für eine Überwindung der Barriere der Haut ist die Beeinflussung der Lipidschichten durch Penetrationsmodulatoren (Suhonen et al. 1999). Aus diesem Grund widmete man sich in den vergangenen Jahrzehnten ausführlichen Untersuchungen zur Zusammensetzung und Organisation der SC Lipide.

Die Zusammensetzung der Lipidmatrix des SC, die von einer komplexen Mischung verschiedener Ceramide, freier Fettsäuren und Cholesterol sowie dessen Derivaten bestimmt wird, ist in unserem Organismus einmalig. Die extrazellulären Lipide stammen von intrazellulären Zellorganellen, den *lamellar bodies*, die im *Stratum granulosum*, einer Schicht unter dem SC zu finden sind. Die im *Stratum granulosum* vorkommenden Glykolipide (Glycosylceramide) sind Vorstufen der Ceramide (Wertz et al. 1982). Den nur im SC in hoher Konzentration vorkommenden Ceramiden wird bei der Strukturgebung der interzellulären Lipidschichten eine besondere Rolle zugeschrieben. Auffallend ist die strukturelle Heterogenität der Ceramide, die sich aufgrund ihrer sich unterscheidenden Kopfgruppen und Seitenketten in verschiedene Klassen einteilen lassen. Welche Bedeutung die einzelnen Ceramid-Spezies am strukturellen Aufbau des SC haben, ist noch weitgehend unklar. Des Weiteren ist wenig über molekulare Wechselwirkungen der Ceramide mit den anderen SC-Bestandteilen bekannt.

Untersuchungen an reinen SC-Lipiden spielen eine wichtige Rolle bei der Strukturaufklärung der komplex zusammengesetzten extrazellulären Lipidmatrix. Eine Aufklärung der Eigenschaften der einzelnen SC-Lipide, die mittels verschiedener experimenteller Methoden erfasst werden können, stellen die Grundvoraussetzung für das Verständnis ihrer Funktion im SC dar. Über diesen Weg kann zielgerichtet versucht werden, die Aufgabe und Bedeutung der jeweiligen Substanzen bei der Strukturausbildung und Barrierefunktion im SC zu ergründen.

Um die Eigenschaften der natürlichen Stratum corneum Lipide zu studieren, werden in der Literatur eine Vielzahl verschiedener physikalischer und bildgebender Verfahren beschrieben. Da sich die meisten dieser Untersuchungsmethoden nicht am lebenden Organismus durchführen lassen, bedient man sich verschiedener Modellsysteme. Untersucht werden Lipidmonoschichten, liposomale Systeme (Abraham et al. 1987 & 1988, Wertz et al. 1986) und Volumenphasen. Meist werden die Lipide aus natürlichen Quellen, etwa durch Extraktion von Schweine- oder humaner Haut gewonnen. Über diese Herangehensweise ist es möglich, eine der natürlichen Situation nahezu identische Lipidzusammensetzung zu charakterisieren. Untersuchungen an isoliertem Stratum corneum wurden von einigen Arbeitsgruppen ebenfalls durchgeführt (Gay et al. 1994, Golden et al. 1987).

Ein Nachteil der komplexen natürlichen Systeme besteht jedoch darin, dass die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Lipide in den komplex zusammengesetzten Matrices nicht erfasst werden können. Des Weiteren überlagern sich die Eigenschaften der verschiedenen Substanzen, wodurch eine Interpretation der generierten Daten in vielen Fällen nicht mehr möglich ist. Werden im Gegensatz dazu synthetisch reine Lipide verwendet, ist man zwar von der physiologischen Situation weit entfernt, es eröffnet sich jedoch die Möglichkeit, die Eigenschaften einer jeden Substanz detailliert zu untersuchen und ihre spezifischen Wechselwirkungen mit weiteren Stoffen festzustellen.

In der Arbeitsgruppe sind bereits Untersuchungen zum Phasenverhalten von *Stratum corneum* Lipiden durchgeführt worden. Im Rahmen dieser Arbeiten wurde festgestellt, dass die Lipide in den untersuchten Systemen nicht miteinander interagieren und in separierten Phasen vorliegen (Wegener et al. 1996 & 1997, Neubert et al. 1997, Wartewig et al. 1998). Die Experimente waren auf kalorimetrische und Ramanspektroskopische Methoden beschränkt und erlaubten daher nur begrenzte Aussagen hinsichtlich der Struktur der Lipide. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Alkylketten der Ceramide in den Mischungen einen hohen Anteil an trans-Konformeren aufweisen.

An diese Untersuchungen anknüpfend sollen weitere ausführliche Experimente durchgeführt werden. Zur Aufklärung von Lipidstrukturen wird die Röntgenpulverdiffraktometrie als die

Methode der Wahl angesehen. Mittels der FT-IR Spektroskopie sollen die Strukturen im polaren Bereich der Lipide charakterisiert werden. Die Raman-Spektroskopie soll verwendet werden, um die Strukturen der Kohlenwasserstoffketten der Lipide hinsichtlich Kettenpackung und Kettenordnung zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk soll auf die Verknüpfung der spektroskopischen Methoden mit der Röntgenpulverdiffraktometrie gelegt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Ceramid-Spezies und andere relevante Lipide hinsichtlich ihrer Strukturausbildung zu charakterisieren und mögliche Wechselwirkungen mit weiteren, im SC vorkommenden Substanzen (Fettsäuren, Cholesterol, Wasser) in ausgewählten einfachen binären oder ternären Systemen zu ergründen. Die Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Aufklärung der strukturbestimmenden Mechanismen im *Stratum corneum* leisten.

Theoretischer Teil

„Nichts tut dem Mann der Wissenschaft mehr not, als etwas über ihre Geschichte zu wissen und über die Logik der Forschung: ... über den Weg, Irrtümer zu entdecken; über die Rolle, die die Hypothesen spielen und die Einbildungskraft; und über die Methode der Nachprüfung.“

Lord Acton

Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut (*Cutis*) ist ein lebenswichtiges Organ, das den Organismus von der Umwelt abgrenzt und ihn vor äußeren Belastungen schützt. Mit einer Fläche 1,5 bis 2,0 m² beim Erwachsenen ist die Haut das größte Organ des Menschen (Wohlrab 2001).

Histologisch lässt sich die Haut in drei Schichten gliedern. Sie besteht aus der Oberhaut (Epidermis) und dem darunter befindlichen, bindegewebigen Teil, der Lederhaut (*Corium*). Unter der Lederhaut befindet sich die Unterhaut (*Subcutis*). Sie stellt ein lockeres Bindegewebe dar, dem mehr oder weniger reichlich Fettläppchen eingelagert sind.

Die äußerste Schicht der Haut, die Epidermis, ist frei von Blutgefäßen. Sie wird wiederum in mehrere funktionelle Zellschichten untergliedert. Der physiologische Ausgangspunkt ist das *Stratum basale*, dem sich *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und als äußerste Schicht der Epidermis das *Stratum corneum* (Hornschicht) angliedern. Das *Stratum corneum* besteht aus 10 bis 30 Lagen enddifferenzierten, kernlosen, Epithelzellen (Corneocyten, Hornzellen), die abgestorben sind und in denen keine Zellorganellen mehr zu finden sind.

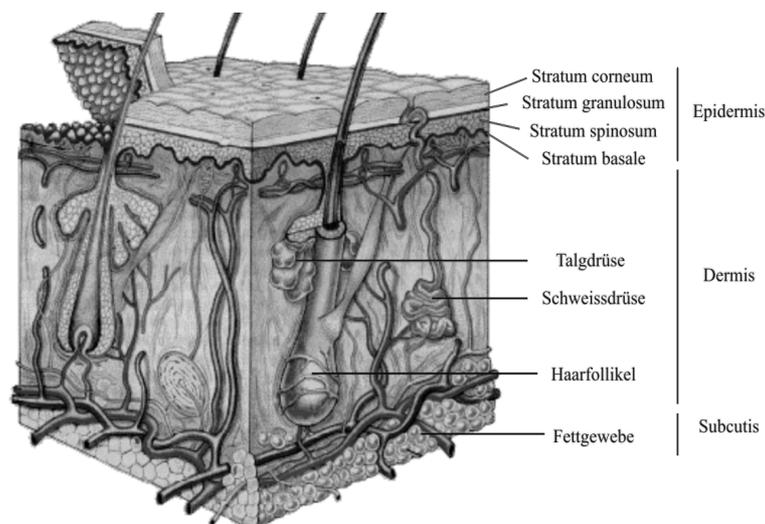


Abb. 1 Die menschliche Haut (schematische Darstellung).

Während der epidermalen Differenzierung migrieren die Zellen zur Oberfläche der Haut. Gehen die Zellen in die äußerste lebende Schicht der Epidermis, das *Stratum granulosum* über, extrudieren die „lamellar bodies“ ihren lipidreichen Inhalt in den Extrazellularraum. Aus

dieser Lipidmatrix bilden sich ausgedehnte, das SC durchspannende lamellare Schichten, die sich nahezu parallel zu den Corneocytenoberflächen ausrichten.

Bei der Aufnahme von Arzneistoffen durch die Haut unterscheidet man prinzipiell die transglanduläre, transfollikuläre, die transzelluläre und die interzelluläre Penetration. Die Permeation von Arzneistoffen durch das *Stratum corneum* erfolgt im Allgemeinen interzellulär entlang der Lipidschichten (Talreja et al. 2001).

Stark beeinflusst wird die Barrierefunktion der Haut von ihrer Hydratation. Eine Erhöhung der Hautfeuchte, wie zum Beispiel unter okklusiven Bedingungen, aber auch extreme Austrocknung können eine Steigerung der Penetration bewirken. Die molekularen Mechanismen der Beeinflussung sind jedoch noch nicht verstanden. Als Modelle werden hierfür lediglich Phospholipidsysteme diskutiert (Sparr et al. 2001a). Auch Erkrankungen der Haut können mit einer Erniedrigung der Barriereigenschaften der Haut verbunden sein (McIntosh et al. 1999).

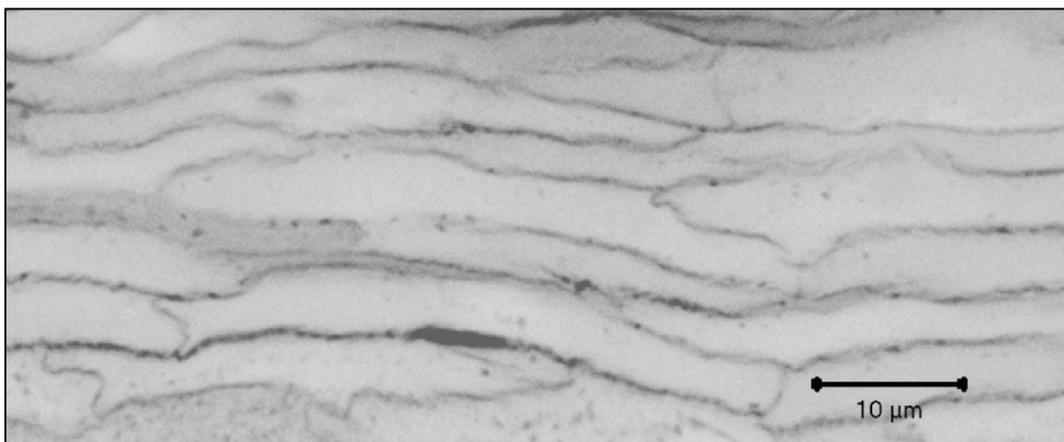


Abb. 2 Mikroskopischer Querschnitt durch das humane Stratum corneum (Talreja et al. 2001).

Das *Stratum corneum* stellt die Hauptbarriere der Haut dar. Seine komplexe Struktur bedingt die vielfältigen Funktionen der Haut, wie Schutz vor physikalischen, chemischen sowie biologischen Noxen der Umwelt und die Minimierung des epidermalen Wasserverlustes. Die Hornzellen zeigen eine besondere Anordnung, welche dem Aufbau in einer Ziegelmauer ähnelt. Dabei wird die Lipidsubstanz in den Interzellularräumen zwischen den Hornzellen mit dem Mörtel zwischen den Steinen einer Ziegelmauer („brick and mortar model“) verglichen (Michaels et al. 1975). *Desmosomen* halten die *Corneocyten* zusammen und stabilisieren die Struktur des SC. Der proteolytische Abbau der *Corneodesmosomen* im äußeren Bereich des SC bewirkt eine Schwächung der Bindungskräfte zwischen den *Corneocyten* und fördert damit den Mechanismus der Abschuppung der äußersten Zellschichten des *Stratum corneum* (Egelrud, 2000).

Während in den Schichten der lebenden Epidermis polare Lipide wie Phospholipide und Glykolipide dominieren (Wertz et al. 1983a&b), findet man im SC vorwiegend Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol, sowie Derivate des Cholesterols. Die stoffliche Zusammensetzung dieser Lipidschicht spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barriereigenschaften des SC (Mao-Quiang et al. 1993, Norlen et al. 1999).

Die für die Hautbarriere essentiellen lamellaren Schichten konnten von Breathnach et al. erstmals elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Breathnach et al. 1973 & 1975). Ein methodischer Durchbruch war die RuO₄-Nachfixierung, durch welche die Strukturen des SC wesentlich detaillierter abgebildet werden konnten. Man konnte die „lamellar bodies“ sichtbar machen und erkannte eine ungewöhnliche „breit-schmal-breit“-Abfolge der Lipidschichten (Madison et al. 1987, Swartzendruber et al. 1989 & 1992).

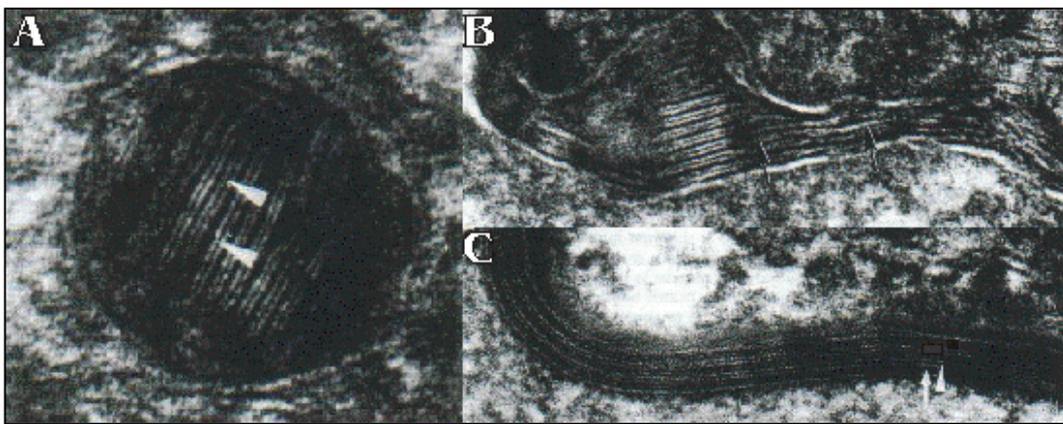


Abb. 3 Mikroskopischer Querschnitt durch Teile der Epidermis (Madison et al. 1987).

A: „lamellar body“. B: Fusion eines „lamellar body“ mit der Plasmamembran.

C: Durchgängige Lipidschichten im enddifferenzierten Stratum corneum.

Die Existenz der lamellaren Strukturen konnte mittels Röntgenstrukturuntersuchungen bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass im *Stratum corneum* zwei lamellare Wiederholabstände dominieren, welche Periodizitäten von 6 beziehungsweise 13 nm aufweisen (White et al. 1988, Bouwstra et al. 1991). Es wird angenommen, dass die 13 nm Struktur im *Stratum corneum* bei der Ausbildung der Barrierefunktion der Haut eine bedeutende Rolle spielt (Bouwstra et al. 1998). Als laterale Anordnung der Alkylketten (Kettenpackung) der SC-Lipide wird eine Koexistenz zum Teil orthorhombisch, hexagonal Orientierungen angenommen, die neben einem Teil fluider Lipidketten vorliegen sollen. Bei Temperaturerhöhung wird eine Abnahme der orthorhombischen Strukturen zu Gunsten einer hexagonalen Anordnung beobachtet. Werden *Stratum corneum* Proben über 90 °C erhitzt, sind nur noch fluide Phasen zu finden. Über eine Tiefenprofilierung des *Stratum corneum* ließ sich feststellen, dass bei physiologischer Temperatur (32 °C) der Anteil der hexagonalen

Kettenpackung im Vergleich zur orthorhombischen Anordnung in den äußeren Schichten des SC dominiert (Pilgram et al. 1998 & 1999). Während im humanen *Stratum corneum* und im SC von Mäusen orthorhombische Subzellen als laterale Strukturen gefunden wurden (White et al. 1988, Garson et al. 1991, Bouwstra et al. 1994), beobachtete man bei Schweinehaut eine hexagonale Orientierung der Alkylketten (Bouwstra et al. 1995). Die Ursachen der gefundenen Strukturunterschiede und mögliche Auswirkung auf die Barrierefunktion der Haut sind noch weitgehend unverstanden. Wenig bekannt ist auch über die mittels spektroskopischen und kalorimetrischen Methoden detektierten Phasenumwandlungen der SC-Lipide (Gay et al. 1994, Ongpipattanakul et al. 1994).

Es existieren derzeit verschiedene Ansätze, mit denen versucht wird, den Aufbau der Lipidschichten modellhaft zu beschreiben. Im „*Domain mosaic model*“ (Forslind, 1994) stellt man sich die Lipidmatrix des *Stratum corneum* als ein diskontinuierliches System vor, indem kristalline Domänen über Lipide flüssigkristalliner Phasen zusammengehalten werden. Modifizierte Varianten dieses Modells schlug Norlen (2001 a, b) vor und betitelte seine Vorstellungen als „*membrane folding model*“ und „*single gel phase model*“. Im „*sandwich model*“ (Bouwstra et al. 2000 & 2001) wird auf die Anordnung der Lipidschichten eingegangen. Nach diesem Modell, welches die elektronenmikroskopisch sichtbare „breit-schmal-breit“-Abfolge der lamellaren Schichten einbezieht, befindet sich innerhalb des 13 nm Wiederholabstandes der SC-Lipidschichten eine fluide Phase (schmal), die von geordneten Lipidstrukturen (breit) umgeben ist. Die Permeation von Substanzen durch das SC soll nach diesem Modell hauptsächlich im Bereich dieser fluiden Phase erfolgen. Experimentelle Ergebnisse liegen zu dieser Vorstellung jedoch noch nicht vor.

Nach dem „*Domain mosaic model*“ von Forslind soll der Permeationsweg entlang fluider Domänen stattfinden. Diese Vorstellung wird von einigen Arbeiten an künstlichen Modellsystemen gestützt, in welchen festgestellt wurde, dass *Stratum corneum* Lipide unter bestimmten Versuchsbedingungen entmischte Phasen bilden. Diese konnten sowohl mit Hilfe der DSC als auch mit spektroskopischen Methoden festgestellt werden (Wegener et al. 1996 & 1997). Percot et al. (2001) konnten phasenseparierte *Stratum corneum* Lipide über die Raman-Mikroskop-Technik abbilden. Mit AFM-Experimenten an Monoschichten aus *Stratum corneum* Lipiden konnten die separierten Phasen ebenfalls sichtbar gemacht werden (Ekelund et al. 2000; Engström et al. 2000; Sparr et al. 1999 & 2001b).

Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen sind in der Literatur beschrieben. Hiermit konnte festgestellt werden, dass Calciumionen zur Fusion von aus *Stratum corneum* Lipiden präparierten Liposomen in lamellare Schichten führen (Abraham et al. 1987 & 1988). Weitere

Erkenntnisse lieferten NMR-Experimente an Volumenphasen (Abraham et al. 1992), mittels derer festgestellt werden konnte, dass *Stratum corneum* Lipidmischungen bei Temperaturen oberhalb 60 °C invershexagonale Strukturen (H_{II} -Phasen) ausbilden.

Der Sphingolipid-Stoffwechsel

Die *de novo* Synthese der Ceramide findet an der cytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Reticulums (ER) statt. Die Strukturen der Ceramide leiten sich vom Palmitoyl-CoA und L-Serin ab, welche von der Serin-Palmitoyl-Transferase zum 3-Oxosphingamin verknüpft werden. Die 3-Oxosphingamin-Reduktase reduziert die Carbonylgruppe zur sekundären Hydroxylgruppe. Mit einer N-Acyltransferase wird die NH_2 -Gruppe des entstandenen D-Erythro-Sphingamins mit Fettsäure-CoA-estern acyliert. Es entstehen die N-Acyl-Sphinganine (Dihydroceramide). Die Dihydroceramid-Desaturase fügt die *trans*-4,5-Doppelbindung ein. Die Ceramidase spaltet die Fettsäure vom Sphingosin ab. Die Ceramid-Synthase verknüpft die Amidbindung.

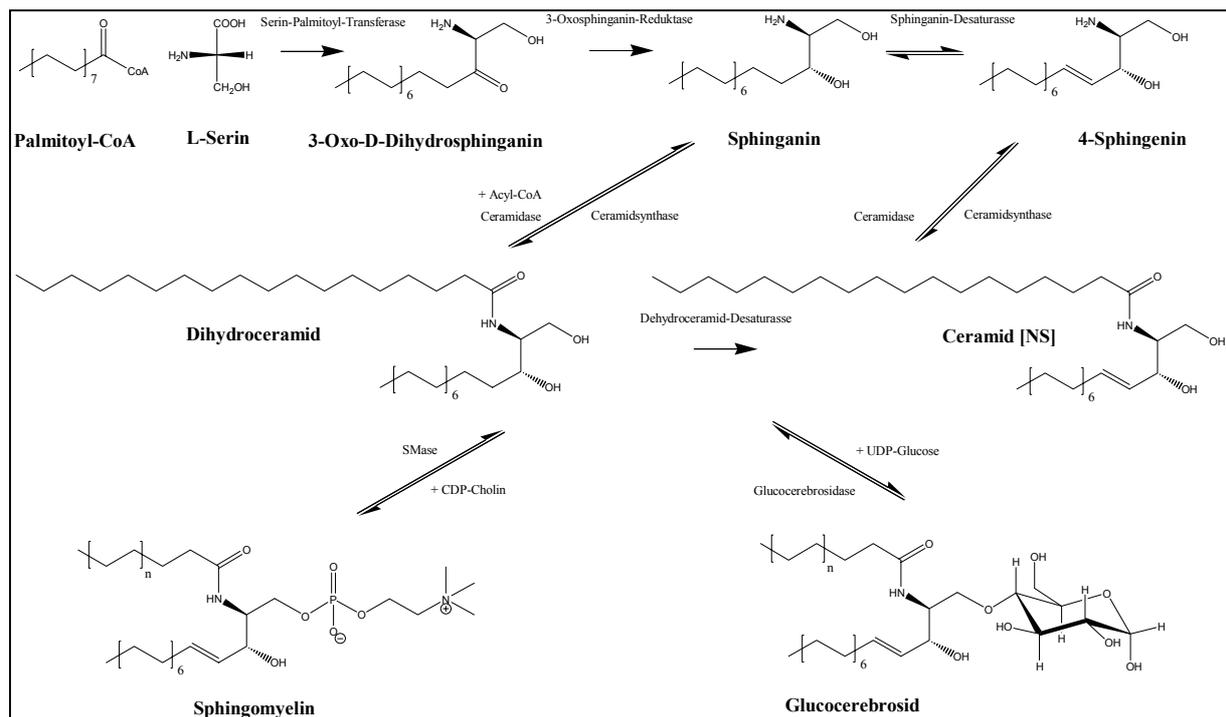


Abb. 4 Biosynthese der Ceramide im Säugetierorganismus

Werden die Ceramide im *Golgiapparat* an ihrer primären Hydroxylgruppe glycosidiert, bilden sich die Glycosphingolipide (Cerebroside) (Madison et al. 1998). Die durch Saposin C (Sphingolipid Aktivator Protein) regulierte Glucocerebrosidase spaltet die Cerebroside (Wilkening et al. 1998, Doering et al. 1999a). Durch Reaktion mit CDP-Cholin werden aus den Ceramiden die Sphingomyeline (SM) gebildet. Die Sphingomyelinase spaltet die SM zu

den Ceramiden (Mathias et al. 1998; Sandhoff et al. 1998). Neben den Glucocerebrosiden, der Hauptvorstufe der epidermalen Ceramide, werden bestimmte Ceramide des SC durch Spaltung von Sphingomyelinen gebildet (Uchida et al. 2000).

Die Lipid-Zusammensetzung der epidermalen Zellen ändert sich, wenn sie im Zuge ihrer Differenzierung zur Körperoberfläche wandern. Die Zellen der basalen Schicht (*Stratum basale*) besitzen eine sehr komplexe Lipidzusammensetzung mit Phospholipiden als Hauptkomponente. Im *Stratum granulosum* ist der Gehalt an Phospholipiden vermindert, während der Gehalt an Cerebrosiden (Glycosylceramide), Ceramiden, Cholesterol und Cholesterolsulfat als ein Ergebnis der *de novo* Synthese und der Einlagerung in die *Lamellar bodies* höher liegt. Glycosylceramide sind die Hauptvorstufe der epidermalen Ceramide. Sie werden zusammen mit anderen polaren Lipiden (Sterole, Phospholipide) und verschiedenen Hydrolasen über spezialisierte sekretorische Zellorganellen, den sogenannten *Lamellar bodies*, transportiert. Durch die lysosomale Lipidhydrolasen werden die hydrophilen Lipide in hydrophobere Lipide gespalten. Beim Übergang vom *Stratum granulosum* (SG) zum *Stratum corneum* (SC) fusionieren die *Lamellar bodies* mit der Plasmamembran und extrudieren ihren Inhalt in den Extrazellularraum des SC (Landmann, 1986, Downing, 1992). Die im *Stratum corneum* vorliegenden Lipidmischungen weisen einen sehr hohen Gehalt an Ceramiden (35-40 %) und freien Fettsäuren auf. Phospholipide und Cerebroside sind dagegen nur in Spuren nachweisbar (Gray et al. 1975, Lampe et al. 1983).

Eine genetische Störung des Sphingolipidstoffwechsels kann aufgrund seiner Komplexität auf verschiedenen Ebenen erfolgen und kann zu verschiedenen pathologischen Zuständen, den Glycosphingolipidosen führen (Schuette et al. 1999, Schmuth et al. 2000). Ist die Umwandlung der Cerebroside in die Ceramide gestört, etwa durch einen partiellen Defekt der β -Glucocerebrosidase, wird eine normale Ausbildung der Epidermis unmöglich. Die betroffenen Säuglinge (*collodion babies*), welche eine nasse Körperoberfläche, mit drastisch eingeschränkter Barrierefunktion aufweisen, sterben kurz nach der Geburt aufgrund des hohen Flüssigkeitsverlustes. Mit der entsprechenden Punktmutation generierte *knock-out*-Mäuse zeigen ebenfalls eine abnorme Hautausbildung und sterben 24 Stunden nach der Geburt. Durch analytische Bestimmung der Lipidzusammensetzung der Haut dieser *knock-out*-Mäuse konnte ein hoher Gehalt an Glucosylceramiden zugunsten eines erniedrigten Ceramidanteils nachgewiesen werden (Doering et al. 1999b).

Ceramide des Stratum corneum

Während Ceramide in fast allen Geweben des Organismus vorkommen und schon in geringen Konzentrationen als Signalsubstanzen fungieren (Sawai et al. 1999), liegt ihre Bedeutung im *Stratum corneum* in der Ausbildung einer Lipidbarriere begründet. Die im SC vorkommenden Ceramide zeichnen sich durch eine ausgesprochene strukturelle Heterogenität aus. Gemeinsam ist allen Ceramiden, dass sie aus Sphingoidbasen aufgebaut sind, deren Stickstoffatome mit Fettsäuren amidiert sind. Bei den Sphingoidbasen der *Stratum corneum* Ceramide unterscheidet man Phytosphingosine (4-Hydroxysphinganine), Sphingosine (Sphingenine und Sphinganine) und die 6-Hydroxysphingosine. Für die Bindung am Stickstoffatom kommen Nonhydroxy-, α -Hydroxy- und ω -Hydroxyfettsäuren in Betracht. Letztere können mit einer weiteren Fettsäure verestert sein. Unter den in der Natur vorkommenden α -Hydroxyfettsäureceramiden existieren nur die D-Komponenten (Karlsson et al. 1974).

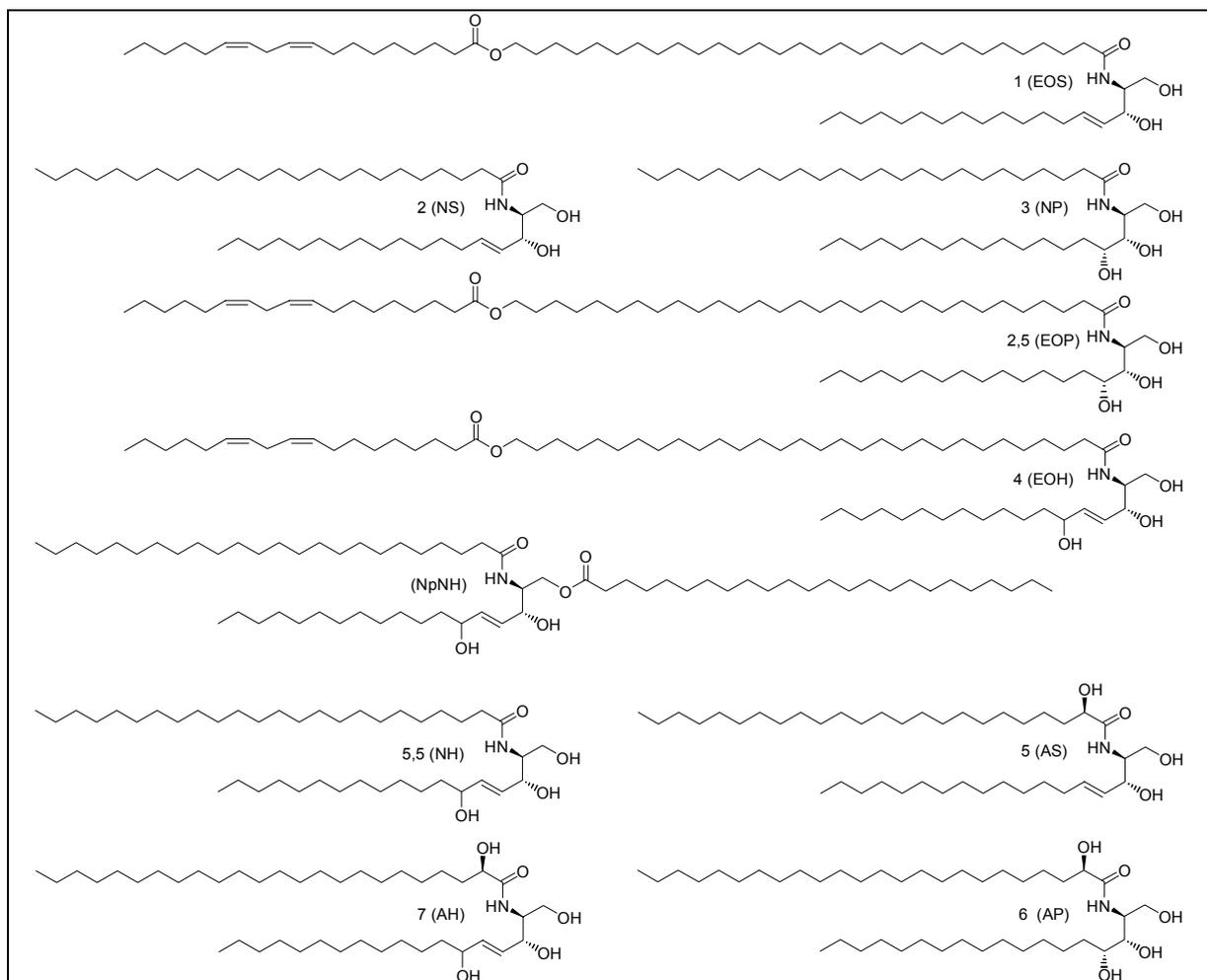


Abb. 5 Identifizierte molekulare Strukturen der aus dem Stratum corneum extrahierbaren Ceramide (Chopart et al. 2002). Die Zahlen entsprechen der Klassifizierung in Anlehnung an das chromatographische

Laufverhalten (Stewart et al. 1999). Die Bezeichnungen nach Motta et al. (1993) wurden in Klammern gesetzt.

Die mit polaren Lösungsmitteln extrahierten Lipide wurden anhand ihres chromatographischen Laufverhaltens in sechs Klassen aufgetrennt. Diesen Lipidbanden wurden chemische Strukturen zugeordnet. Durch ständige Fortschritte auf dem Gebiet der Lipidanalytik änderten sich die Ansichten über die Ceramid Zusammensetzung im *Stratum corneum* in den vergangenen Jahren. Da die neu gefundenen Ceramidstrukturen die Hauptkomponenten in den Ceramidfraktionen waren, musste die Auffassung über das Ceramidmuster aufgrund der Fehlinterpretationen der Lipidbanden mehrmals grundlegend novelliert werden. Zur quantitativen Zusammensetzung der Lipidfraktionen liegen in der Literatur sehr verschiedene, kontroverse Angaben vor (Robson et al. 1994, Stewart et al. 1999, Chopart et al. 2002). Die Ceramiden [AH], [AP], [NH] und [NP] stellen nach gegenwärtigem Kenntnisstand die mengenmäßig größten Fraktionen dar. Auf eine prozentuale Darstellung soll in diesem Zusammenhang verzichtet werden.

Die aktuelle Einteilung nach Stewart & Downing (1999) anhand der chromatographischen Mobilität umfasst den Zahlenbereich 1 bis 7 und enthält auch gebrochene Zahlen. Eine generell gültige Terminologie, die sich an der chemischen Struktur der Ceramide orientiert, führten Motta et al. 1993 ein. Dabei gibt ein kombinatorisches Buchstabensystem die Struktur der Ceramide wieder. Der letzte Buchstabe bezeichnet nach dieser Terminologie die Struktur der Sphingoidbase (S-Sphingosin, P-Phytosphingosin und H-6-Hydroxysphingosin). Die amidierten Fettsäuren können über ihre Hydroxylierung unterschieden werden. Fettsäuren ohne Hydroxylgruppe werden mit N bezeichnet (nonhydroxy). Omegahydroxyfettsäuren erhalten den Buchstaben O und α -Hydroxyfettsäuren den Buchstaben A.

Nach diesem System werden Ceramide mit Cer[EOS] bezeichnet, wenn an ein Ceramid mit einer Sphingosinseitenkette eine Omegahydroxyfettsäure gebunden ist, an deren Omega-Hydroxylgruppe eine weitere Fettsäure über eine Esterbindung verknüpft ist. Mit Cer[NP] wird das Amid einer Nonhydroxyfettsäure mit Phytosphingosin und mit Cer[AH] das mit einer Alpha-Hydroxyfettsäure verknüpfte 6-Hydroxysphingosin benannt. Erst kürzlich wurden Ceramide einer weiteren Ceramid-Spezies aus humanem Stratum corneum isoliert, welche aus 6-Hydroxysphingosin aufgebaut sind, die mit einer Nonhydroxyfettsäure amidiert und mit einer weiteren Nonhydroxyfettsäure am primären Hydroxylsauerstoff der Sphingoidbase verestert sind (Chopart et al. 2002). In Anlehnung an Motta wird für diese Struktur die Abkürzung Cer[NpNH] eingeführt.

Nach der Extraktion der *Stratum corneum* Lipide bleibt eine esterartig an Proteine der *Corneocyten* gebundene Monoschicht aus Ceramiden zurück. Erst nach alkalischer Hydrolyse können diese freigesetzt und damit der Analytik zugänglich gemacht werden (Wertz et al. 1987, Swartzendruber et al. 1987 & 1988, Robson et al. 1994). Über eine spezifische Bindung mit Immunogold Antikörpern konnten Vielhaber et al. (2001) die kovalent an die *Corneocyten*-Oberfläche gebundenen Ceramide elektronenmikroskopisch sichtbar machen. Im direkten Vergleich mit den leicht extrahierbaren SC-Lipiden, die zum Teil fluide Eigenschaften zeigen, bilden die an die *Corneocyten*oberfläche gebundenen Lipide rigidere Strukturen aus (Alonso et al. 2000). Die oberflächlich gebundenen Ceramide leiten sich strukturell vom Sphingosin und 6-Hydroxysphingosin ab, welche mit ω -Hydroxyfettsäuren verknüpft sind (Cer[OS] und Cer[OH]). Von letzteren dominieren einfach ungesättigte mit 32 C-Atomen und gesättigte Fettsäureseitenketten mit 30 C-Atomen in etwa gleichen Anteilen. Es konnte nachgewiesen werden, dass von den potenziell zur Verfügung stehenden Hydroxylgruppen der Ceramide nur die ω -Hydroxylgruppen nicht aber die Hydroxylgruppen der Kopfgruppen mit den Proteinen der *Corneocyten*oberfläche verestert sind. Die Doppelbindung der ungesättigten Acylseitenkette, die in ω -9-Position angenommen wird, soll zur Fluidisierung der distalen Enden der ω -Hydroxyfettsäureketten beitragen und die Kettenlängenunterschiede egalalisieren. Die Formation von Esterbindungen an *Corneocyten*-Proteine soll hierdurch biophysikalisch begünstigt werden (Stewart et al. 2001).

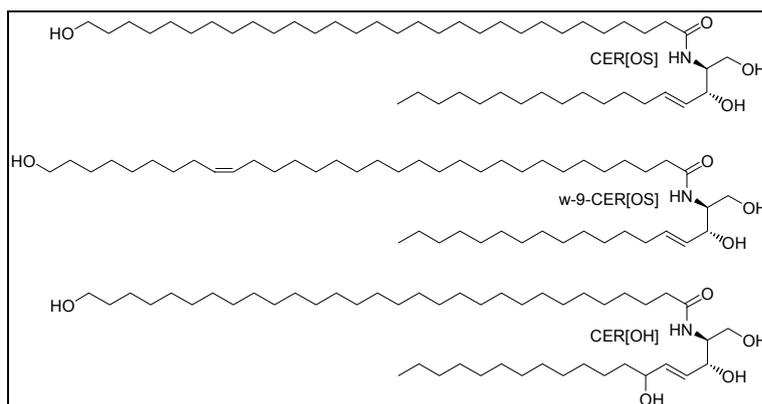


Abb. 6 An die *Corneocyten*oberfläche gebundene Ceramide mit ω -Hydroxygruppe.

Die ω -Acylceramide Cer[EOS] sind im Gegensatz zu den ω -Hydroxyceramiden aus dem *Stratum corneum* extrahierbar. Durch die ω -Acylgruppe, bei der es sich fast ausschließlich um Linolsäure handelt, wird die Fettsäureseitenkette drastisch verlängert. Dieser einzigartigen Lipidstruktur der ω -Acylceramide wird eine große Bedeutung beigemessen. Bei der Ausbildung des lamellaren Wiederholabstandes von 13 nm sollen ω -Acylceramide mehrere

Lipidschichten durchspannen können und damit die essentielle strukturgebende Komponente sein (Bouwstra et al. 1996, 1998 & 2002). Die beiden Doppelbindungen in der Acylseitenkette von CER[EOS] sind von besonderer Bedeutung. Eine Substitution der Linolsäure gegen Ölsäure führt zu einer drastischen Störung der Struktur des SC und der Barrierefunktion (Melton et al. 1987).

Die anteilige Zusammensetzung der verschiedenen Stratum corneum Ceramide spielt eine große Rolle bei der Homöostase der Hautbarriere. Motta et al. (1993 & 1994) konnten in psoriatischer im Vergleich mit gesunder Haut eine verminderte Konzentration an Cer[EOS] feststellen und diese verminderte Cer[EOS] Konzentration mit einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL) korrelieren. Auch an Haut von Patienten mit atopischem Ekzem konnte eine modifizierte Ceramid-Zusammensetzung festgestellt werden (Bleck et al. 1999, Yamamoto et al. 1991).

Strukturelle Eigenschaften der Stratum corneum Lipide

Ceramide

Die Röntgenbeugung an Einkristallen ist die Methode der Wahl, um die Raumstruktur einer Verbindung zu bestimmen. Der limitierende Faktor ist dabei die Züchtung qualitativ hochwertiger Einkristalle, welches sich besonders bei den Lipiden als äußerst schwierig erweist.

Zur Zeit sind lediglich Kristallstrukturen von den zwei Ceramiden N-Tetracosanoylphytosphingosin (C_{24} CER[NP]) und N-(2D,3D-dihydroxyoctodecanoyl)-phytosphingosin in der Literatur verfügbar. Letzteres Ceramid wurde in Pflanzen und Pilzen gefunden und spielt im Säugetierorganismus nach derzeitigem Kenntnisstand keine Rolle. Die Kristallstruktur (Pascher et al. 1992) weist jedoch einige interessante Besonderheiten auf. In der Einheitszelle befinden sich zwei Moleküle, deren Kohlenwasserstoffketten auseinandergestreckt vorliegen und alternierend mit antiparalleler Orientierung angeordnet sind. Die Kopfgruppe wird demzufolge von den Alkylketten abgeschirmt. Die Kettenpackung beider Seiten ist in dieser aufgeklärten Kristallstruktur orthorhombisch senkrecht.

Das auch im SC vorkommende C_{24} CER[NP] weist einen ausgeprägten Polymorphismus auf (Dahlen et al. 1979). Von einer der sechs identifizierten Modifikation konnten Dahlen et al. (1972) die Kristallstruktur bestimmen. In dieser sowie in vier weiteren Modifikationen weisen die Ceramidmoleküle eine V-förmige Konformation auf, in der die C_{18} -Phytosphingosin- und die C_{24} -Fettsäureseitenketten in separaten Subzellen packen. Die beiden Alkylketten eines

Ceramid-Moleküle schließen einen Winkel (α) ein, dessen Spitze die Ceramid-Kopfgruppe bildet. Nur in einer Modifikation sind beide Seitenketten nebeneinander in einer Subzelle angeordnet und schließen folglich keinen Winkel ein.

Des Weiteren sind die Kristallstrukturen des Triacetylspingosins (O'Connell et al. 1969) und verschiedener Glycosphingolipide (Pascher et al. 1977, Nyholm et al. 1990, Abrahamsson et al. 1997) aufgeklärt worden. Aufgrund des erhöhten Platzbedarfs der Kopfgruppen der Glycosphingolipide sind für diese Substanzklasse nur parallele Anordnungen der Alkylketten möglich.

Nach den Strukturinformationen der zitierten Einkristalldaten lassen sich demzufolge prinzipiell drei mögliche Anordnungen der Alkylketten der Sphingolipide unterscheiden:

- parallele Anordnung der Ketten ($\alpha = 0^\circ$)
- gewinkelte Anordnung der Ketten ($0 < \alpha < 180^\circ$)
- gestreckte Form ($\alpha = 180^\circ$)

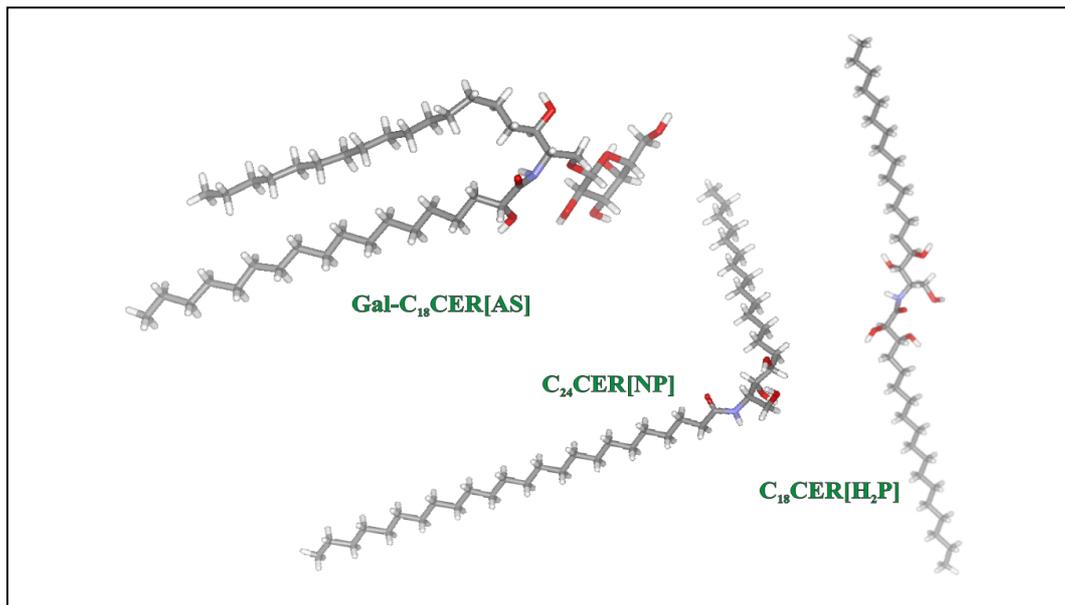


Abb. 7 Aus Röntgeneinkristalldaten ermittelte 3d-Raumstrukturen von Sphingolipiden.

Kettenanordnung parallel: Gal-C₁₈CER[AS] Galactocerebrosid (Pascher et al. 1977).
 gewinkelt: C₂₄CER[NP] Tetracosanoylphytosphingosin (Dahlen et al. 1972).
 gestreckt: C₁₈CER[H₂P] N-(2D,3D-dihydroxyoctodecanoyl)-phytosphingosin (Pascher et al. 1992).

Sha et al. (1995a & b) untersuchten α -Hydroxyfettsäuresphingosine CER[AS] und Nonhydroxyfettsäuresphingosine CER[NS] im hydratisierten und nicht hydratisierten Zustand. Beide Strukturen wurden aus biologischem Material isoliert. Das synthetische Analogon Palmitoylsphingosin C₁₆CER[NS] ist im Rahmen dieser Untersuchungen ebenfalls einbezogen worden. Im Gegensatz zu C₁₆CER[NS] und den natürlichen CER[NS] zeigten die hydratisierten AS-Ceramide eine reversible L β '/H_{II}-Umwandlung. Das Ceramid C₁₈CER[NS] wurde als Monoschicht an der Wasser-Luft-Grenzfläche untersucht und zeigte abhängig vom lateralen Druck orthorhombische und hexagonale Anordnungen (Vaknin & Kelly 2000).

Da die Untersuchung an synthetisch reinen Ceramiden durch das Vorhandensein derselben limitiert werden, bediente man sich in früheren Untersuchungen auch Ceramid-Analoga (O'Connell et al. 1969, Mizushima et al. 1996 & 1997). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich allerdings aufgrund der strukturellen Abweichungen dieser Modellsubstanzen von den Ceramiden nur in beschränktem Maße übertragen.

Cholesterol-Lipid-Wechselwirkungen

Cholesterol ist das wichtigste Sterol höherer tierischer Organismen. Es kommt in den verschiedensten Geweben sowohl frei als auch mit Fettsäuren verestert vor. Eine wesentliche Rolle spielt Cholesterol als Bestandteil von Biomembranen.

Aufgrund der großen Bedeutung von Cholesterol liegen umfangreiche Untersuchungen vor. Die Kristallstruktur von Cholesterol wurde von Shieh et al. (1977), die des Cholesterolmonohydrates (Chol:H₂O) von Craven et al. (1976) bestimmt. Das Phasenverhalten von Cholesterol und Chol:H₂O ist bereits aufgeklärt. Beim Erhitzen von Cholesterol werden bei 39 °C eine fest/fest Umwandlung und bei 150 °C das Schmelzen beobachtet. Chol:H₂O dehydratisiert bei 86 °C in die wasserfreie Form. Ist Wasser neben der dehydratisierten Form vorhanden, wird bei 123 °C ein Übergang in eine smektische, flüssigkristalline Phase beobachtet. Der Schmelzpunkt der smektischen Phase (156 °C) liegt etwas höher als bei wasserfreiem Cholesterol (Small, 1986).

In Biomembranen spielen die Wechselwirkung von Cholesterol mit den anderen vorkommenden Membranlipiden eine große Rolle. In einem Großteil der publizierten Arbeiten werden die Interaktionen von Cholesterol mit Phospholipidmembranen diskutiert. Die Einarbeitung von Cholesterol in natürliche und künstliche Lipidmembranen führt zu verschiedenen Änderungen der Membraneigenschaften. So werden Membranpermeabilität und die laterale Diffusion stark vom Cholesterolgehalt der Membran beeinflusst. Die Umwandlung vom Gel- in den flüssigkristallinen Zustand wird bei Cholesterolzugabe

verbreitert. Flüssigkristalline Strukturen werden durch Cholesterol rigidisiert und geordnete Gelphasen fluidisiert. Die Einarbeitung von Cholesterol in künstliche Lipidsysteme führt zu einer höheren Mischbarkeit der Lipide (Sparr et al. 2001b). In mehreren Untersuchungen führte die Einarbeitung von Cholesterol in Membranen verschiedenster Lipide zu einer Verringerung der Lamellendicke.

Der Mechanismus der Wechselwirkung von Cholesterol mit Membranlipiden ist nur unzureichend verstanden und wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Zwar konnten einige Arbeiten das Vorhandensein von Wasserstoffbrückenbindungen der 3 β -Hydroxylgruppe zu Carbonylsauerstoffatomen der anderen Membran-Lipide nachweisen (Mizushima et al. 1996 & 1997), jedoch wird auch diskutiert, dass diese Wechselwirkung in biologischen Systemen nur von untergeordneter Bedeutung ist. Nach neueren Erkenntnissen werden die Cholesterol-Lipid-Wechselwirkungen mit hydrophoben Effekten in Verbindung gebracht. Die Hydroxylgruppe soll nach diesen Vorstellungen Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen eingehen (Boggs, 1987). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Cholesterol invers-hexagonale Strukturen stabilisieren kann und in verschiedenen flüssigkristallinen Phasen unterschiedliche nichtkovalente Bindungen eingeht (Hayakawa et al. 1998). Die Stabilisierung der Membranen durch Cholesterol wird auf eine Behinderung der Alkylkettenbewegung zurückgeführt (Bhattacharya et al. 2000).

Bei der Ausbildung der lamellaren Strukturen im Stratum corneum wird Cholesterol eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Es wurden bereits zahlreiche Röntgenbeugungsexperimente von Cholesterol mit komplexen Hautlipid-Mischungen natürlichen Ursprungs durchgeführt (Ongpipattanakul et al. 1994, Bouwstra et al. 1991; 1996; 1998). Zu Wechselwirkungen des Cholesterols mit chemisch reinen Ceramiden liegen nur punktuelle kalorimetrische (Wiedmann et al. 1991) und spektroskopische Untersuchungen vor (Wegener et al. 1997; Chen et al. 2001, Velkova et al. 2002). Die mittels Röntgendiffraktometrie durchgeführten Untersuchungen beschränken sich auf wasserfreie Systeme (Ohta et al. 2002) beziehungsweise auf punktuelle Messungen, die keine umfassenden Interpretationen zulassen (Glombitza et al. 2002).

Grundlagen der eingesetzten Messmethoden

Differential Scanning Calorimetry

Thermoanalytische Verfahren erlauben den Einfluss der Temperatur auf die physikalischen Eigenschaften von Substanzen zu messen, während die Substanz einem geregelter Temperaturprogramm unterworfen wird. Die Differential Scanning Calorimetry (DSC) ist die thermoanalytische Methode, bei der Probe und Referenz dem gleichen Temperaturregime unterworfen werden und die Wärmeströme zu Probe und Referenz gemessen werden. Die Differenz der Energiezufuhr wird als Funktion der Temperatur dargestellt. Die von der Probe aufgenommene oder abgegebene Wärme ergibt sich aus den Wärmestromdifferenzen. Das Integral entspricht der Umwandlungsenthalpie der Probe. Bei der leistungskompensierten DSC werden Probe und Referenz einzeln beheizt. Ändert sich im Zuge einer Phasenumwandlung die Wärmeaufnahme der Probe, wird die Heizleistung über die Steuer- und Regeleinheit automatisch geändert, so dass Probe und Referenz die gleiche Temperatur aufweisen ($\Delta T=0$). Die Temperaturdifferenz wird also kompensiert. Damit ist die Wärmestromdifferenz zwischen Probe und Referenz gleich der Heizleistungsdifferenz, die als Funktion der Zeit gemessen wird. Das Messsignal ist folglich für endotherme Reaktionen positiv und für exotherme Reaktionen negativ.

IR- und Raman-Spektroskopie

Die Infrarot (IR)-Spektroskopie und die Raman-Spektroskopie sind Methoden zur Aufnahme von Schwingungsspektren. Die Spektren beider Methoden ergänzen sich gegenseitig zu einem vollständigen Bild über die molekulare Struktur einer Substanz (Wartewig et al. 2002).

Die Grundlage der IR-Spektroskopie ist die Absorption von elektromagnetischer Strahlung im infraroten Bereich. Dabei gehen die Moleküle in einen angeregten Schwingungszustand über. Die Atome bewegen sich um ihre Gleichgewichtslage, ohne dass sich der Gesamtschwerpunkt der Moleküle verschiebt. Eine Schwingung ist nur dann IR-aktiv, wenn mit dem Schwingungsvorgang eine Änderung des Dipolmomentes verbunden ist.

Das Prinzip der Raman-Spektroskopie ist ebenfalls seit langem bekannt. Durch Wechselwirkung von Molekülen mit monochromatischer Strahlung lassen sich Schwingungen indirekt über die Polarisierung der Elektronenhülle anregen und untersuchen. Das Auftreten von zusätzlichen Linien im Streuspektrum verglichen mit dem Spektrum der Lichtquelle wird als Raman-Effekt bezeichnet (Schrader 1995). Aus der Streustrahlung resultieren der IR-Spektroskopie komplementäre Spektren. Man spricht von einer Raman-aktiven Mode, wenn die Schwingung die elektronische Polarisierbarkeit des Moleküls ändert. Substanzen oder Strukturen mit starkem Dipolcharakter bewirken nur eine geringe Ramanstreuung, während unpolare Atomgruppen starke Ramanbanden geben.

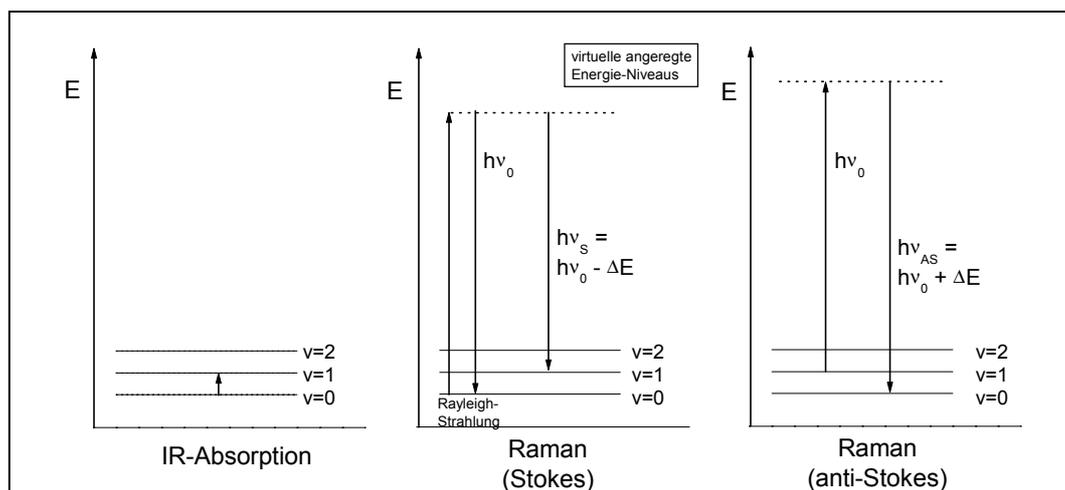


Abb. 2 Wechselwirkungen von monochromatischer Strahlung mit Molekülen.

IR- und die Raman-Spektroskopie eignen sich, um strukturelle Informationen von Lipiden zu charakterisieren und ihre physikochemischen Eigenschaften zu bestimmen (Mantsch 1998, Mendelsohn et al. 1998). Auch für komplexe Systeme natürlichen Ursprungs finden die beiden Methoden Anwendung (Gniadecka et al. 1998).

Prinzipiell unterscheidet man Valenzschwingungen entlang der Bindungsachse und Deformationsschwingungen quer zur Bindungsachse. Durch Kopplung von Schwingungen treten Kombinationsschwingungsbanden auf.

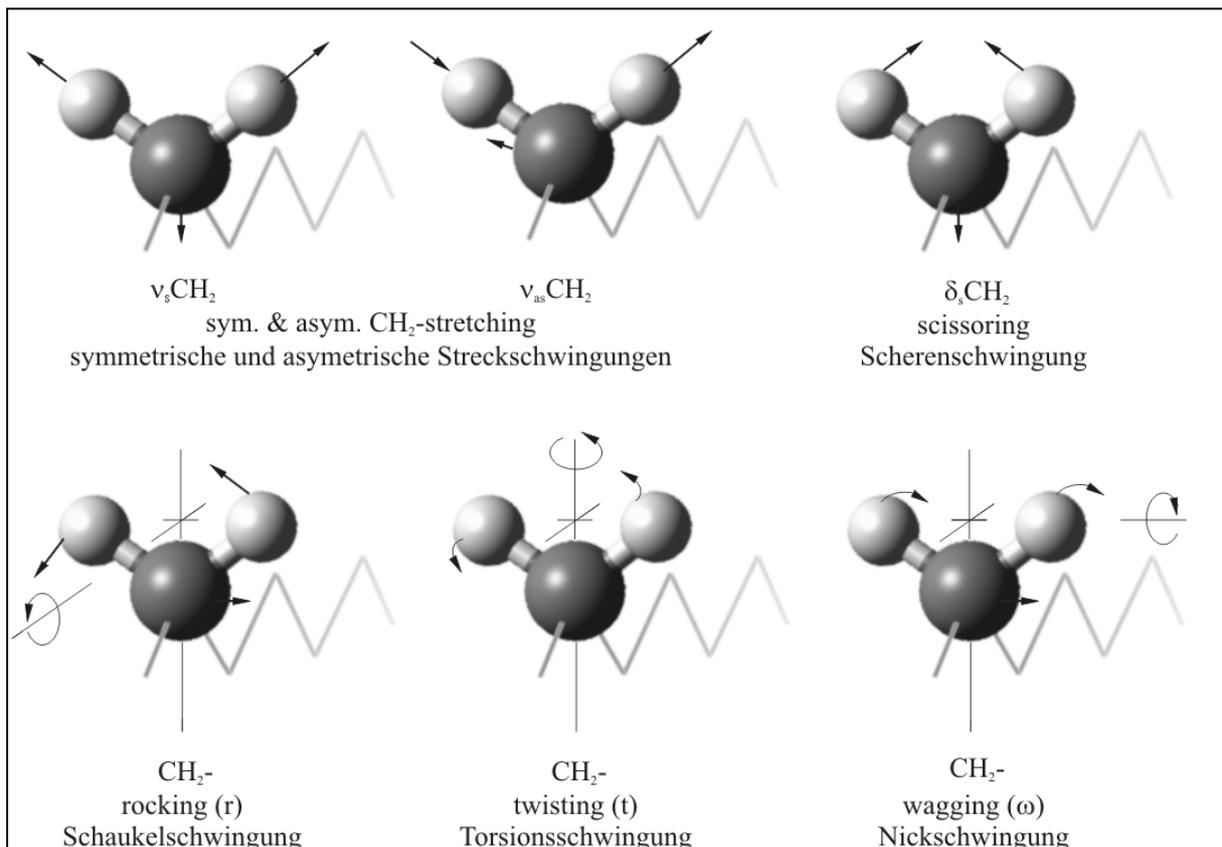


Abb. 3 Normal- und Deformationsschwingungen der CH₂-Gruppen in Alkylketten (modifiziert nach Günzler et al., 1996). Die Pfeile symbolisieren die Richtung der Auslenkung der Atomkerne.

Mit der Raman-Spektroskopie lassen sich auch Kristallgitterschwingungen bestimmen, die bei Wellenzahlen $< 400 \text{ cm}^{-1}$ lokalisiert sind. Bei den longitudinalen akustischen Moden (LAM) schwingt das gesamte Molekül über die gestreckte, all-trans-konformierte Alkylkette. Die Schwingung wird deshalb auch als „accordion-like motion“ bezeichnet (Schaufele et al. 1967). Die Bandenposition der LAM wird durch die Länge der Kette und die Masse der Endgruppen bestimmt (Minoni et al. 1982 & 1984).

Die Raman-Spektroskopie ist eine nützliche Methode, um lange Alkylketten enthaltende Verbindungen hinsichtlich ihrer Struktur zu charakterisieren (Mendelsohn et al. 1989). Im festen Zustand zeichnen sich die langen Kohlenwasserstoffketten durch eine transplanare Struktur aus (*all-trans*). Neben dieser hoch geordneten zick-zack-Anordnung existieren geringe Anteile mit konformativen Störungen (*gauche*-Konformere). Die Atomgruppen der *gauche*-Sequenzen enthaltenden Kohlenwasserstoffketten zeichnen sich durch ein anderes Schwingungsverhalten aus als Alkylketten in *all-trans*-Konformation. Als strukturelle Parameter zieht man zur Auswertung der Raman-Spektren deshalb verschiedene konformationsempfindliche Banden heran, um den Anteil an *gauche*-Konformeren (G) neben den *trans*-Konformeren (T) zu bestimmen.

Der spektrale Bereich zwischen 2800 und 3000 cm^{-1} setzt sich aus Fundamentalschwingungen der symmetrischen und antisymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungen und Obertönen von Deformationsschwingungen in Fermiresonanz zusammen (Abbate et al. 1982 & 1984). Zur Auswertung des G/T-Verhältnisses werden die Bandenpositionen der CH_2 -Valenzschwingungen und deren Intensitätsverhältnisse genutzt. Zusätzlich zu den ebenfalls IR-aktiven CH_2 -Valenz- und Deformationsschwingungen können zur Auswertung die C-C-Gerüstschwingungen herangezogen werden, welche sehr sensitiv auf konformative Änderungen der Alkylketten reagieren. Phasenumwandlungen, die mit Änderungen im G/T-Verhältnis verbunden sind, können durch sprunghafte Änderungen der konformationsempfindlichen Parametern erkannt werden (Kirchoff et al. 1987).

Im Bereich zwischen 850 und 900 cm^{-1} werden im Raman-Spektrum Banden beobachtet, die von Kettenend-Bewegungen der Alkylkette herrühren. Die CH_3 -*rocking* Schwingung ruft unter Beteiligung der CC-Streckschwingungen der terminalen C-C-Bindungen eine scharfe Bande bei 890 cm^{-1} hervor, wenn die zwei terminalen C-C-Bindungen *trans*-Konformation aufweisen (tt). Treten stattdessen *gauche*-Konformere am Kettenende auf, zeigt sich im Spektrum eine breite Bande bei 870 cm^{-1} (Brown et al. 1987).

Der Bereich der Deformationsschwingungen ist zwischen 1400 und 1500 cm^{-1} lokalisiert. Die CH_2 -Scherschwingungen treten in diesem Bereich in Fermiresonanz mit Obertönen der IR-aktiven CH_2 -*rocking* Schwingungen. Über diesen Bereich des Spektrums können Aussagen über die Kettenpackungen der Lipide erhalten werden. In diesem Zusammenhang können zwei Anordnungen unterschieden werden.: (a) eine Kette pro Einheitszelle (trikline und hexagonale Kettenpackung) und (b) zwei Ketten pro Einheitszelle (orthorhombische Kettenpackung). Befinden sich zwei Ketten in der Einheitszelle beobachtet man im Raman-Spektrum eine Aufspaltung des CH_2 -Scherschwingungsbereichs in drei Banden, die als

Faktorgruppenaufspaltung bezeichnet wird. In den IR-Spektren beobachtet man in diesem Falle gleichbedeutende Aufspaltungen der CH₂-Scherschwingung und der CH₂-*rocking* Mode. Befindet sich stattdessen nur eine Kette in der Einheitszelle, zeichnet sich der Bereich der Scherschwingungen im Raman-Spektrum durch zwei Banden aus. Die CH₂-Scherschwingung und der CH₂-*rocking* Mode der IR-Spektren zeigen dann jeweils nur eine Bande.

Im Gegensatz zur IR-Spektroskopie, bei der Wasser durch seine starke Absorption störend wirkt, lassen sich aufgrund der niedrigen Ramanstreuung des Wassers auch Proben mit hohem Wassergehalt gut charakterisieren. Prinzipiell ist aber auch die IR-Spektroskopie für wässrige Systeme anwendbar. Dies erfordert jedoch spezielle Anordnungen wie besonders dünne Küvetten oder die Verwendung der ATR-Technik (Chen et al. 2001). Vorteilhaft ist es auch, dass im Gegensatz zur IR-Spektroskopie, Proben durch Glasgefäße vermessen werden können, da Glas sowohl für die Anregungs- als auch für die Streustrahlung durchlässig ist. Aufgrund dieser Vorzüge gestaltet sich auch die Probenpräparation verhältnismäßig einfach.

Im Gegensatz zur Raman-Spektroskopie kann man mit der IR-Spektroskopie Informationen über die Kopfgruppen der Lipide erhalten. Diese polaren Strukturen liefern eine Reihe von intensitätsstarken Banden, wie die Streck- und Deformationsschwingungsbanden der Carbonylgruppen und die Streckschwingungen der Hydroxylgruppen. Mit diesen Banden können beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen und konformative Änderungen an den polaren Atomgruppierungen spektroskopisch verfolgt werden.

Das Schwingungsverhalten von Molekülen lässt sich durch verschiedene Faktoren beeinflussen. Betrachtet man die Molekülschwingung von zwei Atomen mit dem Modell eines eindimensionalen harmonischen Oszillators, der aus zwei Massen m_1 und m_2 besteht, die durch eine mechanische Feder mit der Kraftkonstanten k verbunden sind, ist die Schwingungsfrequenz ν durch folgende Gleichung gegeben:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

Aus der Gleichung ist ersichtlich, dass die Schwingungsfrequenz ν von den Massen der Atome und den zwischen den Atomen wirkenden Bindungskräften abhängig ist (Günzler et al. 1996). Damit kann die Schwingungsfrequenz unter Beibehaltung der Bindungskräfte allein über eine Änderung der an der Schwingung beteiligten Massen, zum Beispiel durch einen Austausch der Atome gegen Isotope, beeinflusst werden. Der Austausch von Wasserstoff

gegen Deuterium führt zu so starken Änderungen im Schwingungsverhalten, dass es möglich ist, die deuterierten und die nichtdeuterierten Strukturen isoliert von einander im Spektrum zu verfolgen.

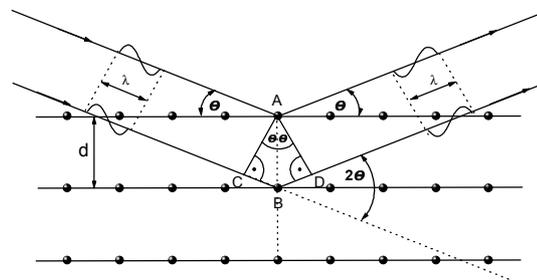
Das Schwingungsverhalten wird ebenfalls von sterischen Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, mesomeren und induktiven Effekten bestimmt. Auch intermolekulare Wechselwirkungen haben einen Einfluss auf das Schwingungsverhalten und damit auf die Schwingungsfrequenz. So kann die Schwingungsfrequenz von Atomgruppen beispielsweise vom Lösungsmittel beeinflusst werden. Ein weiteres Beispiel für intermolekulare Wechselwirkungen sind Assoziate, diese zeichnen sich durch geringe molekulare Wechselwirkungen aus, die sich in einer Beeinflussung der Spektren widerspiegeln. Als Beispiel sei hier die Änderung der Carbonylschwingungsbanden bei Fettsäure-Seifenkomplexen angeführt (Tandon et al. 2001). Ein besonderer Fall der molekularen Wechselwirkungen liegt bei Wasserstoffbrückenbindungen vor. Die Beeinflussung der H-Brückenbindungen zeigt sich in einer langwelligen Verschiebung der O-H- und der C-O-Valenzschwingungen und einer Verbreiterung der Deformationsschwingungsbanden.

Röntgenbeugung

Grundlage dieser Messmethode ist die Beugung von Röntgenstrahlen beim Durchdringen eines Systems mit geordneten Strukturen. Durch die Wechselwirkung eines monochromatischen Röntgenstrahls der Wellenlänge (λ) mit den Atomen einer Netzebenenschar kommt es zum Auftreten eines Maximums im Streudiagramm bzw. einer Schwärzung auf dem Röntgenfilm.

Die einfallenden Röntgenstrahlen erzeugen an jedem Gitterpunkt sphärische Kugelwellen, die sich überlagern und zu einer neuen Wellenfront zusammenlaufen. Je nach Einfallswinkel (θ) der Röntgenstrahlung kann es zur Auslöschung oder Verstärkung der Wellenzüge kommen, die von zwei benachbarten Netzebenen mit dem Netzebenenabstand d_{hkl} hervorgehen.

Bei Pulveraufnahmen enthält das durchstrahlte Probenvolumen ein feinkörniges Kristallmaterial, indem alle für die Interferenzbedingungen notwendigen Einfallswinkel realisiert werden. Zur Verstärkung (konstruktive Interferenz)



kommt es, wenn der Gangunterschied genau der Wellenlänge (λ) oder eines ganzzahligen Vielfachen ($n\lambda$) entspricht. Der funktionelle Zusammenhang wird von der *Bragg'sche* Reflexionsgleichung (1) beschrieben:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta \quad (1)$$

$$d_{hkl} = n\lambda / \sin\theta \quad (2)$$

$$s = D^* = 1/d \quad (3)$$

$$s_{hkl}^2 = D_{hkl}^* = h^2 a^{*2} + k^2 b^{*2} + l^2 c^{*2} + 2kl b^* c^* \cos\alpha^* + 2lh c^* a^* \cos\beta^* + 2hk a^* b^* \cos\gamma^* \quad (4)$$

(* reziproke Variablen)

Aus den Maxima der Streukurven können nach Umformulierung der *Bragg'schen* Gleichung die Netzebenenabstände bestimmt werden (2). Diese sind umgekehrt proportional zu den reziproken Netzebenenabständen (3) und werden mit den *Miller'schen* Indices h , k und l gekennzeichnet. Um ein triklinen Gitter zu indizieren, müssen sechs unabhängige Variablen des reziproken Gitters, die Gitterachsen a^* , b^* , c^* und die Winkel α^* , β^* , γ^* der reziproken Einheitszelle, gefunden werden. Den Netzebenen werden die ganzzahligen, ebenfalls unbekanntes *Miller'schen* Indices (h,k,l) zugeordnet. Diese verknüpfen funktional die

Gitterparameter einer Elementarzelle mit den experimentell ermittelten reziproken Abständen im reziproken Raum (4). Durch das Fehlen von Reflexen nach Auslöschungsregeln erschwert sich die Auswertung noch weiter. Eine Indizierung erfolgt daher leichter bei einfacheren Gittertypen mit höherer Symmetrie (kubisch, orthorhombisch, tetragonal und hexagonal).

Die Aufklärung von Kristallstrukturen langkettiger Verbindungen wird durch die Schwierigkeit ausreichend große Kristalle zu züchten limitiert. Verschiedene Parameter, die Aussagen zur Struktur erlauben, können aus Röntgenpulveraufnahmen abgeleitet werden. Dies ist möglich, da sich bei langkettigen Verbindungen verschiedene Eigenschaften des dreidimensionalen Gitters auf zweidimensionale Gitter reduzieren lassen.

Die Charakterisierung ein- zwei- oder dreidimensionalen Gitter von Lipiden erfolgt zunächst über die Auswertung der Reflexe im Röntgenkleinwinkelbereich. Die verschiedenen Überstrukturen von Lipid/Wasser- Aggregaten (Bischichten, Zylinder, Mizellen, etc.) zeichnen sich durch charakteristische Positionen ihrer *Bragg'schen* Reflexe im Röntgenbeugungsdiagramm aus (Seddon, 1990). Die charakteristischen Abfolgen der reziproken Abstände ($s_{hkl} = 1/d_{hkl}$) sind für verschiedene Überstrukturen im Folgenden zusammengefasst:

1. Lamellar: $s_l = l / d$ (1; 2; 3; 4; ...)
2. Hexagonal: $s_{hk} = 2\sqrt{h^2 + k^2 - hk} / \sqrt{3}a$ (1; $\sqrt{3}$; 2; $\sqrt{7}$; $\sqrt{12}$; $\sqrt{13}$...)
3. Kubisch: $s_{hkl} = \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} / a$ (1; $\sqrt{2}$; $\sqrt{3}$; 2; $\sqrt{5}$; $\sqrt{6}$; $\sqrt{8}$; 3 ...)

Langkettige Lipide zeigen meist schon im nicht hydratisierten, kristallinen Zustand eine lamellare Überstruktur. Zu den hydratisierten lamellaren Strukturen mit geordneten Alkylketten (*all-trans*) zählt man die Gelphase L_β' , die Ripple-Phase und die Subgel-Phase L_C . Als L_α Phasen werden lamellare Lipidstrukturen bezeichnet, deren Alkylketten ungeordnet sind und einen hohen Anteil an *gauche*-Konformeren aufweisen (Nagle et al. 2001).

Bei den hexagonalen Überstrukturen unterscheidet man normale hexagonale Phasen H_I , in der sich die hydrophilen Kopfgruppen am Außenrand der hexagonal angeordneten Röhren befinden und die invers hexagonalen Phasen H_{II} . In Letzteren ordnen sich die hydrophilen Molekülteile der Lipide und Wasser im Röhreninnern und werden von den weniger polaren Strukturen umgeben.

Der Röntgenweitwinkelbereich erlaubt Aussagen über die laterale Anordnung der Lipidketten (Kettenpackung). Zur Bestimmung der Kettenpackung kann ein zweidimensionales reziprokes Gitter zugrundegelegt werden. Die kleinste wiederkehrende Einheit wird dabei als Subzelle bezeichnet (Abrahamsson et al. 1978). Die Anzahl der Variablen wird in einem schiefwinkligen Gitter einer Elementarzelle von sechs auf drei in der Subzelle reduziert.

$$s_{hk}^2 = h^2 a^{*2} + k^2 b^{*2} + 2hk a^* b^* \cos \gamma^* \quad (\text{schiefwinklig})$$

$$s_{hk}^2 = \frac{4}{3} a^{*2} (h^2 + k^2 + hk) \quad (\text{hexagonal})$$

$$s_{hk}^2 = h^2 a^{*2} + k^2 b^{*2} \quad (\text{orthorhombisch})$$

Im graphischen Verfahren nach *Vand* (1948) werden die experimentell ermittelten s -Werte der Reflexe als Kreisbögen mit gleichem Koordinatenursprung in ein zweidimensionales Netz eingezeichnet. In einem indizierten Gitter schneidet jeder Kreisbogen unter Beachtung der Auslöschungsregeln mindestens eine Masche des Netzes.

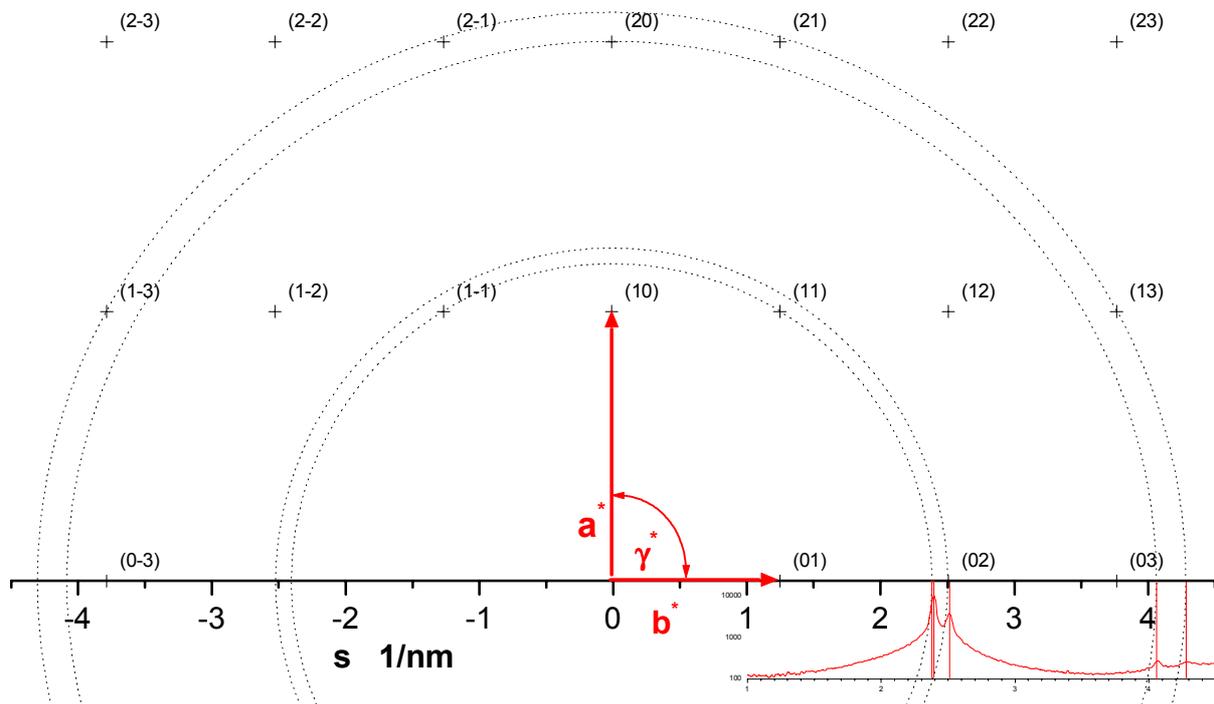


Abb. 8 Graphische Indizierung der Weitwinkelreflexe der deformiert hexagonalen Kettenpackung in der Rotatorphase von *n*-Docosan (40 °C). Die Punkte des zweidimensionalen reziproken Gitters sind mit Kreuzen gekennzeichnet. Darüber befinden sich die dazugehörigen Miller'schen Indices. Zur Veranschaulichung wurde die dazugehörige Röntgenaufnahme in die Abbildung integriert (unten rechts). Die roten Hilfslinien verlaufen durch die Maxima der Beugungsreflexe und entsprechen den Radien der Kreisbögen.

Experimenteller Teil

„Nur dort, wo gewisse Vorgänge (Experimente) auf Grund von Gesetzmäßigkeiten sich wiederholen bzw. reproduziert werden können, nur dort können Beobachtungen, die wir gemacht haben, grundsätzlich von jedermann nachgeprüft werden.“

Sir Karl Raimund Popper

Verwendete Substanzen und Chemikalien

CER[AS] (Ceramid Typ IV; Lot 46H5520) wurde von Sigma Chemie bezogen. Aufgrund der hohen Reinheit, die von Sigma mit >99 % (α -Hydroxyacylsphingosin) angegeben wurde, konnte dieses Ceramid ohne weitere Aufarbeitungsschritte verwendet werden.

CER[NP] (Ceramid III; GBR 24196, Batch: S001) wurde mit einem Gehalt >94 % (berechnet als N-Stearylphytosphingosin (MG: 584,5 g/mol) durch Cosmoferm (Netherlands) zur Verfügung gestellt. Die Substanz wurde in einer Retrosynthese aus biotechnologisch gewonnenen Phytosphingosin und dem Säurechlorid der Stearinsäure hergestellt.

Um die Reinheit zu erhöhen, wurde CER[NP] vor Beginn der Untersuchungen aus THF bzw. einer Chloroform/Methanol-Mischung umkristallisiert.

C_{18:1}CER[NP] (Ceramid Typ III B; Batch: 62380028) mit einem Gehalt >94 % (berechnet als N-Oleoylphytosphingosin (MG: 582,5 g/mol) und C_{18:2}CER[NP] (Ceramid Typ III A; Batch: 62150002) wurden mit einem Gehalt >94 % (berechnet als N-Linolylphytosphingosin (MG: 580,5 g/mol) durch Cosmoferm (Netherlands) zur Verfügung gestellt.

CER[AP] (Ceramid VI, Batch 62110005) wurde mit einem Gehalt >94 % (berechnet als N- α -Hydroxystearylphytosphingosin (AP), MG: 600,0 g/mol) durch Cosmoferm (Netherlands) zur Verfügung gestellt. Die Substanz wurde säulenchromatographisch gereinigt und über einen Lösungsmittelgradienten in D- und L-CER[AP] getrennt. Die CER[AP]-Proben wurden umkristallisiert und über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach beschriebener Aufbereitung wiesen beide Diastereomere eine Reinheit >99 % (berechnet als N- α -Hydroxystearylphytosphingosin (AP), MG: 600,0 g/mol) auf.

Die stereochemische Reinheit beider Diastereomeren wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Hierbei wurden die Substanzen über eine Farbreaktion mit Bromthymolblau nachgewiesen und densitometrisch quantifiziert. Die L-Komponente konnte mit einer

Reinheit >99 % (berechnet als N-L- α -Hydroxystearylphytosphingosin L-CER[AP]) erhalten werden. N-D- α -Hydroxystearylphytosphingosin (D-CER[AP]) zeigte nach beschriebener Aufbereitung noch einen 5-10 %igen Anteil von L-CER[AP].

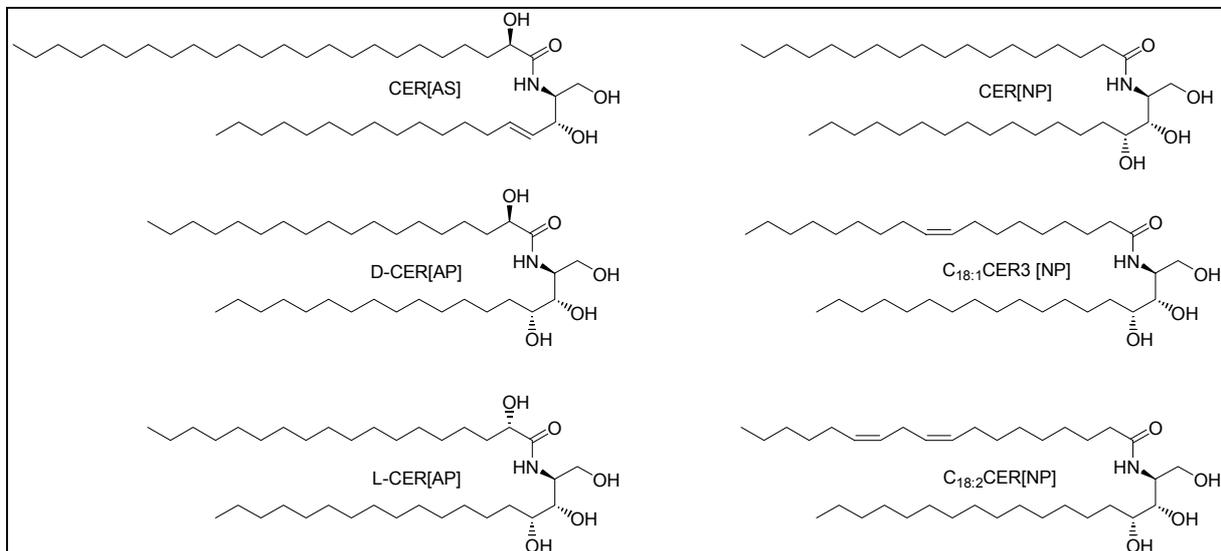


Abb. 9 Strukturformeln und Nomenklatur der untersuchten Ceramide.

Die zur Präparation der Lipidsysteme verwendete Ölsäure wurde mit einer Reinheit >99 % (Ölsäure für biochemische Zwecke; K21110181) von MERCK (Darmstadt, D) bezogen. Natriumoleat und der „Acid-Soap“-Komplex wurden aus obiger Ölsäure mittels Methode nach *Kung* und *Goddard* präpariert (Raudenkolb, Diplomarbeit 1999). Das Phasenverhalten von Ölsäure, Natriumoleat und des „Acid-Soap“-Komplexes wurde in früheren Untersuchungen röntgendiffraktometrisch und schwingungsspektroskopisch charakterisiert (Tandon et al. 2000a, 2000b & 2001).

Cholesterol (LOT 54H8429) wurde mit einer Reinheit >98 % von der Firma SIGMA (Taufkirchen, D) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Die zur Synthese und zur Umkristallisation der Ceramide verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und getrocknet.

Die untersuchten Glycolipide wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie synthetisiert (Schmidt et al. 2002). Die einkettigen Lipide unterscheiden sich in den Zuckerkopfgruppen, den Kettenlängen und der Verknüpfung der Ketten mit der Kopfgruppe. Die Substanzen MS 51, 87 und 88 enthalten Thiaspacer. Die Substanz Gal 16-2 enthält zwei Ethoxyspacer. Gal 20-0 und Gal 16-0 enthalten keine Spacer.

Während es sich bei MS 88 um ein Glucopyranosid und bei MS 87 um ein Desoxypyranosid handelt, enthalten die vier anderen Glycolipide β -glycosidisch verknüpfte Galaktose als Zuckerkopfgruppe. Gemeinsam ist allen untersuchten Glycolipiden die β -glycosidische Verknüpfung an 1-Position des jeweiligen Zuckers.

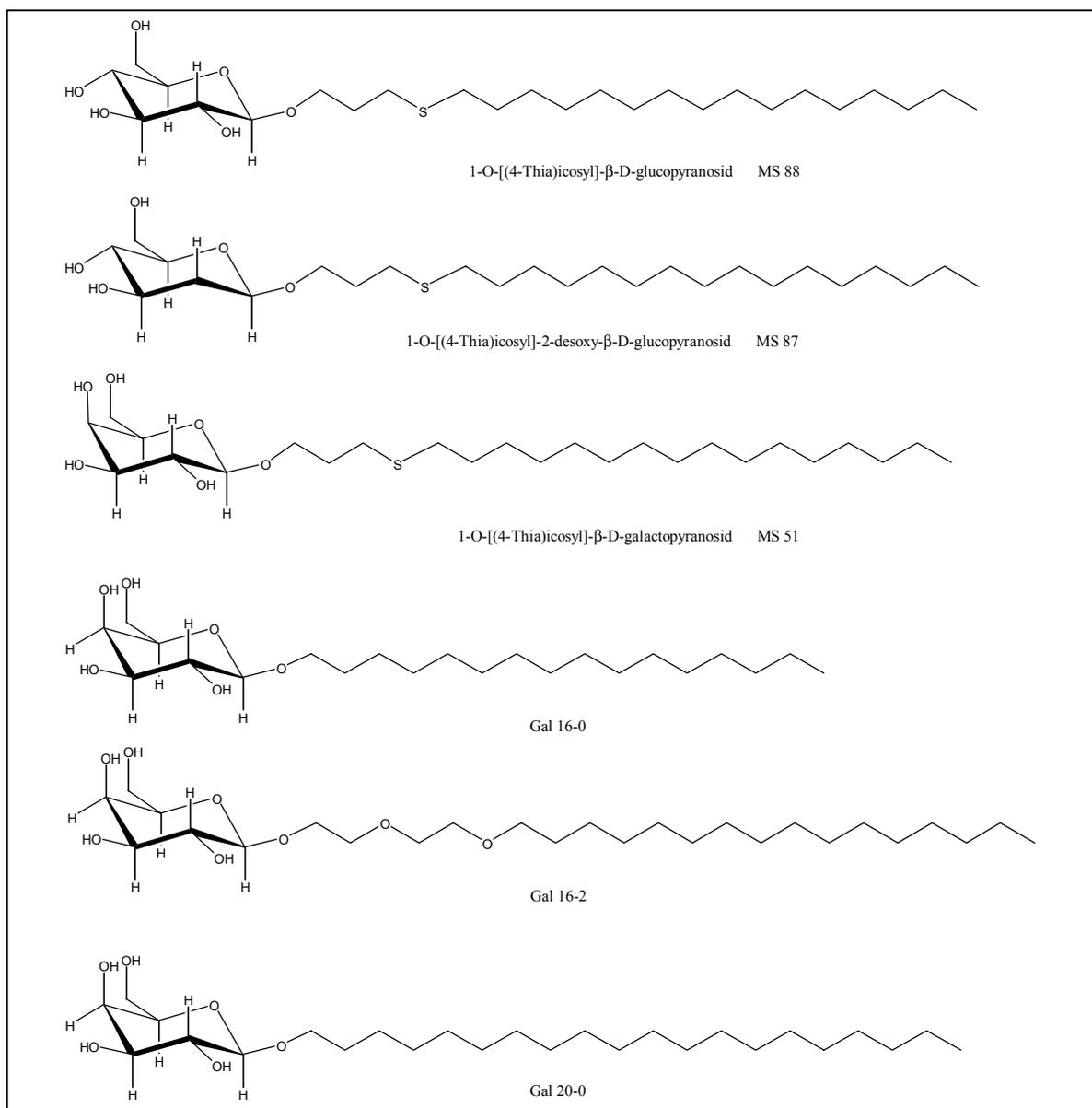


Abb. 10 Strukturformeln und Nomenklatur der untersuchten einkettigen Glykolipide.

Synthese und Analytik des deuterierten CER[NP]

Das partiell deuterierte Ceramid N-d₃₅-Stearoyl-Phytosphingosin (d₃₅CER[NP]) wurde über eine modifizierte Methode nach Müller et al. (2000) in einer Retrosynthese aus d₃₅-Stearinsäure (CDN Isotopes) und Phytosphingosin gewonnen.

Die deuterierte Stearinsäure wurde zunächst mittels FT-Raman-Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Substanz als geringe Verunreinigung (<2 %) Wasserstoffatome enthält. Phytosphingosin (D-ribo-1,3,4-trihydroxy-2-aminooctadecan) wurde von Cosmoferm (Delft, Niederlande) bezogen und konnte aufgrund der hohen Reinheit (>90 %), die dünnschichtchromatographisch überprüft wurde, ohne weitere Aufbereitung zur Synthese eingesetzt werden. Die d₃₅-Stearinsäure und Phytosphingosin wurden vor Beginn der Synthese 24 Stunden über Phosphorpentoxid getrocknet.

Im Gegensatz zu Duclos (2001), welcher mit dem entsprechenden Fettsäurechlorid die Amidverknüpfung durchführte, wurde das auch in der Peptidchemie angewandte Acylierungsreagenz EEDQ (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin) genutzt (Belleau, 1968). Dabei reagiert in einer Einstufenreaktion das aus EEDQ und der Fettsäure intermediär entstehende Mischanhydrid (II) selektiv mit der primären Aminogruppe des Phytosphingosins, ohne das in größerem Ausmaß Ester der primären und sekundären alkoholischen Gruppen entstehen oder Racemisierungen an den chiralen Kohlenstoffatomen stattfinden (Zacharie, 1995). Aufgrund des relativ hohen Preises der deuterierten Stearinsäure wurde mit einem stöchiometrischen Überschuss von EEDQ und Phytosphingosin gearbeitet. Die Reaktion wurde bei 50 °C unter Argonbegasung durchgeführt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgebrochen, als nach 48 Stunden mehr als 90 % der deuterierten Stearinsäure umgesetzt waren. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Wasser gewaschen und an Kieselgel unter Verwendung eines Chloroform/Methanol/THF Gradienten chromatographiert, aus THF umkristallisiert und 72 Stunden über Phosphorpentoxid getrocknet. Identität und Reinheit wurden mittels Elementaranalyse, Massenspektrometrie, DSC, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Röntgenpulverdiffraktometrie und IR-Spektroskopie bestimmt (S. Anhang S. 123ff). Die Zuordnungen der chemischen Verschiebungen der NMR-Spektren erfolgte mit ChemDrawUltra und Literaturangaben (Li et al. 2002). Als Referenz für die analytischen Untersuchungen wurde das undeuterierte CER[NP] verwendet. Die chemische Reinheit des d₃₅CER[NP] kann mit >99 % (berechnet als N-Stearoylphytosphingosin) angegeben werden. Über die Massenspektrometrie konnte ein D-H Austausch an den beiden

α -Kohlenstoffatomen festgestellt werden (ca. 30 % -CDH-CO-, -CD₂-CO-). Diese Isotopenverunreinigung, die in geringerem Maße schon bei der deuterierten Stearinsäure festzustellen war, wird durch die Acidität der α -Methylengruppe hervorgerufen, deren Deuteriumatome in protischen Lösungsmitteln gegen Wasserstoff ausgetauscht werden. Der Einfluss des Isotopenaustausches in α -Position wirkt sich jedoch nicht störend auf die schwingungsspektroskopischen Untersuchungen zum Phasenverhalten aus und ist daher vernachlässigbar. Eine Synthese in deuterierten Lösungsmitteln wäre nicht nur unverhältnismäßig teuer, sondern würde in jedem Fall zum vollständigen Austausch der Wasserstoffatome an den Hydroxylgruppen und der Amidbindung führen und damit die Vergleichbarkeit der IR-Spektren mit denen des nichtdeuterierten CER[NP] erschweren.

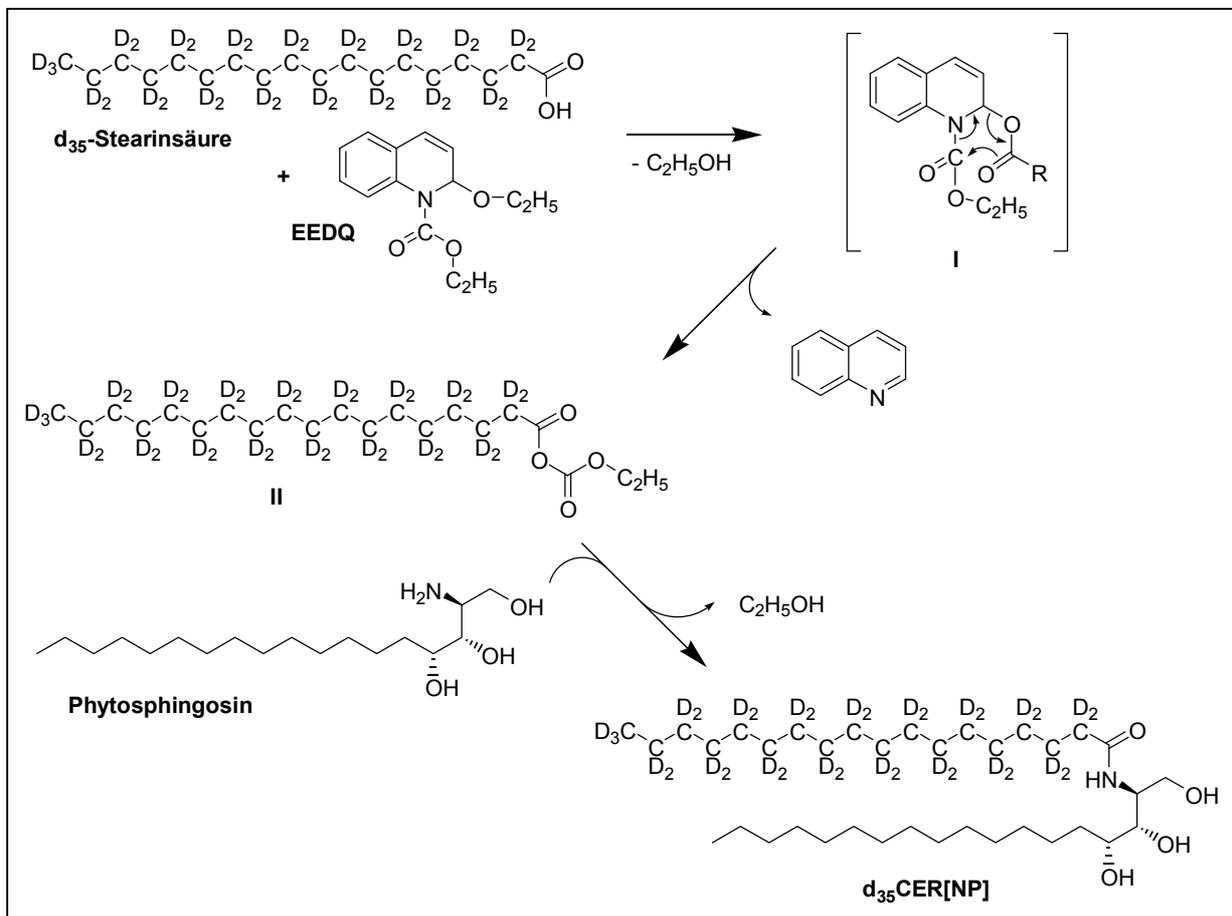


Abb. 11 Synthese von d_{35} CER[NP]

Methoden

Kalorimetrische Messungen

Die DSC-Messungen wurden mit einem Kalorimeter DSC-7 der Firma Perkin-Elmer (Norwalk, Connecticut, USA) durchgeführt. Das DSC-7 ist ein leistungskompensiertes, isoperiboles Kalorimeter, dessen zwei Probenhalter mit trockenem Stickstoff umspült werden. Die zur Enthalpie- und Temperaturbestimmung erforderliche Kalibrierung wurde mit den Standardsubstanzen Indium ($T_S = 429,75 \text{ K}$; $\Delta H = 28,47 \text{ J/g}$) und Wasser ($T_S = 273,15 \text{ K}$; $\Delta H = 334 \text{ J/g}$) durchgeführt. Für die durchgeführten DSC-Messungen wurden die Lipidproben in Aluminiumkapseln mit einer Präzisionswaage (Autobalance AD4 Perkin-Elmer) eingewogen. Zur Korrektur von Gerät- und Kapselschwankungen wurde eine Basislinie, die mit einer gleich hergestellten Leerkapsel aufgenommen wurde, von der Messkurve subtrahiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Analysenprogramms von Perkin-Elmer.

FT-Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektren wurden mit dem FT-Raman-Spektrometer RFS 100 der Firma Bruker (Ettlingen, D) aufgenommen. Als Lichtquelle diente ein Nd:YAG Laser mit der Anregungswellenlänge von 1064 nm. Die am Probenort auftreffende Laser-Leistung betrug 280 mW. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden 200 Scans koaddiert. Die Interferogramme wurden mit einer „Blackman-Harris 4-Term“-Funktion apodisiert und Fourier transformiert. Die mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} erhaltenen Raman-Spektren wurden einer „Zero Filling“-Prozedur (Faktor 2) unterzogen. Die Aufnahme und Auswertung der Raman-Spektren erfolgten mit dem Softwareprogramm OPUS NT (Bruker, Ettlingen).

Die Variation der Proben temperatur wurde mit einem speziellen Glasdewar realisiert in dem die in einem NMR-Röhrchen oder in einer Röntgenkapillare untergebrachte Probe von einem Gasstrom variabler Temperatur umspült wurde. Der Gasstrom wurde mit Hilfe einer Temperaturregeleinheit (Eurotherm) temperiert. Als Gasquelle für die Tieftemperaturmessungen diente verdampfender Stickstoff, für alle Messungen oberhalb 25 °C wurde Pressluft verwendet. Zur Stabilisierung der Messtemperatur wurde die Probe nach Temperaturänderung von 2 K 5 Minuten equilibriert. Die Temperatur der Probe wurde mit Hilfe eines im Regelkreis integrierten Temperaturmessfühlers kontrolliert.

Für die Aufnahme der Röntgenkapillaren wurde eine spezielle Halterung entwickelt. Der Einsatz von Röntgenkapillaren im Vergleich zur Anordnung mit NMR-Röhrchen überzeugte durch einige Vorteile bei gleichbleibender Qualität der Raman-Spektren:

- Eine genauere Justierung der Probe im Strahlengang
- Minimierung des Substanzbedarfs auf etwa 1 mg
- Es ist nur eine Probe für Röntgenbeugung und Raman-Spektroskopie erforderlich. Dadurch wird nicht nur der Substanzbedarf verringert, sondern auch die Vergleichbarkeit der Messmethoden verbessert.
- Der Wassergehalt in der Probe bleibt konstant.
- Durch die geringere Wandstärke der Kapillare (0,01 mm) erfolgt die Wärmeübertragung zur Probe schneller. Die geringere Schichtdicke der Probe verkürzt die Equilibrierzeit nach einem Temperaturschritt.
- Durch den Zeitgewinn kann der Verbrauch an Flüssig-Stickstoff bei Tieftemperaturmessungen reduziert werden.
- Die Kosten einer Kapillare belaufen sich auf ca. 1 €. Ihr Einsatz ist somit deutlich günstiger als die Verwendung der bisher eingesetzten NMR-Röhrchen (ca. 10 €).

FT-IR-Spektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte in Transmissionstechnik mit einem Infrarotspektrometer Vector 22 der Firma Bruker (Ettlingen, D). Das mit einem „Shuttle“ ausgestattete Gerät erlaubte eine abwechselnde Proben- und Leerkanalmessung. Die kristallinen Lipidproben wurden vor Aufnahme der Spektren in einer Kugelmühle vermahlen. Spektren wurden sowohl durch Messung von Kaliumbromid-Presslingen als auch von Verreibungen mit Nujol erhalten. Die Variation der Proben temperatur wurde über beheizbare Bariumfluoridfenster realisiert. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden 32 Scans koaddiert. Die Interferogramme wurden mit einer „Blackman-Harris 3-Term“-Funktion apodisiert und Fourier transformiert. Die mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} erhaltenen IR-Spektren wurden einem „Zero Filling“ (Faktor 2) unterzogen.

Neben der Transmissionstechnik wurden bei Raumtemperatur IR-Spektren mit einem Infrarotspektrometer IFS 28 der Firma Bruker (Ettlingen, D) aufgenommen, das wahlweise mit einer ATR-Zelle oder einer photoakustischen Messzelle Modell 200 MTEC (Ames, USA) betrieben werden konnte.

Die photoakustische Messzelle wurde mit Helium gespült. Die zu untersuchenden Mischungen wurden in spezielle Messing-Probenpfannen überführt und unter Anwendung der "step-scan"-Technik mit Phasenmodulation vermessen. Die Messungen wurden mit Modulationsfrequenzen von 45-195 Hz, einer Modulationsamplitude von $2 \lambda_{\text{HeNe}}(1,25 \mu\text{m})$ und 10 Koadditionen durchgeführt. Als Referenz diente bei allen photoakustischen Messungen eine "Carbon Black"-Probe. Die Interferogramme wurden mit einer „Norton-Beer“-Funktion apodisiert und Fourier transformiert. Die mit einer Auflösung von 10 cm^{-1} erhaltenen IR-PA-Spektren wurden einem „Zero Filling“ (Faktor 2) unterzogen.

Die mit einem Zinkselenidkristall ausgestattete ATR-Zelle wurde vor Beginn der Messungen mit trockener Luft gespült. Von den ATR-Spektren wurde ein Leerspektrum subtrahiert, das vor Beginn der Probenmessung aufgenommen wurde. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden 32 Scans koaddiert. Die Interferogramme wurden mit einer „Blackman-Harris 3-Term“-Funktion apodisiert und Fourier transformiert. Die mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} erhaltenen IR-ATR-Spektren wurden einem „Zero Filling“ (Faktor 2) unterzogen.

Die Auswertung aller IR-Spektren erfolgte ebenfalls mit der OPUS-NT-Software von Bruker.

Röntgenpulverdiffraktometrie

Die röntgendiffraktometrischen Messungen wurden mit der Apparatur STADI P von STOE&CIE (Darmstadt, D) durchgeführt. Als Röntgenquelle diente eine Kupferröntgenröhre, die mit 35 kV und 60 mA betrieben wurde. Mit Hilfe eines Primärstrahlmonochromators (PSD) wurde die Kupfer $K_{\alpha 1}$ Linie ($\lambda = 0,1541 \text{ nm}$) vom Spektrum isoliert. Ein ortsempfindlicher Detektor (PSD) gestattete eine durchgängige Aufnahme im Streubereich von $0 < 2\theta < 44^\circ$ ($0 < s < 4,7 \text{ nm}^{-1}$) mit einer Auflösung von 0.03° ($0,0034 \text{ nm}^{-1}$). Nach jeder Neujustierung des Monochromators wurde der PSD mit den Referenzsubstanzen p-Brombenzoesäure und Korund kalibriert.

Nach Normierung der Beugungskurven auf das Maximum ihrer Primärstrahlintensität wurde von jeder Beugungskurve die Beugungskurve einer leeren Röntgenkapillare subtrahiert. Bei den eingesetzten Röntgenkapillaren handelte es sich um Markröhrchen mit einem Durchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,01 mm. Kristalline Substanzen wurden vor ihrer Messung auf eine Größe von zirka 0,1 mm zerkleinert, um eine Vorzugsorientierung zu vermeiden. Zur Unterstützung der Statistik wurden die Kapillaren während der Messungen um ihre Längsachse rotiert. Die Variation der Proben temperatur wurde durch eine beheizbare Gasphase um die Röntgenkapillare ermöglicht. Die Kühlung erfolgte über einen Wasserkreislauf und bei Messtemperaturen unter $20 \text{ }^\circ\text{C}$ zusätzlich durch verdampfenden Stickstoff.

Zusätzliche Röntgenaufnahmen wurden am Messplatz A2 des *Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB)* am *Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY)* durchgeführt. Bei dem Messplatz A2 handelte es sich um eine doppeltfokussierende Röntgenkamera. Die Monochromatisierung des weißen Synchrotronstrahls erfolgte mit einem Germanium-Einkristallmonochromator, dessen (111)-Netzebene bei einem Streuwinkel von $2\theta = 26.5^\circ$ eine Wellenlänge von 0,150 nm reflektiert. Der Monochromator fokussierte den Strahl durch eine leichte Krümmung in horizontaler Richtung, die Fokussierung in vertikaler Richtung erfolgte über die Krümmung eines vor dem Monochromator horizontal angeordneten Nickelspiegels. Hierdurch ließ sich die Größe des Röntgenstrahles am Ort des Fokus auf etwa 0,5 mm vertikal und 2 mm horizontal einstellen. Die Wellenlänge des auf die Probe treffenden Strahles beträgt fest eingestellte 0,150 nm (etwa 8 KeV). Der Abstand zwischen Probe und Detektor konnte zwischen 5 cm und 300 cm variiert werden.

Zur simultanen Detektion der Reflexe im Klein- und Weitwinkelbereich wurden zwei separate PSD mit unterschiedlichem Abstand zur Probe genutzt. Diese Versuchsanordnung gestattete die Aufnahme von Reflexen im SAXS im Bereich von $0 < s < 0.5 \text{ nm}^{-1}$ und im WAXS von $1,8 < s < 3 \text{ nm}^{-1}$. Die Detektorauflösung betrug im SAXS $0,0014$ und im WAXS $0,005 \text{ nm}^{-1}$. Die Kalibrierung des SAXS PSD erfolgte mit einer Rattail-Probe ($d = 65 \text{ nm}$), die des WAXS PSD über die Weitwinkelreflexe der p-Brombenzoesäure. Nach jeder Änderung der Detektorposition wurde die Kalibrierung wiederholt. Die Versuchsanordnung gestattete ebenfalls temperaturabhängige Messungen. Die Proben wurden in Markröhrchen mit einem Innendurchmesser von $1,0 \text{ mm}$ und einer Wandstärke von $0,01 \text{ mm}$ eingeschmolzen.

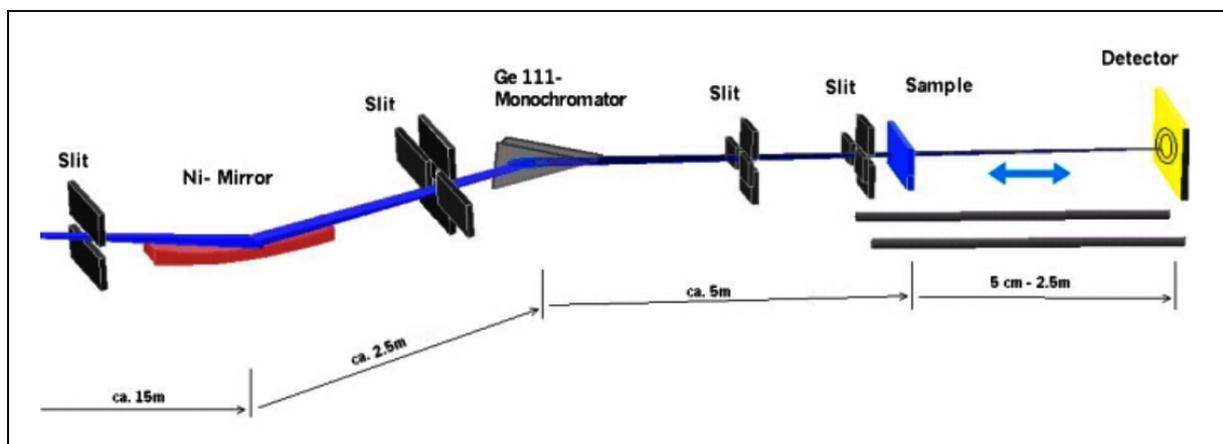


Abb. 12 Versuchsanordnung am Messplatz A2 (HASYLAB, DESY)

Die Auswertung und Bearbeitung der Beugungskurven wurde mit Microcal Origin durchgeführt. Die Intensität der Kurven wurde normiert und eine Leeraufnahme subtrahiert. Zur Erhöhung der Genauigkeit bei der Positionsbestimmung und zur Intensitätsbestimmung der Reflexe wurden diese mittels *Lorentz*-Funktionen gefittet. Die Indizierung der Weitwinkelreflexe erfolgte nach dem grafischen Verfahren von Vand (1948).

Ergebnisse und Diskussion

„Hypothesen sind Netze, nur der wird fangen, der auswirft ...“

Novalis

N-Docosan

Das C_{22} -n-Alkan Docosan wurde als Modell- und Referenzsubstanz im Rahmen der Untersuchungen zum Packungsverhalten der Ceramide charakterisiert. Aus der Literatur war bekannt, dass sich n-Docosan vor dem Übergang von der kristallinen Phase (trikline Kristallzelle, trikline Subzelle) in die Schmelze in eine Rotatorphase umwandelt, in der die Kohlenwasserstoffketten hexagonal ($L\beta'_H$) angeordnet sind (Craievich et al. 1985; Denicolo et al. 1983). In den DSC Heizkurven werden zwei endotherme Umwandlungen detektiert. Die Umwandlungstemperaturen und Enthalpien stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Daten überein (Small, 1986). Auch die Röntgenaufnahmen zeigen beim Aufheizen die bekannte Phasenabfolge.

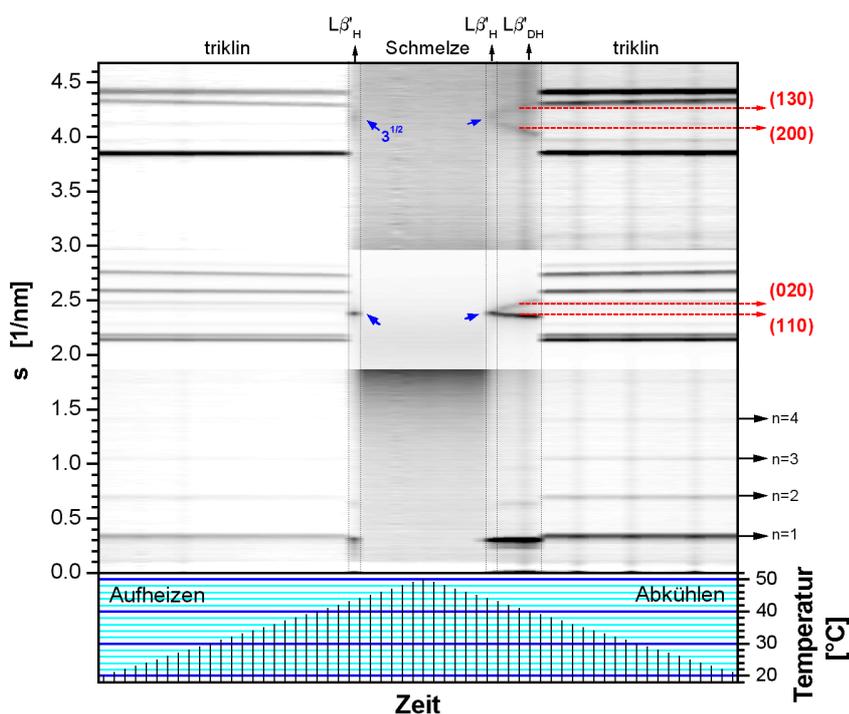


Abb. 13 Röntgenkonturplot (Höhenprofil der Streuintensitäten) von n-Docosan. Der Winkelbereich ist in vier Abschnitte zerlegt, in denen die Streuintensitäten separat skaliert wurden ($0 < \theta < 0,25 < \theta < 1,9 < \theta < 3,0 < \theta < 4,7 \text{ nm}^{-1}$). Im unteren Bildteil ist das Temperaturprogramm dargestellt. Die Phasenbezeichnungen befinden sich über dem Konturplot. Die blauen Pfeile kennzeichnen die Reflexe der hexagonalen Kettenpackung. Die WAXS-Reflexe der Rotatorphase mit deformiert hexagonaler Kettenpackung sind mit den *Miller'schen* Indices gekennzeichnet (rot). Die Reflexe der ersten vier Ordnungen der lamellaren Überstruktur der kristallinen Phase wurden mit schwarzen Pfeilen hervorgehoben.

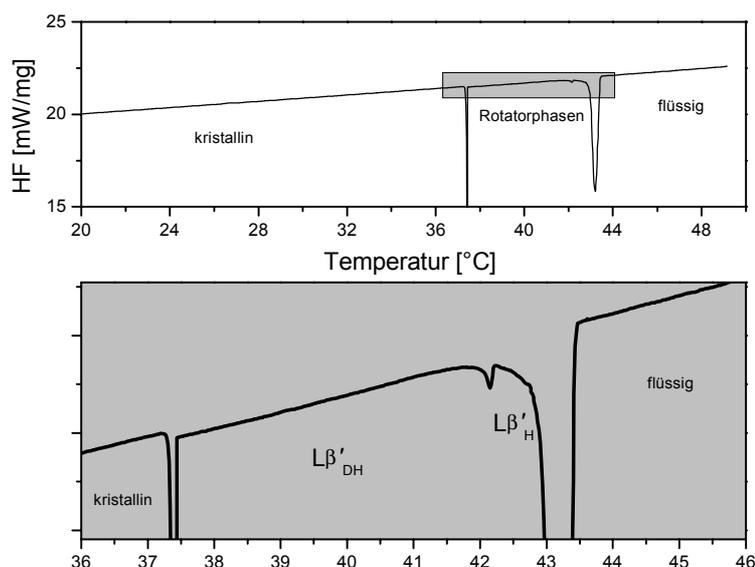
Bis zur ersten Umwandlung ist die Substanz kristallin und zeigt mehrere scharfe Reflexe im WAXS-Bereich. Im Kleinwinkelbereich sind vier äquidistante Reflexe einer lamellaren Überstruktur zu erkennen. Die Rotatorphase wurde bei einer Proben­temperatur von 44 °C erfasst. Im Zuge der Umwandlung der kristallinen Phase zur Rotatorphase verschieben sich die Schichtreflexe im SAXS zu kleineren Winkeln. Die Vergrößerung des Schichtabstandes kommt durch die Änderung der Neigungsachse der Alkylketten zustande. Im Weitwinkelbereich wird nur noch ein Reflex beobachtet, der für eine hexagonale Kettenpackung typisch ist. Der korrespondierende $\sqrt{3}$ -Reflex im Ultraweitwinkelbereich bestätigt die hexagonale Struktur.

Zusätzlich wurde das Phasenverhalten von n-Docosan beim Abkühlen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass aus der Schmelze zunächst die Rotatorphase mit hexagonaler Kettenpackung ($L\beta'_H$) hervorgeht. Aus dieser Phase bildet sich jedoch nicht unmittelbar der kristalline Ausgangszustand. Die Rotatorphase mit hexagonaler Kettenpackung ($L\beta'_H$) wandelt sich zuvor in eine weitere Rotatorphase mit einer deformierten hexagonalen Subzellenpackung ($L\beta'_{DH}$) um. Diese Änderung wird durch die Aufspaltung des WAXS-Reflexes und des $\sqrt{3}$ -Reflexes deutlich. Die Umwandlung von $L\beta'_H$ in $L\beta'_{DH}$ wirkte sich jedoch nicht auf den Wiederholabstand der lamellaren Überstruktur aus. In der Phase $L\beta'_{DH}$ sind kontinuierliche Verschiebungen der Kettenreflexe zu erkennen, während der Schichtabstand keine Änderungen erfährt.

Eine deformierte hexagonale Phase ($L\beta'_{DH}$) wurde bislang nur bei ungeradzah­li­gen n-Alkanen gefunden (Doucet et al. 1981), während für geradzah­li­gen n-Alkane die Existenz dieser Struktur noch nicht beschrieben worden ist. Aus der $L\beta'_{DH}$ Phase geht schließlich bei weiterem Abkühlen die trikline Phase hervor, deren Röntgenreflexe mit denen der Ausgangsstruktur identisch sind.

Die Umwandlung von $L\beta'_H$ zu $L\beta'_{DH}$ konnte ebenfalls mittels DSC nachgewiesen werden. Bei einer Abkühlrate von 5 K/min wird der Umwandlungspeak von $L\beta'_H$ zu $L\beta'_{DH}$ nicht aufgelöst und von der Umwandlung flüssig-isotrop zu $L\beta'_H$ überlagert. Mit Abkühlraten von 1 K/min und kleiner lassen sich beide Peaks gut voneinander trennen.

Abb. 14 DSC Abkühlkurve von n-Docosan, gemessen mit einer Abkühlrate von 0,5 K/min. Um die Gel/Gel-Umwandlung besser darzustellen, ist der grau unterlegte Bereich im unteren Fenster vergrößert abgebildet.



Vergleicht man die Raman-Spektren der kristallinen, flüssigen und der Rotatorphasen, so zeigen diese deutliche Unterschiede. Im kristallinen n-Docosan beobachtet man Bereich der CH_2 -Valenzschwingung bei 2860 cm^{-1} eine kleine Bande, welche ein Charakteristikum der triklinen Kettenpackung darstellt. Diese Bande überlagert sich mit der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung ($\nu_s\text{CH}_2$). Die Verschiebung der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande zu einer niedrigeren

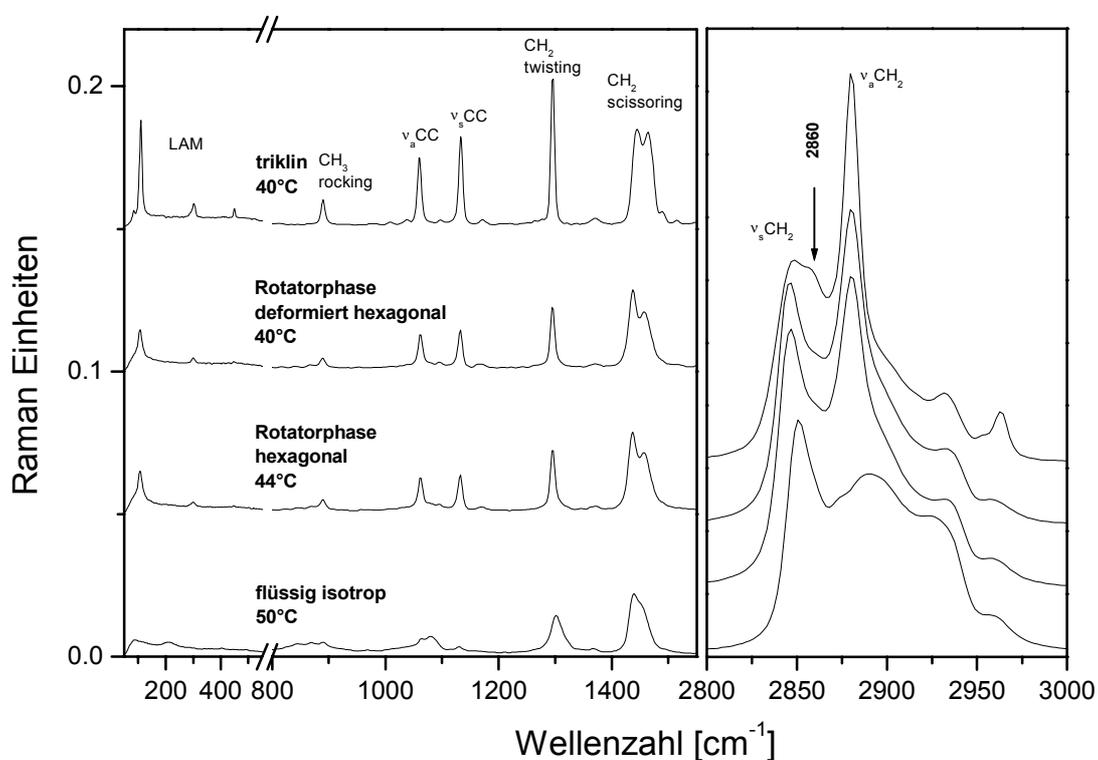


Abb. 15 FT-Ramanspektren und Bandenzuordnung in den verschiedenen Phasen von n-Docosan.

Wellenzahl im Zuge der Umwandlung von der kristallinen zur Rotatorphase ist nicht auf eine Zunahme der *trans*-Konformere zurückzuführen, sondern auf das Verschwinden der Bande bei 2860 cm^{-1} , die weder in den Rotatorphasen noch in der Schmelze zu finden ist.

Ursache dieser Bande sind Kopplungen benachbarter Kohlenwasserstoffketten im kristallinen Zustand (Snyder et al. 1978). Die Zunahme an *gauche*-Konformeren bei der Umwandlung der kristallinen Phase in die Rotatorphase lässt sich stattdessen mit anderen konformationsempfindlichen Banden nachweisen (Strobl et al. 1983; Pink et al. 1980; Snyder et al. 1993). Besonders auffallend sind die Änderungen der Bandenform der CH_2 -twisting Schwingung sowie der Intensitäten der antisymmetrischen CH_2 -Valenzschwingung, der CC-Valenzschwingung und der CH_3 -rocking Schwingung.

Über einen Vergleich der verschiedenen Bandenparameter wird erkennbar, dass die CH_3 -rocking Bande in ihrer Intensität beim Übergang von der kristallinen Phase (*all trans*) in die Rotatorphase mehr beeinflusst wird als die CC-Gerüstschwingungen ($\nu_s\text{CC}$ und $\nu_a\text{CC}$).

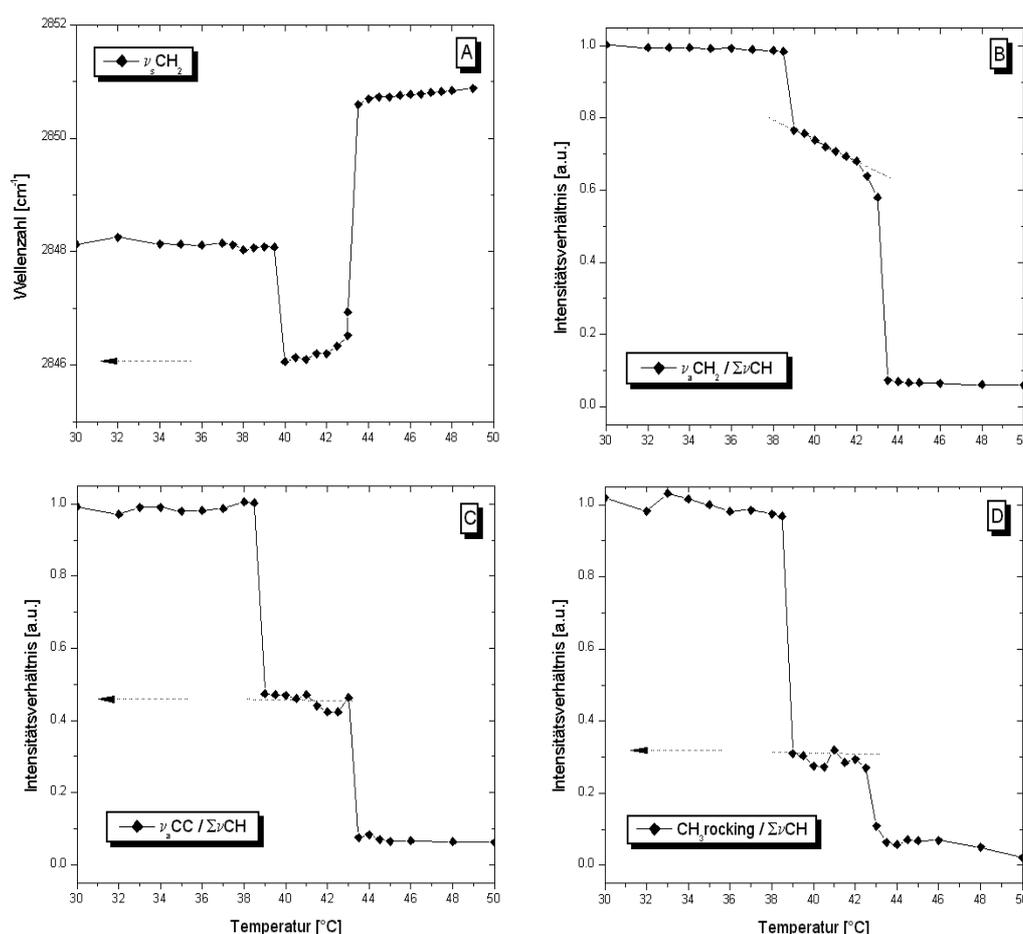


Abb. 16 Änderung von Bandenparametern der Ramanspektren von n-Docosan beim Abkühlen. (A) Position der Bande $\nu_s\text{CH}_2$. (B) Normierte Intensität der $\nu_a\text{CH}_2$ -Bande. (C) Normierte Intensität der $\nu_a\text{CC}$ -Bande. (D) Intensität der CH_3 -rocking Bande. B-C wurden auf die Intensität des νCH -Valenzschwingungsbereiches von $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ normiert. Die Hilfslinien kennzeichnen die $\text{L}\beta'$ -Phase.

Auch die Intensität der $\nu_a\text{CH}_2$ -Bande ändert sich weniger stark als die der CH_3 -rocking Mode. Da die CH_3 -rocking Bande bei 891 cm^{-1} nur vorhanden ist, wenn die zwei äußersten CC-Bindungen trans-Konformation aufweisen (tt) und im Gegensatz dazu sowohl die CC- als auch die CH_2 -Streckschwingungsbanden die konformativen Änderungen der gesamten Kette widerspiegeln, lässt sich schlussfolgern, dass sich in den Rotatorphasen die gauche-Konformere hauptsächlich an den Kettenenden befinden. Dieses Resultat steht im Einklang mit theoretischen Berechnungen (Ryckaert et al. 1987) und spektroskopischen Daten, die von IR-Messungen an spezifisch deuterierten ungeradzahligen n-Alkanen stammen (Maroncelli et al. 1985).

Die CH_2 -Scherschwingungen zeigen bei den Phasenübergängen Änderungen in den Bandenpositionen und Bandenintensitäten, die Änderungen im Packungsverhalten der Alkylketten widerspiegeln (Snyder 1979). In keiner der Phasen ist eine Faktorgruppenaufspaltung der CH_2 -Scherschwingungen zu beobachten. Obwohl die deformiert hexagonale Kettenpackung im engeren Sinne eine orthorhombische Struktur ist, die zwei nichtparallele Ketten in der Subzelle enthält, zeigt diese Phase keine Faktorgruppenaufspaltung. Dies wird auf ein geringeres Kopplungsvermögen der in der Rotatorphase weiter entfernten benachbarten Alkylketten zurückgeführt.

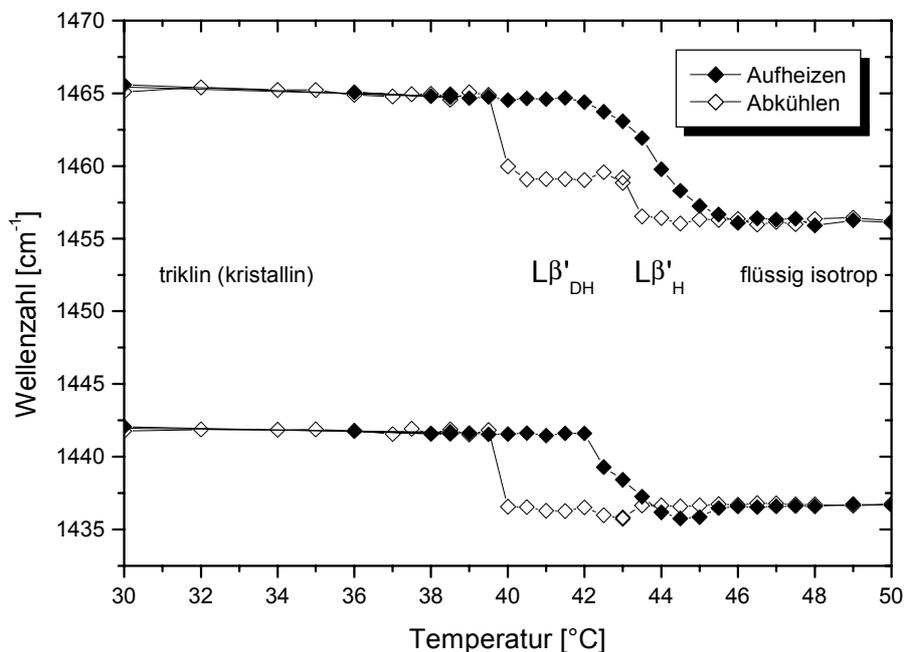


Abb. 17 Temperaturabhängige Verschiebung der Bandenpositionen der CH_2 -Scherschwingung in den FT-Ramanspektren von n-Docosan.

Ceramid AS

Dieses Ceramid stellt ein Amid des Sphingosins mit α -Hydroxyfettsäuren dar und entspricht damit der Struktur des Ceramid 5 [AS] (Siehe S.15f). Dieses kommerziell erhältliche Ceramid wurde durch Hydrolyse einer aus Rinderhirn isolierten Cerebrosidfraktion gewonnen. Aufgrund der durch den natürlichen Ursprung bedingten Schwankungen der Kettenlängen ist dieser Substanz ein multimodales Molmassenspektrum eigen (S. Anhang S.119). Durch thermische Degradation konnten die α -Hydroxyfettsäuren abgespalten werden (Neubert et al.1998). Es zeigte sich, dass die Längen der Hydroxyfettsäuren im CER[AS] von 18 bis 26 Kohlenstoffatomen variieren, während die Sphingosinketten einheitlich 18 Kohlenstoffatome enthalten. Die Hauptfraktion stellt das eine Fettsäurekette mit 24 Kohlenstoffatomen enthaltende α -Hydroxytetracosanoylsphingosin (MG: 666 g/mol) dar.

Eine Phasenseparation, die durch die unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen bedingt ist, konnte nicht beobachtet werden. Röntgenbeugungsaufnahmen zeigen im Kleinwinkelbereich eine Folge vier äquidistanter Beugungsmaxima, die eine einheitliche lamellare Überstruktur widerspiegeln. Aus den

Reflexlagen wurde ein Schichtabstand von 6,02 nm (20 °C) bestimmt.

Im Weitwinkelbereich werden drei intensitätsstarke Reflexe beobachtet, die eine hohe Ordnung der Alkylketten anzeigen.

Beim Erhitzen von CER[AS] bis zum Schmelzpunkt erfahren diese Reflexe ebenso wie die Kleinwinkelreflexe nur geringe Änderungen.

Wird der Schmelzpunkt erreicht, verschwinden sowohl die scharfen Klein- als auch die Weitwinkelreflexe. CER[AS] schmilzt bei einer Temperatur von 95,6 °C unter einem drastischen Anstieg von gauche-Konformeren und einem vollständigen Zusammenbruch der lamellaren Überstruktur zu einer isotropen Flüssigkeit. Im Kleinwinkelbereich wird ein breiter Reflex mit einem Maximum bei 0,32 nm⁻¹ und im Weitwinkelbereich ein ebenfalls breiter

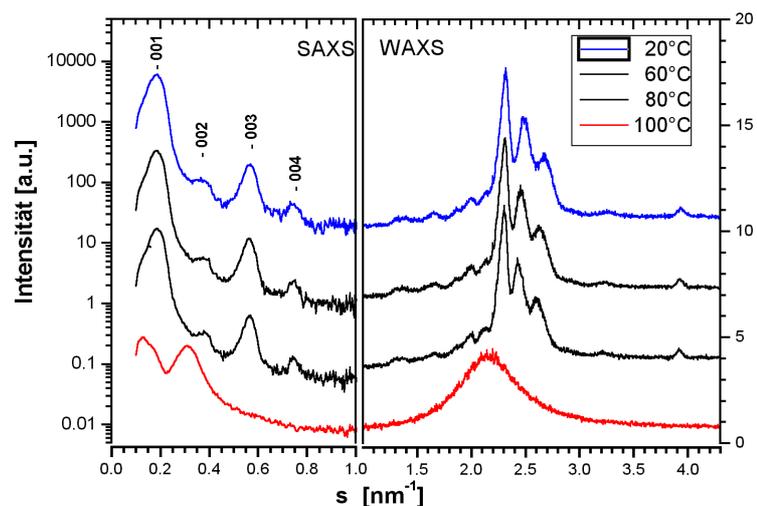


Abb. 18 Röntgendiffraktogramme des trockenen CER[AS] beginnend bei 20 °C (Wötzel, 1999). Die Intensitäten im SAXS-Bereich sind logarithmisch aufgetragen.

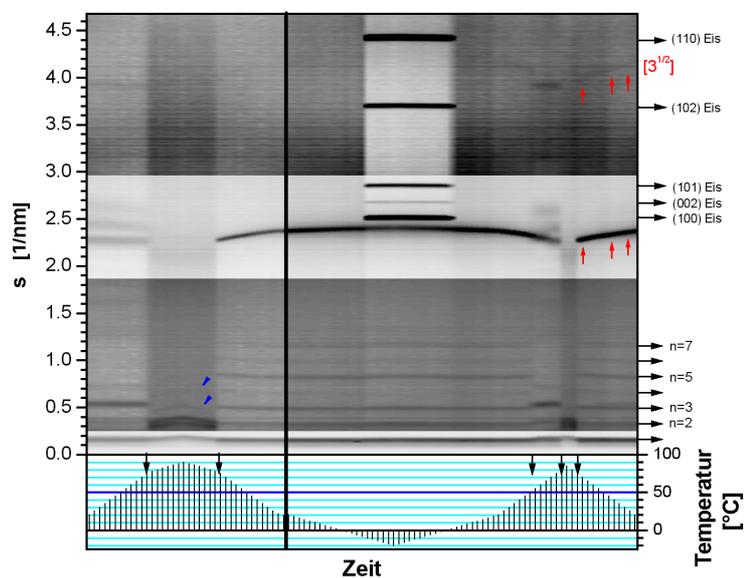
Reflex (Halo) mit einem Maximum bei $2,2 \text{ nm}^{-1}$ beobachtet, der eine Phase mit geschmolzenen Ketten signalisiert.

Die Kristallisation aus der Schmelze CER[AS] führt zur Ausgangsstruktur. Die Phasenumwandlung vom kristallinen zum flüssig isotropen Zustand ist damit vollständig reversibel.

Ceramid AS und Wasser

Mit kalorimetrischen und punktuellen röntgendiffraktometrischen Untersuchungen (Sha et al. 1995) wurde das Phasenverhalten von α -Hydroxyfettsäuresphingosinen (AS) bereits charakterisiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Struktur der untersuchten Ceramide von der Hydratation abhängig ist. Durch die Zugabe von Wasser (>20 %) konnte die Hauptumwandlungstemperatur der AS auf $80 \text{ }^\circ\text{C}$ abgesenkt werden. Nach dieser Umwandlung bildet sich eine invers hexagonale Phase. Wegener (Dissertation, 1997) konnte die kalorimetrischen Untersuchungen wiederholen und mit Ramanspektroskopischen Untersuchungen ergänzen.

Abb. 19 Röntgenkonturplot. CER[AS] + Wasser (25 + 75 m%) aufgenommen am STADI P. Im Bereich von $0,25 - 1,9 \text{ nm}^{-1}$ wurden die Intensitäten logarithmisch aufgetragen. Die beiden blauen Pfeilspitzen kennzeichnen den $7^{1/2}$ - und den $12^{1/2}$ -Reflex der H_{II} -Phase. Die Kettenreflexe der $L\beta'$ -Phase wurden mit den roten Pfeilen hervorgehoben. Die Vertikale Linie kennzeichnet eine 14-tägige isotherme Lagerung der Probe.



Um den Einfluss von Wasser auf die Struktur von CER[AS] näher zu untersuchen, wurden ausführlichere Röntgenbeugungsexperimente durchgeführt. Diese zeigen bei Zugabe von Wasser zum trockenen CER[AS] zunächst Reflexlagen, die mit denen des trockenen CER[AS] identisch sind. Wasser überlagert als diffuse Streuung mit einem Maximum um $3,2 \text{ nm}^{-1}$ das Beugungsmuster von CER[AS]. Eine 14-tägige Lagerung der Probe bei Raumtemperatur und ein Erhitzen der Probe bis zur Hauptumwandlungstemperatur konnten

keine Änderungen im Röntgenbild und damit auch keine strukturellen Änderungen hervorrufen. Nach der Hauptumwandlung beobachtet man auch bei den hydratisierten CER[AS] Proben eine diffuse Streuung (Halo) im Weitwinkelbereich. Im Gegensatz zum trockenen System werden im Kleinwinkelbereich neue Reflexe gefunden. Mittels hochauflösender Synchrotronstrahlung (*DESY, HASYLAB*) konnten drei starke Reflexe im Röntgenkleinwinkelbereich detektiert werden, deren reziproke Abstände den ersten drei Ordnungen einer invers hexagonalen Phase ($1; \sqrt{3}; 2$) entsprechen. Aus diesen ersten drei Ordnungen direkt auf eine hexagonale Ordnung (H_{II}) zu schließen ist nicht statthaft, da eine kubische Struktur diese drei Reflexe ebenfalls zeigt (Seddon, 1990). Über den $\sqrt{7}$ -Reflex kann die hexagonale Struktur verifiziert werden. Dieser lag für Probertemperaturen $< 86^\circ\text{C}$ noch innerhalb des messbaren Bereichs des Detektors. Mit dem STADI P konnte der $\sqrt{7}$ -Reflex auch für höhere Temperaturen nachgewiesen werden. Der intensitätsschwache $\sqrt{12}$ -Reflex war noch andeutungsweise zu erkennen. Obwohl die Intensität dieses Reflexes im Bereich des Grundrauschens des Detektors lag, kann auch dieser aufgrund seiner temperaturabhängigen Verschiebung zur Verifizierung des hexagonalen Gitters herangezogen werden. Eine kubische Struktur muss abgelehnt werden, da $\sqrt{2}$ - und $\sqrt{5}$ -Reflexe fehlen.

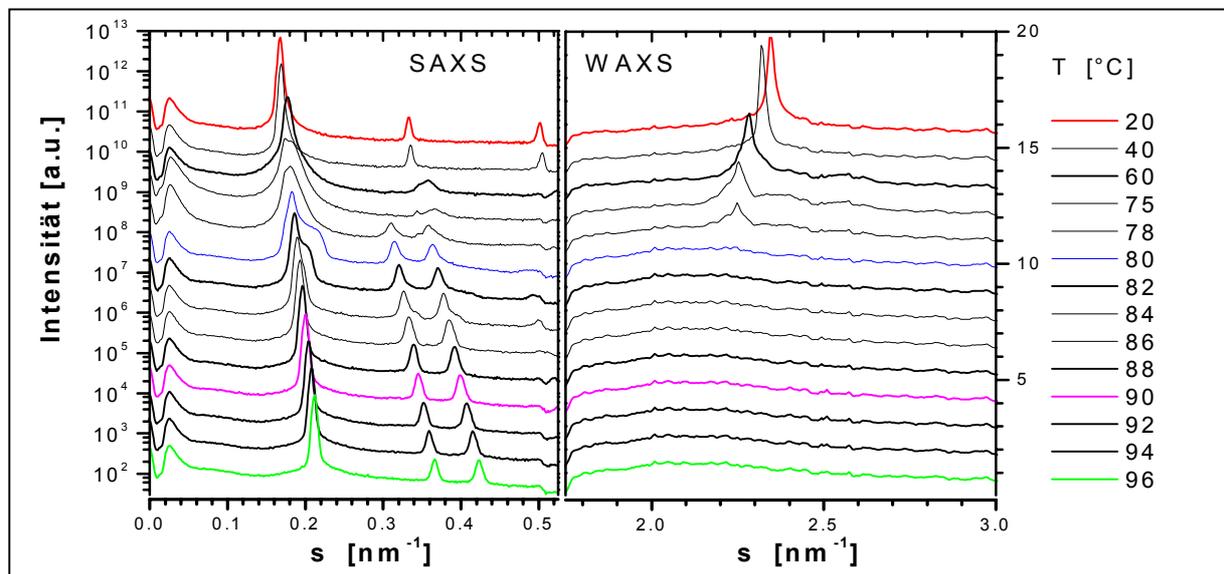


Abb. 20 Röntgenaufnahme des hydratisierten CER AS beim Aufheizen beginnend in der Gelphase $L\beta'$ unter Nutzung von Synchrotronstrahlung (*DESY, HASYLAB*). SAXS logarithmisch skaliert.

Aus den drei ersten, intensitätsstarken Reflexen wurde der Röhrendurchmesser bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass sich bei Temperaturerhöhung der H_{II} -Phase die Röhrenmittelpunkte der hexagonalen Überstruktur kontinuierlich, nahezu linear annähern, von 6,42 nm bei 78 °C auf 5,45 nm bei 96 °C. Diese Querschnittsverringering der hexagonal angeordneten Röhren ist beim Abkühlen reversibel (S. Anhang S.120).

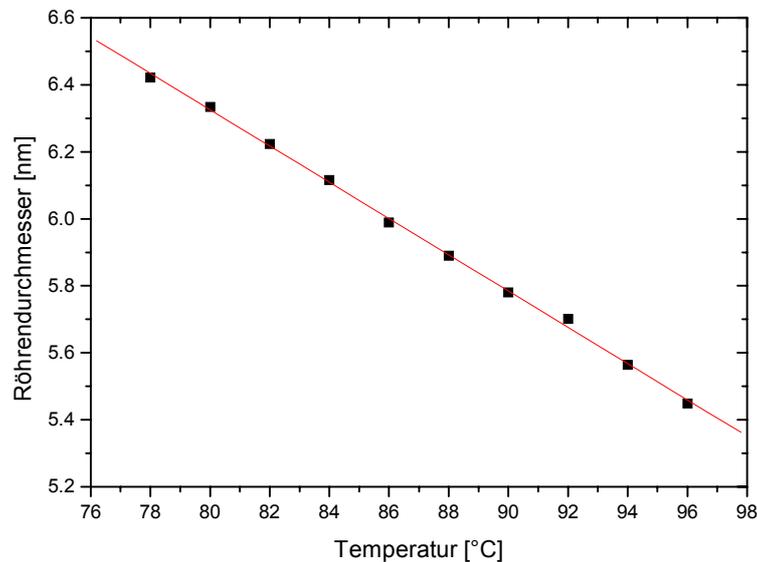


Abb. 21 Temperaturabhängigkeit des Röhrendurchmessers in der H_{II} -Phase des hydratisierten CER[AS].

Bei 80 °C kommt es zur Ausbildung eines zusätzlichen Reflexes bei $0,21 \text{ nm}^{-1}$, welcher bei weiterem Aufheizen bei 82 °C noch zu erkennen ist und bei höheren Temperaturen nicht mehr beobachtet werden kann. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesem Reflex um den ersten Schichtreflex einer flüssigkristallinen $L\alpha$ -Phase handelt, aus welcher gewöhnlich die H_{II} -Phasen hervorgehen (Seddon, 1990). Untermuert wird diese Annahme durch eine Schulter am Reflex der 3. Ordnung der hexagonalen Überstruktur, diese entspricht in ihrer Position dem Reflex der 2. Ordnung der lamellaren Überstruktur.

Wird die invers hexagonale Phase abgekühlt, kommt es zu einer sprunghaften Zunahme von *trans*-Konformeren im Bereich der Alkylketten. Es bildet sich eine lamellare Gelphase, deren für eine eindimensionale lamellare Überstruktur (5,67 nm bei 78 °C) charakteristischen Reflexe im Kleinwinkelbereich bis zur 7. Ordnung detektiert werden können. Die Kohlenwasserstoffketten zeigen in dieser Gelphase eine hexagonale Kettenpackung ($L\beta'$). Beim Abkühlen der Gelphase vergrößert sich der Lamellenabstand (5,85 nm bei 20 °C) unter simultaner Verringerung des lateralen Flächenbedarfs der Alkylketten. Die Struktur der Gelphase bleibt von der Kristallisation des Wassers sowohl hinsichtlich der Kettenpackung

als auch des Lamellenabstandes nicht unbeeinflusst. Der scharfe, hexagonale Kettenreflex erfährt beim Auftreten der Eispeaks eine geringe Verbreiterung und der lamellare Wiederholabstand verringert sich sprunghaft auf 5,78 nm. Beim Erhitzen der Probe beginnend bei 20 °C vergrößert sich der Lamellenabstand zunächst bis zum Aufschmelzen des Eises kontinuierlich und erreicht eine Ausdehnung von 5,84 nm. Der WAXS-Bereich zeigt nach dem Aufschmelzen des Eises den scharfen, isolierten Reflex der hexagonalen Kettenpackung. Durch weiteres Erhitzen der Gelphase wird zunächst eine kontinuierliche Verringerung des Lamellenabstandes der Gelphase und eine Aufweitung der Kettenpackung beobachtet. Bei einer Temperatur von 60 °C ist eine sprunghafte Verringerung des Lamellenabstandes festzustellen. Aus dem scharfen Reflex im Weitwinkelbereich gehen drei Reflexe hervor. Bis zum Erreichen des Kettenschmelzens entsprechen die Klein- und Weitwinkelreflexe vollkommen denen des nichthydratisierten CER[AS]. Wird in diesem Zustand die Proben­temperatur nicht bis zum Erreichen der Hauptumwandlungstemperatur erhöht, sondern auf Raumtemperatur abgekühlt, kann die dehydratisierte Form des Ceramides beibehalten werden. Eine strukturelle Änderung bedingt durch eine Einlagerung von Wasser bei Temperaturen unterhalb des Kettenschmelzens (kalte Hydratisierung) konnte auch nach mehrtägiger Lagerung nicht beobachtet werden. Der lamellare Wiederholabstand ist nicht nur aufgrund der fehlenden Wasserschicht deutlich geringer als in der Gelphase. Die Hauptursache der Reduktion des Schichtabstandes ist auf die stärkere Neigung der Alkylketten zur Bischenormalen des trockenen CER[AS] im Vergleich zur Gelphase

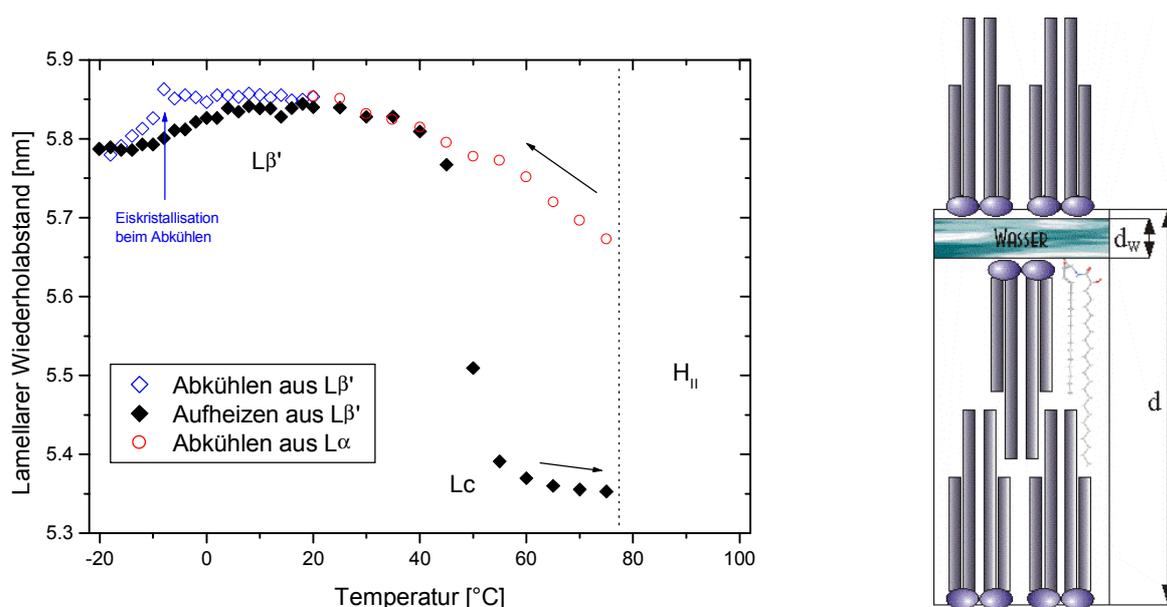


Abb. 22 Temperaturabhängige Änderungen des lamellaren Wiederholabstandes des hydratisierten CER[AS] (links). Strukturvorschlag zur multilamellaren Anordnung der Ceramide in der Gelphase des CER[AS] unter Einbeziehung des ermittelten Bischenichtabstand (d) (rechts).

zurückzuführen. Die starke Kettenneigung wird durch die breiten WAXS-Reflexe erkennbar (Tardieu et al. 1973). Sowohl in der trockenen als auch in der hydratisierten Form des CER[AS] sind die Fettsäure- und Sphingosinseitenketten nebeneinander angeordnet.

Bei erneutem Erhitzen der Probe in den Bereich der flüssig-kristallinen Phase, bildet sich nach Abkühlung wieder die lamellare Gelphase mit hexagonaler Kettenpackung. Eine Wechselwirkung von Wasser mit CER[AS] lässt sich demnach nur durch ein Erhitzen der Substanz über ihren Kettenschmelzpunkt (heiße Hydratisierung) und nachfolgendes Abkühlen der flüssig-kristallinen H_{II} -Phase erreichen.

Die Untersuchungen zur Hydratation von CER[AS] wurden mittels FT-Raman-Spektroskopie in einer den Röntgenbeugungsexperimenten analogen Weise durchgeführt. Beim Erhitzen der in Wasser dispergierten CER[AS] Proben unterscheiden sich die Spektren erwartungsgemäß zunächst nicht von denen des wasserfreien CER[AS], da unterhalb des Kettenschmelzpunktes keine Hydratisierung von CER[AS] möglich ist. Die niedrige Bandenposition der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung von $2848,6 \text{ cm}^{-1}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) signalisiert einen hohen Anteil an trans-Konformeren im Bereich der Alkylketten.

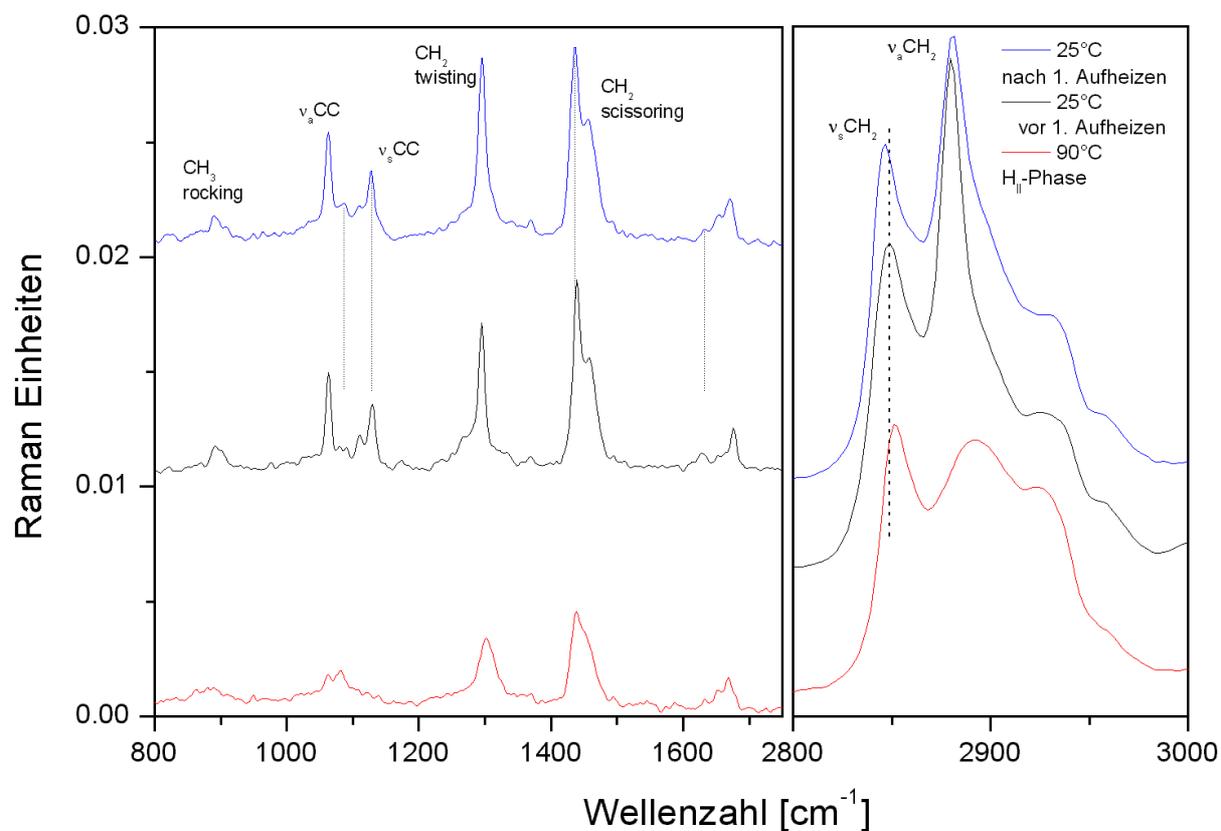


Abb. 23 Ramanspektren von CER[AS] (dispergiert in Wasser).

Die sprunghafte Verschiebung der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung zu höheren Wellenzahlen ($2851,5 \text{ cm}^{-1}$) erfolgt, wie schon von Wegener et al. (1997) beschrieben, bei niedrigeren Temperaturen ($76 \text{ }^\circ\text{C}$) als beim trockenen CER[AS]. Die Raman-Spektren der H_I -Phase und der flüssig isotropen Phase zeigen keine charakteristischen Unterschiede, da in beiden Phasen die Alkylketten verknäult sind.

Beim Abkühlen der bis über den Kettenschmelzpunkt erhitzten hydratisierten Probe verschiebt sich die symmetrische CH_2 -Valenzschwingung ($\nu_s\text{CH}_2$) zurück zu $2848,7 \text{ cm}^{-1}$. Im Gegensatz zum trockenen CER[AS], dessen Bandenposition nach der Kristallisation der Ketten bis zur Abkühlung auf Raumtemperatur nahezu unverändert bleibt, verschiebt sich die $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande der hydratisierten Probe nach der Kristallisation der Ketten auch bei weiterem Abkühlen sukzessive zu niedrigeren Wellenzahlen ($2846,3 \text{ cm}^{-1}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Diese kontinuierliche Bandenverschiebung ist beim Erhitzen reversibel. Während in früheren Arbeiten festgestellt wurde, dass sich hydratisiertes und wasserfreies CER[AS] nicht in ihren Raman-Spektren unterscheiden (Wegener et al. 1997), können mit den aktuellen Untersuchungen signifikante Unterschiede erkannt werden. Befindet sich die hydratisierte Probe bei Raumtemperatur in der Gelphase $\text{L}\beta'$ lassen sich die Raman-Spektren schon allein über die Position der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande gut von denen der nicht hydratisierten Probe abgrenzen. Weitere auffallende Unterschiede werden bei der Auswertung des Intensitätsverhältnisses der CH_2 -Streckschwingungsbanden ($\nu_a\text{CH}_2/\nu_s\text{CH}_2$) und der Bandenform des CH_2 -Scherschwingungsbereichs beobachtet.

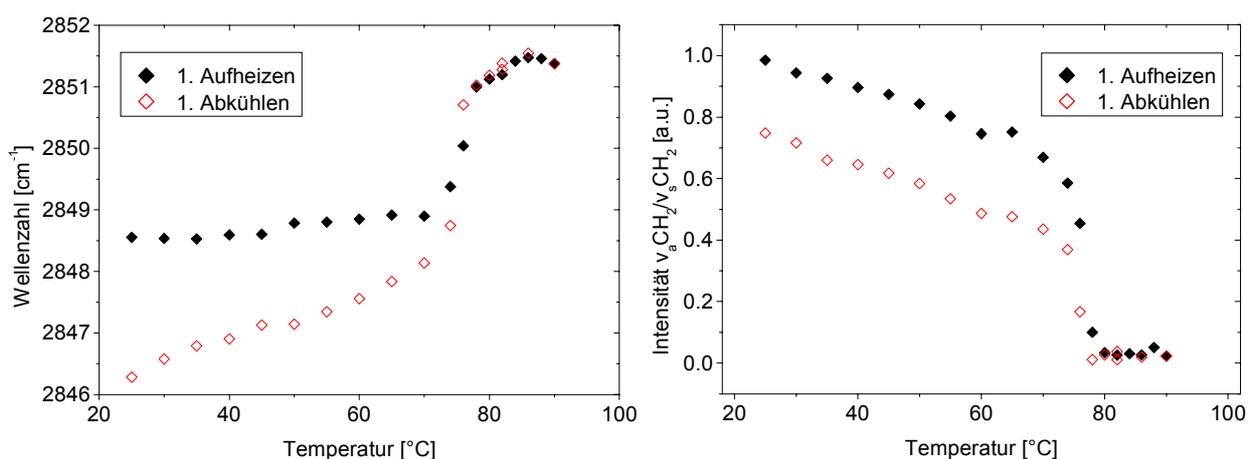


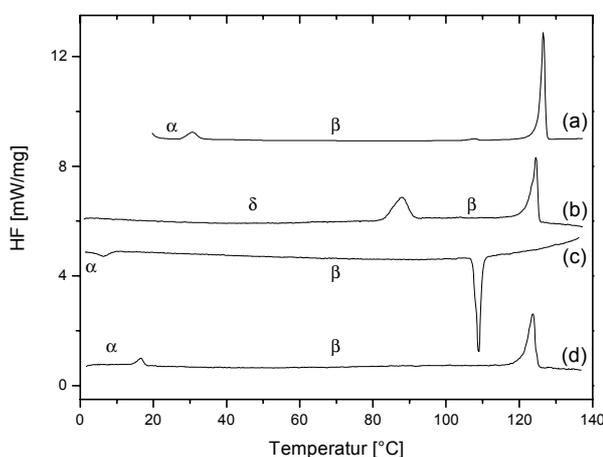
Abb. 24 Temperaturabhängige Änderungen der CH_2 -Streckschwingungen in den Ramanspektren beim Aufheizen und Abkühlen von CER[AS]. Ausgehend von einer Dispersion aus dehydratisiertem CER[AS] und Wasser (25/75 m%). Bandenposition der symmetrischen CH_2 -Streckschwingung (links). Normiertes Intensitätsverhältnis der Banden der asymmetrischen CH_2 -Streckschwingung gegen die symmetrische CH_2 -Streckschwingung.

Ceramid NP

Bei der untersuchten Verbindung handelt es sich um die synthetische Reinsubstanz N-Stearylphythosphingosin (MG: 584,5 g/mol). Die Verbindung entspricht der unter den Hautlipiden vorkommenden Struktur des mit einer nichthydroxylierten Fettsäure verknüpften Phytosphingosins CER[NP] (Siehe S.13f). Das Ceramid konnte über verschiedene Umkristallisationsmethoden modifikationsrein erhalten werden. Aus einer verdünnten Lösung in einer Chloroform/Methanol-Mischung kristallisiert CER[NP] bei langsamer Abkühlung in Form dünner faserartiger, bis zu 10 mm langen Nadeln. Diese Modifikation des CER[NP] wurde als α -Phase bezeichnet. Beim Erhitzen der α -Phase ist bei 31 °C eine endotherme Phasenumwandlung zu beobachten. Die entstandene β -Phase schmilzt bei 125 °C. Wird CER[NP] aus der Schmelze abgekühlt, kristallisiert die β -Phase. Durch Abkühlung kann die β -Phase reversibel in die α -Phase umgewandelt werden.

Aus einer gesättigten Lösung in THF kristallisiert CER[NP] in der δ -Phase. Bei 70 °C wandelt sich die δ -Phase irreversibel in die β -Phase um, welche dann wiederum durch Abkühlen in die α -Phase überführt werden kann. Eine direkte Umwandlung der δ -Phase in die α -Phase und Umwandlungen von α beziehungsweise β in die δ -Phase konnten nicht beobachtet werden.

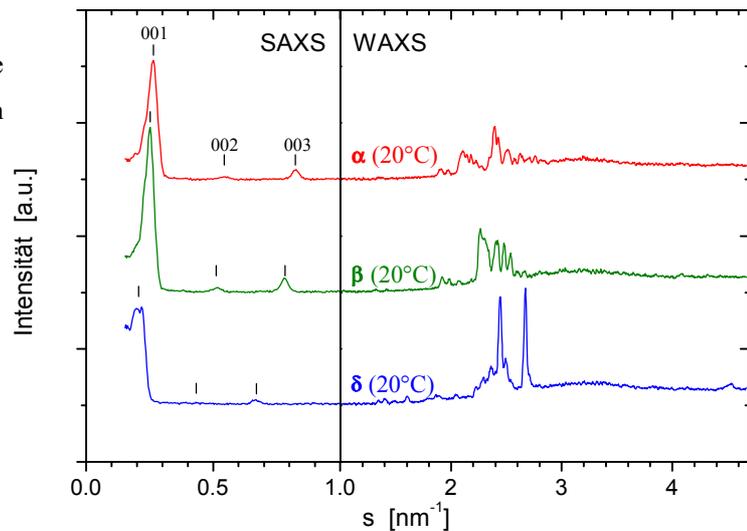
Abb. 25 DSC-Kurven von CER[NP].
 (a) 1. Aufheizen kristallisiert aus einer Chloroform/
 Methanol-Mischung. (b) 1. Aufheizen kristallisiert
 aus THF. (c) Abkühlen nach (b). (d) 2. Aufheizen
 nach (c).



Die Phasenumwandlungstemperatur von der α - in die β -Modifikation ist abhängig von den Kristallisationsbedingungen. Werden die Phasen durch sehr schnelles Abkühlen ($\Delta T = 5$ K/min) oder durch schnelle Evaporation des Lösungsmittels im Vakuumrotationsverdampfer erhalten, ist die Phasenumwandlung zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Unter den experimentellen Bedingungen, mit denen die Röntgendiffraktogramme, die FT-IR und die FT-Raman-Spektren aufgenommen wurden, war die Phasenumwandlungstemperatur von α in β stets bei 31 °C und die Rückumwandlung von

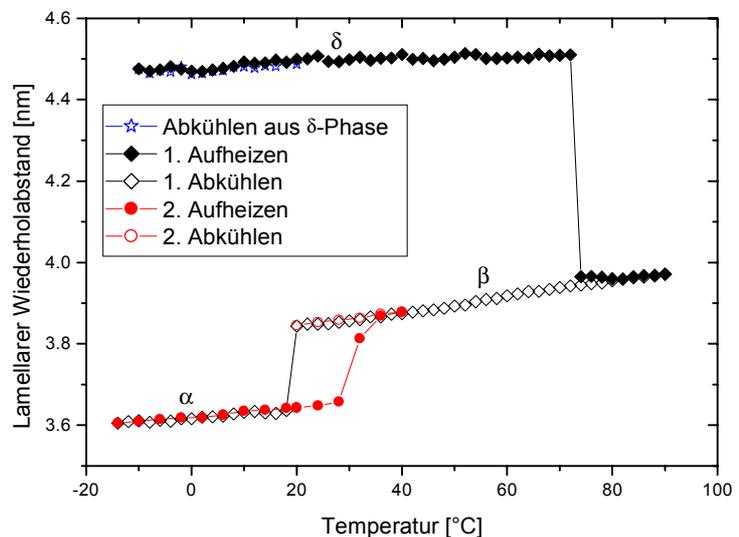
β in α im Abkühllexperiment bei 18 °C. Bei den DSC-Messungen waren die Phasenumwandlungen teilweise zu niedrigeren Temperaturen verschoben. In den Untersuchung von Garidel (2002), bei denen CER[NP] ohne Umkristallisation eingesetzt wurde, konnte die β - α -Umwandlung nach Abkühlen der Schmelze nicht beobachtet werden. Je nach entsprechender Kristallisationsmethode bzw. Temperaturprogramm lassen sich die kristallinen Phasen des CER[NP] (α , β und δ) bei 20 °C erhalten. Zur Röntgeneinkristallstrukturanalyse waren die Kristalle der CER[NP]-Phasen leider nicht geeignet. Von den Modifikationen α , β und δ wurden deshalb Röntgenpulverdiffraktogramme aufgenommen.

Abb. 26 Röntgenpulverdiffraktogramme der drei kristallinen Phasen von CER[NP].



Erwartungsgemäß unterscheiden sich die drei Modifikationen in ihren Pulveraufnahmen signifikant. Allen gemeinsam ist die eindimensionale lamellare Überstruktur, deren Dimension durch drei äquidistante Reflexe, die den ersten drei Ordnungen der lamellaren Struktur entsprechen, bestimmt wurde. Der lamellare Wiederholabstand unterscheidet die drei Modifikationen.

Abb. 27 Temperaturabhängigkeit des lamellaren Wiederholabstandes von CER[NP].



Die Modifikation α weist mit 3,65 nm (20 °C) den geringsten, β mit 3,85 nm (20 °C) einen etwas größeren und δ mit 4,5 nm (20 °C) den weitesten lamellaren Abstand auf. Über eine Auswertung der Kleinwinkelreflexe der Röntgenmessungen konnte eine temperaturabhängige Beeinflussung des Schichtabstandes festgestellt werden.

Die Phasenumwandlungen widerspiegeln sich als sprunghafte Änderungen im lamellaren Wiederholabstand. In allen kristallinen Phasen ist eine kontinuierliche Temperaturabhängigkeit des Schichtabstandes zu beobachten. Während die meisten Lipide eine Verringerung des lamellaren Wiederholabstandes aufgrund einer temperaturabhängigen Zunahme von *gauche*-Konformeren zeigen, vergrößert sich der Lamellenabstand von CER[NP] in allen Phasen kontinuierlich. Diese Änderung kann nicht mit Änderungen im *trans/gauche*-Verhältnis in Verbindung gebracht werden und erfordert daher eine andere Interpretation.

Um von den Pulveraufnahmen die Molekülstruktur im Raum ableiten zu können, wurde zunächst mit Einkristalldaten des strukturell ähnlichen, sich von CER[NP] lediglich durch eine Kettenverlängerung um sechs Kohlenstoffatome unterscheidenden Tetracosanylphytosphingosins (C_{24} CER[NP]) gearbeitet (Dahlen et al. 1972). Dieses homologe Ceramid wurde in einer triklinen Einheitszelle ($a = 0,6181$ nm, $b = 0,4929$ nm, $c = 3,7278$ nm, $\alpha = 90,96^\circ$, $\beta = 91,30^\circ$, $\gamma = 105,51^\circ$) kristallisiert. In der von Dahlen aufgeklärten Struktur können die Alkylketten der Fettsäure und des Phytosphingosins aufgrund des Platzbedarfs der Kopfgruppe nicht in einer Ebene zusammen angeordnet sein. Sie zeigen stattdessen V-förmig, einen Winkel von 101° einschließend, auseinander. Beide Ketten sind in Form trikliner Subzellen mit paralleler Ausrichtung der Ketten (T_{II}) angeordnet.

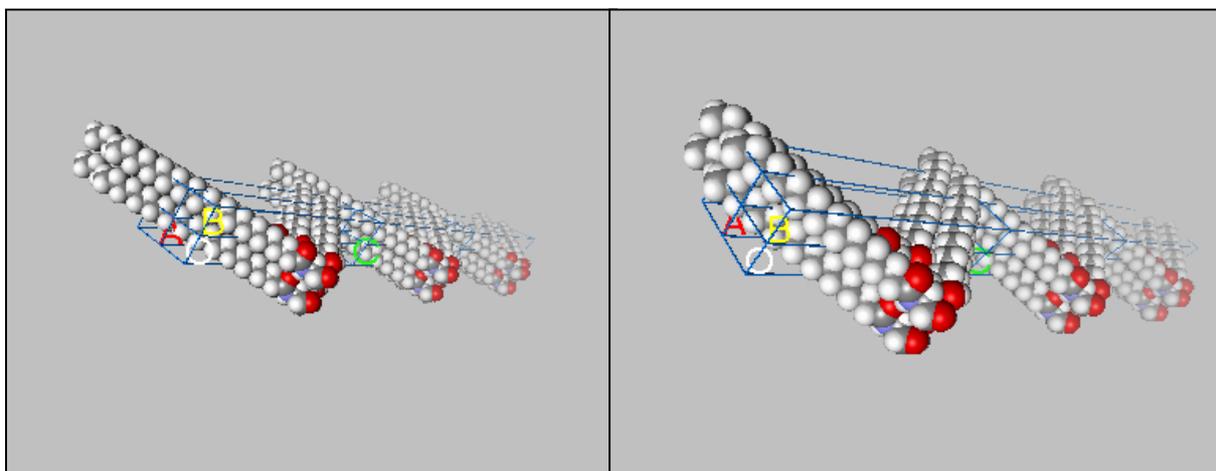


Abb. 28 3D-Strukturen von C_{24} CER[NP] (links) und C_{18} CER[NP] (rechts).

Elementarzellen wurden entlang der a und b Achsen 1fach und entlang der c -Achse 2fach angefügt.

Zur Modellierung der Kristallstruktur von CER[NP] wurde unter Beibehaltung von $a = 0,6181$ nm, $b = 0,4929$ nm und der Winkel α , β und γ die Einheitszelle durch eine Verkürzung der Fettsäureseitenkette um sechs Kohlenstoffatome in c-Richtung auf $c = 3,2032$ nm modifiziert (Förster, 2000).

Aus der modellierten Kristallstruktur konnte ein theoretisches Beugungsbild einer Röntgenpulveraufnahme simuliert werden. Vergleicht man die simulierten Röntgendiffraktogramme von C_{18} CER[NP] und C_{24} CER[NP], kann man sowohl in Position und Intensität der Reflexe Unterschiede feststellen. Lediglich die Lage der (hk0)-Reflexe ist bei beiden Verbindungen identisch (S. Anhang S.121). Aufgrund ihrer geringen Intensität eignen sich die (hk0)-Reflexe nur schwer zur Auswertung der Pulveraufnahmen. Die Schichtreflexe können dagegen sehr gut zur Auswertung herangezogen werden.

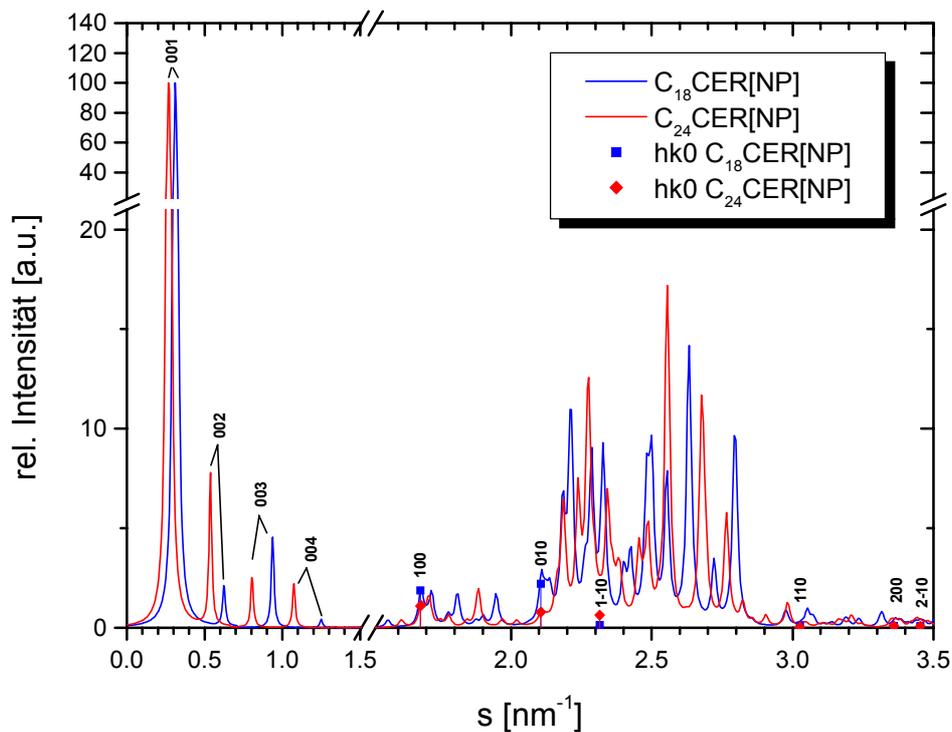


Abb. 29 Mit Cerius² simulierte Streukurven von C_{18} CER[NP] und C_{24} CER[NP] (Förster, 2000).

Die *Miller'schen* Indices bezeichnen die Schichtreflexe (001) - (004) und die (hk0)-Reflexe. Die Streuintensitäten wurden auf den 001-Reflex normiert. Die relativen Intensitäten der (hk0)-Reflexe für C_{18} CER[NP] (■) und C_{24} CER[NP] (◆) sind eingezeichnet.

Durch einen direkten Vergleich der Streukurve des simulierten $C_{18}CER[NP]$ mit den gemessenen Streukurven von $CER[NP]$ kann die simulierte Struktur falsifiziert werden, da keine der gemessenen Streukurven mit der simulierten Streukurve identisch ist. Die Molekülstruktur des $C_{24}CER[NP]$ lässt sich demzufolge nicht unmittelbar auf $CER[NP]$ anwenden. Eine Interpretation der zahlreichen Kristallreflexe im Weitwinkelbereich der Beugungskurven war aufgrund der unzureichenden Indizierung der Pulveraufnahmen nicht möglich. Dennoch können über die Reflexe im Kleinwinkelbereich Aussagen über die Struktur von $CER[NP]$ getroffen werden. Vergleicht man den lamellaren Wiederholabstand der simulierten Kurve ($d = 3,20 \text{ nm}$) mit den aus den gemessenen Streukurven ermittelten Werten, so weisen letztere deutlich größere Schichtabstände auf ($3,6 < d < 4,5 \text{ nm}$). Unter Annahme der V-förmigen Struktur deutet diese Aufweitung des Gitters in c-Richtung auf einen größeren Winkel zwischen den beiden Alkylketten des Ceramides hin.

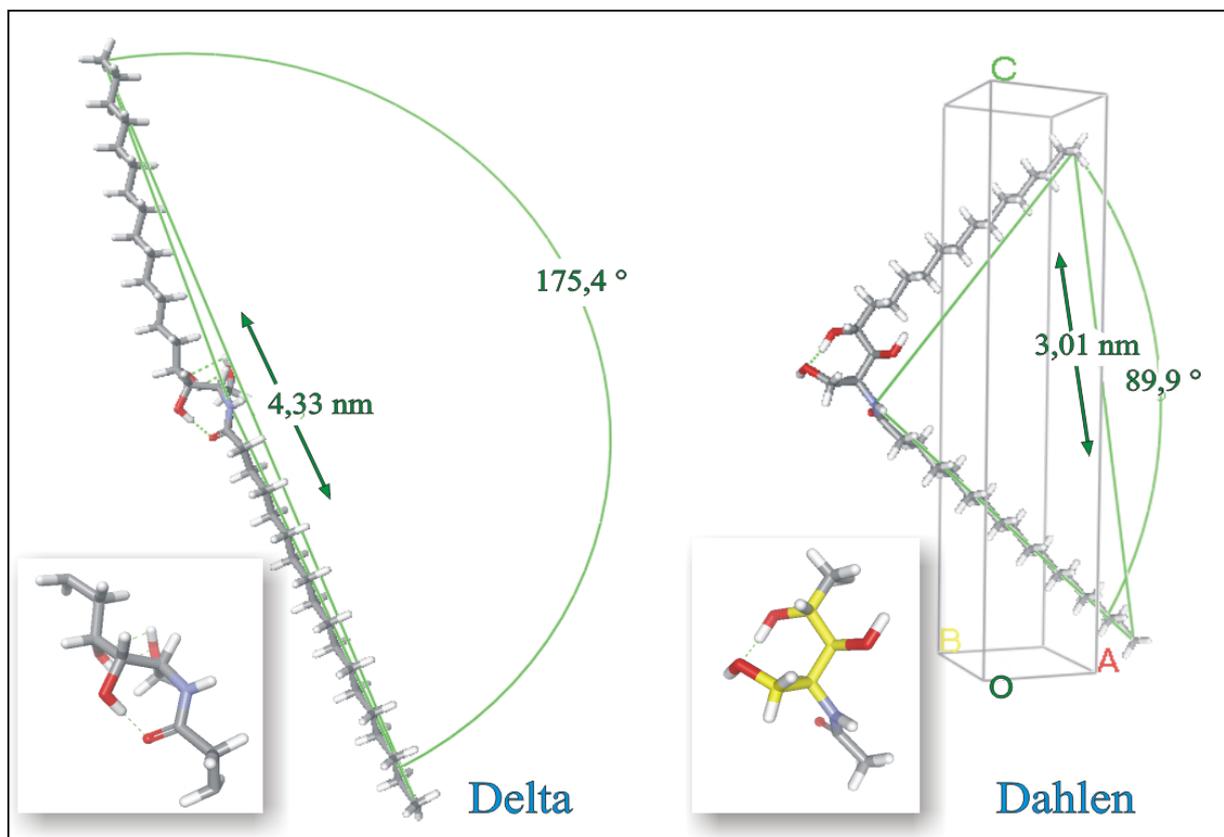


Abb. 30 Vergleich möglicher molekularer Raumstrukturen von $CER[NP]$.

Rechts: Das durch Kettenverkürzung von $C_{24}CER[NP]$ (Dahlen et al. 1972) modellierte $C_{18}CER[NP]$. Links: Die vorgeschlagene Struktur der δ -Phase von $CER[NP]$, die aus der Struktur des $C_{18}CER[NP]$ durch Drehung der Phytosphingosinseitenkette um sp^3 -hybridisierte CC-Bindungen der Kopfgruppe (gelb unterlegt) erhalten wurde. Die möglichen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, die Abstände der terminalen CH_3 -Gruppen und der Winkel (CH_3-N-CH_3) sind eingezeichnet.

Eine Änderung dieses Winkels kann ohne Störung der Bindungslängen und -winkel allein durch Drehungen der Kettenachsen um die sp^3 -hybridisierten CC-Bindungen der CER[NP]-Kopfgruppe ermöglicht werden.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die gewinkelte Struktur der Ceramide im *Stratum corneum* nicht von Bedeutung sein kann, da die resultierende laterale Phasenseparation der SC-Lipide mit einer drastischen Einschränkung der Barrierefunktion verbunden wäre. Wesentlich wahrscheinlicher ist hier die gestreckte Konformation der Ceramide, wie sie in der δ -Phase von CER[NP] erreicht wird. In dieser Anordnung durchspannen die Ceramidmoleküle zwei Lipidschichten und können somit die lamellaren Strukturen des SC stabilisieren. Unter Annahme der gestreckten Konformation der Ceramide ist auch erklärbar, weshalb die Schichtabstände der Lipidschichten des SC durch eine Variation des Wassergehaltes des Stratum corneum nicht beeinflusst werden.

In der Kopfgruppe von CER[NP] findet man mehrere funktionelle Gruppen mit hohem Dipolcharakter, die mit der IR-Spektroskopie gut nachzuweisen sind. Unter Annahme einer Winkeländerung sollte die Konformation der Kopfgruppe entsprechend beeinflusst werden. Die IR-Spektren der drei CER[NP] Modifikationen sind in der folgenden Grafik abgebildet.

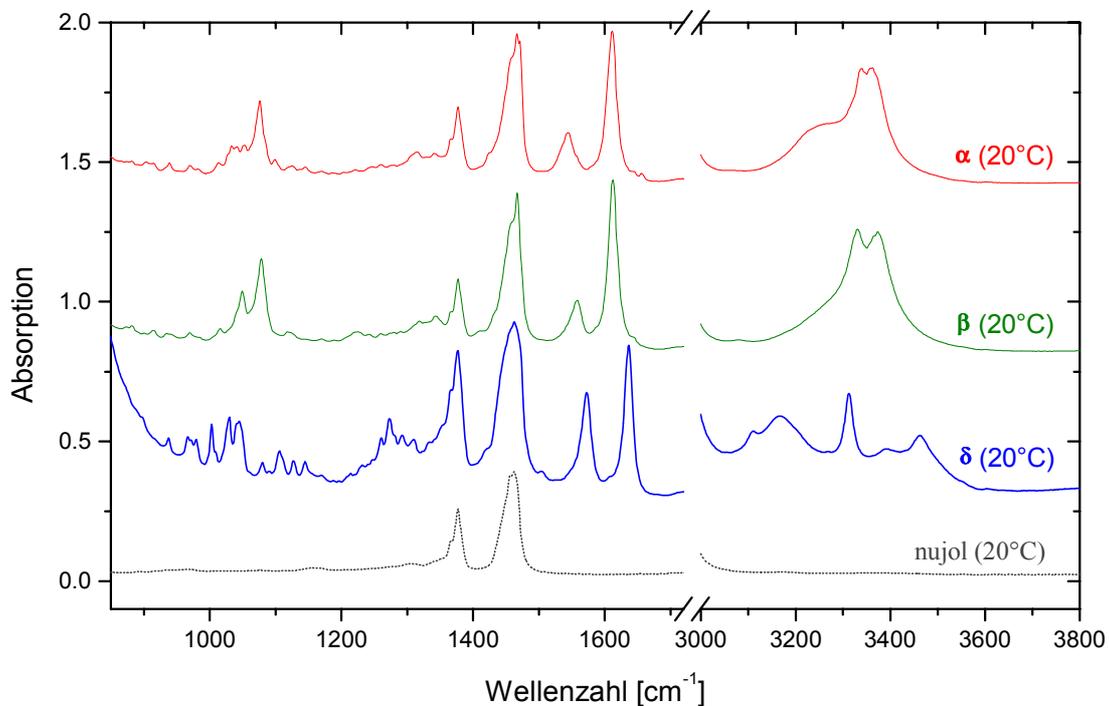


Abb. 31 IR-Spektren der kristallinen CER[NP]-Phasen (gemessen als Nujol-Verreibung in Transmission zwischen BaF_2 -Fenstern)

Die Amidbindung befindet sich strukturell im Zentrum des Ceramid Moleküls. Im Infrarotspektrum liefert die Amidbindung mehrere Banden, die zur Charakterisierung der Amidstruktur herangezogen werden können. Die Amid I-Bande (80 % C=O-Streckschwingung) und die Amid II-Bande (60 % C-N-H-Deformations-, und 40 % C-N-Streckschwingung) sind besonders empfindlich in Bezug auf konformative Unterschiede in der Nähe der Amidbindung und spiegeln ebenfalls Verschiedenheiten wider, die auf unterschiedliche Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sind. Für alle drei Phasen kann aufgrund der Wellenzahlen der Amid I- und II-Banden von starken Wasserstoffbrückenbindungen ausgegangen werden. Zum Vergleich zeigte eine 1 %ige Lösung von CER[NP] in THF bei 20 °C die Position der Amid I-Bande bei 1675 cm⁻¹ und die der Amid II-Bande bei 1518 cm⁻¹.

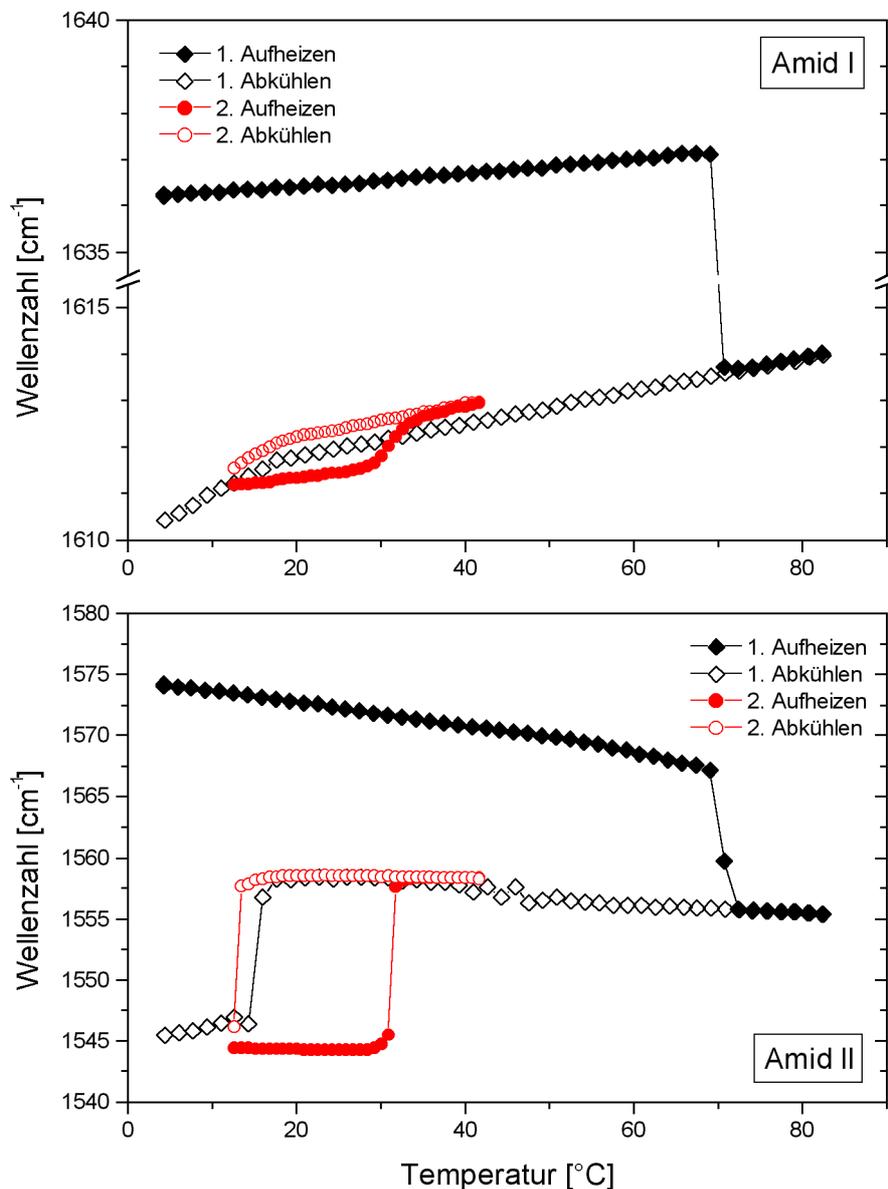


Abb. 32 Temperaturabhängigkeit der Bandenpositionen der Amid I- (oben) und der Amid II-Bande (unten) in den IR-Spektren von CER[NP].

Sowohl die Amid I als auch die Amid II-Bande verschieben sich temperaturabhängig innerhalb der kristallinen Phasen kontinuierlich und im Bereich der Phasenumwandlungen sprunghaft. Die kontinuierlichen Bandenverschiebungen, die auf eine stetige Lockerung der Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sind, korrelieren mit der konstanten, temperaturabhängigen Aufweitung des Lamellenabstandes innerhalb der Phasen.

Die Vergrößerung des lamellaren Wiederholabstandes kann mit einer kontinuierlichen Aufweitung des Winkels der beiden Kohlenwasserstoffketten erklärt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Wasserstoffbrückenbindungen durch die Aufweitung des Winkels beeinflusst werden. Aus den beobachteten Bandenverschiebungen können Abstandsänderungen der an den Wasserstoffbrücken beteiligten Atome abgeleitet werden.

Eine Vergrößerung des Abstandes führt zu einer Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung. Wird ein kritischer Abstand der Atome überschritten, kommt es zum Zusammenbruch der Wasserstoffbrücke(n) und gegebenenfalls zur Ausbildung anderer, neuer Wasserstoffbrücken. Wodurch die sprunghaften Verschiebungen der Amidbanden im Bereich der Phasenübergänge erklärt werden können (Raudenkolb et al. 2002).

Die Raman-Spektren der kristallinen CER[NP]-Phasen zeigen ebenfalls charakteristische Unterschiede. Im Gegensatz zur IR-Spektroskopie, welche mit KBr-Presslingen und Nujolverreibungen durchgeführt wurde, konnte die Substanz direkt vermessen werden.

Auch bei den Raman-Spektren lassen sich Unterschiede in den Bandenpositionen der Amid I-Banden feststellen. Diese entsprechen den Resultaten der FT-IR-Experimente. Apparativ bedingt konnte mit der Versuchsanordnung der FT-Raman-Spektroskopie ein breiterer Temperaturbereich untersucht und somit auch Spektren der flüssigen Phase von CER[NP] aufgenommen werden. Betrachtet man für die verschiedenen CER[NP]-Phasen die Banden der Schwingungen der Kohlenwasserstoffketten, so kann man über den gesamten spektralen Bereich strukturell bedingte Unterschiede in den Raman-Spektren feststellen. In allen kristallinen Phasen weisen die Alkylketten einen hohen Anteil an trans-Konformeren auf. Dies zeigt sich in der niedrigen Wellenzahl der symmetrischen CH₂-Streckschwingung, in den Intensitäten der CC-Gerüstschwingungen und der Bandenform der CH₂-twisting Schwingung. Die ausgeprägte Bande der CH₃-rocking Schwingung bei 891 cm⁻¹ zeigt an, dass die zwei am Kettenende befindlichen CC-Bindungen trans-Konformation (tt) aufweisen. In der β-Phase lässt sich ein deutlich höherer Anteil an *gauche*-Konformeren als in α und δ feststellen. Dafür sprechen die Bandenverbreiterung der CH₂-twisting Mode, die Verschiebung der symmetrischen und der Intensitätsrückgang der antisymmetrischen CH₂-Valenzschwingung.

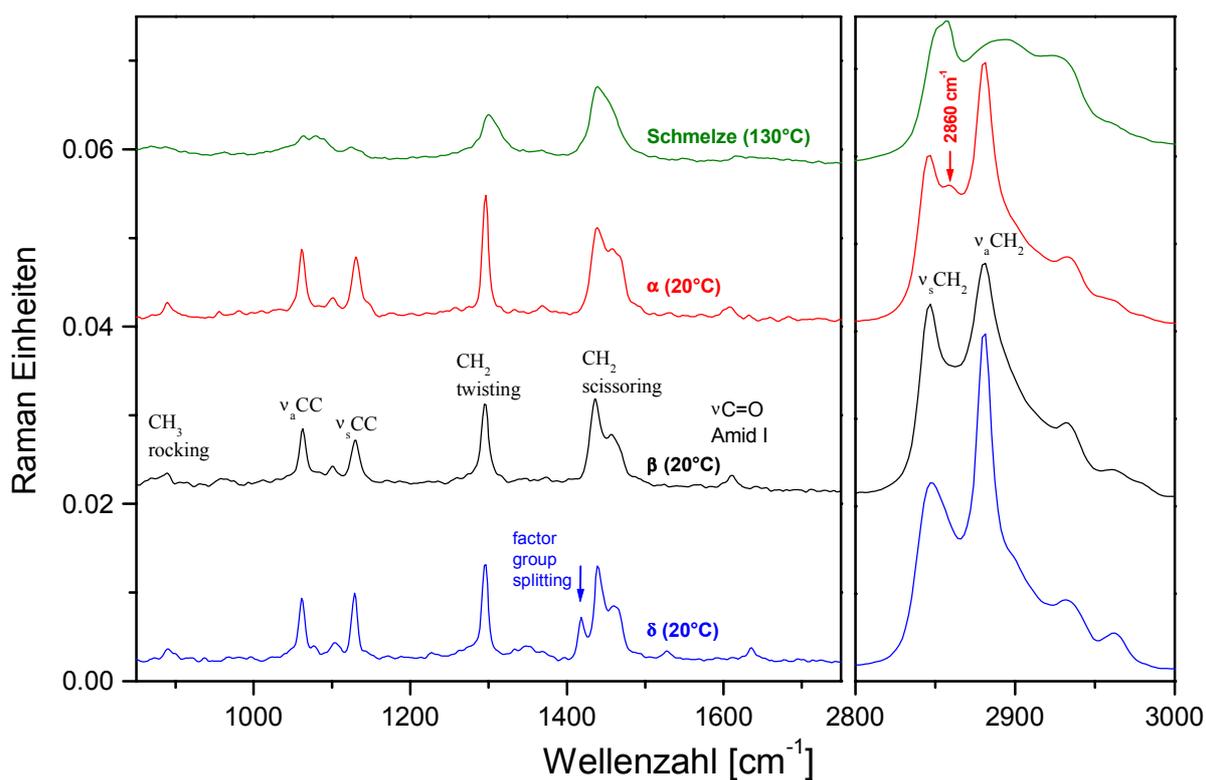


Abb. 33 Ramanspektren und Bandenzuordnung von CER[NP]. Die Faktorgruppenaufspaltung der CH₂-Scherschwingung in der δ-Phase und die für die triklinen Kettenpackung charakteristische Bande bei 2860 cm⁻¹ sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

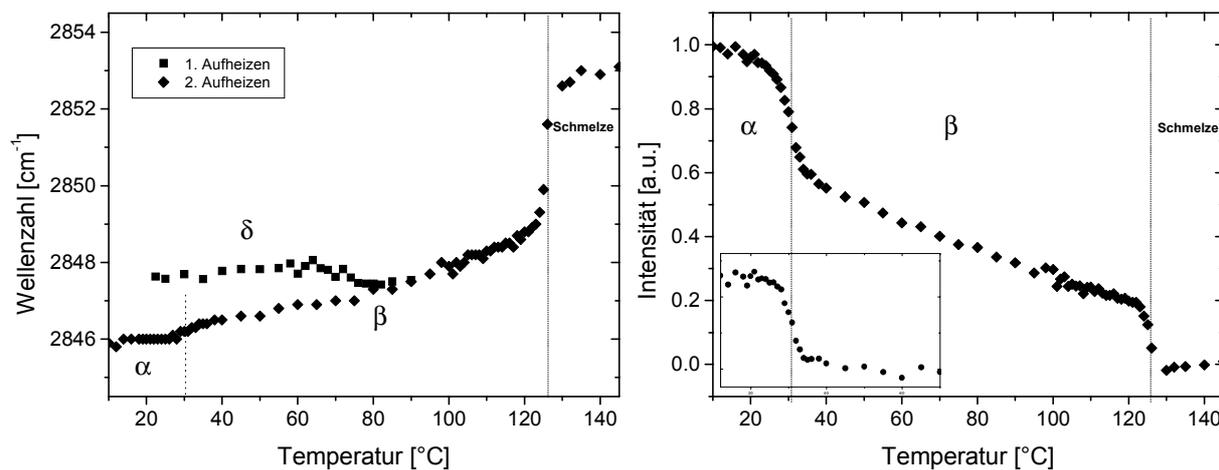


Abb. 34 Temperaturabhängige Änderungen im Bereich der CH₂-Strettschwingungen. Verschiebung der ν_sCH₂-Bande (links). Intensität der ν_aCH₂-Bande normiert auf die Gesamtfläche des CH-Strettschwingungsbereichs von 2800-3000 cm⁻¹ (rechts). Im eingefügten Diagramm der rechten Abbildung: Normierte Intensität der Bande bei 2860 cm⁻¹.

Mit der Phasenumwandlung von α zu β verschiebt sich die antisymmetrische CH_2 -Valenzschwingung von 2846 auf $2846,5 \text{ cm}^{-1}$. Diese Verschiebung ist zwar nur marginal, kann jedoch aufgrund des stufenartigen Verlaufs mit der Phasenumwandlung in Verbindung gebracht werden und widerspiegelt somit die durch die Phasenumwandlung bedingte konformative Änderung in den Alkylketten von CER[NP]. Aufgrund der Bandenverschiebung zu höheren Wellenzahlen ist von einer geringen Abnahme der Kettenordnung auszugehen. Der Anteil an *gauche*-Konformeren nimmt in der β -Phase kontinuierlich zu, bleibt aber bis zum Erreichen des Schmelzpunktes von CER[NP] gering.

Die α -Phase zeigt zwischen $\nu_s(\text{CH}_2)$ und $\nu_a(\text{CH}_2)$ bei 2860 cm^{-1} eine kleine Bande. Das Vorhandensein dieser Bande ist für triklinen Kettenpackungen typisch (Snyder et al. 1978). Die gleiche Bande wurde auch bei in den Spektren von n-Docosan gefunden. In den Phasen β und δ kann diese Bande nicht beobachtet werden. Die $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande der δ -Phase unterscheidet sich durch ihre breite Form von denen der anderen Phasen. Diese Bandenverbreiterung wird mit intermolekularen Kopplungen benachbarter Ketten in Verbindung gebracht.

Drastische Unterschiede lassen sich auch in der Bandenintensität der $\nu_a(\text{CH}_2)$ -Bande im relativen Verhältnis zur $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande erkennen. Die Phasen α und β zeigen einen anderen temperaturabhängigen Verlauf des Intensitätsverhältnisses $\nu_a(\text{CH}_2) / \nu_s(\text{CH}_2)$. Die spektralen Verschiedenheiten der drei Phasen im Bereich der CH_2 -Streckschwingungen sind auf Änderungen im *trans/gauche* Verhältnis (Zerbi et al. 1981a & b) und/oder auf unterschiedliche Kettenpackungen zurückzuführen (Abbate et al. 1982 & 1984). Die Obertöne der CH_2 -Scherschwingungen bewirken über Fermiresonanzwechselwirkung mit den CH_2 -Streckschwingungen Änderungen des komplex zusammengesetzten Spektralbereichs von $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ (Snyder et al. 1979).

Im Unterschied zu den Phasen α und β weisen die Spektren der δ Phase longitudinal akustische Moden (LAM) auf, die auf eine all-*trans* Orientierung über das gestreckte Molekül schließen lassen. Noch auffälliger sind die Unterschiede im Bereich der CH_2 -Scherschwingungen. Dieser Bereich des Raman-Spektrums widerspiegelt die Unterschiede im Packungsverhalten der Kohlenwasserstoffketten der verschiedenen CER[NP]-Phasen. Die Raman-Spektren zeigen in diesem Bereich typischerweise ein Bandenduplett. Befinden sich jedoch zwei Alkylketten in einer Subzelle, wie bei einer orthorhombisch senkrechten Orientierung der Alkylketten, findet man eine weitere Bande bei niedrigerer Wellenzahl. Diese sogenannte Faktorgruppenaufspaltung wurde nur in den Spektren der δ -Modifikation von CER[NP] gefunden. Die Aufspaltung verschwindet beim ersten Aufheizen der Substanz mit der Phasenumwandlung von δ zu β unwiederbringlich. In den FT-IR Spektren (in KBr)

werden gleichbedeutende Aufspaltungen der CH_2 -*rocking* Bande bei 720 und 730 cm^{-1} und der CH_2 -Scherschwingung beobachtet (S. Anhang S. 123).

In den Modifikationen α und β wird der spektrale Bereich der CH_2 -Scherschwingung durch eine Überlagerung von vier Banden bestimmt. Mittels Kurvenanpassung konnte dieser Bereich in zwei Dupletts zerlegt werden, die auf zwei verschiedene Kettenpackungen deuten. Die Phasen α und β unterscheiden sich in diesem Bereich signifikant. Position, Intensität und Form der gefitteten Dupletts bezeichnen im Falle der α -Phase die Überlagerung einer triklinen und einer hexagonalen Subzelle. In der β -Modifikation wird die Scherschwingung der hexagonalen Subzelle von einer weiteren, nicht eindeutig zugeordneten Kettenpackung überlagert. Der relative Anteil der hexagonalen Kettenpackung ist in der β -Phase wesentlich größer als in der α -Phase. Auch der Bereich der CH_2 -Scherschwingung in den Spektren der δ -Phase zeigt neben den für eine orthorhombische Kettenpackung typischen Banden noch zusätzliche Banden, die zu einer Überlagerung führen, so dass eine neben der orthorhombischen Kettenpackung noch eine weitere Anordnung vorhanden sein muss.

Ceramid NP (mit d₃₅-Stearinsäureseitenkette)

Zur gezielten Untersuchung der Seitenketten des CER[NP] wurden die Wasserstoffatome der Stearinsäureseitenkette durch Deuterium ersetzt (Siehe S. 34f). Aus der Literatur ist bekannt, dass ein derartiger Isotopenaustausch nur geringe Änderungen im Phasenverhalten hervorruft (Mendelsohn et al. 1976 & 1978, Chen et al. 2000). Schon die DSC-Kurven konnten zeigen, dass das partiell deuterierte Ceramid N-d₃₅-Stearoylphytosphingosin (d₃₅CER[NP]) in der bei CER[NP] mit δ bezeichneten Modifikation vorliegt und die gleichen Phasenumwandlungen wie das undeuterierte CER[NP] zeigt.

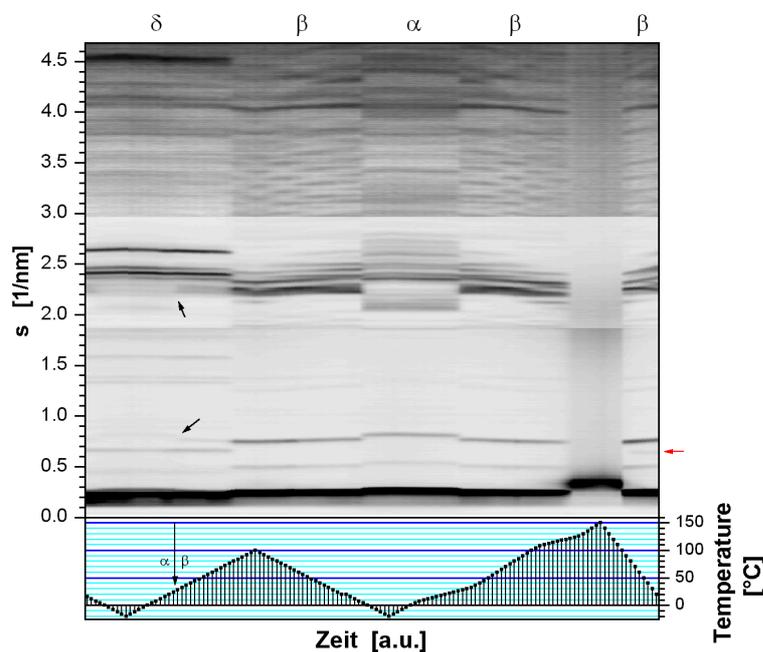


Abb. 34 Röntgenkonturplot d₃₅CER[NP]. Die Phasenbezeichnungen befinden sich über der Abbildung. Der Reflex des Zersetzungsproduktes wird durch den Pfeil rechts des Diagramms angezeigt. Die Pfeile im Diagramm kennzeichnen charakteristische Änderungen von Reflexen im Bereich der δ -Phase, die der α/β -Umwandlung zuzuordnen sind.

Die temperaturabhängigen Röntgenaufnahmen entsprechen denen der undeuterierten Substanz. Auch die ermittelte Phasenabfolge ist mit CER[NP] identisch. Die untersuchte deuterierte Probe war jedoch nicht modifikationsrein und enthielt $11 \pm 2\%$ d₃₅CER[NP] in der β -Phase, welche durch charakteristische Reflexe zu identifizieren war und über diese quantifiziert werden konnte. Dieser Anteil zeigt auch die reversible α/β -Umwandlung. Nach der Umwandlung von der δ - in die β -Modifikation liegt d₃₅CER[NP] phasenrein vor und wandelt sich beim Abkühlen vollständig in die α -Modifikation um. Aus der auf 150 °C erhitzten Schmelze kristallisiert beim Abkühlen die β -Phase in unveränderter Struktur. Ein beim Abkühlen ab 100 °C neu auftretender Reflex bei $0,65 \text{ nm}^{-1}$ wird einem unbekanntem thermischen Zersetzungsprodukt zugeordnet. Der Anteil konnte aufgrund der fehlenden Referenz nicht genau quantifiziert werden und wird, da keine weiteren Reflexe detektiert wurden, auf weniger als 1 % geschätzt. Die Struktur von d₃₅CER[NP] wird von dieser

geringen Verunreinigung jedoch nicht beeinflusst. Beachtet man die Maximaltemperatur der Probe von 150 °C, lässt sich feststellen, dass $d_{35}\text{CER}[\text{NP}]$ eine außerordentlich hohe thermische Stabilität aufweist. $D_{35}\text{CER}[\text{NP}]$ unterscheidet sich damit beispielsweise vom α -Hydroxysphingosin (AS), welches sich schon bei 120 °C zersetzt (Neubert et al. 1998). Sowohl über die Auswertung der IR- als auch der Raman-Spektren des $d_{35}\text{CER}[\text{NP}]$ konnte gezeigt werden, dass die nichtdeuterierte Phytosphingosinkette und die deuterierte Fettsäurekette von den Phasenumwandlungen beeinflusst werden. Die Bandenverschiebungen der $\nu_a(\text{CH}_2)$ - und der $\nu_s(\text{CH}_2)$ -Bande zeigen dies ohne Zweifel. Im Gegensatz zur Ölsäure bei deren γ - α Umwandlung sich nur die Kettenpackung des CH_3 -seitigen Kettenabschnittes ändert, während der carboxylseitige Kettenabschnitt unbeeinflusst bleibt (Tandon et al. 2000a), ändert sich bei den fest/fest-Umwandlungen des $\text{CER}[\text{NP}]$ das gesamte Molekül sowohl im Bereich der Kopfgruppe als auch beider Ketten. Die Indizierung der Röntgen-Reflexe der verschiedenen kristallinen Phasen von $\text{CER}[\text{NP}]$ wird im Gegensatz zur Ölsäure durch die Phasenumwandlungen nicht wesentlich erleichtert.

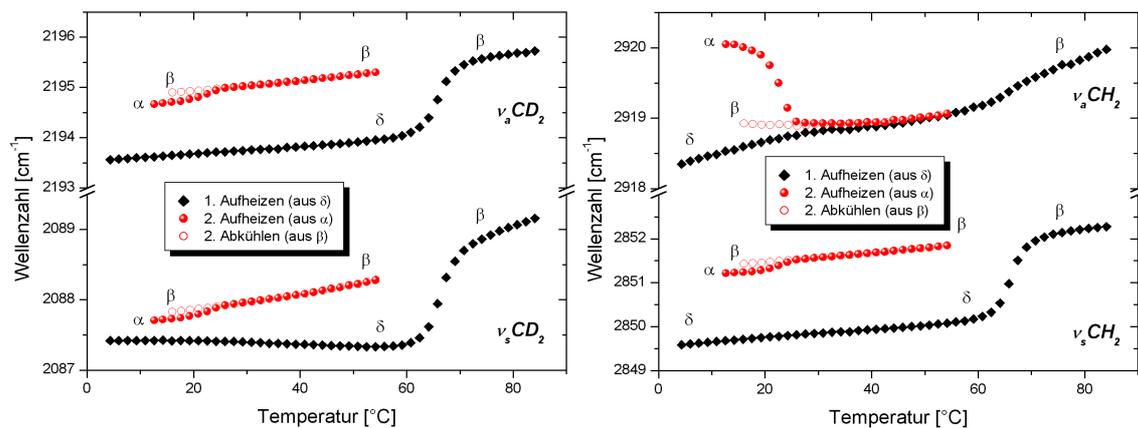


Abb. 35 Temperaturabhängigkeit der Bandenpositionen der symmetrischen und antisymmetrischen CD_2 -Valenzschwingungen (links) und CH_2 -Valenzschwingungen (rechts) in den IR-Spektren von $d_{35}\text{CER}[\text{NP}]$ (KBr-Pressling).

Es ist beachtenswert, dass sich sowohl die symmetrische als auch die antisymmetrische CH_2 -Valenzschwingung bei der Umwandlung von der α - in die β -Phase zu kleineren Wellenzahlen verschieben, während sich die entsprechenden CD_2 -Valenzschwingungen zu größeren Wellenzahlen verschieben.

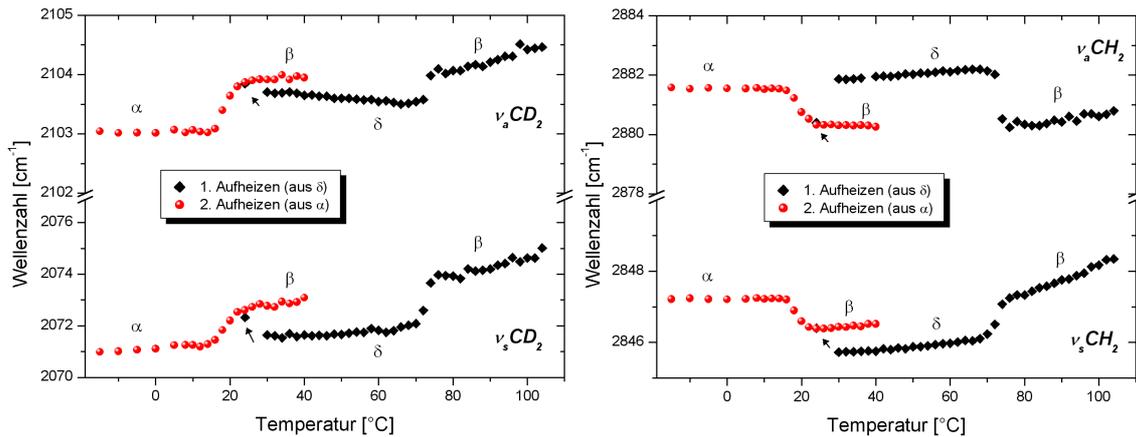


Abb. 36 Temperaturabhängigkeit der Bandenpositionen der symmetrischen und antisymmetrischen CD_2 -Valenzschwingungen (links) und CH_2 -Valenzschwingungen (rechts) in den Raman-Spektren von $d_{35}CER[NP]$. Die Pfeile kennzeichnen die Messung der nach dem 1. Aufheizen abgekühlten Probe.

Ein gleichartiger Fall wurde für die d_{27} - und d_{31} -Acylsphingosine CER[NS] beschrieben (Chen et al. 2000). In diesen Untersuchungen wurde in Folge einer fest/fest-Umwandlung eine ähnliche Verschiebung festgestellt. Im Gegensatz zu $d_{35}CER[NP]$ verschob sich in den Untersuchungen von Chen et al. die symmetrische CD_2 -Valenzschwingung der deuterierten Fettsäureketten zu niedrigeren Wellenzahlen. Dieser Effekt war unerwartet und konnte von Chen nicht näher erklärt werden. Sicher ist jedoch, dass diese Verschiebung nicht auf eine Zunahme der Kettenordnung zurückgeführt werden kann. Vielmehr kann die Verschiebung mit durch Änderung der Kettenpackung hervorgerufenen Effekten in Verbindung gebracht werden. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der Untersuchungen an n-Docosan einzubeziehen (s. S.41). Beim Übergang von der triklinen Phase in die Rotatorphase von n-Docosan wird ebenfalls eine Verschiebung der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung zu kleineren Wellenzahlen beobachtet, obwohl der Anteil an *gauche*-Konformeren zunimmt. Vergleicht man nun die Verschiebungen der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung des undeuterierten CER[NP] mit denen des $d_{35}CER[NP]$, wird augenfällig, weshalb die Verschiebung in CER[NP] nur marginal ausfällt. Hier überlagern sich die positive Verschiebung der $\nu_s(CH_2)$ -Bande der Fettsäureseitenkette und die negative Verschiebung der $\nu_s(CH_2)$ -Bande der Phytosphingosinseitenkette. Die spektroskopischen Befunde sprechen für eine trikline Packung der Phytosphingosinseitenketten in der α -Phase, während die Fettsäureseitenketten in der α -Phase definitiv nicht in einer triklinen Packung angeordnet sein können.

Interessanterweise zeigen die Raman-Spektren der δ -Modifikation von d_{35} CER[NP] im Gegensatz zum undeuterten CER[NP] keine Faktorgruppenaufspaltung der CH_2 -Scherschwingungsbanden. Gleichbedeutend werden auch in den FT-IR-Spektren keine Aufspaltungen der CH_2 -Scherschwingungsbanden und der CH_2 -rocking Bande beobachtet (S. Anhang S.123). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in der δ -Phase von CER[NP] und d_{35} CER[NP] nur die Fettsäureseitenketten und nicht die Phytosphingosinseitenketten in Form orthorhombisch senkrechter Subzellen angeordnet sind. In den Phasen α und β zeigen weder die Phytosphingosin- noch die Fettsäureseitenketten eine orthorhombisch senkrechte Kettenpackung.

Die Subzellendimension der Fettsäureseitenkette in der δ -Phase konnte nach Indizierung der WAXS-Reflexe bestimmt werden (S. Anhang S.122). Aus einer bei 20 °C erhaltenen Röntgenaufnahme wurden ermittelt: $a^* = 0,745$ nm, $b^* = 0,488$ nm und $\gamma = 90^\circ$. Die Subzelle zeigt eine temperaturabhängige Expansion sowohl in a^* - als auch in b^* -Richtung. Diese kontinuierlichen Änderungen konnten zur Verifizierung der indizierten Beugungsreflexe genutzt werden. Die übrigen Reflexe im Weitwinkelbereich werden auf Kristallreflexe und auf Reflexe der Kettenpackung der Phytosphingosinseitenketten zurückgeführt, welche nicht indiziert werden konnten.

Es lässt sich ableiten, dass Fettsäure- und Sphingosinseitenketten in allen Phasen getrennt voneinander vorliegen und die Möglichkeit besitzen, in verschiedenen Subzellen angeordnet zu sein. Damit unterscheiden sich die kristallinen CER[NP]- und d_{35} CER[NP]-Phasen vom Kristall des N-(2D,3D-dihydroxyoctodecanoyl)-phytosphingosins (Pascher et al. 1992), dessen nebeneinander angeordnete Fettsäure- und Phytosphingosinketten alternierend aufeinanderfolgen und zusammen in orthorhombisch senkrechten Subzellen packen.

Des Weiteren kann aus röntgendiffraktometrischen und den spektroskopischen Untersuchungen auf eine gewinkelte, V-förmigen Molekülstruktur geschlossen werden, welche der Struktur des C_{24} CER[NP] ähnelt. Der von den beiden Kettenachsen beschriebene Winkel ist jedoch größer als im Fall des C_{24} CER[NP], was sich anhand des entsprechend erweiterten lamellaren Wiederholabstand im Vergleich mit dem der simulierten C_{18} CER[NP] Struktur belegen lässt.

Ceramid NP und Wasser

CER[NP] wurde mit einem Überschuss an destilliertem Wasser versetzt und kalorimetrisch untersucht. Die Hauptumwandlung wird durch die Zugabe des Wassers nicht unter 100 °C herabgesetzt. Weil das Experiment durch den Siedepunkt des Wassers limitiert wurde, konnte der Einfluss des Wassers auf den Kettenschmelzpunkt von CER[NP] nicht untersucht werden. Die fest-fest-Umwandlung von der α -Phase in die β -Phase zeigt sich sowohl hinsichtlich Phasenumwandlungstemperatur als auch der Umwandlungsenthalpie vom Wasserüberschuss nicht beeinflussbar. Auf Untersuchungen zum Wasserbindungsvermögen über die Auswertung des Eispeaks konnte deshalb verzichtet werden.

Die Röntgenbeugungsuntersuchungen zum wässrigen System wurden mit einer Dispersion aus CER[NP] in Wasser durchgeführt. Als Ausgangsstruktur wurde zum einen die β -Phase und zum anderen die δ -Phase von CER[NP] in getrennten Experimenten eingesetzt. Beim Abkühlen der β -Phase entsteht wie auch im trockenen System die α -Phase. Kristallisiert das Wasser aus, zeigen sich die charakteristischen Eisreflexe im Röntgenweitwinkelbereich. Die Struktur von CER[NP] bleibt davon unbeeinflusst, da alle Kristallreflexe des CER[NP] in der α -Phase unverändert in ihrer Intensität und Position vorliegen.

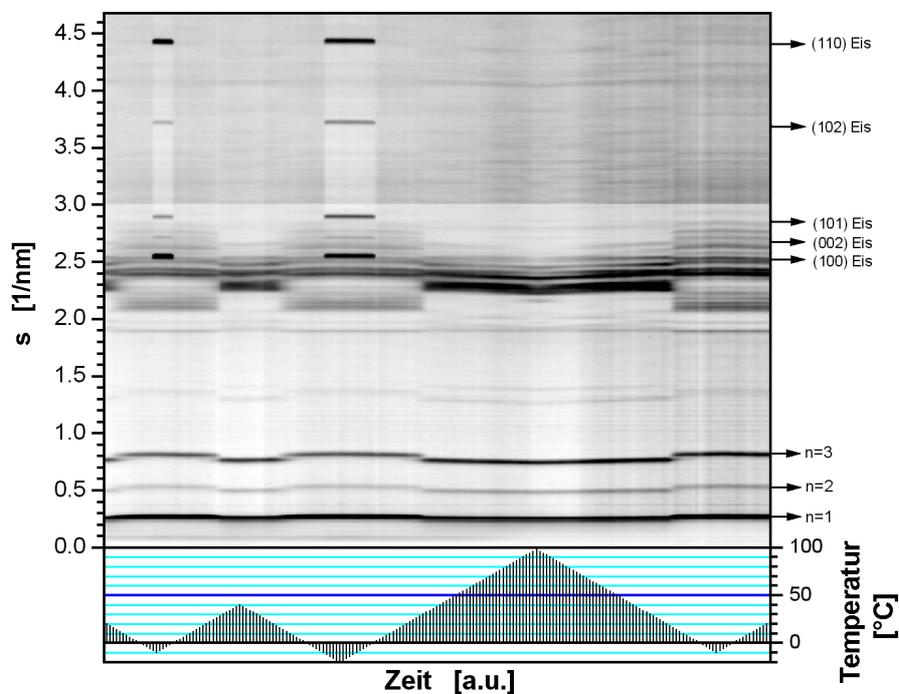


Abb. 37 Röntgenkonturplot einer CER[NP]-Wasser-Dispersion (25/75 m%). (beginnend in der β -Phase)

Wird CER[NP] aus der δ -Phase im Wasserüberschuss abgekühlt, ändert sich auch hier die Struktur nicht. Auch beim Auftreten der Eisreflexe bleiben die Reflexe von CER[NP] sowohl im Klein- als auch im Weitwinkelbereich unverändert. Die Phasenabfolge der kristallinen Phasen entspricht der trockenen Probe. Beim Erhitzen der δ -Phase entsteht demzufolge, wie auch beim wasserfreien System, die β -Phase, die sich beim Abkühlen in die α -Phase umwandelt. Wird die α -Phase erhitzt, entsteht wieder die β -Phase. Ein Einfluss des Wassers auf die Struktur der β -Phase war nicht festzustellen.

Im Gegensatz zu CER[AS] kann sich Wasser bei CER[NP] nicht in den Bereich der Kopfgruppen einlagern und dadurch den lamellaren Wiederholabstand vergrößern. Die Annahme der V-förmigen Molekülkonformation wird hierdurch zusätzlich untermauert.

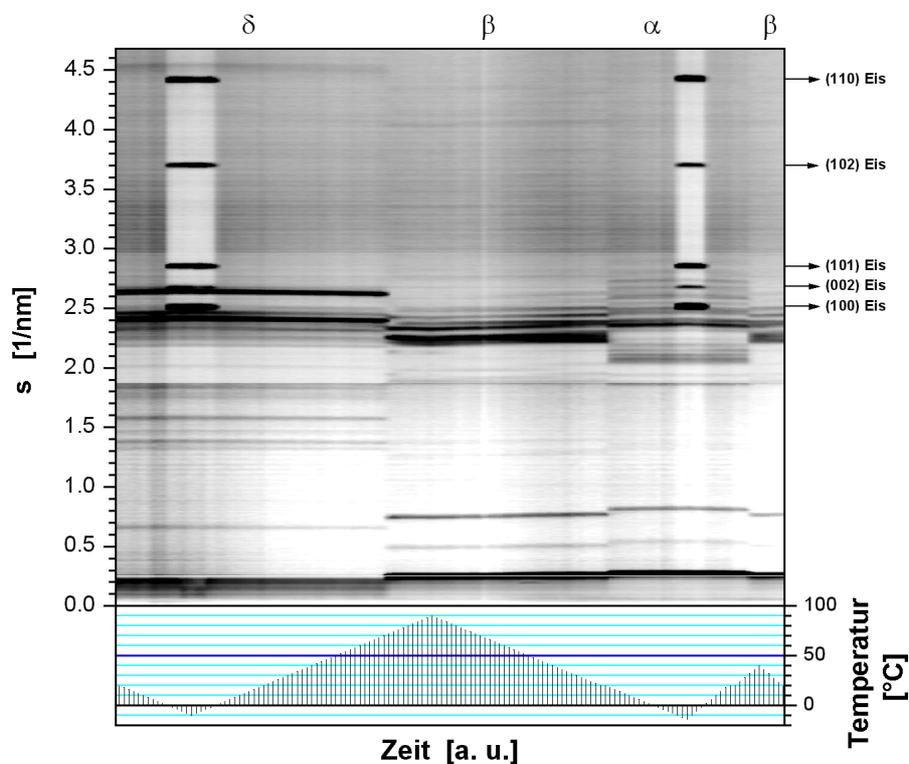


Abb. 38 Röntgenkonturplot einer CER[NP]-Wasser-Dispersion. (beginnend in der δ -Phase)

Es ist davon auszugehen, dass die Temperatur des Kettenschmelzens von CER[NP] bei Anwesenheit von Wasser erniedrigt wird. Dieser Zustand kann jedoch nicht erreicht werden, da der Schmelzpunkt von CER[NP] weiterhin über dem Siedepunkt des Wassers liegt, wodurch der experimentell erfassbare Temperaturbereich limitiert wird. Um den Einfluss von Wasser auf die fluiden Strukturen von CER[NP] zu untersuchen, müssten drucksichere Versuchsanordnungen verwendet werden.

Ceramide $C_{18:1}$ CER[NP] und $C_{18:2}$ CER[NP]

Die beiden Ceramide N-Oleolylphytosphingosin ($C_{18:1}$ CER[NP]) und N-Linoloylphytosphingosin ($C_{18:2}$ CER[NP]) vom Typ der Nonhydroxyacyl-phytosphingosine (CER[NP]) kommen nach derzeitigem Kenntnisstand nicht im *Stratum corneum* vor. Die Einführung von ein ($C_{18:1}$ CER[NP]) beziehungsweise zwei trans-Doppelbindungen ($C_{18:2}$ CER[NP]) in die Fettsäureseitenkette von AP führt zu einer Erniedrigung der Hauptumwandlungstemperatur im Vergleich zum gesättigten CER[NP]. Dadurch wird es möglich, den Einfluss von Wasser auf NP-Ceramide mit geschmolzenen Ketten unter Normaldruck zu untersuchen.

Zunächst wurden jedoch beide Ceramide im trockenen Zustand charakterisiert. Wie beim gesättigten N-Stearoylphytosphingosin (CER[NP]) vergrößert sich der lamellare Wiederholabstand von $C_{18:1}$ CER[NP] und von $C_{18:2}$ CER[NP] mit steigender Temperatur kontinuierlich. Die lamellaren Abstände unterscheiden die beiden Substanzen. Der Lamellenabstand des einfach ungesättigten $C_{18:1}$ CER[NP] (3,85 nm; 20 °C) ist 0,2 nm größer als der des $C_{18:2}$ CER[NP] (3,65 nm; 20 °C).

Ein Polymorphismus wie beim CER[NP] konnte bei beiden Substanzen nicht beobachtet werden. Weder $C_{18:1}$ CER[NP] noch $C_{18:2}$ CER[NP] zeigen fest/fest-Phasenumwandlungen.

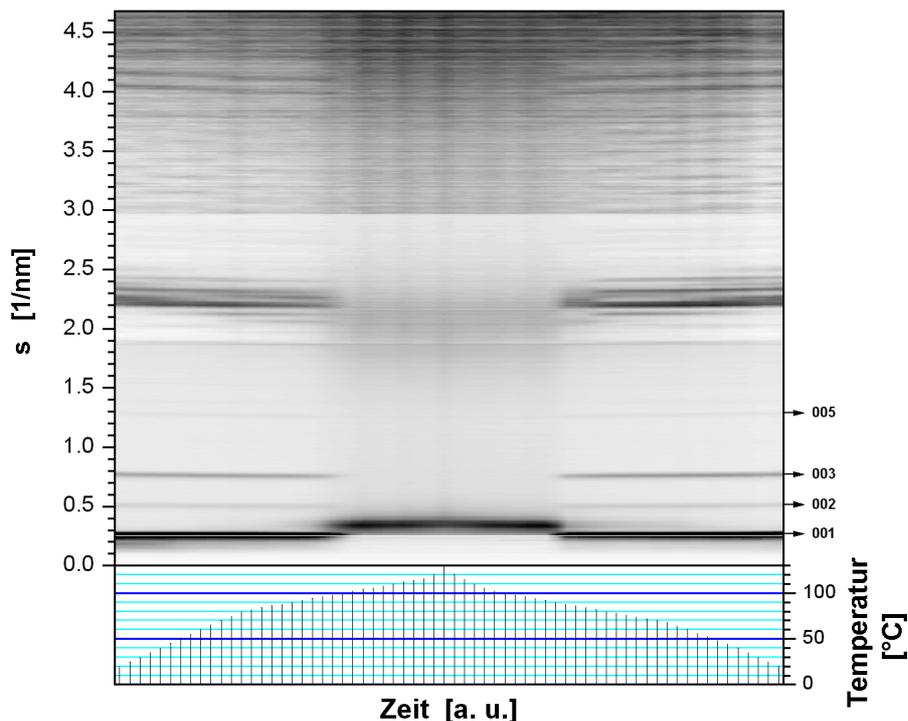


Abb. 39 Röntgenkonturplot von $C_{18:1}$ CER[NP]. Die Ordnungen der lamellaren Überstruktur wurden mit ihren Miller'schen Indices gekennzeichnet.

FT-IR-spektroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Kopfgruppenstruktur (Wasserstoffbrückenbindungen) von $C_{18:1}CER[NP]$ und $C_{18:2}CER[NP]$ denen der β -Modifikation des gesättigten $CER[NP]$ entsprechen (S. Anhang S.129). Sowohl die NH- und OH-Streckschwingungsbanden als auch die Amid I- und die Amid II-Banden der Spektren von $C_{18:1}CER[NP]$ und $C_{18:2}CER[NP]$ entsprechen in ihrer Bandenposition, Bandenform und Intensität denen des Spektrums von $CER[NP]$ in der β -Phase. Es sind eindeutige Unterschiede im Vergleich mit dem PA-Spektrum des $CER[NP]$ festzustellen, da sich die Substanz $CER[NP]$ unter den experimentellen Bedingungen in der α -Modifikation befand.

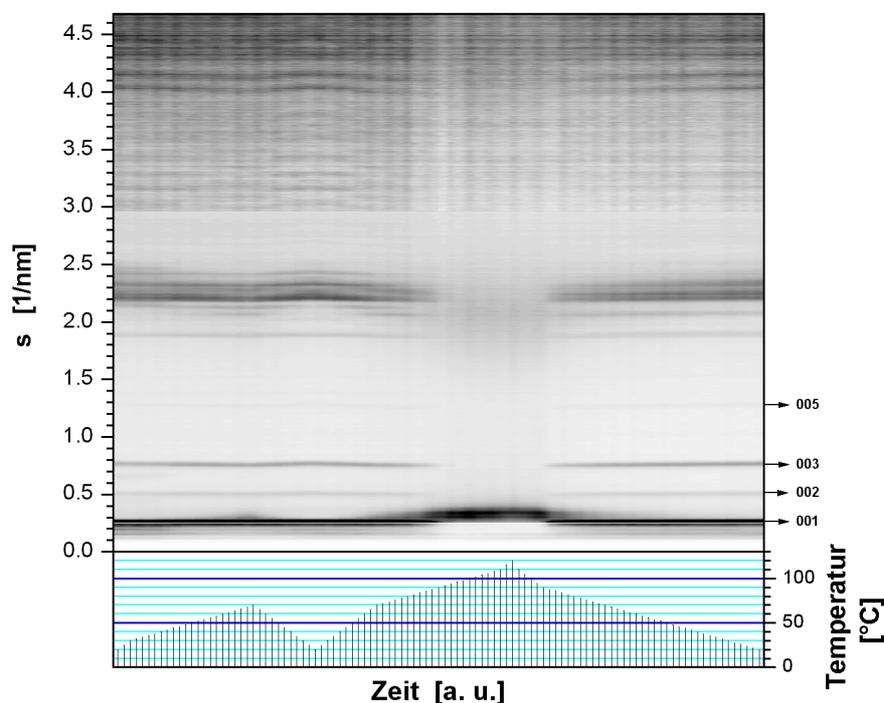


Abb. 40 Röntgenkonturplot von $C_{18:2}CER[NP]$. Die Ordnungen der lamellaren Überstruktur wurden mit ihren *Miller'schen* Indices gekennzeichnet.

Nach Beendigung des Kettenschmelzens zeigen $C_{18:1}CER[NP]$ und $C_{18:2}CER[NP]$ im Röntgenweitwinkelbereich ein Halo und im Kleinwinkelbereich eine diffuse Streuung. Eine charakteristische Überstruktur ist nach dem Kettenschmelzen nicht mehr feststellbar. Die Ausbildung einer invers hexagonalen Phase H_{II} beziehungsweise einer lamellaren flüssigkristallinen Phase $L\alpha$ bei Temperaturen oberhalb des Kettenschmelzens konnte nicht beobachtet werden. Die Proben sind optisch isotrop.

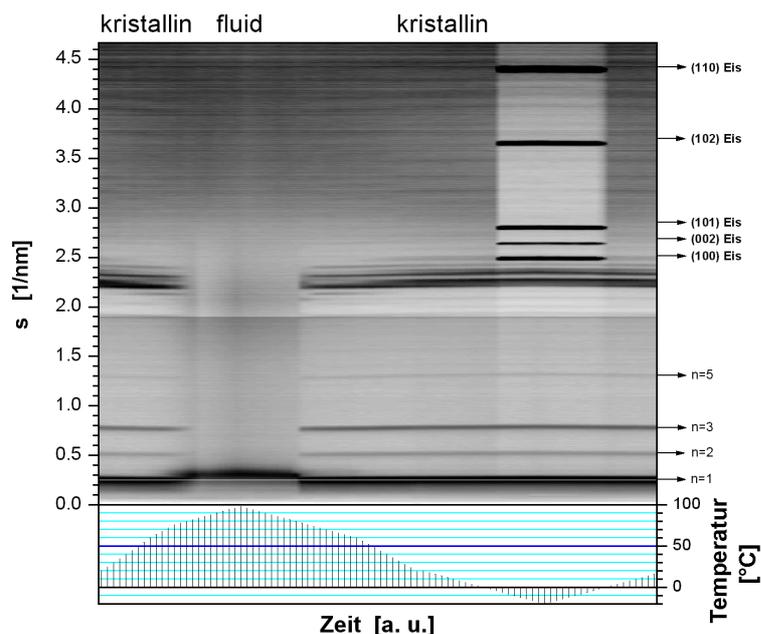
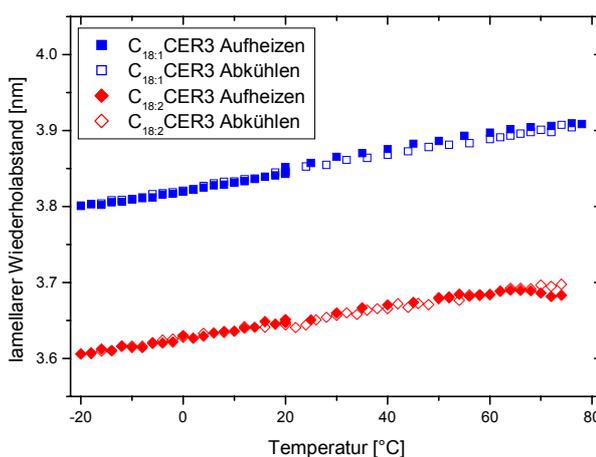


Abb. 41 Röntgenkonturplot einer Dispersion aus $C_{18:1}$ CER[NP] und Wasser (25/75m%). Die SAXS-Intensitäten wurden logarithmisch aufgetragen. Die ersten fünf Ordnungen der lamellaren Überstruktur der geordneten Phase sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

Werden die Substanzen im Beisein von Wasser über den Schmelzpunkt erhitzt, kann keine lamellare Überstruktur mehr nachgewiesen werden. Die Abkühlung der in Wasser dispergierten fluiden Phase führt reversibel zur Ausbildung der Ausgangsstruktur. Eine heiße Hydratisierung wie beim CER[AS] ist demnach nicht möglich. Die Struktur des einfach-ungesättigten $C_{18:1}$ CER[NP] wird weder vor noch nach dem Aufschmelzen der Alkylketten von Wasser beeinflusst. Lediglich die Temperatur des Kettenschmelzens wird durch den Zusatz von Wasser um etwa 20 K herabgesetzt.

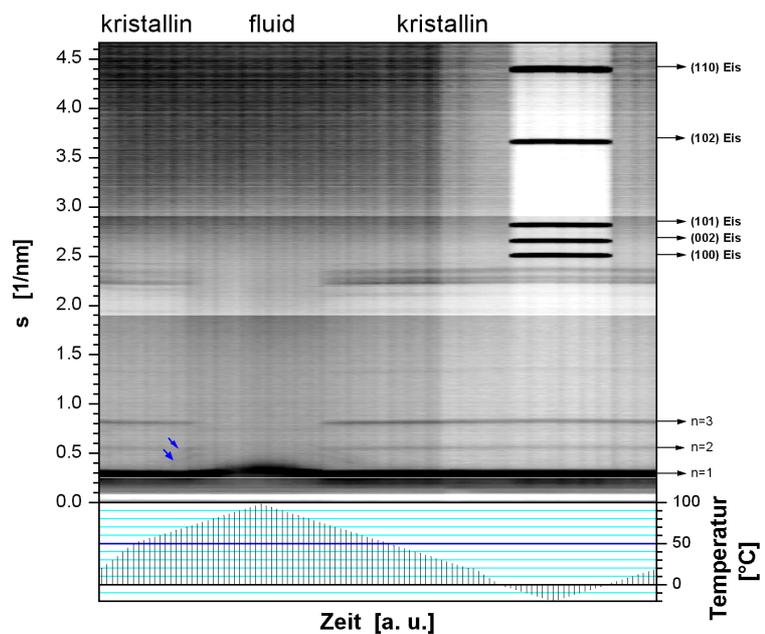
Abb. 42 Temperaturabhängige Änderungen der lamellaren Wiederholabstände der in Wasser dispergierten Ceramide $C_{18:1}$ CER[NP] und $C_{18:2}$ CER[NP].



Ebenso verhält es sich auch mit $C_{18:2}$ CER[NP]. Wie beim gesättigten CER[NP] bewirkt eine Zugabe von Wasser keine strukturellen Änderungen. Die Reflexlagen sind mit denen der trockenen Substanz identisch. Auch die Kristallisation von Eis ändert die Strukturen der Ceramide nicht, da sowohl die Schichtreflexe im SAXS als auch die Reflexe im WAXS der Ceramide beim Auftreten der Eisreflexe unbeeinflusst bleiben.

Im Unterschied zum Oleoylphytosphingosin tritt beim Lineoylphytosphingosin vor Erreichen des Kettenschmelzens zwischen 60 und 80 °C ein Koexistenzbereich lamellarer und hexagonaler Überstrukturen auf. Die Intensität der Reflexe der lamellaren Struktur nimmt mit Zunahme der hexagonalen Struktur ab. Beim Aufschmelzen der Ketten verschwinden die Kleinwinkelreflexe beider Überstrukturen simultan. Aus der fluiden Phase bilden sich beim Abkühlen beide Überstrukturen wieder. Wird die Probe auf Temperaturen < 60 °C abgekühlt, ist nur noch die lamellare Überstruktur nachweisbar.

Abb. 43 Röntgenkonturplot einer Dispersion aus $C_{18:2}$ CER[NP] und Wasser (25/75m%). Die SAXS-Intensitäten wurden logarithmisch aufgetragen. Die ersten drei Ordnungen der lamellaren Überstruktur der geordneten Phase sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die blauen Pfeilspitzen im Diagramm zeigen die Reflexe der 2. und 3. Ordnung einer hexagonalen Überstruktur.



Ceramid AP

Das von Cosmoferm zur Verfügung gestellte CER[AP] (Siehe S.15 f) ist ein Gemisch zweier Diastereomeren, das synthetisch aus der racemischen DL- α -Hydroxystearinsäure und Phytosphingosin gewonnen wurde. Das unbehandelte Diastereomerengemisch wurde bereits von Garidel (2002) mittels DSC und FT-IR-ATR charakterisiert. Da Diastereomere grundsätzlich unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen, ist es naheliegend, die reinen Diastereomeren separat zu untersuchen. Das Diastereomerengemisch wurde im Rahmen dieser Arbeit nur mit DSC charakterisiert.

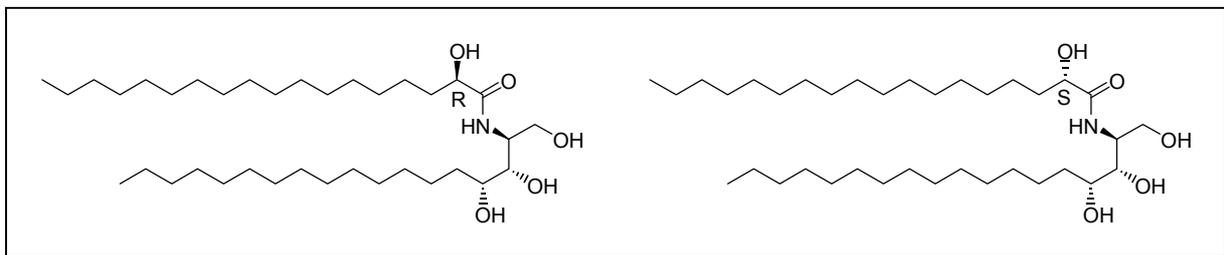


Abb. 44 Strukturformeln von CER[AP]. Die linke Struktur mit dem R-konfigurierten Kohlenstoffatom in α -Position zur Carbonylgruppe ist D-CER[AP]. Bei der rechten Formel handelt es sich um L-CER[AP].

Durch säulenchromatographische Aufbereitung konnte das von Cosmoferm zur Verfügung gestellte Diastereomerengemisch präparativ in D- CER[AP] und L- CER[AP] getrennt werden. Für die Röntgenbeugungsexperimente und spektroskopische Untersuchungen wurden nur die reinen Fraktionen verwendet.

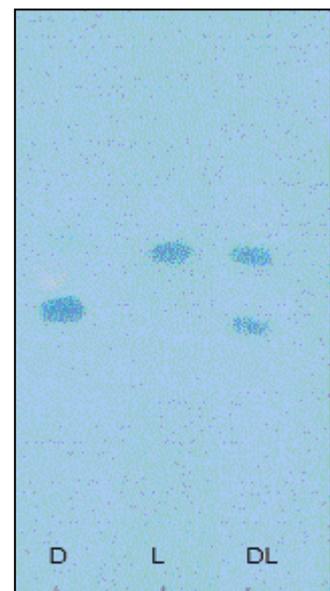


Abb. 45 Dünnschichtchromatographische Trennung von Ceramid AP.
Detektion mit Bromthymolblau.

L-CER[AP]

Das aus einer Chloroform/THF-Mischung kristallisierte L-CER[AP] zeigt im Röntgenkleinwinkelbereich drei äquidistante Reflexe, die einer lamellaren Überstruktur mit einem Schichtabstand von 4,43 nm entsprechen. Im Weitwinkelbereich werden mehrere scharfe Reflexe beobachtet, die für eine hochgeordnete Kristallstruktur sprechen. In Anlehnung an die Terminologie der kristallinen Phasen von CER[NP] wurde die Ausgangsstruktur von L-CER[AP], welche den weitesten Lamellenabstand aufweist, mit δ bezeichnet. Beim Erhitzen der Substanz wurde bei 90 °C eine fest/fest-Umwandlung beobachtet. Im Zuge dieser Phasenumwandlung verringert sich der lamellare Wiederholabstand sprunghaft von 4,44 nm auf 3,89 nm (100 °C). Diese kristalline, mit β bezeichnete Phase erreicht bei 120 °C das Kettenschmelzen. Hierdurch verringert sich der Schichtabstand erneut sprunghaft auf 3,63 nm (125 °C). Es entsteht eine flüssigkristalline Phase mit lamellarer Überstruktur ($L\alpha$ -Phase). Durch Abkühlen der $L\alpha$ -Phase wird der 3,9 nm Abstand erreicht.

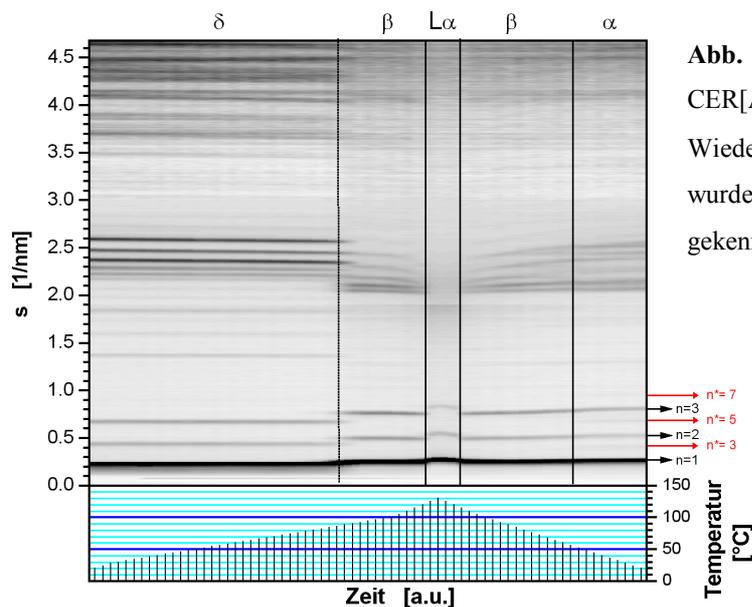
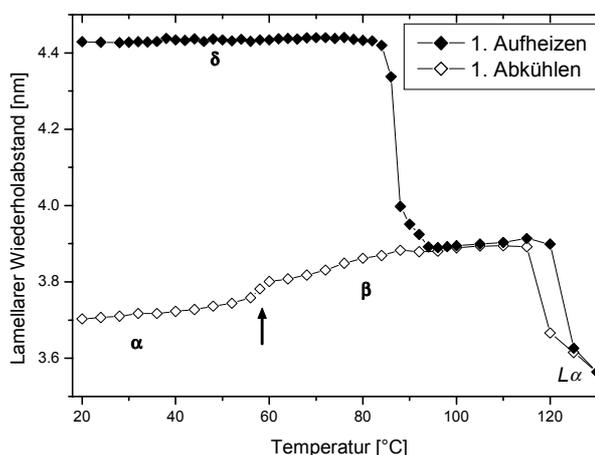


Abb. 46 Röntgenkonturplot des trockenen L-CER[AP]. Die Schichtreflexe des großen Wiederholabstandes der kristallinen α -Phase wurden mit langen roten Pfeilen gekennzeichnet.

Dieser verringert sich bei weiterem Abkühlen auf 3,7 nm bei 20 °C. Bei etwa 58 °C wird eine Stufe beobachtet, die als Phasenumwandlung interpretiert wird. Die hierbei entstehende kristalline Modifikation von L-CER[AP] wurde als α -Phase bezeichnet. Interessanterweise treten bei Temperaturen unterhalb dieser Phasenumwandlung drei neue Reflexe zwischen den Reflexen (001) und (002), zwischen (002) und (003) und oberhalb des (003)-Reflexes auf. Diese ebenfalls äquidistanten Reflexe wurden als Schichtreflexe der 3., 5. und 7. Ordnung einer weiteren lamellaren Überstruktur mit einem Wiederholabstand von 7,15 nm (20 °C)

indiziert. Die zu diesem Wiederholabstand gehörigen Reflexe der 2., 4. und 6. Ordnung werden von den Schichtreflexen der ersten drei Ordnungen des 3,8 nm Abstandes überlagert und können nicht identifiziert werden. Dieser lange Wiederholabstand zeigt eine temperaturabhängige Aufweitung, die mit den Änderungen des kürzeren Wiederholabstandes direkt korreliert.

Abb. 47 Temperaturabhängigkeit des lamellaren Wiederholabstandes des trockenen L-CER[AP]. Die Umwandlung der β -Phase in die α -Phase ist mit einem Pfeil hervorgehoben.



Im Röntgenweitwinkelbereich werden eine Vielzahl von Beugungsreflexen detektiert, deren Indizierung nicht einfach ist. Betrachtet man die fest/fest-Umwandlung, so ist festzustellen, dass zwei starke Reflexe bestehen bleiben, mehrere Reflexe verschwinden und neue hinzukommen. Da im Kleinwinkelbereich für jede Phase nur jeweils eine spezifische Überstruktur gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der Weitwinkelbereich das Beugungsmuster zweier Kettenpackungen widerspiegelt von denen eine Kettenpackung konstant bleibt und die andere sich ändert. Das Vorliegen mehrerer Kettenpackungen in einer Phase konnte auch bei CER[NP] gefunden werden. Die Zuordnung der Reflexe zu den beiden Subzellen wird durch die entsprechende Trennung während der Phasenumwandlung erleichtert.

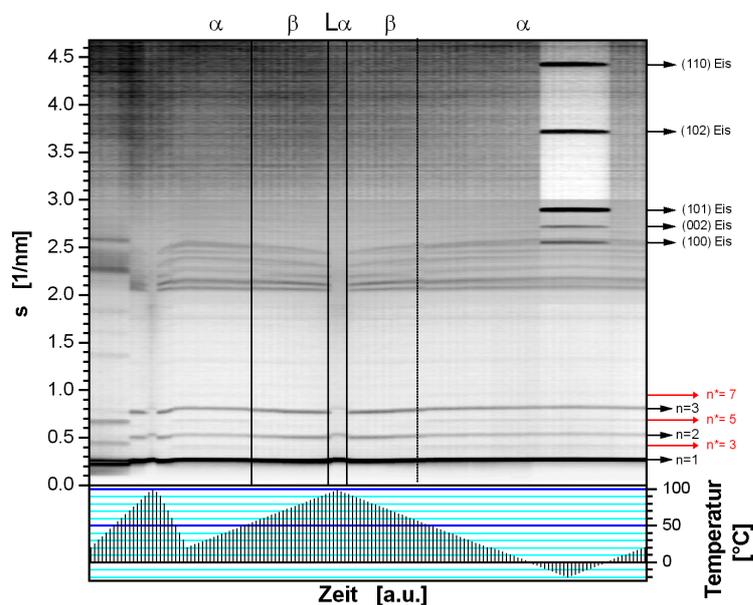


Abb. 48 Röntgenkonturplot einer L-CER[AP] - Wasser Dispersion (25/75 m%). Die Schichtreflexe des langen Wiederholabstandes (7 nm) der kristallinen α -Phase sind mit langen roten Pfeilen gekennzeichnet.

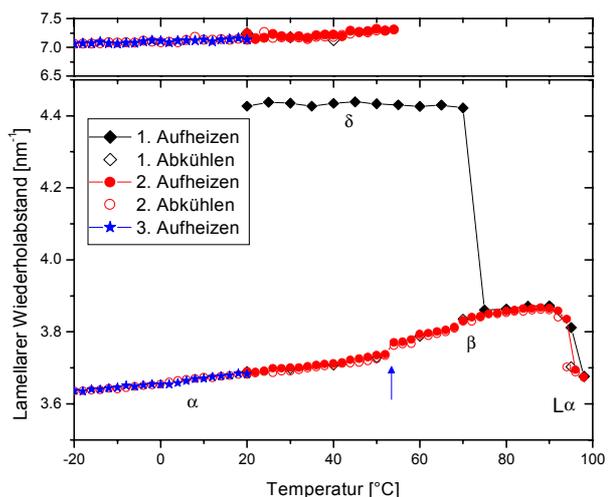
Leider stehen zur Interpretation keine Einkristalldaten zur Verfügung, die im Falle der Ölsäure die Indizierung erleichterten (Tandon et al. 2000). Mit spektroskopischen Untersuchungen konnte anhand der Faktorgruppenaufspaltung der CH₂-Scherschwingung eine antiparallele Orientierung der Ketten nachgewiesen werden.

Eine Zugabe von Wasser im Überschuss ändert die Phasenabfolge nicht. Allerdings wird die Phasenumwandlungstemperatur des Kettenschmelzens drastisch herabgesetzt. Die flüssigkristalline L α -Phase wird im vollständig hydratisierten System schon bei etwa 90 °C erreicht. Die Phasenabfolge beim Abkühlen ist mit der wasserfreien Probe identisch.

Auch hier werden bei Temperaturen < 50 °C zusätzliche Reflexe im Kleinwinkelbereich beobachtet, die einer lamellaren Struktur mit einem Schichtabstand von 7 nm entsprechen.

Wird die Kristallisationstemperatur des Wassers erreicht, werden im Röntgenweitwinkelbereich Eisreflexe sichtbar. Der breite Untergrund, welcher durch die Röntgenbeugung des flüssigen Wassers hervorgerufen wird, verschwindet erwartungsgemäß. Die reversible Kristallisation des Wassers bewirkt bei den Schichtreflexen keine Änderungen. Der lamellare Wiederholabstand verringert sich weiterhin kontinuierlich auf 3,62 nm (-20 °C) und bleibt von der Eiskristallisation unbeeinflusst. Bei erneutem Erhitzen verschwinden bei 0 °C die Eisreflexe zu Gunsten des breiten Streuprofiles des flüssigen Wassers. Der lamellare Wiederholabstand vergrößert sich mit steigender Temperatur. Die Kristallreflexe von L-CER[AP] im Weitwinkelbereich werden von der Eiskristallisation ebenfalls nicht beeinflusst. Die Reflexlagen von L-CER[AP] sind mit denen der trockenen Probe identisch.

Abb. 49 Temperaturabhängige Verschiebung des lamellaren Wiederholabstandes in der L-CER[AP]-Wasser-Dispersion (25/75 m %). Die Umwandlung der β -Phase in die α -Phase ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Im oberen Bildfenster: Temperaturabhängigkeit des langen lamellaren Wiederholabstandes der kristallinen α -Phase (berechnet aus den gewichteten Mittelwerten der Reflexe der 3. und 5. Ordnung).



Für eine Dispersion aus L-CER[AP] und Wasser wurde die Temperaturabhängigkeit der Raman-Spektren untersucht. In den bei Raumtemperatur aufgenommenen Raman-Spektren signalisieren die Position der symmetrischen CH₂-Streckschwingungsbande und die

intensitätsstarken CC-Streckschwingungsbanden eine hohe Orientierung der Kohlenwasserstoffketten, die nahezu vollständig *all-trans* Konformation aufweisen. Bis zur ersten Phasenumwandlung ist nur eine sehr geringe Zunahme an *gauche*-Konformeren festzustellen. Des Weiteren lässt sich eine Aufspaltung der CH₂-Scherschwungung in drei Banden beobachten, die im Verlaufe der Umwandlung in die β -Phase verschwindet. Diese Faktorgruppenaufspaltung zeigt eine orthorhombische Orientierung (O \perp) der Alkylketten an, bei der zwei Alkylketten in einer Subzelle angeordnet sind. Mit Hilfe der IR-Spektroskopie konnten gleichbedeutende Aufspaltungen der CH₂-Scherschwungung und der CH₂-rocking Mode beobachtet werden.

Neben den Änderungen im Bereich der Scherschwungung wurden beim Übergang von der δ - in die β -Phase eine sprunghafte Verschiebung der symmetrischen CH₂-Streckschwingungsbande und ein Intensitätsrückgang der antisymmetrischen CH₂-Streckschwingungsbande beobachtet. Die scharfen Banden der symmetrischen und antisymmetrischen CC-Streckschwungung verlieren an Intensität zu Gunsten eines Anstiegs der breiten Bande bei 1090 cm⁻¹. Des Weiteren ändert sich die Bandenform der CH₂-twisting-Bande, welche in der β -Phase von einer ausgeprägten Schulter überlagert wird. Die Bande der CH₃-rocking Schwingung bei 891 cm⁻¹ erfährt eine deutliche Verbreiterung. Alle aufgeführten Änderungen lassen auf eine Zunahme von *gauche*-Sequenzen in den Kohlenwasserstoffketten von L-CER[AP] in Folge der δ - β -Umwandlung schließen.

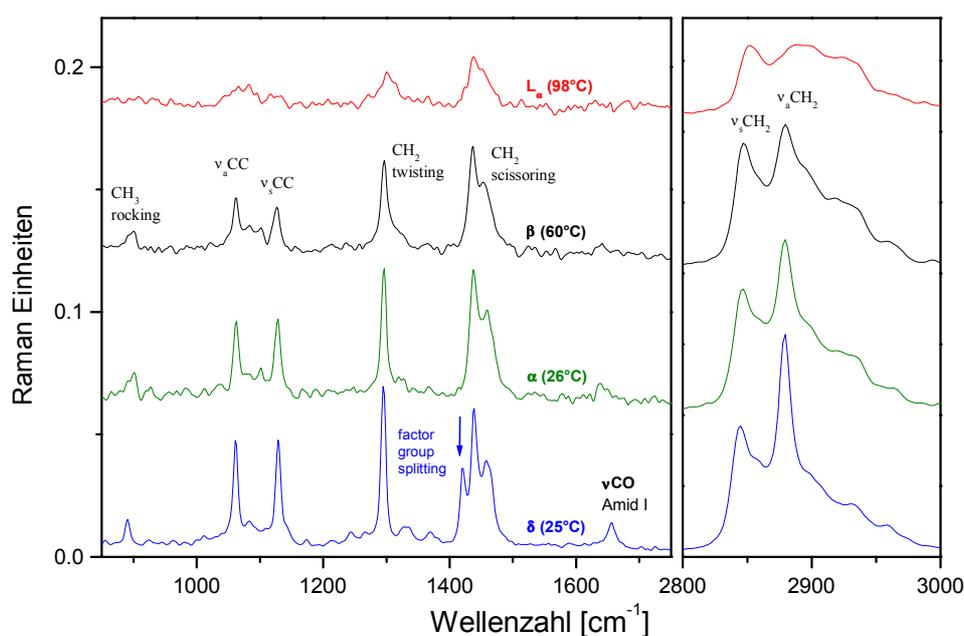


Abb. 50 Ramanspektren und Bandenzuordnung von Ceramid L-AP + Wasser (25/75 m%).

Zusätzlich ändern sich Position und Bandenform der Amid I-Bande ($\nu\text{C=O}$). Eine strukturelle Beeinflussung der Kopfgruppe bedingt durch die Umwandlung von der δ - in die β -Modifikation ist aus diesen Änderungen bereits ableitbar. Da die Amid-Banden nur schwach Raman-aktiv sind, sollten temperaturabhängige IR-Messungen folgen, die umfangreichere Aussagen über die Kopfgruppen liefern können.

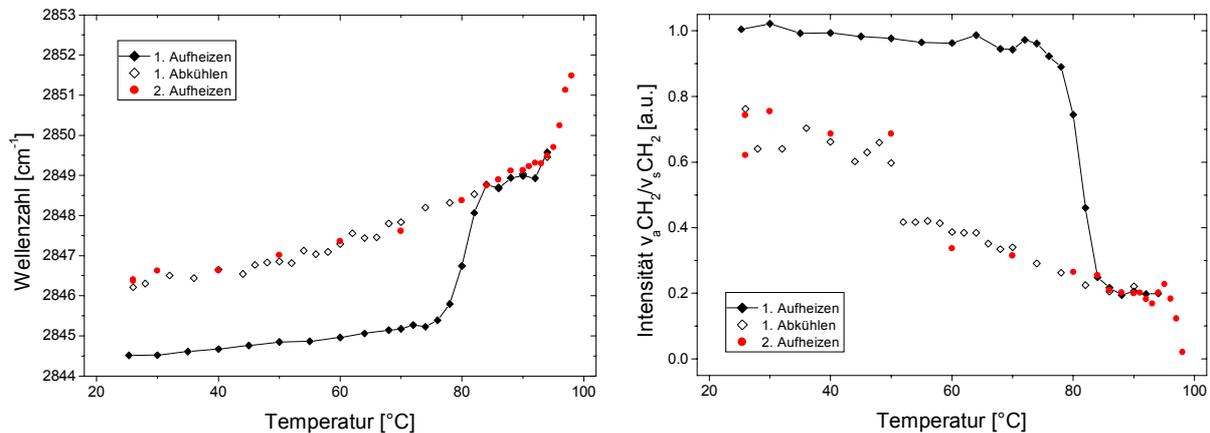


Abb. 51 Temperaturabhängigkeit der Bandenposition der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung ($\nu_s\text{CH}_2$) (links). Die Intensität der $\nu_a\text{CH}_2$ -Bande wurde auf die $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande normiert (rechts).

Die Raman-Spektren der aus der β -Phase durch Abkühlen entstehenden α -Phase zeigen im Vergleich zu den Spektren der β -Phase einen geringeren Anteil an *gauche*-Konformeren. In beiden Phasen kann eine kontinuierliche Verschiebung der symmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande zu höheren Wellenzahlen beobachtet werden. Der Phasenübergang von der α - in die β -Phase wird durch die sprunghafte Intensitätsänderung der antisymmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande im Vergleich zur symmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande erkennbar. Weitere sprunghafte Änderungen werden beim Übergang in die flüssigkristalline Phase beobachtet. Bei 98 °C liegen die Alkylketten von L-CER[AP] vollständig verknäult vor. Die scharfen CC-Streckschwingungsbanden sind in diesem Zustand nicht mehr festzustellen.

D-CER[AP]

Das wasserfreie D-CER[AP] kristallisiert in einer lamellaren Überstruktur mit einem Schichtabstand von 4,5 nm. Diese mit α bezeichnete Phase zeigt beim Aufheizen eine Phasenumwandlung in die Phase β , in Folge derer sich im Kleinwinkelbereich die Schichtreflexe zu kleineren Beugungswinkeln verschieben. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung zweier Reflexe einer neuen Überstruktur, die nicht mit dem breiten Halo im WAXS korreliert werden können. Diese beiden Reflexe erfahren eine temperaturabhängige Verschiebung zu größeren Beugungswinkeln. Das Kettenschmelzen vollzieht sich über einen breiten Temperaturbereich beginnend bei etwa 80 °C und ist bei 100 °C abgeschlossen.

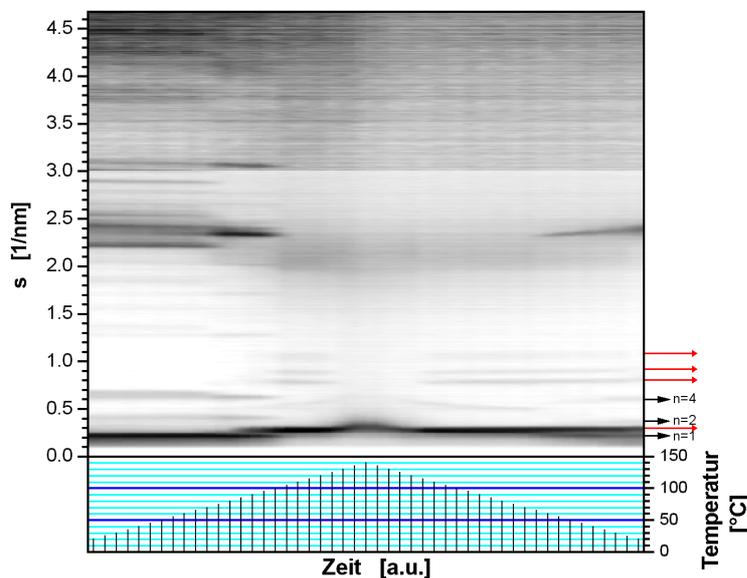


Abb. 52 Röntgenkonturplot des trockenen Ceramid D-AP

Mit dem Einsetzen des Kettenschmelzens sind Reflexe einer flüssigkristallinen $L\alpha$ Phase der ersten und zweiten Ordnung zu finden. Diese Schichtreflexe zeigen ähnlich dem L-CER[AP] eine temperaturabhängige Verschiebung zu größeren Streuwinkeln. Zusätzlich werden noch weitere schwache Reflexe zwischen 0,6 und 1,2 nm⁻¹ beobachtet, die nicht indiziert werden konnten. Beim Abkühlen kommt es zu einer langsamen Rekristallisation einer lamellaren Struktur mit hexagonaler Kettenpackung. Diese Phase ist beim Abkühlen bis auf 20 °C stabil. Die flüssigkristalline Phase bleibt bis 20 °C nachweisbar. Eine Umwandlung in eine Phase mit orthorhombisch orientierten Ketten wurde unter den experimentellen Bedingungen nicht beobachtet. Das Auftreten von mehreren Subzellen wie beim oben beschriebenen L-CER[AP] kann aus den Messungen an L-CER[AP] nicht abgeleitet werden.

Wird D-CER[AP] im Überschuss Wasser zugesetzt, beobachtet man beim Aufheizen eine lamellare Struktur, die mit der nicht hydratisierten Probe identisch ist. Die fest/fest-Umwandlung konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Mit der Phasenumwandlung verschiebt sich der lamellare Wiederholabstand sprunghaft von 4,5 auf 4,7 nm.

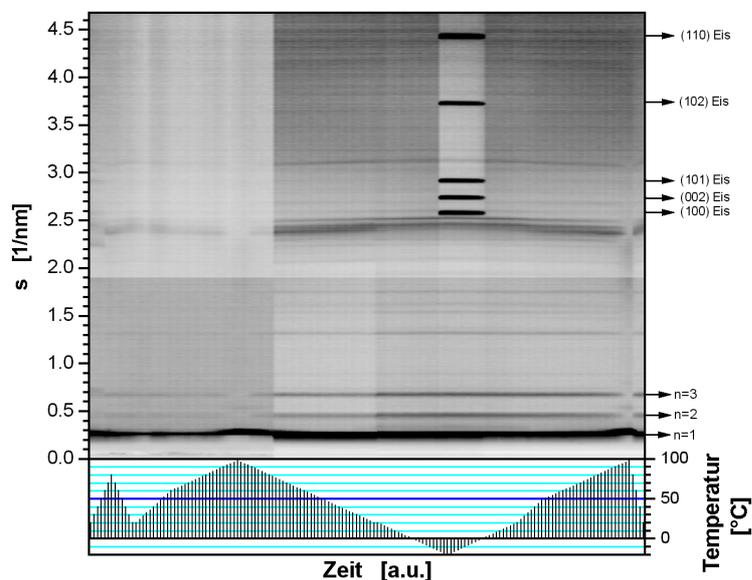
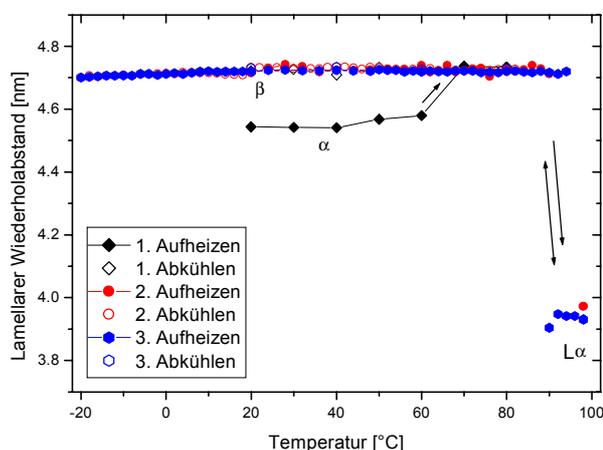


Abb. 53 Röntgenkonturplot einer Ceramid D-AP + Wasser Dispersion (25/75 m%).

Bei 90 °C schmelzen die Alkylketten. Im Kleinwinkelbereich werden oberhalb dieser Temperatur drei äquidistante Reflexe gefunden, die den ersten drei Ordnungen einer lamellaren Überstruktur zugeordnet werden können. Die $L\alpha$ -Phase zeigt einen lamellaren Wiederholabstand von 4,0 nm. Beim Abkühlen der $L\alpha$ -Phase kristallisiert die lamellare Phase mit einem lamellaren Abstand von 4,7 nm. Durch weiteres Abkühlen des D-CER[AP] konnte keine weitere Phasenumwandlung gefunden werden. Der lamellare Wiederholabstand zeigt im Gegensatz zu L-CER[AP] nur eine sehr geringe temperaturabhängige Aufweitung von 4,70 nm (-20 °C) zu 4,72 nm (80 °C). Von der Eiskristallisation bleibt D-CER[AP] sowohl hinsichtlich Kettenpackung als auch Überstruktur unbeeinflusst.

Abb. 54 Temperaturabhängigkeit des lamellaren Wiederholabstandes in einer D-CER[AP]-H₂O-Dispersion (25/75 m %). Die Pfeile zeigen die Richtung der reversiblen bzw. irreversiblen Umwandlung an.



In den Raman-Spektren zeigen die konformationempfindlichen Banden eine hohe Ordnung der Alkylketten von D-CER[AP] an. Im Gegensatz zu L-CER[AP] beobachtet man weder vor dem ersten Aufheizen noch nach dem Abkühlen aus der $L\alpha$ -Phase eine Faktorgruppenaufspaltung der CH_2 -Scherschwung. Somit packen die Alkylketten von D-CER[AP] in keiner der gefundenen Phasen in orthorhombischen Subzellen.

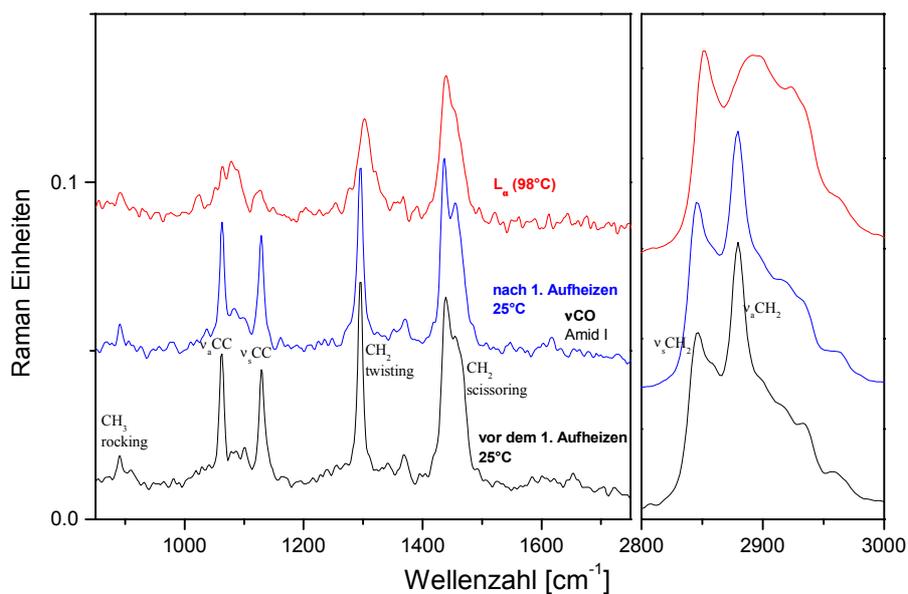


Abb. 56 Ramanspektren und Bandenzuordnung von Ceramid D-AP + Wasser (25/75 m%).

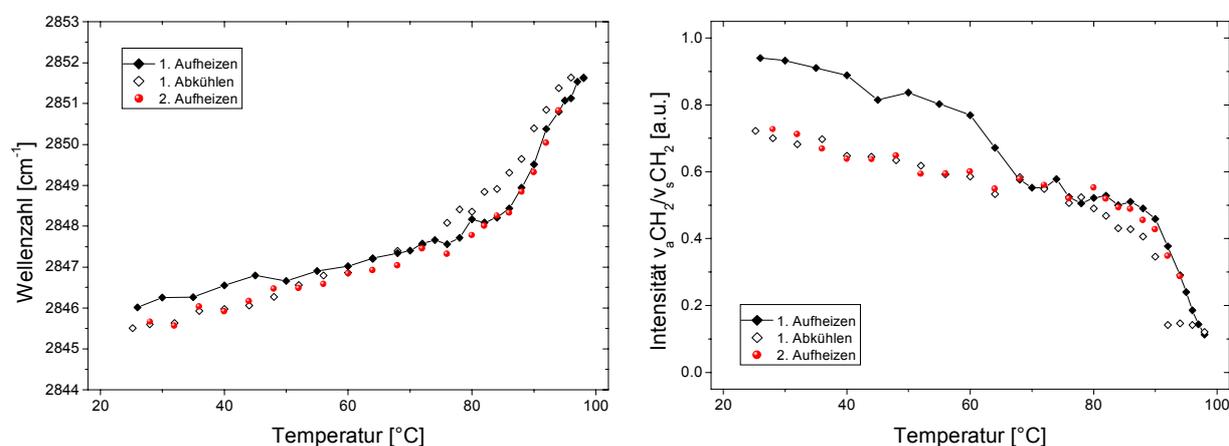


Abb. 55 Temperaturabhängigkeit der Bandenposition der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung (links). Intensität der $\nu_a\text{CH}_2$ -Bande normiert auf die $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande (rechts).

Im Bereich der Amid I-Bande, im CH_2 -Scher- und im CH_2 -Streckschwingungsbereich der Raman-Spektren können vor beziehungsweise nach dem ersten Aufheizen auffällige Unterschiede beobachtet werden. Die antisymmetrische CH_2 -Streckschwingung zeigt nach dem Abkühlen eine deutlich geringere Intensität als vor dem Aufheizen.

Vergleichende Betrachtung von L-CER[AP] und D-CER[AP]

Unter den in der Natur vorkommenden α -Hydroxyfettsäureceramiden existieren nur die D-Komponenten (D-CER[AP]). Nach Karlsson et al. (1974) zeigt deren Hydroxylgruppe in die vom Molekül entfernte Richtung, wodurch intermolekulare Wechselwirkungen ermöglicht werden. Im Molekül der unnatürlichen L-Komponente (L-CER[AP]) hingegen, soll die α -Hydroxylgruppe sehr nahe zum Carbonyl-Sauerstoffatom der Amidbindung stehen und zu dieser eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung ausbilden können. Eine derartige intramolekulare Kompensation der polaren Strukturen würde zu einer deutlichen Erniedrigung der Polarität im Vergleich zur natürlichen D-Form (Pascher 1976) führen, woraus eine unterschiedliche chromatographische Mobilität resultieren würde.

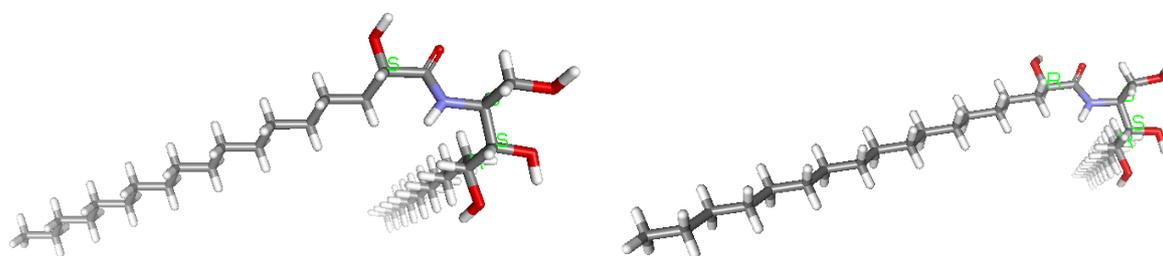


Abb. 57 Raumstrukturen von Ceramid CER[AP] (links L- CER[AP] und rechts D- CER[AP]).

Die Moleküle wurden so ausgerichtet, dass die Phytosphingosinseitenketten beider Moleküle in die Papierebene zeigen. Die Molekülteile, welche im Bildhintergrund liegen, wurden heller gezeichnet. Im Unterschied zu L-AP, dessen Fettsäureseitenkette ebenfalls in die Papierebene zeigt (hell), richtet sich die Fettsäureseitenkette des D-AP zum Betrachter (dunkel).

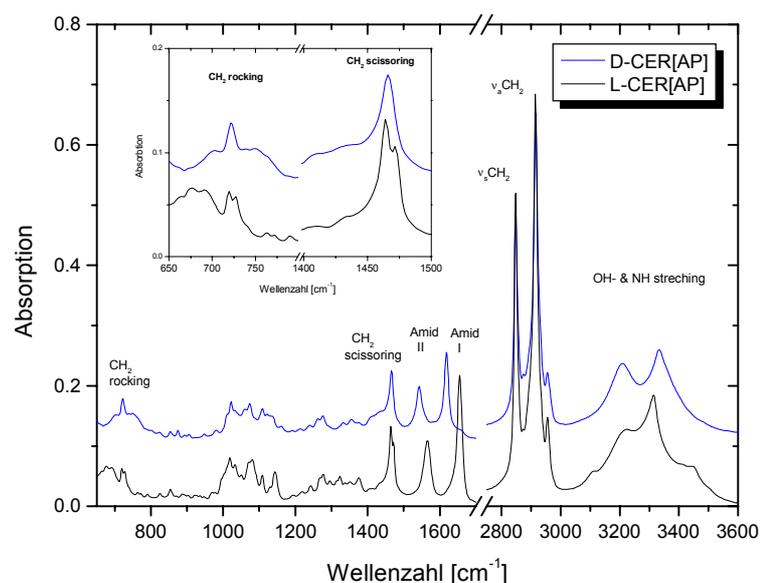
Eine einfache Computersimulation mit Chem3D und WebLabViewer konnte jedoch zeigen, dass weder in D-CER[AP] noch in L-CER[AP] intramolekulare Wasserstoffbrücken von der α -Hydroxylgruppe zum benachbarten Carbonylsauerstoff möglich sind. Das nicht identische chromatographische Laufverhalten der beiden Diastereomeren wird daher zunächst mit der unterschiedlichen Raumstruktur in Verbindung gebracht. In der gestreckteren D-Form werden die Hydroxylgruppen in einem anderen Ausmaß sterisch abgeschirmt als in der spitzeren L-Form. Diese konformativen Unterschiede wirken sich auch noch im Zustand mit ungeordneten Ketten aus, der letztlich in einer Lösung vorliegt, und bestimmen damit die Verteilungsvorgänge an der stationären Phase in der Chromatographie. Die höhere chromatographische Mobilität des L-CER[AP] ist in diesem Sinne begründbar. Ein weiterer in diesem Zusammenhang zu betrachtender Aspekt ist die mögliche Dimerenbildung von

Ceramiden, die bereits als 1:1-Ceramid-Addukte für CER[NP] mit Hilfe der Massenspektrometrie gefunden wurden (Trommer, 2002a). Da die CER[NP]-Addukte in der Kapillarelektrophorese stabil sind (Trommer, 2002b), werden als Ursache für den Zusammenhalt starke intermolekulare Wechselwirkung diskutiert. Weil eine Adduktbildung über Wasserstoffbrückenbindungen in der mobilen Phase ebenfalls zu einer Kompensation der polaren Strukturen führt, wird das chromatographische Laufverhalten von der Art und dem Ausmaß dieser nichtkovalenten Bindungen zwischen den Molekülen der Addukte bestimmt.

Obwohl beide Substanzen identische Alkylketten besitzen, zeigen diese jedoch signifikante Unterschiede im Packungsverhalten der kristallinen Phasen. Eine orthorhombisch senkrechte Orientierung der Lipidketten mit zwei Ketten in einer Subzelle konnte nur in der δ -Phase des L-CER[AP] nachgewiesen werden.

Ganz offensichtliche Unterschiede zeigen auch die IR-Spektren, die neben dem Packungsverhalten der Alkylketten auch Eigenschaften der Kopfgruppe widerspiegeln. Die Aufspaltung der CH₂-scissoring und der CH₂-rocking Schwingungen in den IR-Spektren von L-CER[AP] untermauern die Strukturinformationen der Ramanspektroskopischen Ergebnisse. Besonders auffallend sind jedoch die verschiedenen Bandenpositionen der Amid I und II-Banden der beiden Diastereomeren sowie der Bereich der OH- und NH-Streckschwingungsbanden. Diese Differenzen in den IR-Spektren werden auf verschiedene Möglichkeiten zur Ausbildung inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeführt.

Abb. 58 FT-IR-Spektren von D-CER[AP] und L-CER[AP] (δ -Phase) gemessen mit der ATR-Technik bei 25 °C. Die Bereiche der CH₂-rocking und CH₂-scissoring Schwingungen wurden vergrößert (Inset).



Aus der niedrigen Position der Amid I-Bande lässt sich ableiten, dass das Carbonylsauerstoffatom von L-CER[AP] weniger stark über Wasserstoffbrückenbindungen beeinflusst wird als in D-CER[AP].

Auch die flüssigkristallinen Strukturen des trockenen D-CER[AP] unterscheiden sich von denen des L-CER[AP]. Zwar zeigen beide Diastereomeren nach dem Kettenschmelzen lamellare Überstrukturen, jedoch unterscheiden sich die Schichtabstände der $L\alpha$ -Phasen, obwohl beide Substanzen identische Kettenlängen besitzen. Während L-CER[AP] in der $L\alpha$ -Phase einen Lamellenabstand von 3,6 nm aufweist, ist der lamellare Wiederholabstand von D-CER[AP] mit 3,9 nm deutlich größer. Auch in den kristallinen Phasen weist L-CER[AP] den geringeren Schichtabstand auf. Dieser Unterschied lässt sich durch die Lage der beiden Alkylketten im dreidimensionalen Raum begründen. Lässt man intermolekulare Wechselwirkungen außen vor und betrachtet nur die singulären Moleküle, so schließen die Ketten beider Substanzen einen Winkel ein, der im L-CER[AP] deutlich spitzer ist, als im D-CER[AP]. Der Schichtabstand von 4,7 nm bei D-CER[AP] lässt sich nur durch eine nahezu gestreckten Konformation erklären, die annäherungsweise senkrecht zur Lamellenebene ausgerichtet ist.

Die Lamellenabstände beider Diastereomeren bleiben von der Kristallisation des Wassers unbeeinflusst. Daraus kann man schlussfolgern, dass sich Wasser nicht zwischen die polaren Ceramid-Kopfgruppen einlagern kann.

Vergleicht man die strukturellen Eigenschaften der beiden CER[AP]-Ceramide mit CER[AS] und CER[NP], nehmen die CER[AP]-Ceramide eine Zwischenstellung ein. Die kristallinen Phasen des L-CER[AP] ähneln sowohl hinsichtlich des Packungsverhaltens als auch der Überstruktur sehr denen des CER[NP]. Auch lässt sich Wasser nicht in die Struktur der CER[AP]-Ceramide integrieren, solange diese geordnete Alkylketten aufweisen.

Schmelzen jedoch die Ketten von CER[AP] zeigen CER[AP]-Ceramide im Gegensatz zu CER[NP] eine flüssigkristalline Überstruktur. Diese ist jedoch nicht wie bei CER[AS] hexagonal sondern lamellar ($L\alpha$).

Ceramid-Ölsäure Mischsysteme

Ölsäure (OA) ist ein Hauptbestandteil der Fettsäurefraktion der SC-Lipide. In Mischungen mit natürlichen SC-Lipiden werden die Phasenumwandlungstemperaturen der Lipide durch OA deutlich herabgesetzt. Im *Stratum corneum* soll OA ebenso fluidisierend auf hochgeordnete Lipide wirken, womit ihre penetrationsfördernde Eigenschaft begründet werden kann (Ongpipattanakul et al. 1991).

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde Ölsäure mit CER[NP] in verschiedenen molaren Verhältnissen (11; 26; 44; 47 und 53 mol% CER[NP]) dispergiert. In der Probe mit 53 mol% CER[NP] war der Ölsäureanteil mit dem Natriumsalz zu 30 % verseift. Zur Präparation der Systeme kamen drei verschiedene Methoden zur Anwendung:

1. Mechanische Dispersion durch mehrmaliges Zentrifugieren
2. Präzipitation aus einem Lösungsmittelgemisch (Chloroform/Methanol 2:1) mit nachfolgender Trocknung unter Vakuum
3. Wiederholtes kurzzeitiges Erhitzen in den isotropen Zustand und Abkühlen im Eisbad

	X (CER[NP])	X (OA)	X (Na/OA)	Methode
A	0,11	0,89	0	3
B	0,26	0,74	0	3
C	0,44	0,56	0	2 & 3
D	0,47	0,53	0	1
E	0,54	0,46	0,3	2

Tabelle 1 Probenplan zur Präparation verschiedener Cer[NP]/OA-Mischungen.

Die Lipidkonzentration wurde als Molenbruch (X) angegeben

Die chemische Stabilität der Lipide wurde mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie überprüft und war bei allen Präparationsmethoden gewährleistet.

Im untersuchten Konzentrationsbereich liegt das System CER[NP]/OA entmischt vor. Unabhängig vom Mischungsverhältnis und Präparationsverfahren zeigen die Röntgenpulveraufnahmen bei Raumtemperatur das Beugungsmuster von CER[NP] in der β -Phase mit einem lamellaren Wiederholabstand von 3,9 nm, welches von einem Halo der flüssigen Ölsäure überlagert wird. Bei Abkühlung des Systems kristallisiert bei 8 °C die Ölsäure in der α -Modifikation ($d = 4,2$ nm) und ist im Röntgendiffraktogramm anhand ihres Beugungsmusters zu erkennen.

Bei weiterem Abkühlen wandelt sich die OA in die γ -Modifikation um. Die γ/α -Phasenumwandlung, die bei allen Mischungen beobachtet wurde, erlaubt eine spezifische Zuordnung der Reflexe der beiden Lipidkomponenten in den Röntgenaufnahmen. Auch die CER[NP]-Struktur kann anhand ihrer α/β -Umwandlung eindeutig identifiziert werden. Hinsichtlich der Phasenumwandlungstemperatur der α/β -Umwandlung differieren die drei Präparationsmethoden. Bei den Lipidmischungen, die nach Methode 1 und 2 präpariert wurden, vollzieht sich die Umwandlung des CER[NP] bei 30 °C und nach Methode 3 bei 10 °C. Da derartige Differenzen in den Umwandlungstemperaturen schon beim reinen CER[NP] auftraten, wurde die Temperatur der fest/fest-Umwandlung von CER[NP] nicht als Parameter zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen CER[NP] und OA herangezogen. Zur Identifizierung der Röntgenreflexe der verschiedenen CER[NP]-Phasen und Abgrenzung von den Reflexen der Ölsäure ist die Beobachtung der Umwandlung von großem Nutzen.

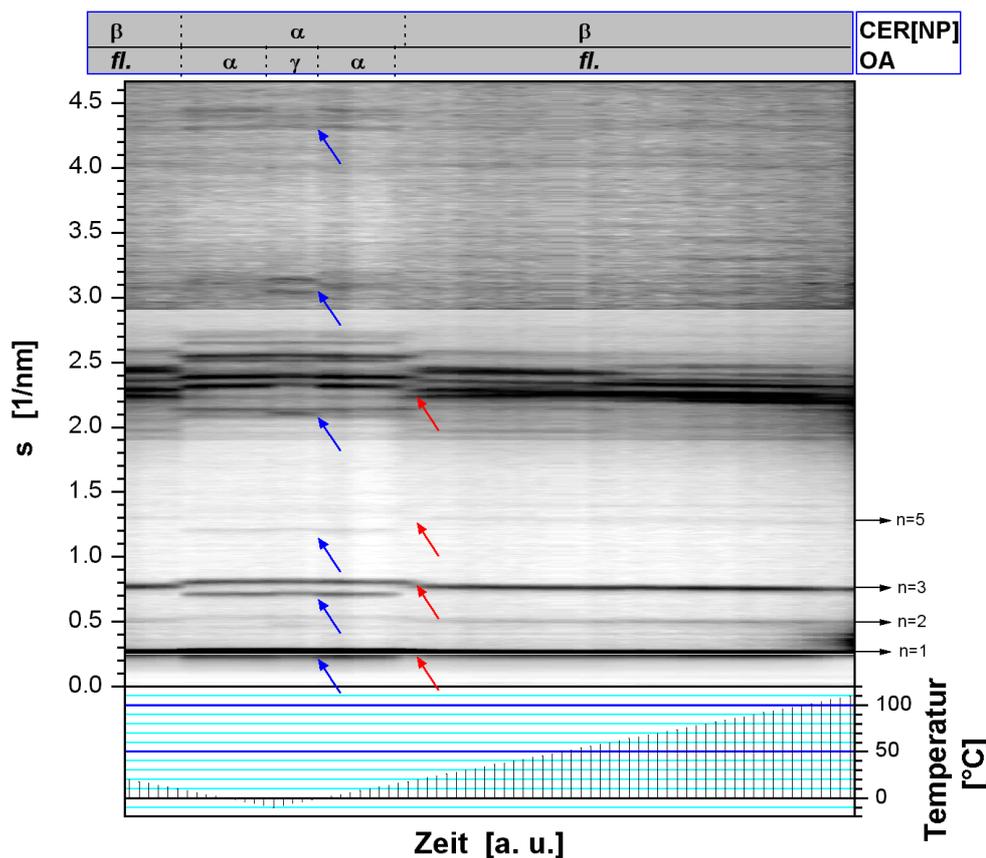


Abb. 59 Röntgenkonturplot einer äquimolaren OA / CER[NP] – Mischung (D). Die schwarzen Pfeile (rechts) kennzeichnen die Schichtreflexe von CER[NP]. Die blauen Pfeile signalisieren die charakteristischen Änderungen im Streuprofil der OA bei ihrer Umwandlung von der γ - in α -Modifikation. Die Umwandlung von CER[NP] von der α - in die β -Phase wurde mit roten Pfeilen hervorgehoben. Zum besseren Verständnis der Abbildung wurde über dem Konturplot ein Zustandsdiagramm mit der Phasenabfolge der Lipide eingefügt. Die fluide Phase wurde hierin mit „fl.“ Abgekürzt.

Bis zur Hauptumwandlung des CER[NP], dessen Umwandlungstemperatur durch einen äquimolaren Ölsäureanteil um nahezu 30 Kelvin herabgesetzt wird, befinden sich die Lipide in separierten Phasen. Nach Erreichen des Kettenschmelzens von CER[NP] ist keine geordnete Überstruktur mehr nachweisbar. Die Probensubstanz ist optisch isotrop.

Liegt ein Teil der OA (30 mol%) verseift vor, lassen sich Reflexe des 1:1 Fettsäure-Seife Komplexes nachweisen, der durch die überschüssige OA und CER[NP] schon bei etwa 25 °C in flüssige OA und darin gelöstes Natriumoleat zerfällt. In dieser Flüssigkeit liegt CER[NP] als dispergierte kristalline Phase vor und zeigt bei 70 °C die fest/fest-Umwandlung von der δ - in die β -Modifikation. Im Bereich von 100-110 °C schmelzen die Ketten von CER[NP]. Bei Temperaturen oberhalb 110 °C wird im WAXS nur noch eine diffuse Streuung (halo) detektiert, welche den ungeordneten Zustand der Ketten charakterisiert. Die Probe ist in diesem Zustand optisch isotrop.

Mit Hilfe der Raman-Spektroskopie können die entmischten Phasen über ihre indirekt Phasenumwandlungen nachgewiesen werden. Diese geben sich anhand spezifischer stufenförmigen Änderungen von Bandenparametern der Schwingungsspektren zu erkennen.

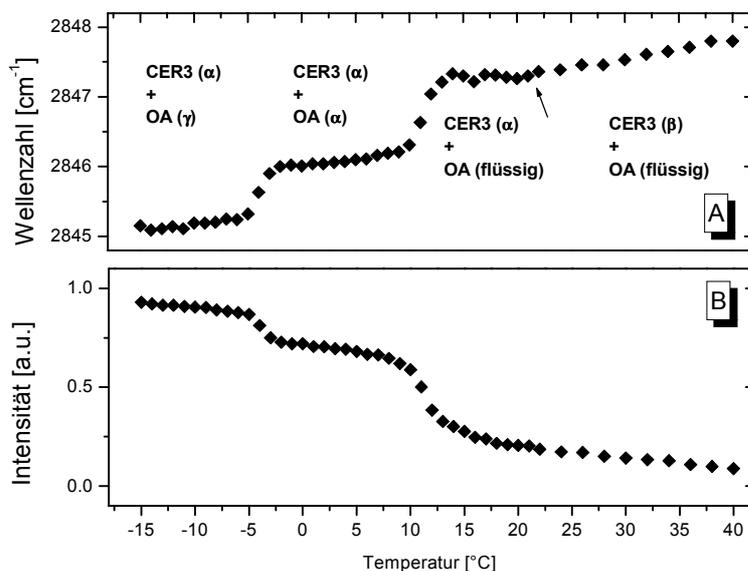


Abb. 60 Änderungen in den CH_2 -Schwingungsbanden beim Aufheizen einer Mischung aus CER[NP] und OA (Mischung D). **A:** Bandenposition der $\nu_s\text{CH}_2$ -Schwingung. Der Pfeil signalisiert die α/β -Umwandlung des CER[NP]. **B:** Bandenintensität der $\nu_a\text{CH}_2$ normiert auf die Intensität des CH -Streckschwingungsbereich ($2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$).

Beim Aufheizen der Probe beginnend bei -20 °C beobachtet man die erste Stufe bei -5 °C . Durch die Zunahme von gauche-Konformeren im CH_3 -seitigen Kettenabschnitt wird bei der Umwandlung der Ölsäure von der γ - in die α -Phase die Position der symmetrischen CH_2 -Valenzschwing ($\nu_s\text{CH}_2$) zu höheren Wellenzahlen verschoben und die Intensität der antisymmetrischen CH_2 -Valenzschwing ($\nu_a\text{CH}_2$) verringert (Tandon et al. 2000). Eine weitere Stufe erfolgt beim Schmelzen der Ölsäure. Die stufenförmigen Verschiebungen in Folge der Umwandlung des CER[NP] von der α - in die β -Modifikation sind nur schwer

festzustellen. Unterschieden können die Phasen α und β durch den unterschiedlichen temperaturabhängigen Anstieg der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande, der in der α -Phase nahezu null ist, während sich die $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande in der β -Phase bei Temperaturerhöhung zu höheren Wellenzahlen verschiebt.

Um die separierten Phasen sichtbar zu machen, wurde die Rasterkraftmikroskopie (AFM) eingesetzt. In der Literatur existieren nur Untersuchungen von Monoschichten aus Hautlipiden, die durch Spreitung von Lipidlösungen an Wasseroberflächen mittels *Langmuir-Blodgett*-Technik erhalten wurden (Ekelund et al. 2000; Engström et al. 2000; Sparr et al. 1999 & 2001).

Um eine Abbildung aus einer Volumenphase zu erhalten, wurde eine Mischung von CER[NP] und OA im molaren Verhältnis (1:1) nach Methode 3 präpariert und bei Raumtemperatur zwischen zwei Glimmerplatten gebrochen. Zunächst wurden Übersichts-Scans über eine Probenfläche von $1\ \mu\text{m}^2$ durchgeführt. Darauf folgten zielgerichtete Zoom-Scans in ausgewählte Bereiche der Probe. Die CER[NP]-Phasen lassen sich gut über ihre hoch geordnete lamellare Struktur von der bei $20\ ^\circ\text{C}$ flüssigen Ölsäure unterscheiden, die keine charakteristische Morphologie zeigt (Raudenkolb et al. 2001). In der nach Methode 3 präparierten Probe zeigen die entmischten Phasen eine laterale Ausdehnung von 100 bis 500 nm.

Abb. 61 AFM-3D-Abbildung einer CER[NP]/OA-Mischung (D). Aufgenommen bei $20\ ^\circ\text{C}$ im non-contact Modus. Die Abbildung wurde über eine „3rd order plane leveling“ Prozedur bearbeitet.

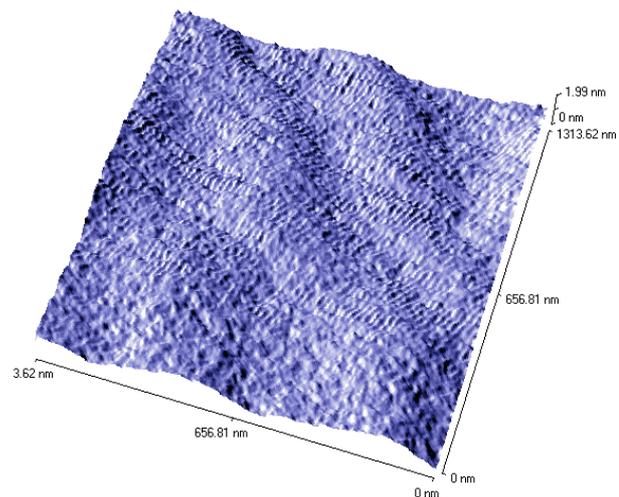
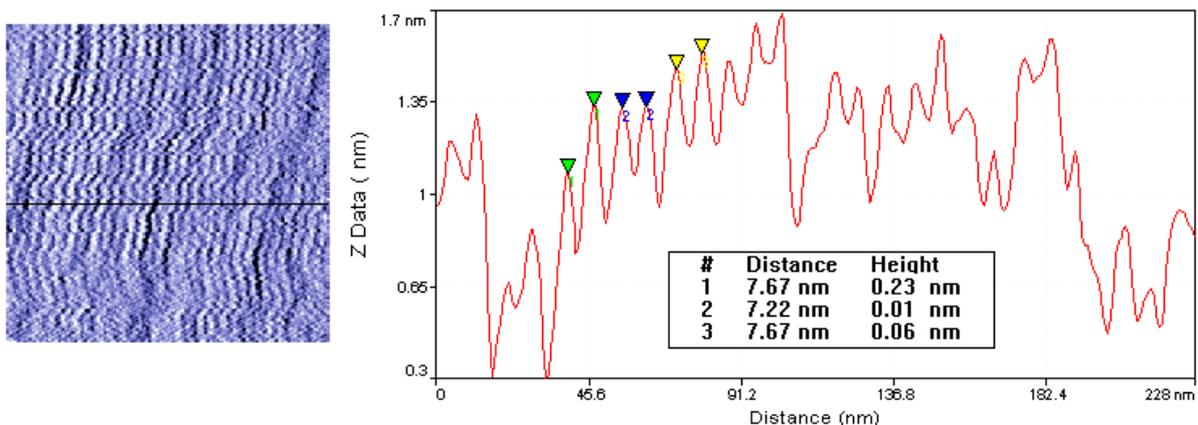


Abb. 62 Hochaufgelöste AFM-Aufnahme (zoom scan) im Bereich der geordneten Struktur (links). Höhenmessung entlang der in der linken Abbildung gezogenen Linie (rechts).



Es war ebenfalls möglich, aus der Volumenphase Lipidschichten abzuscheiden (S. Anhang S. 135). Über Löcher beziehungsweise Fehlstellen dieser abgeschiedenen Schichten konnte eine Schichtdicke von 2,3 - 2,7 nm bestimmt werden. Aufgrund dieser Größenordnung ist deshalb von Ceramid-Monoschichten auszugehen (Hauser 2001).

Wird die isotrope Schmelze der CER[NP]/OA-Mischung (D) langsam abgekühlt, bildet sich eine neue Phase (X) deren lamellare Überstruktur einen Wiederholabstand von 4,6 nm aufweist. Die äquidistanten Schichtreflexe im SAXS sind bis zur 5. Ordnung nachweisbar. Im Gegensatz zum Verhalten von CER[NP] vergrößert sich der Lamellenabstand dieser Struktur beim Abkühlen kontinuierlich. Das Auftreten dieser neuen, lamellaren Überstruktur korrespondiert mit ebenfalls neuen Reflexen im Weitwinkelbereich (Raudenkolb et al. 2000). Der Reflex mit der höchsten Intensität lässt sich einer hexagonalen Kettenpackung zuordnen. Ein mit der gleichen Temperaturabhängigkeit verlaufender $\sqrt{3}$ -Reflex im UltraWAXS Bereich bestätigt diese Annahme.

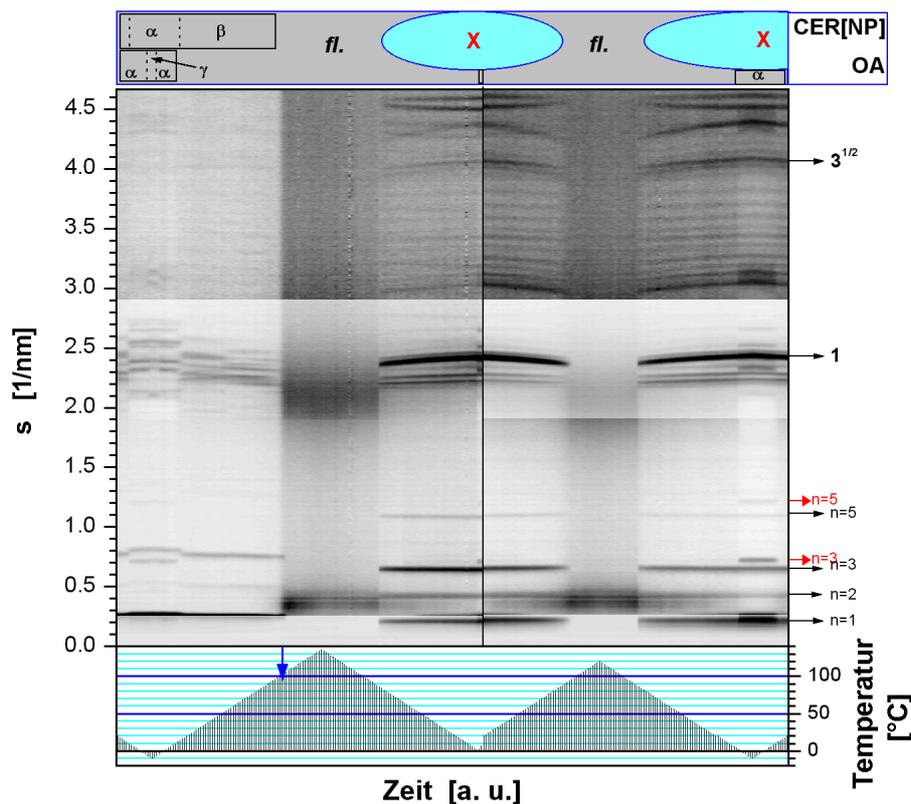
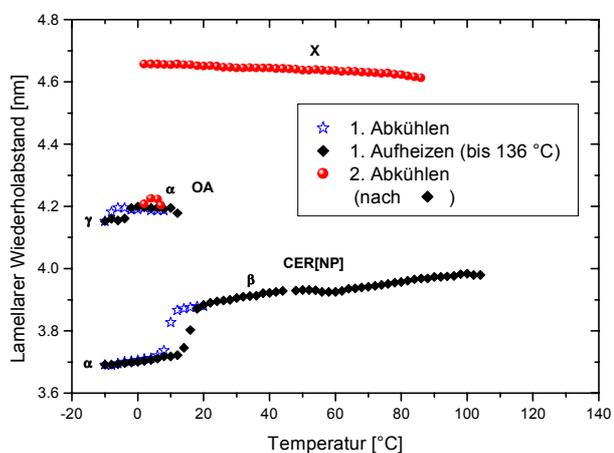


Abb. 63 Röntgenkonturplot der CER[NP]/OA-Mischung (D). Das linke Viertel (bis zum blauen Pfeil) entspricht Abb. 59. Die schwarzen Pfeile (rechts) kennzeichnen die Schichtreflexe des Lamellenabstandes von 4,6 nm der Phase (X). Die aufgelösten OA-Schichtreflexe sind mit kurzen roten Pfeilen hervorgehoben. Im Zustandsdiagramm über dem Konturplot wurde die fluide Lipidphase mit „fl.“ abgekürzt.

Neben den Reflexen der hexagonalen Kettenpackung treten noch weitere Reflexe auf, die der Struktur der Phase (X) zugeordnet werden können. Es kann davon ausgegangen werden, dass neben der hexagonalen Kettenpackung noch weitere Anordnungen vorherrschen. Die anderen zur neuen Struktur gehörigen Reflexe konnten nicht indiziert werden.

Abb. 64 Schichtabstände der lamellaren Phasen in der CER[NP]/OA-Mischung (D).



Reflexe kristalliner Phasen von CER[NP] sind nach dem Abkühlen aus der Schmelze nicht mehr nachweisbar, wenn die molare Konzentration der Ölsäure 50 % und mehr beträgt. Stattdessen kristallisiert bei weiterem Abkühlen die Ölsäure aus. Die über ihre Kristallreflexe bei Temperaturen unter 10 °C zu erkennen ist. Die separierten Ölsäure-Domänen zeigen die reversible fest/fest-Umwandlung der reinen Ölsäure.

Beim Abkühlen der teilweise verseiften OA-CER[NP]-Mischung aus der fluiden Phase bildet sich bei 100 °C ebenfalls die lamellare Phase (x) mit einem Wiederholabstand von 4,6 nm. Bei weiterem Abkühlen kristallisiert bei etwa 80 °C CER[NP] in der β -Modifikation. Die Intensitäten der Reflexe CER[NP] sind jedoch deutlich geringer als vor dem Aufschmelzen. Wird der Abkühlvorgang fortgesetzt, lässt sich die Umwandlung von CER[NP] in die

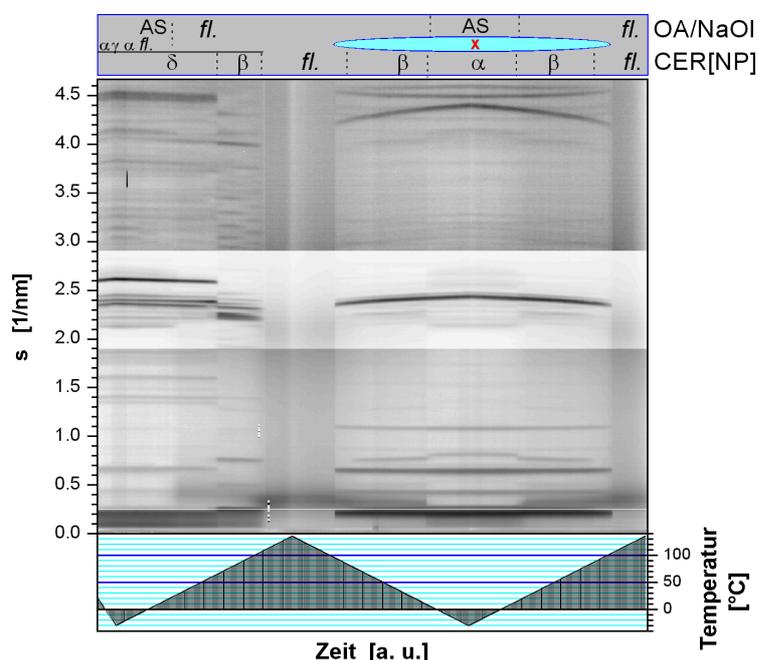


Abb. 65 Röntgenkonturplot und Phasenzuordnung der teilweise verseiften OA / CER[NP]-Mischung (E). Die blaue Form markiert den Existenzbereich der neu gebildeten Phase (X) mit dem lamellaren Wiederholabstand von 4,6 nm. (Abkürzungen: fl.-flüssig, NaOl-Natriumoleat, AS-1:1 Acid-Soap)

α -Modifikation beobachten. Auch die Reflexe des Fettsäure/Seife-Komplexes sind nachweisbar.

Bei erneutem Erhitzen der Probe zerfällt zunächst der Fettsäure/Seife-Komplex in Ölsäure und Natriumoleat. Die separierten CER[NP]-Domänen zeigen die fest/fest-Umwandlung von der α - in die β -Modifikation. CER[NP] ist bei 80 °C vollständig aufgeschmolzen. Hingegen behält die Phase (X) ihre hoch geordnete Struktur aufrecht und geht erst bei Temperaturen über 100 °C in den fluiden Zustand über. Im Vergleich zum ersten Aufheizen ist der Temperaturbereich des Schmelzens der β -Phase um mehr als 30 °C herabgesetzt. Des Weiteren ist beachtenswert, dass beim Abkühlen unter 10 °C keine Reflexe von Ölsäure-Domänen erkennbar sind. Demzufolge ist das Auftreten der Phase (X) mit einer Verringerung der Ölsäure- sowie der CER[NP]-Konzentration verbunden.

Die im Röntgenexperiment auf 136 °C erhitzte Probe wurde einer dünnschichtchromatographischen Analyse unterworfen. Neben den Banden von Ölsäure und CER[NP] kann eine zusätzliche Bande nachgewiesen werden, welche in der thermisch unbehandelten Mischung nicht festzustellen ist. Die Intensität der CER[NP]-Bande ist in der thermisch behandelten Probe deutlich vermindert.

Die nach dem Abkühlen der geschmolzenen Lipidmischung erhaltene Phase (X) mit dem lamellaren Wiederholabstand von 4,6 nm kann damit auf chemische Wechselwirkungen der Komponenten zurückgeführt werden. Die neu auftretende Bande gibt keine Ninhydrinreaktion, entfärbt Brom etwas schwächer als Ölsäure und kann mit Bromthymolblau angefärbt werden. Die Substanz hat demzufolge keine freie primäre Aminogruppe und enthält mindestens eine C=C Doppelbindung. Die höhere Mobilität auf der DC-Platte im schwach sauren Laufmittel lässt auf eine weniger polare Verbindung als Ölsäure und CER[NP] schließen. Die Acidität der Substanz ist deutlich geringer als die der Ölsäure und entspricht in etwa der der Ceramide.

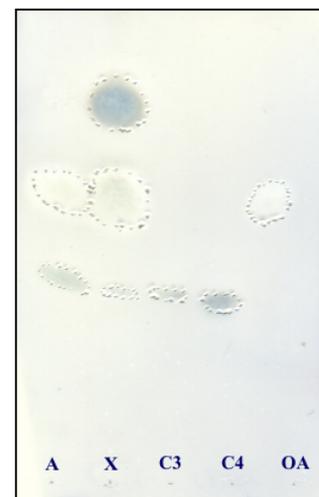


Abb. 66 DC-Trennung der CER[NP]/OA-Mischung (D). Vor dem Erhitzen (A). Nach dem Erhitzen auf 136 °C im Röntgenexperiment (X). Referenz CER[NP] (C3). Referenz CER[AS] (C4). Referenz OA (OA). Detektion: Brom-Lösung, Bromthymolblau.

Um eine höhere Ausgangsmenge der Substanz zu erhalten, wurde CER[NP] mit einem molaren Überschuss an Ölsäure (1:2) gemischt, mit Argon überschichtet und im Ölbad auf 110 °C und damit über den Kettenschmelzpunkt von CER[NP] erhitzt. Bei dieser Temperatur war die Probe flüssig und optisch isotrop. Es konnte eine Gasentwicklung festgestellt werden. Das farblose, kontinuierlich entweichende Gas konnte mittels Kupfer(II)-sulfat als Wasserdampf identifiziert werden. Nach zwei Stunden bei 110 °C wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt und dünnschichtchromatographisch analysiert. Neben den Banden der Ausgangssubstanzen konnte auch die nach dem Röntgenexperiment beobachtete Bande identifiziert werden. Für die Ausbildung der neuen Verbindung ist folglich eine Probertemperatur oberhalb des Kettenschmelzens von CER[NP] und die Anwesenheit von Ölsäure erforderlich, da CER[NP] als Reinsubstanz auch in der fluiden Phase bei Temperaturen von 150 °C chemisch stabil ist. Durch einen Zusatz des Fettsäure-Seife-Komplexes konnte der Ablauf der Reaktion signifikant gehemmt werden.

Die Substanz wurde säulenchromatographisch isoliert und verschiedenen Analysemethoden zugeführt. Mittels Massenspektrometrie konnte ein Masse-Ladungsverhältnis $m/z = 848,8$ bestimmt werden, die der Masse eines Monoacylesters von CER[NP] zugeordnet werden kann (S. Anhang S. 130). Zusätzlich wurden noch Peaks mit $m/z = 283,3$ und $564,6$ identifiziert, die bislang nur in MS/MS-Experimenten an CER[NP] gefunden wurden. Beim Defragmentieren des $848,8$ Signals resultieren Peaks mit $m/z = 283,3$; $316,4$ und $564,6$. Eine weitere Defragmentierung des $564,6$ Signals führte zu den Masse-Ladungsverhältnissen $308,3$; $281,3$ und $265,4$.

Da die primäre alkoholische Hydroxylgruppe die reaktivste im CER[NP] Molekül ist, kann angenommen werden, dass diese und nicht die sekundären alkoholischen Gruppen von der Fettsäure acyliert werden. Signale mit Masse-Ladungsverhältnissen, die zweifach oder dreifach acylierten CER[NP]-Molekülen entsprechen, konnten nicht detektiert werden. Dies kann auf eine sterisch bedingte Minderung der Reaktivität nach Acylierung der primären alkoholischen Gruppe zurückgeführt werden (Dobner 2002).

Über eine Reaktion nach *Malaprade* kann die Substanz zwischen den vicinalen Hydroxylgruppen unter Beibehaltung der Esterbindung gespalten werden. Ein Referenzversuch mit reinem CER[NP] wurde bereits durchgeführt (S. Anhang S. 132). Die entstehenden Ketoverbindungen wurden mit Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert, um bei der Massenspektrometrie das Ionisationsvermögen im Elektrospray zu erhöhen. Durch Identifizierung des m/z -Signals $356,3$ im Negativionen-Modus ist bewiesen worden, dass die Spaltung von CER[NP] zwischen den vicinalen Hydroxylgruppen möglich ist. Ein analoger

Versuch mit der neu isolierten Substanz steht noch aus. Wird hierbei im Negativmodus ein Masse/Ladungsverhältnis von 620,0 detektiert, kann die Struktur des mit der primären alkoholischen Gruppe veresterten CER[NP] als verifiziert gelten.

Der chromatographisch isolierte Monoacylester wurde vom Lösungsmittel befreit, in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) aufgenommen und mit NMR untersucht (S. Anhang S. 134). Die C^{13} -NMR-Spektren zeigen bei 130 ppm zwei Signale, die das Vorhandensein der CC-Doppelbindung in der Verbindung bestätigen. Die Signale bei 177,6 und 174,1 ppm werden zwei unterschiedlichen Carbonylfunktionen zugeordnet. 174,1 gibt die Amidstruktur wieder. Der Peak bei 177,6 entspricht eher einer freien Fettsäure als einem Ester. Eine hydrolytische Spaltung der Esterbindung bei Probenlagerung muss daher besonders bei Anwesenheit von Fettsäuren in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse der FT-IR-Untersuchungen untermauern die NMR-Ergebnisse. Hier konnten ebenfalls zwei Carbonylschwingungen ($\text{C}=\text{O}$ stretching) nachgewiesen werden, die einer Amidbindung und einer Carbonylgruppe einer freien Fettsäure zugeordnet werden können (S. Anhang S. 129).

Obwohl die Temperatur für die Bildung dieser neuen Substanz *in vitro* jenseits des physiologischen Bereichs der Haut liegt, erscheint die Substanz diskussionswürdig.

Eine analoge Verbindung eines an der primären Hydroxylgruppe veresterten Ceramides vom Sphingosin-Typ wurde kürzlich als eine Fraktion der humanen *Stratum corneum* Ceramide vorgestellt (Chopart et al. 2002). Es ist demnach auch unter physiologischen Bedingungen möglich die primäre alkoholische Gruppe der Ceramide, mit Fettsäuren zu verestern. Da sich nach bisherigem Kenntnisstand die Ceramidstrukturen nach einem Baukastensystem zusammensetzen, kann das Vorhandensein der *in vitro* durch Erhitzen erzeugten Substanz im *Stratum corneum* durchaus als wahrscheinlich angesehen werden.

Zur Aufklärung des Phasenverhalten von Lipiden ist die Durchführung temperaturabhängige Messungen eine gängige Herangehensweise. Analytische Untersuchungen zu chemischen Wechselwirkungen sind allerdings in diesem Zusammenhang nur in wenigen Arbeiten zu finden. Aus diesem Grund sollten einige Arbeiten der Vergangenheit über das Phasenverhalten von Ceramiden in Mischsystemen kritisch beurteilt werden.

In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen an humanem *Stratum corneum* und extrahierten SC-Lipiden zu betrachten, in denen festgestellt wurde, dass sich die Lipidstrukturen nach dem Abkühlen aus der fluiden Phase vom Ausgangszustand unterscheiden (Bouwstra et al. 1991 & 1992).

Ceramid- Cholesterol Mischsysteme

Röntgenpulveraufnahmen des unbehandelten Cholesterols konnten zeigen, dass es sich bei der eingesetzten Substanz um das Monohydrat ($\text{Chol}\cdot\text{H}_2\text{O}$) handelt. Die Reflexlage stimmen mit denen aus der Literatur bekannten Positionen überein (Loomis et al. 1979). Erwartungsgemäß zeigt $\text{Chol}\cdot\text{H}_2\text{O}$ beim Erhitzen die Umwandlung zur wasserfreien Form (Chol). Im Wasserüberschuss führte die Abkühlung erst nach mehreren Stunden zur vollständigen Ausbildung des $\text{Chol}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Diese zeitabhängige Hydratisierung wurde bereits in der Literatur beschrieben.

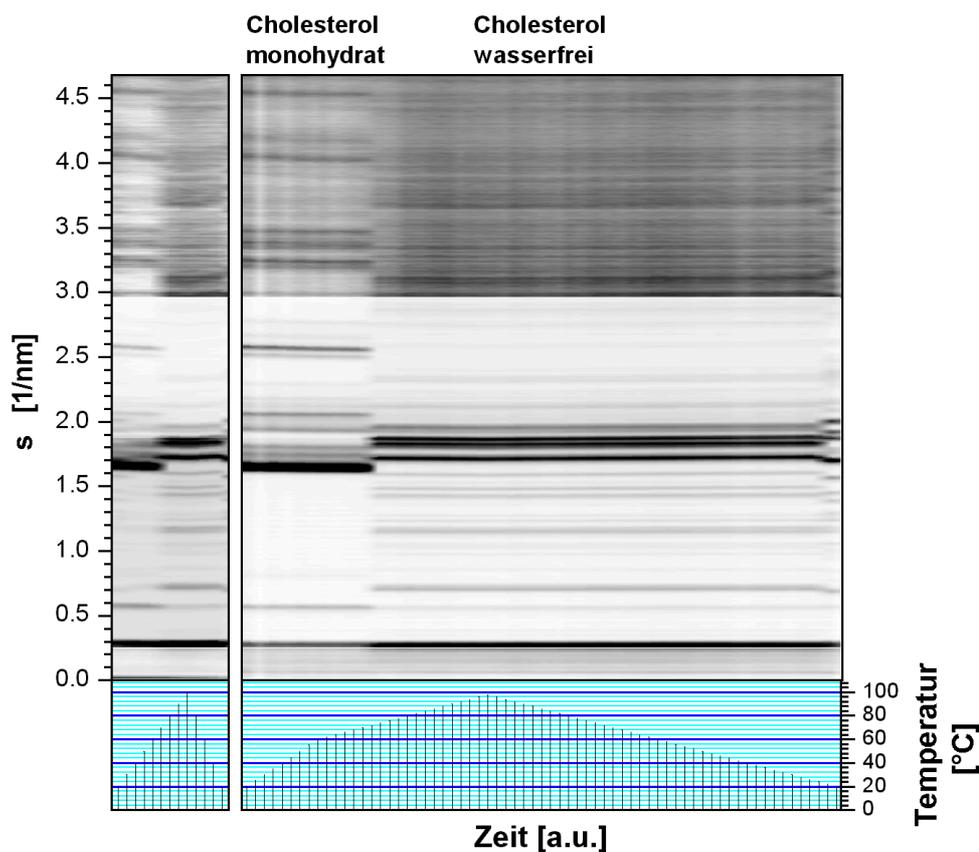


Abb. 67 Röntgenkonturplot einer Cholesterol-Wasser-Dispersion (50/50m%). Nach dem ersten Aufheizen (links) wurde die Probe 12 Stunden bei 20 °C temperiert, bevor der 2. Heizlauf gestartet wurde (rechts).

Cholesterol ($\text{Chol}\cdot\text{H}_2\text{O}$) wurde jeweils mit CER[NP] und mit CER[AS] in äquimolaren Verhältnissen in Chloroform/Methanol (2:1) gelöst und nachfolgend im Vakuumrotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Die homogenisierten Lipidmischungen wurden mit destilliertem Wasser hydratisiert, in Markröhrchen eingeschmolzen und mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert.

Cholesterol + CER[NP] (50/50 mol%)

Untersuchungen zum Mischungsverhalten von Cholesterol und CER[NP] ohne Wasserzusatz wurden erst kürzlich publiziert (Ohta et al. 2002). Die mit mäßiger Auflösung erhaltenen Röntgendaten zeigen Nichtmischbarkeit der Lipide. Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit auf den Polymorphismus von CER[NP] und Cholesterol nicht eingegangen.

Im Röntgenpulverdiffraktogramm des hydratisierten Systems überlagern sich die Reflexe beider Komponenten. Cholesterol liegt in der Mischung als Monohydrat vor und CER[NP] in der β -Phase. Die Reflexlagen und Intensitäten stimmen mit denen der Einzelsubstanzen überein. Beim Erhitzen verschwinden die Reflexe des CholH₂O bei 80 °C, die Reflexe des CER[NP] zeigen die für die Reinsubstanz beschriebenen temperaturabhängigen Verschiebungen im Klein- und Weitwinkelbereich.

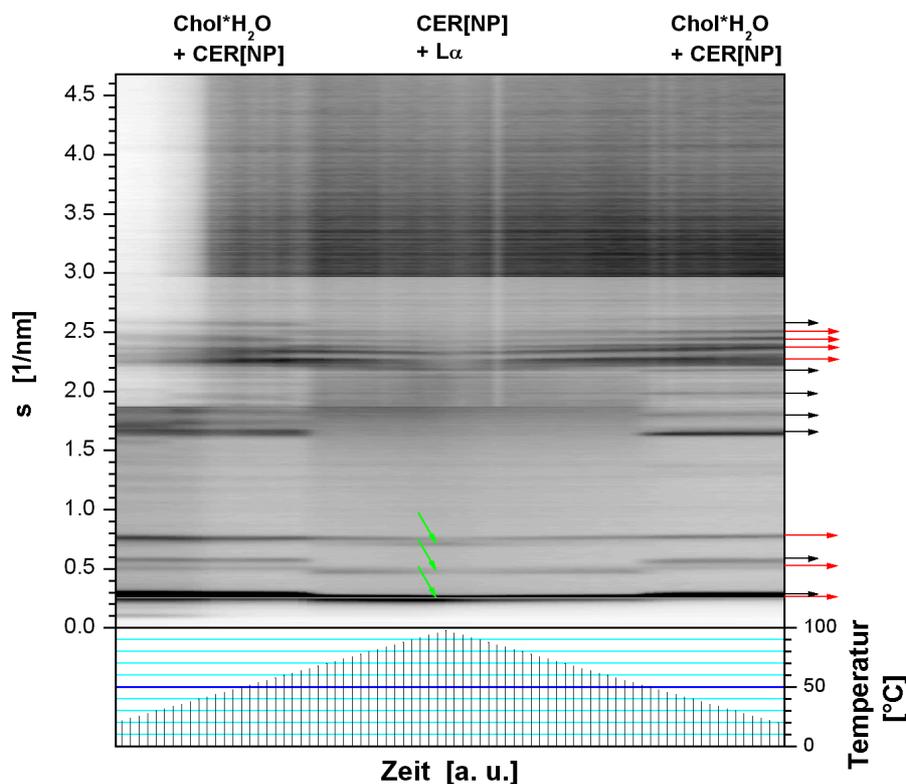


Abb. 68 Röntgenkonturplot einer äquimolaren Cholesterol/CER[NP]-Mischung im Wasserüberschuss (25/75 m%). Die kurzen schwarzen Pfeile (rechts) kennzeichnen die stärksten Kristallreflexe von CholH₂O. Die Kristallreflexe von CER[NP] sind mit langen roten Pfeilen und die ersten drei Ordnungen der $L\alpha$ -Phase mit grünen Pfeilen (innerhalb des Plots) hervorgehoben.

Die Reflexe des CER[NP] werden bis 98 °C beobachtet, allerdings sinkt ihre Intensität kontinuierlich beginnend mit dem Aufschmelzen des Cholesterols. Der kontinuierliche Intensitätsrückgang der CER[NP]-Reflexe signalisiert eutektisches Schmelzen und kann mit

einem Aufschmelzen der Überschuskomponente nach Schmelzen der Cholesterol-reichen eutektischen Zusammensetzung CER[NP] gedeutet werden. Demnach kann die Lage des Eutektikums auf der Cholesterol-reichen Seite des Phasendiagramms angenommen werden. Im Unterschied zu den wasserfreien Cholesterol/CER[NP]-Mischungen bei denen die eutektische Zusammensetzung bei 108 °C schmilzt (Ohta et al. 2002), wird das erste Aufschmelzen der eutektischen Zusammensetzung schon bei 70 °C beobachtet. Bei 98 °C beträgt der kristalline CER[NP]-Anteil weniger als 10 %. Der vollständig fluide Bereich kann bedingt durch den Siedepunkt des Wassers experimentell nicht erreicht werden. Im Weitwinkelbereich nimmt das Halo in dem Maße zu, wie die Intensitäten der Kristallreflexe sich vermindern. Mit der Intensität des Halo's im WAXS korrespondieren drei äquidistante SAXS-Reflexe, die eine eindimensionale lamellare Überstruktur widerspiegeln. Es entsteht demzufolge eine flüssigkristalline Phase mit lamellarer Überstruktur ($L\alpha$), die fluides CER[NP] und Cholesterol enthält. Diese $L\alpha$ -Phase liegt phasensepariert vom kristallinen CER[NP] vor. Die temperaturabhängige Intensitätszunahme der Reflexe der $L\alpha$ -Phase kann mit einem Einbau von aufschmelzenden CER[NP]-Molekülen in Verbindung gebracht werden.

Alle Änderungen sind beim Abkühlen reversibel. Reflexe des dehydratisierten Cholesterols können weder beim Aufheizen noch beim Abkühlen identifiziert werden. Chol:H₂O bildet sich ohne zeitliche Hysterese jedoch mit schärferen, ausgeprägteren Reflexen aus der fluiden Phase zurück.

Aus diesem Experiment geht hervor, dass Cholesterol in wässriger Umgebung die rigide Struktur von CER[NP] fluidisieren kann. Die neu gebildete $L\alpha$ -Phase, die sich aus Cholesterol und geschmolzenem CER[NP] zusammensetzt, existiert schon etwa 60 Kelvin unterhalb der Hauptumwandlung des reinen CER[NP].

Cholesterol + CER[AS] (50/50 mol%)

Bei Raumtemperatur beobachtet man die Reflexlagen von CER[AS] und Cholesterolmonohydrat. Beim Abkühlen sind die Eispeaks des Wassers zu erkennen. Wird die Mischung erhitzt, so verschwinden die Kristallreflexe des CholH₂O. Es entsteht allerdings nicht das dehydratisierte Cholesterol, welches über dessen Kristallreflexe zweifelsfrei zu identifizieren wäre. Stattdessen kann man im Weitwinkelbereich die Ausbildung eines Halo's feststellen. Die Kristallreflexe des CholH₂O im Kleinwinkelbereich verschwinden ebenfalls.

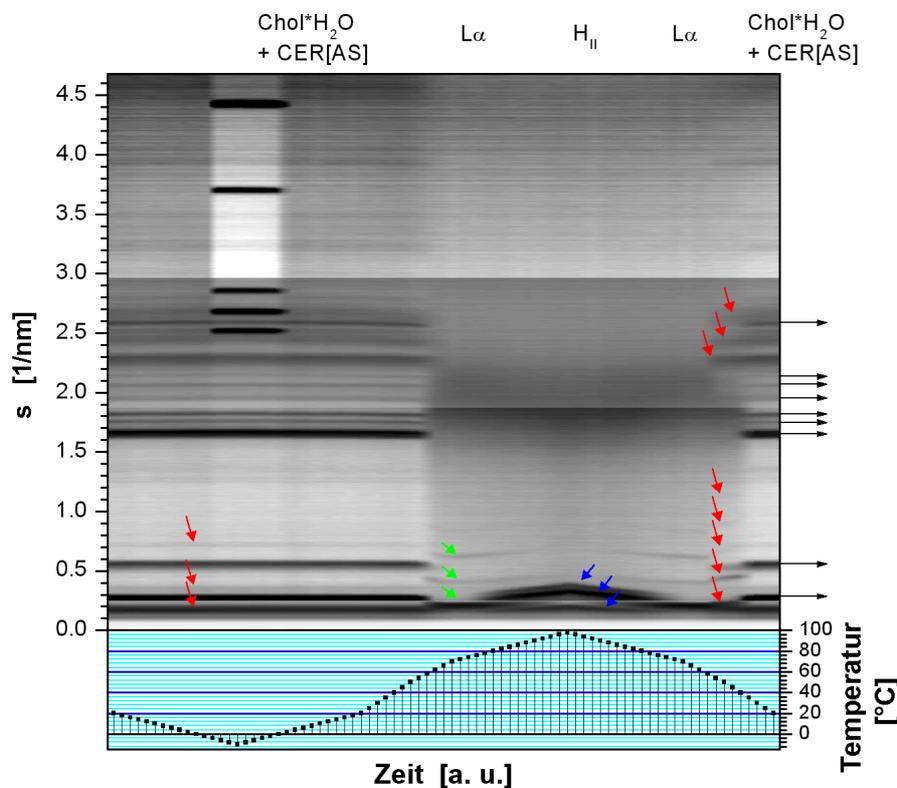


Abb. 69 Röntgenkonturplot einer äquimolaren Cholesterol / CER[AS] – Mischung im Wasserüberschuss (25/75 m%). Die Intensitäten wurden logarithmisch aufgetragen. Die schwarzen Pfeile (rechts) kennzeichnen die stärksten Kristallreflexe von CholH₂O. Die Reflexe von CER[AS] sind mit roten Pfeilen hervorgehoben. Die ersten drei Ordnungen der flüssigkristallinen Phasen: L α (grün), H_{II} (blau).

Die Verschiebung der Schichtreflexe des CER[AS] zu kleineren Winkeln signalisiert eine Aufweitung des lamellaren Schichtabstandes. Wird die Probe noch weiter erhitzt, schmelzen die Alkylketten des CER[AS]. Ab diesem Punkt verkleinert sich der Lamellenabstand bei weiterem Aufheizen. Ab etwa 80 °C werden Reflexe einer hexagonalen Überstruktur

beobachtet, diese verschieben sich mit steigender Proben­temperatur kontinuierlich zu größeren Winkeln. Der Röhrendurchmesser nimmt demzufolge mit steigender Temperatur ab. Die Streuintensität der Reflexe der hexagonalen Überstruktur nimmt mit steigender Temperatur zu, während die Intensitäten der Reflexe der lamellaren Überstruktur kleiner werden und bei 98 °C nicht mehr zu erkennen sind. Verglichen mit dem Heizlauf treten beim Abkühlprozess keine neuen Phasen auf. Die temperaturabhängigen Verschiebungen der Röntgenreflexe verlaufen nahezu konform. Bedingt durch eine temperaturabhängige Hysterese bei der Kristallisation des Chol:H₂O, ist die Existenz des geordneten CER[AS] neben dem flüssigen Cholesterols über einen breiteren Temperaturbereich als beim Aufheizen der Probe zu beobachten. Beachtenswert ist, dass nach dem Schmelzen des Chol:H₂O der lamellare Abstand der Ceramid-Phase wächst. Nach Beendigung des Kettenschmelzens von CER[AS] verkleinert sich der Lamellenabstand der entstandenen L α -Phase kontinuierlich mit steigender Temperatur.

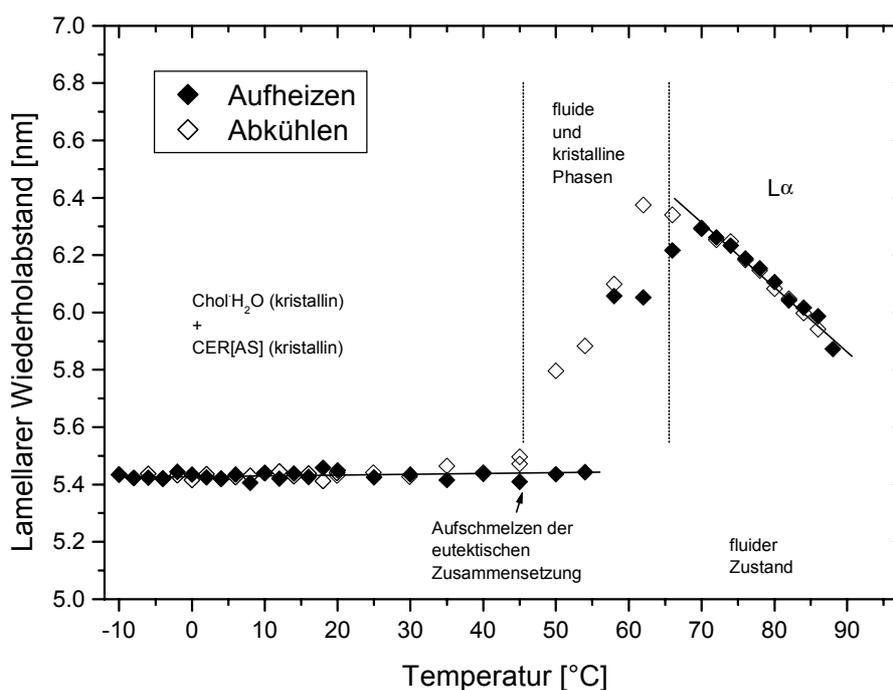


Abb. 70 Lamellarer Wiederholabstand in der hydratisierten äquimolaren CER[AS] / Cholesterol-Mischung. Die Abstandsbestimmung erfolgte über die Reflexlage des Schichtreflexes der 4. Ordnung.

Das Phasenverhalten der äquimolaren Ceramid-Cholesterol-Mischung unterscheidet sich von dem der hydratisierten Reinsubstanzen im Folgenden:

- Das Kettenschmelzen von CER[NP] und CER[AS] erfolgt bei deutlich niedrigeren Temperaturen.
- Es tritt eine lamellare, flüssigkristalline Phase ($L\alpha$) auf, in der sowohl Cholesterol als auch CER[NP] beziehungsweise CER[AS] enthalten ist.
- In der Mischung aus CER[AS] und Cholesterol geht aus der $L\alpha$ -Phase bei weiterem Erhitzen eine H_I -Phase hervor.
- Die Röntgenreflexe des dehydratisierten Cholesterols waren in den Mischungen mit CER[NP] und CER[AS] nicht zu beobachten.
- Chol:H₂O bildet sich aus der fluiden Phase ohne zeitliche Hysterese zurück.
- Die Ausbildung der Gelphase mit hexagonaler Kettenpackung des CER[AS] wird durch Cholesterol unterdrückt.

Da die Absenkung der Temperatur des Kettenschmelzens von CER[AS] durch einen Zusatz von Cholesterol bereits von Wegener (1997) mittels FT-Raman-Spektroskopie festgestellt wurde, konnte auf eine nochmalige Durchführung der spektroskopischen kalorimetrischen Untersuchungen verzichtet werden.

Ähnliche Untersuchungen an Mischungen von N-Stearyl-sphingosin (CER[NS]) und Cholesterol führten Chen et. al. (2001) durch. Hierbei kam die FT-IR Spektroskopie zum Einsatz. Eine Absenkung der Umwandlungstemperatur durch Zugabe von Cholesterol wurde auch für das in dieser Studie eingesetzte Ceramid festgestellt. Aussagen zu Phasenabfolge und Struktur der Lipide im flüssigkristallinen Zustand konnten über die spektroskopischen Untersuchungen jedoch nicht erhalten werden.

Untersuchungen zum Phasenverhalten hydratisierter Glycolipide

Im Zusammenhang dieser Arbeit wurde eine Reihe von Glycolipiden untersucht, die sich zum einen in ihrer Zuckergruppe und ihrem Aglycon unterscheiden (Schmidt et al. 2002). Da von den Thiaglycosiden nur wenige Milligramm zur Verfügung standen, beschränkten sich die durchgeführten Untersuchungen auf das Phasenverhalten der vollständig hydratisierten Lipide. Die Hydratisierung wurde durch Versetzen der Lipide mit einem Überschuss PBS (phosphate buffered saline) und Erhitzen über den Kettenschmelzpunkt erreicht.

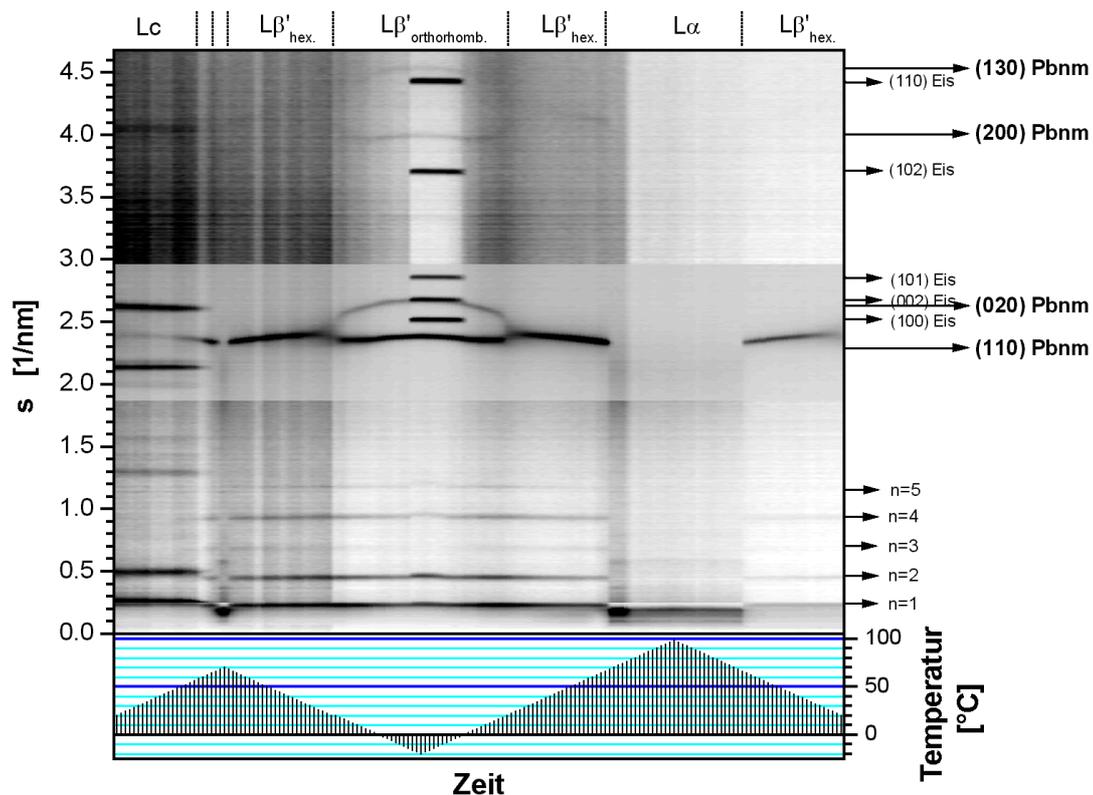


Abb. 71 Röntgenkonturplot des hydratisierten Gal 20-0 (75 m% PBS). Die langen Pfeile indizieren die Kettenreflexe der orthorhombischen Kettenpackung in der Gelphase.

Die untersuchten voll hydratisierten Systeme der verschiedenen Glycolipide bilden lamellare Überstrukturen und zeigen ein generelles Phasenverhalten mit einer Gel/Gel-Umwandlung und einer Umwandlung von einer Gel in die flüssigkristalline $L\alpha$ -Phase. Exemplarisch sollen daher nur die Untersuchungen an Gal 20-0, dem einkettigen Galaktopyranosid mit einer Alkylkette von 20 Kohlenstoffatomen, wiedergegeben werden. Die Röntgenaufnahmen der anderen 5 untersuchten Glycolipide sind im Anhang (S. Anhang S. 136ff) abgebildet.

Die Alkylketten in den Gelphasen $L\beta'$ sind geneigt und verzahnt. Bei Temperaturen unter $0\text{ }^\circ\text{C}$ zeigen die untersuchten Glycolipide eine lateral orthorhombische Orientierung (O_L) der Alkylketten. Beim Erhitzen erfolgt eine Umwandlung in eine Gelphase mit hexagonaler Anordnung der Alkylketten (H). Die Eiskristallisation in der Gelphase führt zu einer deutlichen Verringerung des Lamellenabstandes während die Kettenpackung unbeeinflusst bleibt. Innerhalb der Gelphasen bleibt der lamellare Wiederholabstand nahezu unbeeinflusst. Auch die Änderung der Kettenpackung führt nicht zu sprunghaften Änderungen im SAXS-Bereich.

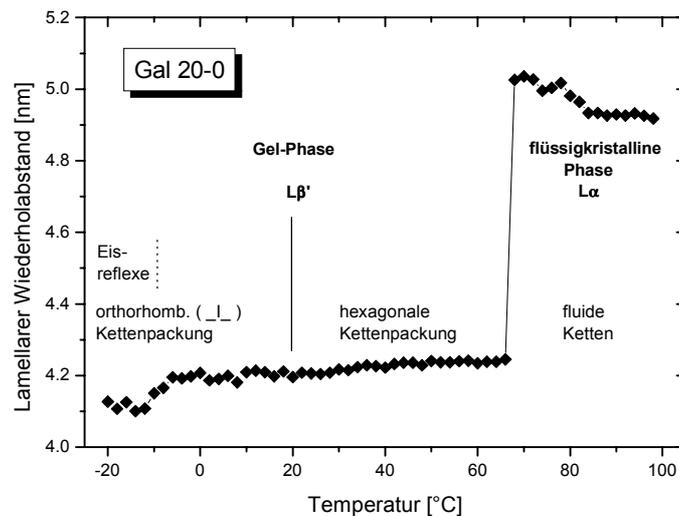


Abb. 72 Lamellarer Wiederholabstand beim Abkühlen des Gal 20-0 in Wasserüberschuss (75 m% Wasser).

Die Röntgenbeugungsmessungen zeigen im Weitwinkelbereich zwei scharfe Reflexe bei 0,41 nm (110) und 3,7 nm (020) im Existenzbereich der orthorhombischen Kettenpackung. Die experimentell ermittelten Reflexlagen und Intensitäten stimmen mit den von Maulik et al. (1990) berechneten Beugungskurven überein. Die Positionen der beiden Reflexe ändern sich graduell bei Temperaturänderung. Bei der Umwandlung von orthorhombisch zu hexagonal verschmelzen die beiden Peaks zu einem starken Reflex (010). Dieser verschiebt sich temperaturabhängig aufgrund einer kontinuierlichen Aufweitung des Gitters zu kleineren Beugungswinkeln und verschwindet beim Erreichen der $L\alpha$ -Phase, in der die ungeordneten Alkylketten die Ausbildung eines Halo's im Röntgenweitwinkelbereich bewirken.

Die Umwandlungstemperatur der Gel/Gel-Umwandlung ist abhängig von der Kettenlänge, Spacerlänge und der Zuckerkopfgruppe.

Mit der FT-Raman-Spektroskopie lassen sich die Wechselwirkungen der Alkylketten in den verschiedenen Packungen verfolgen. Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zeigt das hydratisierte Gal 20-0 deutlich eine Faktorgruppenaufspaltung der CH_2 -Scherschwingung. Dies deutet darauf hin, dass sich zwei Alkylketten in den Subzellen befinden. Beim Übergang zur hexagonalen Kettenpackung verschwindet das für die O_\perp -Packung charakteristische Bandentriplett. Beachtenswert ist, dass sich die durch die Faktorgruppenaufspaltung hervorgerufene Bande bei Temperaturerhöhung zunächst zu höheren Wellenzahlen verschiebt und in ihrer Intensität stark abnimmt. Nahe der Phasenumwandlung O_\perp/H ist sie nur noch als Schulter bei 1420 cm^{-1} zu erkennen, deren genaue Position sich durch Bandenzerlegung oder über die zweite Ableitung des Spektrums bestimmen lässt.

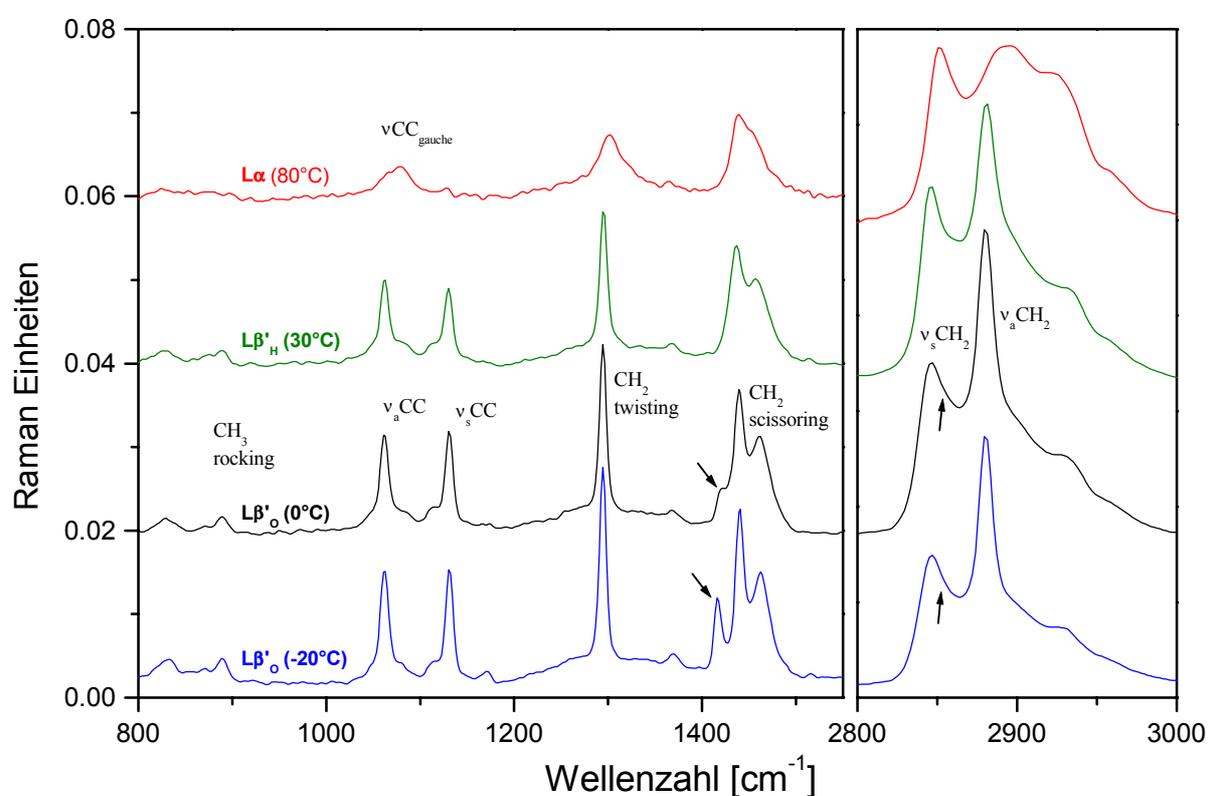


Abb. 73 Ramanspektren und Bandenzuordnung des Gal 20-0. In den Spektren mit orthorhombischen Kettenpackungen kennzeichnen Pfeile die Faktorgruppenaufspaltung der CH_2 -Scherschwingung und eine Schulter im Bereich der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingung.

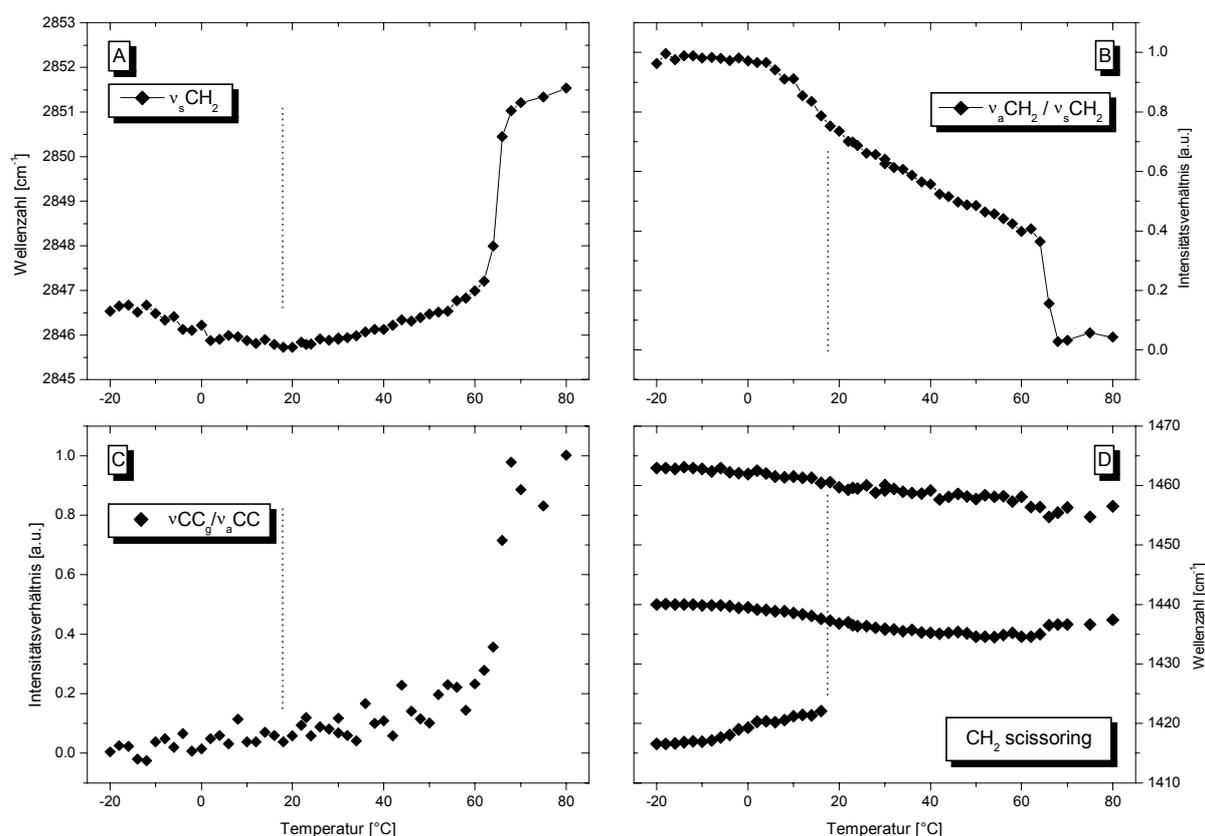


Abb. 74 Änderung von Bandenparametern in den Ramanspektren von Gal 20-0 beim Aufheizen. (A) Bandenposition der $\nu_s\text{CH}_2$. (B) Bandenintensität der $\nu_a\text{CH}_2$, normiert auf die Intensität des gesamten νCH -Valenzschwingungsbereiches von $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$. (C) Intensitätsverhältnis $\nu\text{CC}_{\text{gauche}}/\nu_a\text{CC}$. (D) Bandenposition der CH_2 scissoring. Die Hilfslinien kennzeichnen die Gel/Gel-Umwandlung.

In der Vergangenheit sind kontinuierliche Änderungen im Scherschwingungsbereich mit dem Wachstum von Microdomainen korreliert worden (Snyder et. al., 1992, 1993 & 1995), deren Größe aus DSC-Messungen abgeleitet wurde. Dieser Effekt spielt bei den für die Glycolipide beschriebenen Verschiebungen nur eine untergeordnete Rolle. Die Änderungen lassen sich mit den kontinuierlichen Verschiebungen der a- und b-Werte der Subzelle korrelieren, die eine kontinuierliche temperaturabhängige Aufweitung zeigen. Es lässt sich daraus ableiten, dass sich die Kopplung der Alkylkettenschwingungen, die in der orthorhombisch gepackten Subzelle möglich ist, durch eine temperaturabhängige Änderung der Subzellenparameter beeinflussen lässt.

Die symmetrische CH_2 -Streckschwingung zeigt beim Übergang von der Gel- in die fluide Phase eine drastische Verschiebung ihrer Bandenposition (von 2847 auf 2851 cm^{-1}). Da diese Änderung mit einer Abnahme sowohl der symmetrischen als auch der antisymmetrischen CC -Streckschwingung korreliert, kann man auf eine Zunahme von gauche-Konformere

schließen. Interessanterweise zeigt diese Bande beim Erhitzen der Gel-Phasen zunächst eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen. Dies kann nicht mit einer Zunahme an *trans*-Sequenzen in Verbindung gebracht werden, da simultan die Intensitäten der symmetrischen und antisymmetrischen CC-Streckschwingungsbanden kontinuierlich abnehmen. Aus dieser Tatsache muss man zweifelsfrei schlussfolgern, dass der Anteil an *gauche*-Sequenzen in den Alkylketten der Gelphase mit steigender Temperatur steigt. Die Verschiebung der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande muss daher eine andere Ursache haben. Eine Erklärung liefert der Vergleich mit dem temperaturabhängigen Verlauf der CH_2 -Scherschwingungsbanden. Solange die Faktorgruppenaufspaltung registriert wird (bis etwa 20 °C) verschiebt sich die $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande zu kleineren Wellenzahlen. Ist die Aufspaltung nicht mehr zu sehen, erhöht sich die Wellenzahl der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande temperaturabhängig bis zum Übergang in die fluide Phase.

Dieser Effekt kann folgendermaßen gedeutet werden. Im orthorhombischen Subzellensystem führt die Kopplung mit den benachbarten Alkylketten zu einer Formänderung der $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande. Bedingt durch eine benachbarte Bande höherer Wellenzahl, die als Schulter die $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande überlagert, resultiert eine Verschiebung des Bandenmaximums zu höheren Wellenzahlen. Nimmt die Kopplungsfähigkeit ab, wie bei der Egalisierung der Kettenentfernung im Zuge des Übergangs von einer orthorhombischen zu einer hexagonalen Kettenpackung, verringert sich die Intensität dieser Bande. Die $\nu_s\text{CH}_2$ -Bande wird dabei scheinbar zu einer niedrigen Wellenzahl verschoben, ohne dass sich das relative Verhältnis von *trans*- und *gauche*-Sequenzen ändert.

Die Phasenumwandlungen der neben Gal 20-0 untersuchten Glycolipide (Gal 16-0, Gal 16-2, MS 51, MS 87 und MS 88) konnten ebenfalls mit Hilfe der FT-Raman-Spektroskopie verfolgt werden. Auch bei diesen Glycolipiden war die Korrelation der röntgendiffraktometrischen Ergebnisse mit den spektroskopischen Daten möglich. Auf eine ausführliche Darstellung soll jedoch im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden.

Zusammenfassung

„Der modus tollens der Vernunftschlüsse, die von den Folgen auf die Gründe schließen, beweiset nicht allein ganz strenge, sondern auch überaus leicht. Denn wenn auch nur eine einzige falsche Folge aus einem Satz gezogen werden kann, so ist dieser Satz falsch.“

Immanuel Kant

Die Aufklärung der Ursache der einzigartigen Barriereigenschaften des *Stratum corneum* ist im Hinblick auf die Entwicklung neuer penetrationsbeeinflussender Vehikelsysteme von wesentlicher Bedeutung.

Da die Ceramide als Hauptkomponente der *Stratum corneum* Lipide maßgeblich an der Strukturausbildung und der Barrierefunktion der Haut beteiligt sind, beschäftigt sich der Hauptteil der vorliegenden Arbeit mit der strukturellen Charakterisierung verschiedener Ceramid-Spezies. Die Untersuchungen zum Phasenverhalten wurden sowohl an trockenen Systemen als auch im Beisein von Wasser durchgeführt. Als Methoden kamen neben kalorimetrischen und spektroskopischen Verfahren auch die Röntgenpulverdiffraktometrie zum Einsatz.

- Der Einfluss von Wasser und Temperatur

Alle untersuchten Ceramide zeichnen sich bei Raumtemperatur durch hoch geordnete lamellare Strukturen aus. Liegen die Ceramide rein, nicht mit anderen Lipiden gemischt vor, zeigen die Alkylketten einen hohen Anteil an *trans*-Konformeren, welcher bis zu unphysiologisch hohen Temperaturen erhalten bleibt. Ein alleiniger Zusatz von Wasser trägt nicht zu einer Fluidisierung der Ketten bei.

- Die Strukturen der Ceramide

Unter den geordneten Strukturen der Ceramide werden drei Arten von Anordnungen unterschieden, welche die Lage der Lipidketten widerspiegeln. Im Falle der Gelphase des CER[AS] wird aus den experimentellen Befunden eine parallele Anordnung der Alkylketten abgeleitet. Es konnte festgestellt werden, dass sich bei dieser Konformation eine Wasserschicht zwischen den Kopfgruppen benachbarter Ceramid-Monoschichten einlagern kann. Analog verhalten sich auch die Gelphasen der untersuchten einkettigen Glycolipide. Im Gegensatz zu der parallelen Anordnung wird bei den Ceramiden vom Typ CER[AP] und CER[NP] eine gewinkelte Anordnung der beiden Alkylketten gefunden. Fettsäure- und Sphingoidseitenketten sind bei diesen Substanzen V-förmig angeordnet. Der Winkel ist in einem weiten Größenbereich variabel und bestimmt maßgeblich den lamellaren

Wiederholabstand dieser Ceramid-Spezies. Sowohl bei CER[AP] als auch CER[NP] tritt noch die dritte mögliche Anordnung, die gestreckte Sphingolipid-Konformation auf.

Es konnte festgestellt werden, dass in der gestreckten und in der gewinkelten Anordnung der Ceramide eine Wechselwirkung mit Wasser ausgeschlossen ist. In diesen Anordnungen schirmen die in entgegengesetzte Richtungen zeigenden Fettsäure- und Phytosphingosinseitenketten die Kopfgruppe des Ceramides vom Wasser ab. Des Weiteren sind alle polaren Strukturen der Ceramidmoleküle durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen abgesättigt und stehen nicht zur Bindung mit Wasser zur Verfügung. In diesen Anordnungen ist es möglich, dass sich die beiden Ketten in separaten Subzellen gruppieren. Aus diesem Grund wurde ein Ceramid synthetisiert (d_3 CER[NP]), in dessen Fettsäureseitenkette die Wasserstoffatome durch Deuterium substituiert sind. Über spektroskopische Untersuchungen konnte die Fettsäurekette getrennt von der Phytosphingosinkette untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Phytosphingosin- und die Fettsäureseitenkette verschiedene Kettenpackungen aufweisen und die beobachteten Phasenübergänge neben der Struktur der Kopfgruppe und auch das Packungsverhalten beider Ketten beeinflussen.

- Einfluss der Kopfgruppe (Ceramid-Klasse)

Im Rahmen der Untersuchungen an Ceramiden konnte festgestellt werden, dass die Strukturausbildung der Ceramide in Volumenphasen maßgeblich von der Kopfgruppenstruktur dieser Verbindungsklasse beeinflusst wird. Diese Beziehung der chemischen Struktur zur dreidimensionalen Raumstruktur der Moleküle wird besonders bei den hydratisierten Systemen im Bereich nach dem Kettenschmelzen deutlich.

Die Ceramide vom α -Hydroxysphingosin-Typ CER[AS] bilden nach dem Kettenschmelzen eine invers hexagonale Überstruktur (H_{II} -Phase) aus. Nach erfolgter Hydratisierung führt die Abkühlung der H_{II} -Phase zur Ausbildung einer Gelphase mit hexagonaler Kettenpackung. In dieser Phase ist ein geringer Teil des Wassers an die Kopfgruppe des Ceramides gebunden. Die Hauptmenge des Wassers befindet sich allerdings separiert in Bulkphasen. Eine Schwellung der Lipidschichten über eine Variation des Wassergehaltes konnte in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden.

Während die mit einer nichthydroxylierten Fettsäure verknüpften Ceramide vom Phytosphingosin-Typ CER[NP] nach dem Kettenschmelzen keine charakteristische Überstruktur mehr ausbilden können, zeigen die mit einer α -Hydroxyfettsäure amidierten Phytosphingosine nach dem Kettenschmelzen eine lamellare Überstruktur ($L\alpha$ -Phase).

- Einfluss der Doppelbindungen in den Fettsäureseitenketten

Eine Modifizierung der NP-Ceramide durch die Einführung von ein ($C_{18:1}$ CER[NP]) bzw. zwei ($C_{18:2}$ CER[NP]) Doppelbindungen in den Fettsäureseitenketten wirkte sich vorrangig auf die Hauptumwandlungstemperatur aus, die durch die Einführung einer Doppelbindung um ca. 30 Kelvin herabgesetzt wurde. Eine $L\alpha$ - oder H_{II} -Phase konnten bei $C_{18:1}$ CER[NP] nicht beobachtet werden. $C_{18:2}$ CER[NP] zeigte im Temperaturbereich des Kettenschmelzens eine Koexistenz der lamellaren, kristallinen Struktur neben einer schwach ausgeprägten hexagonalen Überstruktur, welche beide nach Beendigung des Kettenschmelzens nicht mehr nachzuweisen waren. Die Strukturen der untersuchten Ceramide vom Typ NP (CER[NP], d_{35} CER[NP], $C_{18:1}$ CER[NP] und $C_{18:2}$ [NP]) ließen sich nicht durch die Zugabe von Wasser beeinflussen. Lediglich die Umwandlungstemperaturen der Ceramide wurden in den wasserhaltigen Proben deutlich herabgesetzt.

- Der Einfluss der Konfiguration der α -Hydroxylgruppe

Die Einführung einer Hydroxylgruppe in α -Position der Fettsäureseitenkette der Ceramide vom Phytosphingosin-Typ bewirkt hingegen drastische strukturelle Änderungen. Über einen direkten Vergleich der D- mit der L-Form der α -Hydroxystearoylphytosphingosine (AP) konnte der Einfluss der Konfiguration der α -Hydroxylgruppe untersucht werden. L-CER[AP] zeigte einen ausgeprägten Kristallpolymorphismus, der dem des CER[NP] ähnelt. Es konnten drei kristalline Phasen gefunden werden, die sich sowohl in der lamellaren Überstruktur als auch im Packungsverhalten der Alkylketten unterscheiden. Die Substanz geht nach dem Kettenschmelzen in eine flüssigkristalline $L\alpha$ -Phase über. Die Zugabe von Wasser bewirkte eine deutliche Herabsenkung der Phasenumwandlungstemperatur des Kettenschmelzens aber keinerlei strukturelle Beeinflussung oder Änderungen in der Phasenabfolge. Das Pendant D-CER[AP], welches der in der Natur vorkommenden Form des CER[AP] entspricht, unterscheidet sich strukturell deutlich von L-CER[AP]. Die kristallinen Phasen und die $L\alpha$ -Phase des D-CER[AP] weisen deutlich größere lamellare Abstände auf als die des L-CER[AP]. Mit spektroskopischen Verfahren konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Diastereomeren sowohl in der Art der Kettenpackung als auch in der Struktur der Kopfgruppe von einander abgrenzen lassen.

- Der Einfluss von Cholesterol

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewählte Ceramide auf mögliche Wechselwirkungen mit anderen im *Stratum corneum* relevanten Substanzen untersucht. Die Ceramide vom Typ CER[NP] und CER[AS] zeigen evidente Wechselwirkungen mit Cholesterol. In den vollständig hydratisierten Mischsystemen bewirkt der Zusatz von Cholesterol nicht nur eine

Herabsenkung der Hauptumwandlungstemperatur sondern auch die Ausbildung einer flüssigkristallinen $L\alpha$ -Phase, welche bei den reinen Lipiden nicht auftritt. Diese wandelt sich in den Mischungen mit AS-Ceramiden, nicht aber in den CER[NP]/Cholesterol-Mischungen, in eine flüssigkristalline Phase mit invers hexagonaler Überstruktur (H_{II}) um.

- Der Einfluss von Ölsäure

Obwohl bekannt ist, dass Ölsäure die Barrierefunktion des *Stratum corneum* stark beeinflussen kann, zeigten die Modellmischungen mit CER[NP] in allen Verhältnissen die phasenseparierten Einzelkomponenten. Mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) konnten die separierten Phasen der Einzelkomponenten abgebildet werden. Allerdings konnte in den Systemen aus Ölsäure und CER[NP] nach Abkühlung der Schmelze eine neue Phase gefunden werden. Das Auftreten dieser neuen Phase, die zunächst mit Hilfe der Röntgenpulverdiffraktometrie identifiziert wurde, ist jedoch nicht auf physikochemische Wechselwirkungen von Ölsäure und CER[NP], sondern auf die Bildung einer neuen Substanz zurückzuführen. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen ist von einer Veresterung der primären Hydroxylgruppe des CER[NP] mit der Fettsäure auszugehen. Die physiologische Relevanz dieser neuen Verbindung ist noch nicht geklärt, da sie noch nicht im *Stratum corneum* identifiziert wurde. Ihre Existenz *in vitro* kann jedoch als wahrscheinlich angesehen werden.

- Glycolipide

Die charakterisierten einkettigen Glycolipide kommen dagegen in humaner Haut definitiv nicht vor. Der Wert der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ist in erster Linie in experimenteller Hinsicht zu sehen. Alle untersuchten Glycolipide zeigen ein generelles Phasenverhalten mit einer Gel-Gel-Umwandlung und einem Übergang in eine lamellare flüssigkristalline Phase. Die Ergebnisse aus den Röntgenbeugungsexperimenten konnten gut mit den Ramanspektroskopischen Untersuchungen korreliert werden. Dabei konnten die Phasenumwandlungen mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Eine Korrelation der Verschiebung der Kettenreflexe in den Röntgenaufnahmen der Gelphasen der Glycolipide mit den temperaturabhängigen Änderungen von Bandenparametern der CH_2 -Schwingungen der Raman-Spektren wurde erstmals durchgeführt. Für zukünftige Experimente mit Glycolipiden der humanen Haut (Glucocerebroside) und anderen Lipiden stellen diese Untersuchungen eine wichtige Voraussetzung dar.

Ausblick

Die wichtigste Motivation der Menschen, die in die Wissenschaft gehen, war ursprünglich und ist wohl auch heute die Suche nach der Wahrheit.

Carl Friedrich von Weizsäcker

Die Aufklärung der Strukturen und Wechselwirkungen der Lipide und Lipidmischungen wurde in dieser Arbeit durch temperaturinduzierte Phasenumwandlungen, Mischungs- und Entmischungsvorgänge realisiert. Diese Verfahrensweise hat den Vorteil, dass durch die Temperaturabhängigkeit der Messkurven, die Phasenzuordnung wesentlich erleichtert, beziehungsweise erst ermöglicht wird. Im *Stratum corneum* spielen Temperaturänderungen bei der Ausbildungen der Lipidschichten keine wesentliche Rolle. Strukturelle Beeinflussungen werden hier durch biochemische Modifizierungen der Lipide (Spaltung oder Knüpfung von Ester- oder glycosidischen Bindungen) und Änderung der Umgebung (pH-Wert, Ionenstärke und Wassergehalt) hervorgerufen.

In zukünftigen Untersuchungen sollte diesem Aspekt Rechnung getragen werden. Neben einer Ausweitung auf weitere verfügbare *Stratum corneum* Ceramide kann eine Einbeziehung der Glucocerebroside, den natürlichen Vorstufen der Ceramide, als sinnvoll betrachtet werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, in welcher Struktur die Ceramide nach enzymatischer Spaltung der Glucocerebroside mittels Glucocerebrosidase *in situ* vorliegen. Für folgende Arbeiten mit natürlichen, in der Haut vorkommenden Glycolipiden (Glucocerebroside), sind die durchgeführten Experimente an den untersuchten einkettigen Glycolipiden als wesentliche Voruntersuchungen zu betrachten.

Um von den Röntgenaufnahmen umfangreicherer Aussagen über die Struktur der Lipide treffen zu können, sollten sich Struktursimulationen anschließen, in die Informationen der experimentellen Ergebnisse über Kettenpackung, Wasserstoffbrückenbindungen und Überstruktur eingebracht werden können. Um die Kettenpackung und Kettenneigung der Ceramide eindeutig zu bestimmen, kann versucht werden, die gewonnen Ergebnisse aus Volumenphasen mit Daten aus Experimenten an Lipidmonoschichten in Verbindung zu bringen.

Literaturverzeichnis

- (1) Abbate,S., Wunder,S.L., Zerbi,G.; Conformational Dependence of Fermi resonances in *n*-Alkanes. Raman spectra of 1,1,1,4,4-Hexadeuteriobutane. *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 593-600
- (2) Abbate,S., Zerbi,G., Wunder,S.L.; Fermi resonance and vibrational spectra of crystalline and amorphous polymethylene chains. *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3140-3149
- (3) Abraham,W., Downing,D.T.; Lamellar structures formed by stratum corneum lipids in vitro: a deuterium nuclear magnetic resonance (NMR) study. *Pharm. Res.* 9 (11) (1992) 1415-1421
- (4) Abraham,W., Wertz,P.W., Downing,D.T.; Fusion patterns of liposomes formed from stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 90 (1988) 259-262
- (5) Abraham,W., Wertz,P.W., Landmann,L., Downing,D.T.; Stratum corneum lipid liposomes: Calcium-induced transformation into lamellar sheets. *J. Invest. Dermatol.* 88 (1987) 212-214
- (6) Abrahamsson,S., Dahlen,B., Löfgren,H., Pascher,I.; Lateral packing of hydrocarbon chains. *Prog. Chem. Fats Lipids* 16 (1978) 125-143
- (7) Abrahamsson,S., Dahlen,B., Pascher,I.; Molecular Arrangements in Glycosphingolipids: The Crystal Structure of Glucosylphosphatidylcholine Hydrochloride. *Acta Cryst. B*33 (1997) 2008-2013
- (8) Alonso,A., Meirelles,N.C., Tabak,M.; Lipid chain dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance. *Chem. Phys. Lipids* 104 (2000) 101-111
- (9) Belleau,B., Malek,G.; A new convenient reagent for peptide syntheses. *J. Americ. Chem. Soc.* 90 (6) (1968) 1651-52
- (10) Bhattacharya,S., Haldar,S.; Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes: Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Biochim. Biophys. Acta* 1467 (2000) 39-53
- (11) Bleck,O., Abeck,D., Ring,J., Hoppe,U., Vietzke,J.-P., Wolber,R., Brandt,O., Schreiner,V.; Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema. *J. Invest. Dermatol.* 113 No.6 (1999) 894-900
- (12) Boggs,J.M.; Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim. Biophys. Acta* 906 (1987) 353-404
- (13) Bouwstra,J.A., Dubbelaar,F.E.R., Gooris,F.E., Ponec,M.; The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm. Venereol.* 208 (2000) 23-30
- (14) Bouwstra,J.A., Gooris,G.S., Bras,W., Downing,D.T.; Lipid organization in pig stratum corneum. *J. Lipid Res.* 37 (1995) 685-695
- (15) Bouwstra,J.A., Gooris,G.S., Salomons-de Vries,M.A., Spec,J. van der, Bras,W.; Structure of human stratum corneum as function of temperature and hydration. A wide angle X-ray diffraction study. *Int. J. Pharm.* 84 (1992) 205-216
- (16) Bouwstra,J.A., Gooris,G.S., Spec,J. van der, Bras,W.; Structural investigations of human stratum corneum by small angle X-ray scattering. *J. Invest. Dermatol.* 97 (1991) 1005-1012
- (17) Bouwstra,J.A., Gooris,G.S., van der Spek,J., Lavrijsen, Bras,W.; The lipid and protein structure of mouse stratum corneum: a wide and small angle diffraction study. *Biochim. Biophys. Acta* 1212 (1994) 183-192
- (18) Bouwstra,J.A., Cheng,K., Gooris,G.S., Weerheim,A., Ponec,M.; The role of ceramide 1 and 2 in the stratum corneum lipid organisation. *Biochim. Biophys. Acta* 1300 (1996) 177-186
- (19) Bouwstra,J.A., Gooris,F.E., Weerheim,A.M., Ijzerman,E.P., Ponec,M.; Role of ceramide 1 in the molecular organisation of the stratum corneum lipids. *J. Lipid Res.* 39 (1998) 186-196
- (20) Bouwstra J.A., Gooris G.S., Dubbelaar F.E., Ponec M.; Phase behavior of stratum corneum lipid mixtures based on human ceramides: The role of natural and synthetic ceramide 1. *J. Invest. Dermatol.* 118 (4) (2002) 606-617
- (21) Breathnach,A.S.; Aspects of epidermal structure. *J. Invest. Dermatol.* 65 (1975) 2-12

- (22) *Breathnach, A.S., Goodmann, T., Stolinsky, C., Gross, M.; Freeze fracture replication of cells of stratum corneum of human cells. J. Anat. 114 (1973) 65-81*
- (23) *Brown, K.G., Bricknell-Brown, E., Ladjadj, M.; Raman-active bands sensitive to motion and conformation at the chain termini and backbones of alkanes and lipids. J. Phys. Chem. 91 (1987) 3436-3442*
- (24) *Chen, H.-C., Mendelsohn, R., Rerek, M.E., Moore, D.J.; Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry studies of fatty acid homogeneous ceramide 2. Biochim. Biophys. Acta 1468 (2000) 293-303*
- (25) *Chen, H.-C., Mendelsohn, R., Rerek, M.E., Moore, D.J.; Effect of cholesterol on miscibility and phase behavior in binary mixtures with synthetic ceramide 2 and octadecanoic acid. Infrared studies. Biochim. Biophys. Acta 1512 (2001) 345-356*
- (26) *Chopart, M., Castiel-Higounenc, I., Arbey, E., Guey, C., Gaetani, Q., Schmidt, R.; The normal human stratum corneum: A new ceramide profile. Perspectives in Percutaneous Penetration 8a (2002) 35*
- (27) *Craven, B.M.; Crystal structure of cholesterol monohydrate. Nature 260 (1976) 727-729*
- (28) *Craievich, A., Doucet, J., Denicolo, I.; Molecular disorder in even-numbered paraffins. Phys. Rev. B 32, (6) (1985) 4164-4168*
- (29) *Dahlen, B., Pascher, I.; Molecular arrangements in sphingolipids. Crystal structure of N-Tetracosanoylphytosphingosine. Acta Cryst. B28 (1972) 2396-2404*
- (30) *Dahlen, B., Pascher, I.; Molecular arrangements in sphingolipids. Thermotropic phase behaviour of Tetracosanoylphytosphingosine. Chem. Phys. Lipids 24, (1979) 119-133*
- (31) *Denicolo, I., Doucet, J., Craievich, A.F.; X-ray study of the rotator phase of paraffins (III): Even-numbered paraffins $C_{18}H_{38}$, $C_{20}H_{42}$, $C_{22}H_{46}$, $C_{24}H_{50}$, $C_{26}H_{54}$. J. Chem. Phys. 78(3) (1983) 1465-1469*
- (32) *Dittgen, M.; Transdermale Therapeutische Systeme (TTS). In: Müller, R.H., Hildebrand, G.E.; Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen. Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1998) 133-156*
- (33) *Dobner, B.; Persönliche Mitteilungen (2002)*
- (34) *Doering, T., Holleran, W.M., Potratz, A., Vielhaber, G., Elias, P.M., Suzuki, K., Sandhoff, K.; Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. J. Biol. Chem. 274 (1999a) 11038-11045*
- (35) *Doering, T., Proia, R.L., Sandhoff, K.; Accumulation of protein bound epidermal glucosylceramides in β -glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. FEBS Lett. 447 (1999b) 167-170*
- (36) *Doucet, J., Denicolo, I., Craievich, A.; X-ray study of the rotator phase of odd-numbered paraffins $C_{17}H_{36}$, $C_{19}H_{40}$, $C_{21}H_{44}$. J. Chem. Phys. 75 (1981,a) 1523*
- (37) *Doucet, J., Denicolo, I., Craievich, A.; Evidence of a phase transition in the rotator phase of the odd-numbered paraffins $C_{23}H_{48}$ and $C_{25}H_{52}$. J. Chem. Phys. 75 (1981,b) 5125*
- (38) *Downing, D.T.; Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. J. Lipid Res. 33 (1992) 301-313*
- (39) *Duclos, R.I.; The total syntheses of D-erythro-sphingosine, N-palmitoylsphingosine (ceramide), and glucosylceramide (cerebroside) via an azidosphingosine analog. Chem. Phys. Lipids 111 (2001) 111-138*
- (40) *Egelrud, T.; Desquamation in the stratum corneum. Acta Derm. Venereol. Supp. 208 (2000) 44-45*
- (41) *Ekelund, K., Erikson, L., Sparr, E.; Rectangular solid domains in ceramide-cholesterol monolayers - 2D crystals. Biochim. Biophys. Acta 1464 (2000) 1-6*
- (42) *Engström, S., Ekelund, K., Engblom, J., Eriksson, L., Sparr, E., Wennerström, H.; The skin barrier from a lipid perspective. Acta Derm. Venereol. Supp. 208 (2000) 31-35*
- (43) *Forslind, B.; A Domain Mosaic Model of the Skin Barrier. Acta Derm. Venerol. (Stockh) 74 (1994) 1-6*
- (44) *Förster, G.; Persönliche Mitteilungen. (2000)*
- (45) *Garidel, P.; Calorimetric and spectroscopic investigations of phytosphingosine ceramide membrane organisation. Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 1934-1942*
- (46) *Garson, J.C., Doucet, J., Leveque, J.L., Tsoucaris, G.; Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. J. Invest. Dermatol. 96 (1991) 43-49*

- (47) Gay,C.L., Guy,R.H., Golden,G.M., Mak,V.H.W., Francoeur,M.,L.; Characterization of low-temperature (i.e., 65°C) lipid transitions in human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 103 (2) (1994) 233-239
- (48) Glombitza,B., Müller-Goymann,C.C.; Influence of different ceramides on the structure of in vitro model lipid systems of the stratum corneum lipid matrix. *Chem. Phys. Lipids* 117 (2002) 29-44
- (49) Gniadecka,M., Nielsen,O.F., Christensen,D.H., Wulf,H.C.; Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair and nail. *J. Invest. Dermatol.* 110 (4) (1998) 393-398
- (50) Goddard, E.D., Goldwasser,S., Golikeri,G., Kung,H.C.; Molecular association in fatty acid-potassium soap systems. *Advances in chemistry series* 86 (1968) 67-77
- (51) Golden,G.M., Guzek,D.L., Kennedy,A.H., McKie,J.E., Potts,R.O.; Stratum corneum lipid phase transition and water barrier properties. *Biochemistry* 26 (1987) 2382-2388
- (52) Gray,G.M., Yardley,H.J.; Lipid composition of cells isolated from pig, human and rat epidermis. *J. Lipid Res.* 16 (1975) 434-440
- (53) Gray,G.M., Yardley,H.J.; Different population of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. *J. Lipid Res.* 16 (1975) 441-447
- (54) Günzler,H., Heise,H.M.; *IR-Spektroskopie*. 3. Aufl., VCH VerlagsgmbH, Weinheim (1996)
- (55) Hauser,A.; *Persönliche Mitteilungen*. (2001)
- (56) Hayakawa,E., Naganuma,M., Mukasa,K., Shimozawa,T., Araiso,T.; Change of motion and localization of cholesterol molecule during $\text{L}\alpha\text{-H}_{\text{II}}$ Transition. *Biophys. J.* 74 (1998) 892-898
- (57) Karlsson,K.-A., Pascher,I.; Resolution and chromatographic configuration analysis of 2-hydroxy fatty acids. *Chem. Phys. Lipids* 12 (1974) 56-74
- (58) Kirchoff,W.H., Levin,I.W., Description of the thermotropic behaviour of membrane bilayers in terms of Raman spectral parameters: A two state model. *J. Res. National Bureau of Standards* 92 (2) (1987) 113-128
- (59) Kung,H.C., Goddard, E.D.; Molecular association in fatty acid potassium soap systems. *J. Colloid Interface Sci.* 29 (1969) 242-249
- (60) Lampe,M. Bulinghame,A., Whitney,J. Williams,M., Brown,B., Roitman,E., Elias,P.; Human stratum corneum lipids: characterisation and regional variations. *J. Lipid Res.* 24 (1983) 120-130
- (61) Landmann,L.; Epidermal permeability barrier: Transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J. Invest. Dermatol.* 87 (1986) 202-209
- (62) Li,L., Tang,X., Taylor,K.G., DuPre,D.B., Yappert,M.C.; Conformational characterization of ceramides by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.* 82 (2002) 2067-2080
- (63) Loomis,C.R., Shipley,G.G., Small,D.M.; The phase behavior of hydrated cholesterol. *J. Lipid Res.* 20 (1979) 525
- (64) Madison,K., Sando,G.N., Howard,E.J., True,C.A., Gilbert,D., Schwartzendruber,D., Wertz,P.; Lamellar granule biogenesis: a role for ceramide glucosyltransferase, lysosomal enzyme transport, and the Golgi. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 3 (2) (1998) 80-86
- (65) Madison,K., Schwartzendruber,D., Wertz,P., Downing,D.; Presence of intact intercellular lamellae in the upper layers of stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 88 (1987) 714-718
- (66) Mantsch,H.H.; Vibrational spectroscopy of lipids: a historical perspective. *Chem. Phys. Lipids* 96 (1998) 3-7
- (67) Mao-Qiang,M., Elias,P.M.,Feingold,K.R.; Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function. *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 791-798
- (68) Maroncelli,M., Strauss,H.L., Snyder,R.G.; The distribution of conformational disorder in the high-temperature phases of the crystalline n-alkanes. *J. Chem. Phys.* 82 (6) (1985) 2811-2824
- (69) Mathias,S., Pena,L.A., Kolesnick,R.N.; Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* 335 (1998) 465-480
- (70) Maulik,P.R., Ruocco,M.J., Shipley,G.G.; Hydrocarbon chain packing modes in lipids: effect of altered sub-cell dimensions and chain rotation. *Chem. Phys. Lipids* 56 (1990) 123-133

- (71) McIntosh, L.M., Jackson, M., Mantsch, H.H.; *Infrared spectra of basal cell carcinomas are distinct from non-tumor-bearing skin components. J. Invest. Dermatol.* 112 (6) (1999) 951-956
- (72) Mendelsohn, R., Moore, D.J.; *Vibrational spectroscopic studies of lipid domains in biomembranes and model systems. Chem. Phys. Lipids* 96 (1998) 141-157
- (73) Mendelsohn, R., Davies, M.A., Brauner, J.W., Schuster, H.F., Dluhy, R.A.; *Quantitative determination of conformational disorder in the acyl chains of phospholipid bilayers by infrared spectroscopy. Biochem.* 28 (1989) 8934-8939
- (74) Mendelsohn, R., Maisano, J.; *Use of deuterated phospholipids in Raman spectroscopic studies of membrane structure. I. Multilayers of dimyristoyl phosphatidylcholine (and its d_{54} derivative) with distearoyl phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta* 506 (1978) 192-201
- (75) Mendelsohn, R., Sunder, S., Bernstein, H.J.; *Deuterated fatty acids as Raman spectroscopic probes of membrane structure. Biochim. Biophys. Acta* 443 (1976) 613-617
- (76) Michaels, A.S., Chandrasekaran, S.K., Shaw, J.E.; *Drug permeation through human skin. Theory and in vitro experimental measurements. AIChE J.* 21 (5) (1975) 985-996
- (77) Minoni, G., Zerbi, G.; *End effect on longitudinal accordion modes: Fatty acids and layered systems. J. Phys. Chem.* 86 (1982) 4791-4798
- (78) Minoni, G., Zerbi, G., Rabolt, J.F.; *Frequency and intensity patterns of LAM progression in weakly coupled chains: The case of stearic acid and stearyl alcohol. J. Chem. Phys.* 81 (1984) 4782-4789
- (79) Mizushima, H., Fukasawa, J.-I., Suzuki, T.; *Phase behaviour of artificial stratum corneum lipids containing a synthetic pseudo-ceramide: a study of the function of cholesterol. J. Lipid Res.* 37 (1996) 361-367
- (80) Mizushima, H., Fukasawa, J.-I., Suzuki, T.; *Intermolecular Interaction between a Synthetic Pseudoceramide and a Sterol-Combined Fatty Acid. J. Colloid Interface Sci.* 195 (1997) 156-163
- (81) Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., Ghidone, R.; *Ceramide composition of the psoriatic scale. Biochim. Biophys. Acta* 1182 (1993) 147-151
- (82) Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Ghidone, R., Caputo, R.; *Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. Arch. Dermatol.* 130 (4) (1994) 452-456
- (83) Müller, S., Schmidt, R.R.; *Synthesis of the two unique compounds, a ceramide and a cerebroside, occurring in human stratum corneum. J. Prakt. Chem.* 342 (8) (2000) 779-784
- (84) Nagle, J.F., Tristram-Nagle, S.; *Structure of lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta* 1469 (2001) 159-195
- (85) Neubert, R., Raith, K., Raudenkorb, S., Wartewig, S.; *Thermal degradation of ceramides as studied by mass spectrometry and vibrational spectroscopy. Anal. Com.* 35 (1998) 161-164
- (86) Neubert, R., Rettig, W., Wartewig, S., Wegener, M., Wienhold, A.; *Structure of stratum corneum lipids characterised by FT-Raman spectroscopy and DSC. II. Mixture of ceramides and saturated fatty acids. Chem. Phys. Lipids* 89 (1997) 3-14
- (87) Norlen, L., Nicander, I., Lundh Rozell, B., Ollmar, S., Forslind, B.; *Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo. J. Invest. Dermatol.* 112 (1) (1999) 72-77
- (88) Norlen, L.; *Skin barrier formation: The membrane folding model. J. Invest. Dermatol.* 117 (4) (2001) 823-829
- (89) Norlen, L.; *Skin barrier structure and function: The single gel phase model. J. Invest. Dermatol.* 117 (4) (2001) 830-836
- (90) Nyholm, P.-G., Pascher, I., Sundell, S.; *The effect of hydrogen bonds on the conformation of glycosphingolipids. Methylated and unmethylated cerebroside studied by X-ray single crystal analysis and model calculations. Chem. Phys. Lipids* 52 (1990) 1-10
- (91) O'Connell, A.M., Pascher, I.; *The crystal structure of triacetyl sphingosine. Acta Cryst. B* 25 (1969) 2553-2561
- (92) Ohta, N., Hatta, I.; *Interaction among molecules in mixtures of ceramide/stearic acid, ceramide/cholesterol and ceramide/stearic acid/cholesterol. Chem. Phys. Lipids* 115 (2002) 93-105

- (93) Ongpipattanakul,B., Burnette,R.R., Potts,R.O., Franceur,M.L.; Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharm. Res.* 8 (3) (1991) 350-354
- (94) Ongpipattanakul,B., Franceur,M.L., Potts,R.O.; Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1190 (1994) 115-122
- (95) Pascher,I.; Molecular arrangements in sphingolipids: Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 455 (1976) 433-451
- (96) Pascher,I., Sundell,S.; Molecular arrangements in sphingolipids: crystal structure of the ceramide N-(2D,3D-dihydroxyoctadecanoyl)-l-phytosphingosine. *Chem. Phys. Lipids* 61 (1992) 79-86
- (97) Pascher,I., Sundell,S.; Molecular arrangements in sphingolipids: The crystal structure of cerebroside. *Chem. Phys. Lipids* 20 (1977) 175-191
- (98) Percot,A., Lafleur,M.; Direct observation of domains in model stratum corneum lipid mixtures by Raman spectroscopy. *Biophys. J.* 81 (2001) 2144-2153
- (99) Pilgram,G.S.K., Engelsma-van Pelt,A.M., Bouwstra,J.A., Koerten,H.K.; Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J. Invest. Dermatol.* 113 (1999) 403-409
- (100) Pilgram,G.S.K., Engelsma-van Pelt,A.M., Oostergetel,G.T., Koerten,H.K., Bouwstra,J.A.; Study on stratum corneum lipid models by (cryo-) electron diffraction. *J. Lipid Res.* 39 (1998) 1669-1676
- (101) Pink,D.A., Green,T.J., Chapman,D.; Raman scattering in bilayers of saturated phosphatidylcholines. *Experiment and theory. Biochem.* 19 (1980) 349-356
- (102) Raudenkolb,S.; Strukturuntersuchungen zur molekularen Organisation ausgewählter Stratum corneum Lipidsysteme. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie (1999)
- (103) Raudenkolb,S., Hübner,W., Rettig,W., Wartewig,S., Neubert,R.H.H., Polymorphism of Ceramide 3. Part I: An Investigation focused on the Head group of N-Octadecanoylphytosphingosine. (akzeptiert) *Chem. Phys. Lipids* (2002)
- (104) Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W.; Influence of unsaturated fatty acids on the phase behaviour of ceramide III. *Chem. Phys. Lipids* 107 (1) (2000) 56-57
- (105) Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W., Hauser,A.; Phase behaviour of ceramide III influenced by oleic acid. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334 (2) (2001) 80, T62
- (106) Robson,K.J., Stewart,M.E., Michelsen,S., Lazo,N.D., Downing,D.T.; 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.* 35 (1994) 2060-2068
- (107) Ryckaert,J.-P., Klein,M.L., McDonald,I.R.; Disorder at the bilayer interface in the pseudohexagonal rotator phase of solid n-alkanes. *Phys. Rev. Lett.* 58 (7) (1987) 698-701
- (108) Sandhoff,K., Kolter,T., van Echten-Deckert,G.; Sphingolipid metabolism: sphingoid analogs, sphingolipid activator proteins, and the pathology of the cell. *Ann NY Acad. Sci.* 845 (1998) 139-151
- (109) Schaufele,R.F., Shimanouchi,T.; Longitudinal acoustic vibrations of finite polymethylene chains. *J. Chem. Phys.* 47 (9) (1967) 3605-3611
- (110) Schmidt,M., Chatterjee,S.K., Dobner,B., Nuhn,P.; New modified single chained glycolipids. Part I: Synthesis of deoxy and partially O-methylated glycolipids with or without a sulfur containing spacer. *Chem. Phys. Lipids* 114 (2002) 139-147
- (111) Schmuth,M., Man,M.-Q., Weber,F., Gao,W.N., Feingold,K.R., Fritsch,P., Elias,P.M., Holleran,W.M.; Permeability barrier disorder in Niemann-Pick Disease: Sphingomyelin-Ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 115 (3) (2000) 459-466
- (112) Schrader,B; *Infrared and Raman spectroscopy. Methods and applications.* VCH, Weinheim (1995)
- (113) Schuette,C.G., Doering,T., Kolter,T., Sandhoff,K.; The glycosphingolipidoses - from disease to basic principles of metabolism. *Biol. Chem.* 380 (1999) 759-766
- (114) Schurer,N.Y., Elias,P.M.; The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv. Lipid Res.* 24 (1991) 27-56

- (115) Seddon, J.M.; Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1031 (1990) 1-69
- (116) Sha, J., Atienza, J.M., Duclos, R.I., Rawlings, A.V., Dong, Z.X., Shipley, G.G.; Structural and thermotropic properties of synthetic C16:0 (palmitoyl) ceramide: effect of hydration. *J. Lipid Res.* (1995a) 1936-1944
- (117) Sha, J., Atienza, J.M., Rawlings, A.V., Dong, Z.X., Shipley, G.; Physical properties of ceramides: effect of fatty acid hydroxylation. *J. Lipid Res.* 36 (1995b) 1945-1955
- (118) Shieh, H.S., Hoard, L.G., Nordman, C.E.; Crystal structure of anhydrous cholesterol. *Nature* 267 (1977) 287-289
- (119) Small, D.M.; *The physical chemistry of lipids: Handbook of lipids research. Vol.4*, Plenum Press, New York & London (1986)
- (120) Snyder, R.G.; Vibrational correlation splitting and chain packing for the crystalline n-alkanes. *J. Chem. Phys.* 71 (8) (1979) 3229-3234
- (121) Snyder, R.G., Goh, M.C., Srivatsavoy, V.J.P., Strauss, H.L.; Measurement of the growth kinetics of microdomains in binary n-alkane solid solutions by infrared spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 10008-10019
- (122) Snyder, R.G., Conti, G., Strauss, H.L.; Thermally-induced mixing in partially microphase segregated binary n-alkane crystals. *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 7342-7350
- (123) Snyder, R.G., Strauss, H.L., Cates, D.A.; Detection and measurement of microaggregation in binary mixtures of esters and of phospholipid dispersions. *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 8432-8439
- (124) Snyder, R.G., Hsu, S.L., Krimm, S.; Vibrational spectra in the C-H stretching region and the structure of the polymethylene chain. *Spectrochimica Acta* 34A (1978) 395-406
- (125) Snyder, R.G., Scherer, J.R.; Band structure in the C-H stretching region of the Raman spectrum of the extended polymethylene chain: Influence of Fermi resonance. *J. Chem. Phys.* 71 (8) (1979) 3221-3228
- (126) Sparr, E., Wennerström, H.; Responding phospholipid membranes - interplay between hydration and permeability. *Biophys. J.* 81 (2001a) 1014-1028
- (127) Sparr, E., Ekelund, K., Engblom, J., Engström, S., Wennerström, H.; An AFM Study of Lipid Monolayers: II. The effect of cholesterol on fatty acids. *Langmuir* 15 (20) (1999) 6950-6955
- (128) Sparr, E., Eriksson, L., Bouwstra, J.A., Ekelund, K.; AFM study of lipid monolayers: III. Phase behavior of ceramides, cholesterol and fatty acids. *Langmuir* 17 (2001b) 164-172
- (129) Stewart, M.E., Downing, D.T.; A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J. Lipid Res.* 40 (1999) 1434-1439
- (130) Stewart, M.E., Downing, D.T.; The ω -hydroxyceramides of pig epidermis are attached to corneocytes solely through ω -hydroxyl groups. *J. Lipid Res.* 42 (2001) 1105-1110
- (131) Strobl, G.R., Schwickert, H., Trzebiatowski, T.; Molecular motion, defect structures and phase transitions in oligomer crystals. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 87 (1983) 274-279
- (132) Suhonen, T.M., Bouwstra, J.A., Urtti, A.; Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Controlled Release* 59 (1999) 149-161
- (133) Swartzendruber, D.; Studies of epidermal lipids using electron microscopy. *Sem. Dermatol.* 11 (1992) 157-161
- (134) Swartzendruber, D., Wertz, P., Kitko, D.J., Madison, K.C., Downing, D.; Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J. Invest. Dermatol.* 88 (1987) 709-713
- (135) Swartzendruber, D., Kitko, D.J., Wertz, P., Downing, D.; Isolation of corneocyte envelopes from porcine epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 280 (1988) 424-429
- (136) Swartzendruber, D., Wertz, P., Kitko, D.J., Downing, D.; Molecular models of the intercellular lipid lamellae in the upper layer of stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 92 (1989) 251-257
- (137) Talreja, P.S., Kasting, G.B., Kleene, N.K., Pickens, W.L., Wang, T.-F.; Visualization of the Lipid barrier and measurement of lipid pathlength in human stratum corneum. *AAPS Pharm. Sci.* 3 (2) 13 (2001) 1-9
- (138) Tandon, P., Förster, G., Neubert, R.H.H., Wartewig, S.; Phase transitions in oleic acid as studied by X-ray diffraction and FT-Raman spectroscopy. *J. Molecular Structure* 524 (2000) 201-215

- (139) Tandon, P., Neubert, R.H.H., Wartewig, S.; Thermotropic phase behaviour of sodium oleate as studied by FT-Raman spectroscopy and X-ray diffraction. *J. Molecular Structure* 526 (2000) 49-57
- (140) Tandon, P., Raudenkolb, S., Neubert, R.H.H., Rettig, W., Wartewig, S.; X-ray diffraction and spectroscopic studies of oleic acid-sodium oleate. *Chem. Phys. Lipids* 109 (2001) 37-45
- (141) Tardieu, A., Luzatti, V., Reman, F.C.; Structure and Polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases. *J. Mol. Biol.* 75 (1973) 711-733
- (142) Trommer, H., Plätzer, M., Wolf, R., Neubert, R.H.H.; Mass spectrometric investigations on stratum corneum lipid peroxidation caused by ultraviolet irradiation. Part 1 and Part 2 (2002a) Publikation eingereicht in *Skin. Pharmakol. Skin Physiol.*
- (143) Trommer, H.; Persönliche Mitteilungen (2002b)
- (144) Uchida, Y., Hara, M., Nishio, H., Sidransky, E., Inoue, S., Otsuka, F., Suzuki, A., Elias, P.M., Holleran, W.M., Hamanaka, S.; Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J. Lipid Res.* 41 (2000) 2071-2082
- (145) Vaknin, D., Kelly, M.S.; The structure of D-erythro-C18 ceramide at the air-water interface. *Biophys. J.* 79 (2000) 2616-2623
- (146) Vand, V.; Indexing method of powder photographs of long-spacing compounds. *Acta Cryst.* 1 (1948) 109-115
- (147) Velkova, V., Lafleur, M.; Influence of the lipid composition on the organization of skin lipid model mixtures: An infrared spectroscopy investigation. *Chem. Phys. Lipids* 117 (2002) 63-74
- (148) Vielhaber, G., Pfeiffer, St., Brade, L., Lindner, B., Goldmann, T., Vollmer, E., Hintze, U., Wittern, K.-P., Wepf, R.; Localization of ceramide and glycosylceramide by immunogold electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 117 (5) (2001) 1126-1136
- (149) Vietzke, J.-P., Brandt, O., Abeck, D., Rapp, C., Strassner, M., Schreiner, V., Hintze, U.; Comparative Investigation of human stratum corneum ceramides. *Lipids* 36 (3) (2001) 299-304
- (150) Wartewig, S., Neubert, R.; Nicht-invasive Analysenmethoden der Schwingungsspektroskopie in der pharmazeutischen Forschung. *Pharm. Ind.* 64 (8a) (2002) 863-869
- (151) Wartewig, S., Neubert, R., Rettig, W., Hesse; Structure of stratum corneum lipids characterised by FT-Raman spectroscopy and DSC. IV. Mixture of ceramides and oleic acid. *Chem. Phys. Lipids* 91 (1998) 145-152
- (152) Wegener, M.; Kalorimetrische und FT-Ramanspektroskopische Untersuchungen an ausgewählten Lipiden des Stratum corneum. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie (1997)
- (153) Wegener, M., Neubert, R., Rettig, W., Wartewig, S.; Structure of stratum corneum lipids characterised by FT-Raman spectroscopy and DSC. I. Ceramides. *Int J Pharm* 81 (1996) R11-14
- (154) Wegener, M., Neubert, R., Rettig, W., Wartewig, S.; Structure of stratum corneum lipids characterised by FT-Raman spectroscopy and DSC. III. Mixture of ceramides and cholesterol. *Chem. Phys. Lipids* 88 (1997) 73-82
- (155) Wertz, P.W., Abraham, W., Landmann, L., Downing, D.T.; Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 87 (1986) 582-584
- (156) Wertz, P.W., Downing, D.; Glycolipids in mammalian epidermis: Structure and function in the water barrier. *Science* 217 (1982) 1261-1262
- (157) Wertz, P.W., Downing, D.; Acylglycosylceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.* 24 (1983a) 753-758
- (158) Wertz, P.W., Downing, D.; Glycosylceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.* 24 (1983b) 1135-1139
- (159) Wertz, P.W., Downing, D.; Covalently bound ω -hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta* 917 (1987) 108-111
- (160) Wiedmann, T.S., Salmon, A.; Thermotropic phase properties of the hydroxyceramide / cholesterol system. *Lipids* 26 (5) (1991) 364-368

-
- (161) White,S., Mirejosray,D., King,G.; *Structure of lamellar domains and corneocyte envelopes in murine stratum corneum. An X-ray diffraction study. Biochem. 27 (1988) 3725-3732*
- (162) Wilkening,G., Linke,T., Sandhoff,K.; *Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. J. Biol. Chem. 273 (46) (1998) 30271-8*
- (163) Wohlrab,W.; *Aufbau und Funktion der Haut. In: Neubert,R.H.H., Wohlrab,W., Marsch,W.; Dermatopharmazie. WVG Stuttgart (2001) 3-12*
- (164) Wötzel,D.; *Persönliche Mitteilungen. (1999)*
- (165) Yamamoto,A., Serizawa,S., Ito,M., Sato,Y.; *Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. Arch. Dermatol. Res. 283 (1991) 219-223*
- (166) Zacharie,B., Conolly,T.P., Penney,L.; *A simple one-step conversion of carboxylic acids to esters using EEDQ. J. Org. Chem. 60 (1995) 7072-7074*
- (167) Zerbi,G., Abbate,S.; *Spectroscopic determination of the average content of gauche structures in organic molecules containing polymethylene chains. Chem. Phys. Letters 80 (3) (1981) 455-457*
- (168) Zerbi,G., Magni,R., Gussoni,M., Bigotto,A., Dirlikov,S.; *Molecular mechanics for phase transition and melting of n-alkanes: A spectroscopic study of molecular mobility of solid n-nonadecane. J. Chem. Phys. 75 (7) (1981) 3175-3194*

Anhang

Degradation von CER[AS] (Sigma)

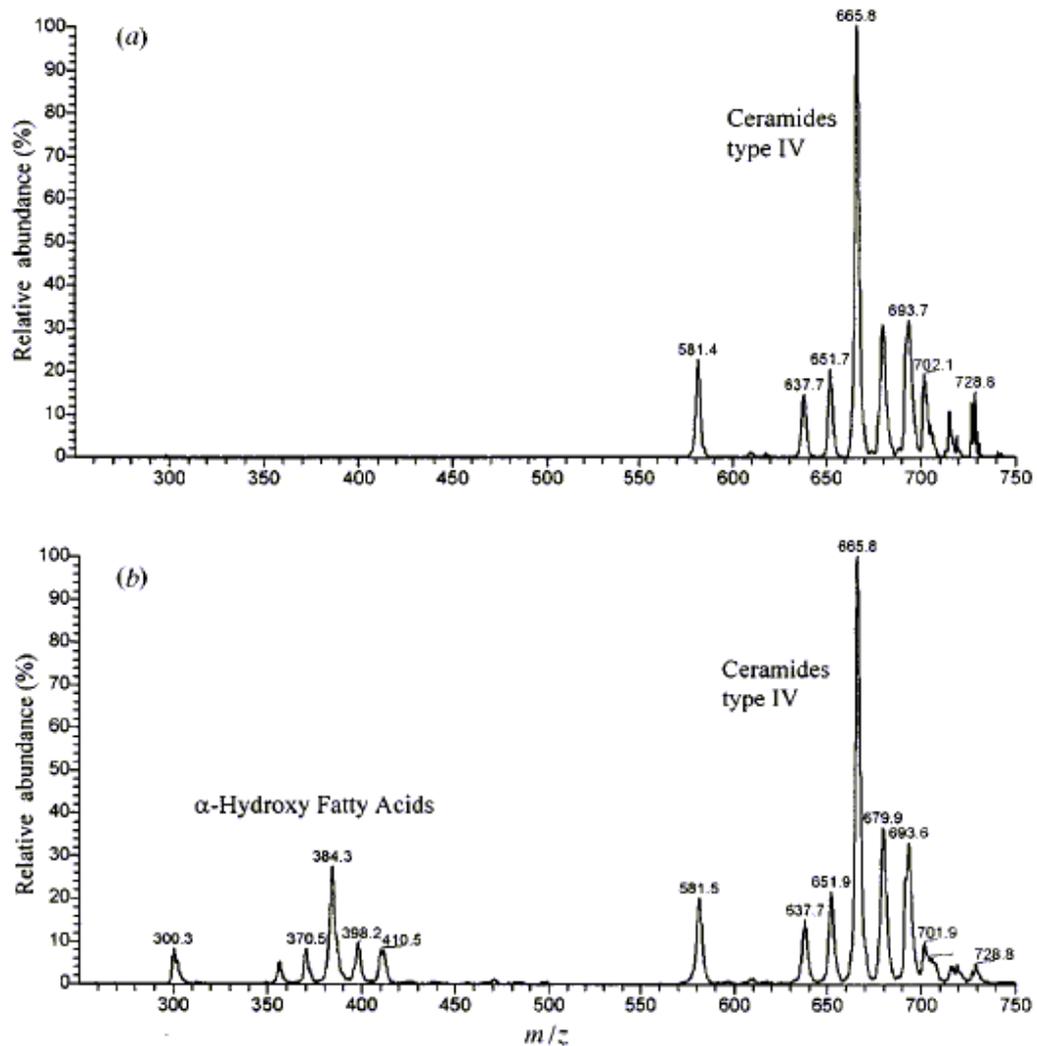


Abb. A 1 Elektrospray Massenspektren von CER[AS] im Negativ-Ionenmodus. (a) unbehandelte Probe, (b) nach thermischer Behandlung (2 h 120 °C). Die Masse/ Ladungsverhältnisse 581, 538, 652, 666, 680 und 694 entsprechen Ceramiden mit α -Hydroxyfettsäuren der Kettenlängen 18, 20, 22, 24, 26 und 28 (Neubert et al., 1998).

Röntgenkonturplot von CER[AS]

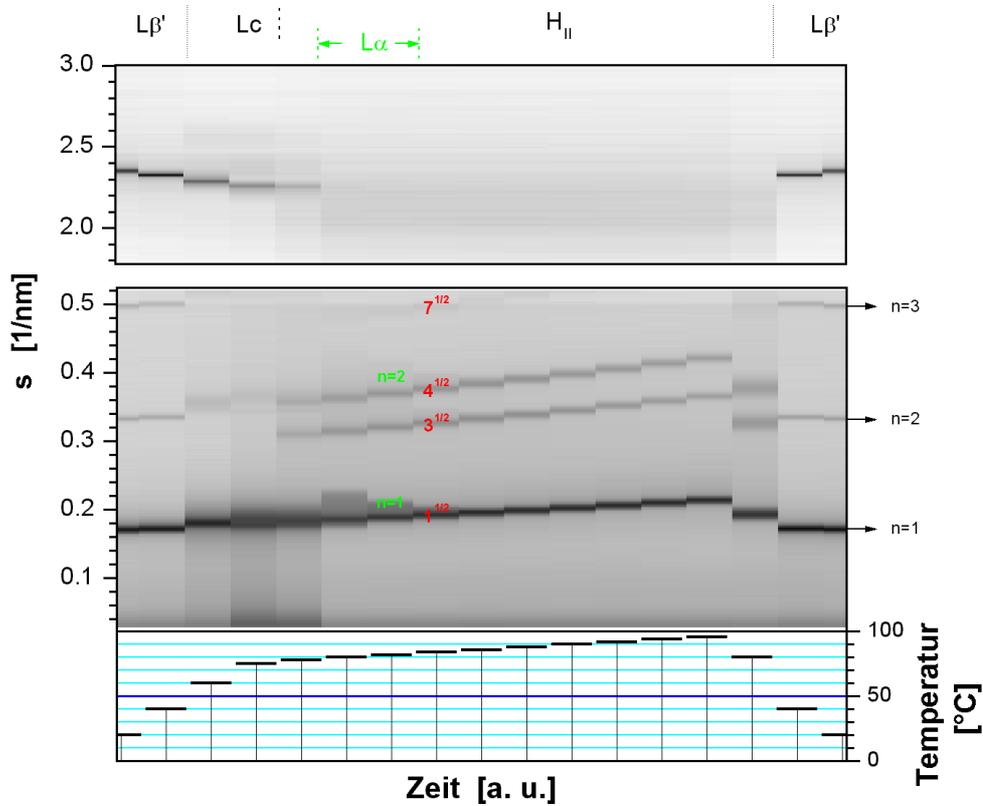


Abb. A 2 Röntgenkonturplot einer CER[AS]-Wasser-Dispersion (25/75 m%). Oben: WAXS. Unten: SAXS. Das Temperaturprogramm der Messserie befindet sich unterhalb, die Phasenbezeichnung oberhalb der Konturplots. Die ersten drei Ordnungen des lamellaren Wiederholabstands sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Innerhalb des Konturplots sind die ersten vier Ordnungen der H_{II} -Phase rot und die ersten zwei Ordnungen der $L\alpha$ -Phase grün gekennzeichnet.

Indizierung der simulierten Kristalle mit *Cerius*²Powder diffraction data: **C₁₈CER [NP]**Radiation used = XRAY
Wavelength = 1.54178

H	K	L	D-SPACING	2-THETA	INTEGRATED INTENSITY
0	0	1	32.0148	2.760	2.44713E+06 100.00 %
0	0	2	16.0074	5.521	51239.0 2.09 %
0	0	3	10.6716	8.285	113295. 4.63 %
0	0	4	8.0037	11.054	10286.3 0.42 %
1	0	0	5.9535	14.88	45689.9 1.87
0	1	0	4.7482	18.687	54075.5 2.21
1	-1	0	4.3187	20.565	3383.04 0.14
1	1	0	3.3055	26.973	2471.82 0.1
2	0	0	2.9768	30.018	2227.39 0.09
2	-1	0	2.8952	30.884	1744.11 0.07
1	-2	0	2.4417	36.808	7536.28 0.31
0	2	0	2.3741	37.896	322 0.01
2	1	0	2.2639	39.817	9762.17 0.4
2	-2	0	2.1594	41.832	1195.63 0.05
3	-1	0	2.0353	44.515	147.779 0.01
1	2	0	2.0263	44.721	420.824 0.02
3	0	0	1.9845	45.717	826.538 0.03

Powder diffraction data: **C₂₄CER [NP]**Radiation used = XRAY
Wavelength = 1.54178

h	k	l	d-spacing	2-theta	Integrated intensity
0	0	1	37.2579	2.371	0.313501E+07 100.00 %
0	0	2	18.6290	4.743	202480. 6.46 %
0	0	3	12.4193	7.117	87799.7 2.80 %
0	0	4	9.3145	9.495	67962.9 2.17 %
1	0	0	5.9535	14.88	34379.6 1.1
0	1	0	4.7482	18.687	24484.2 0.78
1	-1	0	4.3187	20.565	19752 0.63
1	1	0	3.3055	26.973	1104.87 0.04
2	0	0	2.9768	30.018	2369.18 0.08
2	-1	0	2.8952	30.884	2261.84 0.07
1	-2	0	2.4417	36.808	7797.5 0.25
0	2	0	2.3741	37.896	884.154 0.03
2	1	0	2.2639	39.817	7156.37 0.23
2	-2	0	2.1594	41.832	1137.64 0.04
3	-1	0	2.0353	44.515	249.421 0.01
1	2	0	2.0263	44.721	217.732 0.01
3	0	0	1.9845	45.717	596.406 0.02

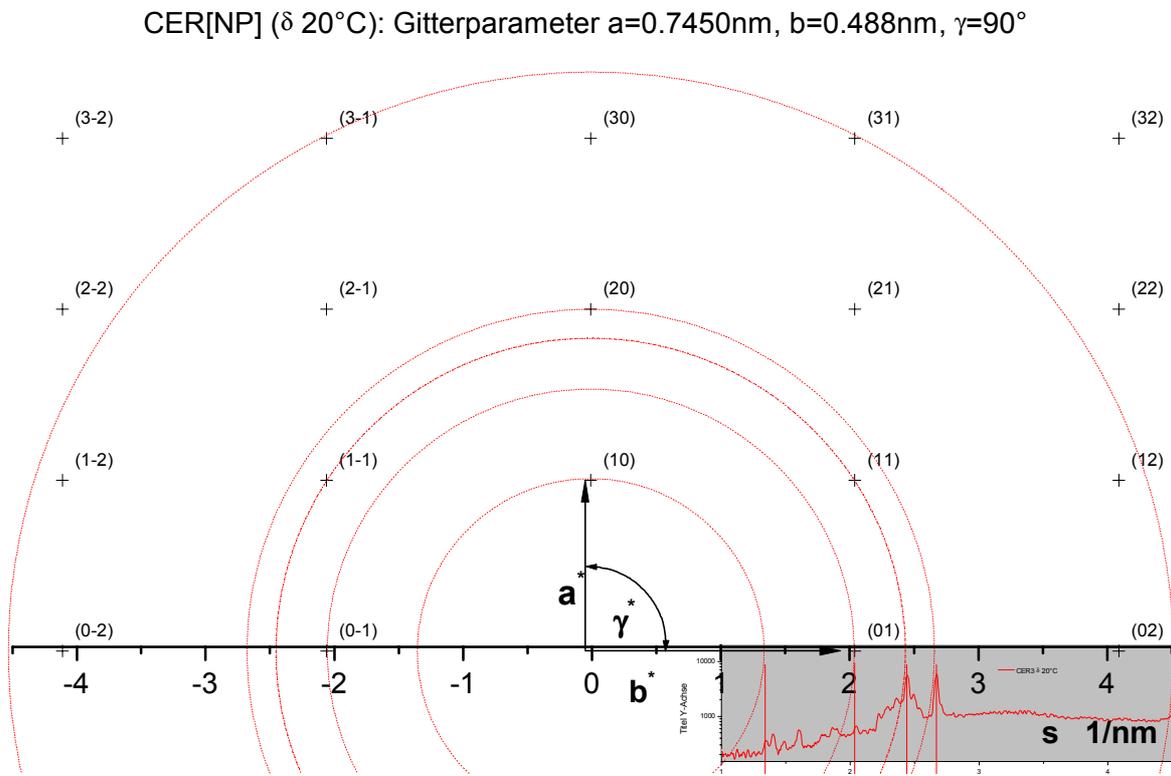
Indizierung der WAXS-Reflexe der δ -Phase von CER[NP]

Abb. A 3 Graphische Indizierung der Kettenreflexe von CER[NP] in der δ -Phase bei 20 °C. Die Kreuze kennzeichnen die Punkte des reziproken zweidimensionalen Gitters mit den *Miller*'schen Indices. In der eingefügten Grafik (unten rechts) ist die Streukurve (WAXS) der δ -Phase abgebildet. Die Radien der Kreisbögen entsprechen den reziproken Abständen der Beugungsreflexe (s) der Röntgenaufnahme.

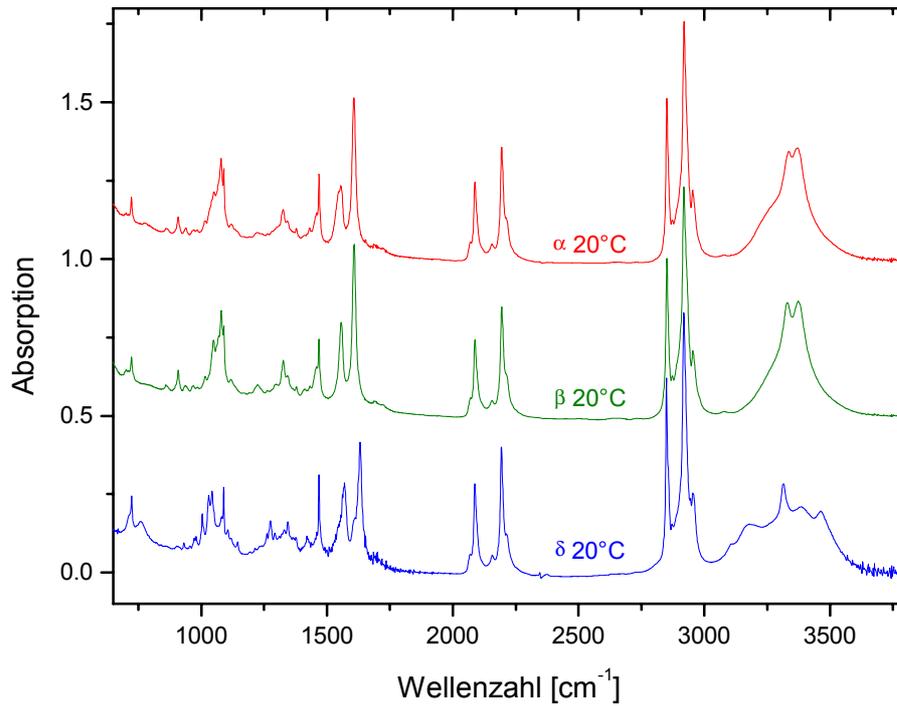
IR-Spektrum von d_{35} CER[NP]

Abb. A 4 FT-IR Spektren der drei Modifikationen von d_{35} CER[NP] aufgenommen als KBr-Pressling.

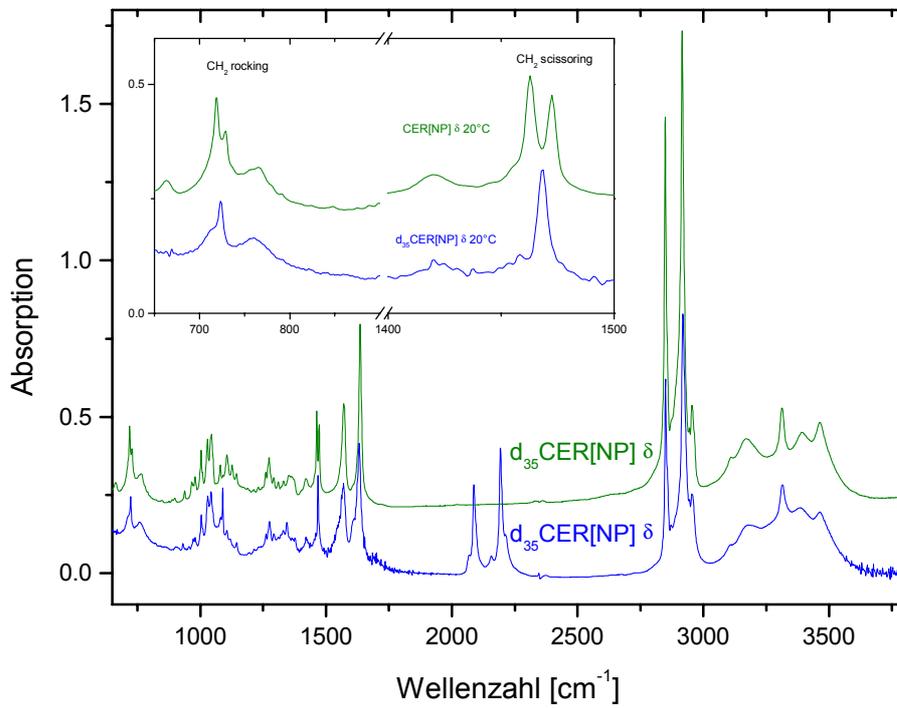


Abb. A 5 FT-IR Spektren (ATR) von d_{35} CER[NP] und CER[NP] in der δ -Phase.

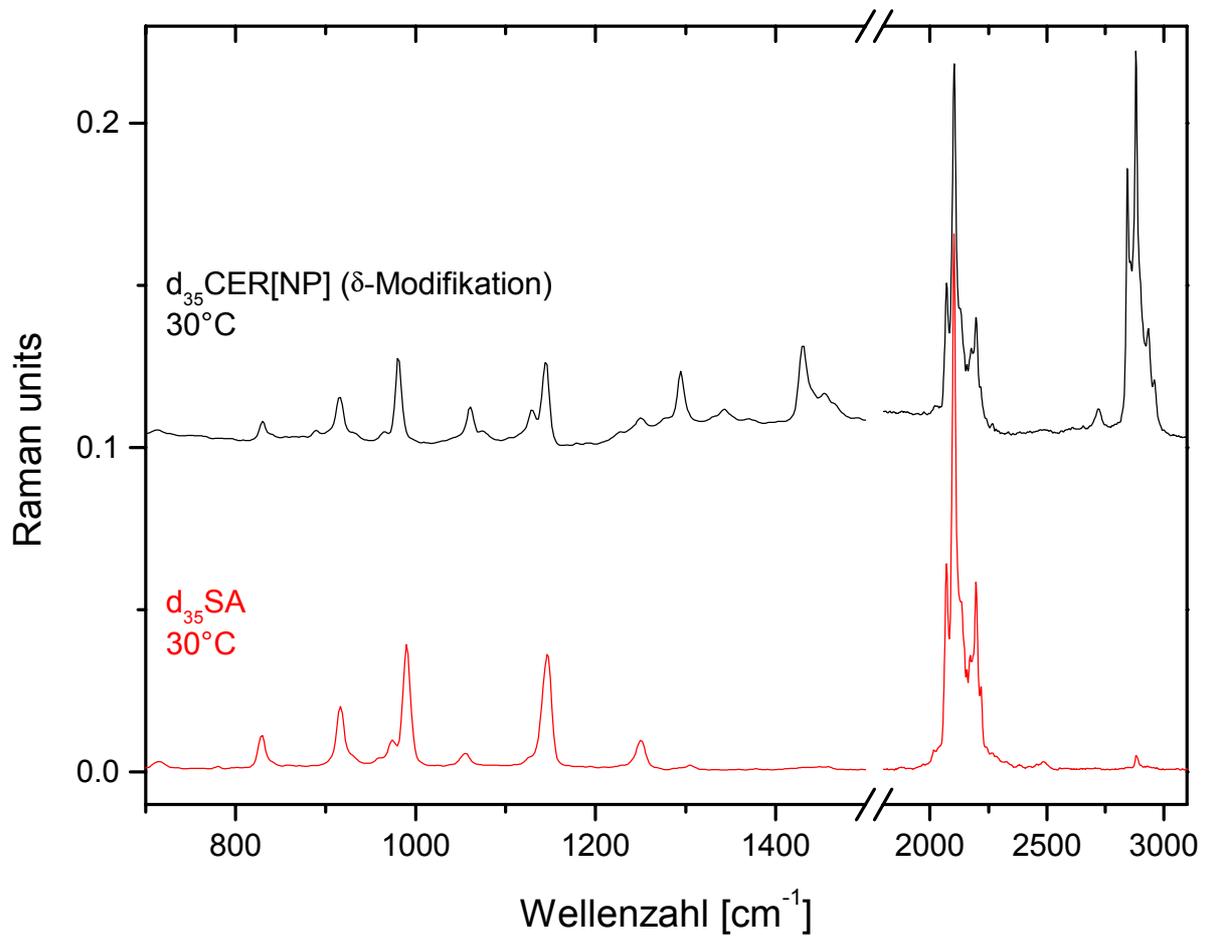
Raman-Spektrum von d_{35} CER[NP]

Abb. A 6 FT-Ramanspektren von d_{35} CER[NP] in der δ -Phase.

Darunter das Spektrum der perdeuterierten Stearinsäure (d_{35} SA).

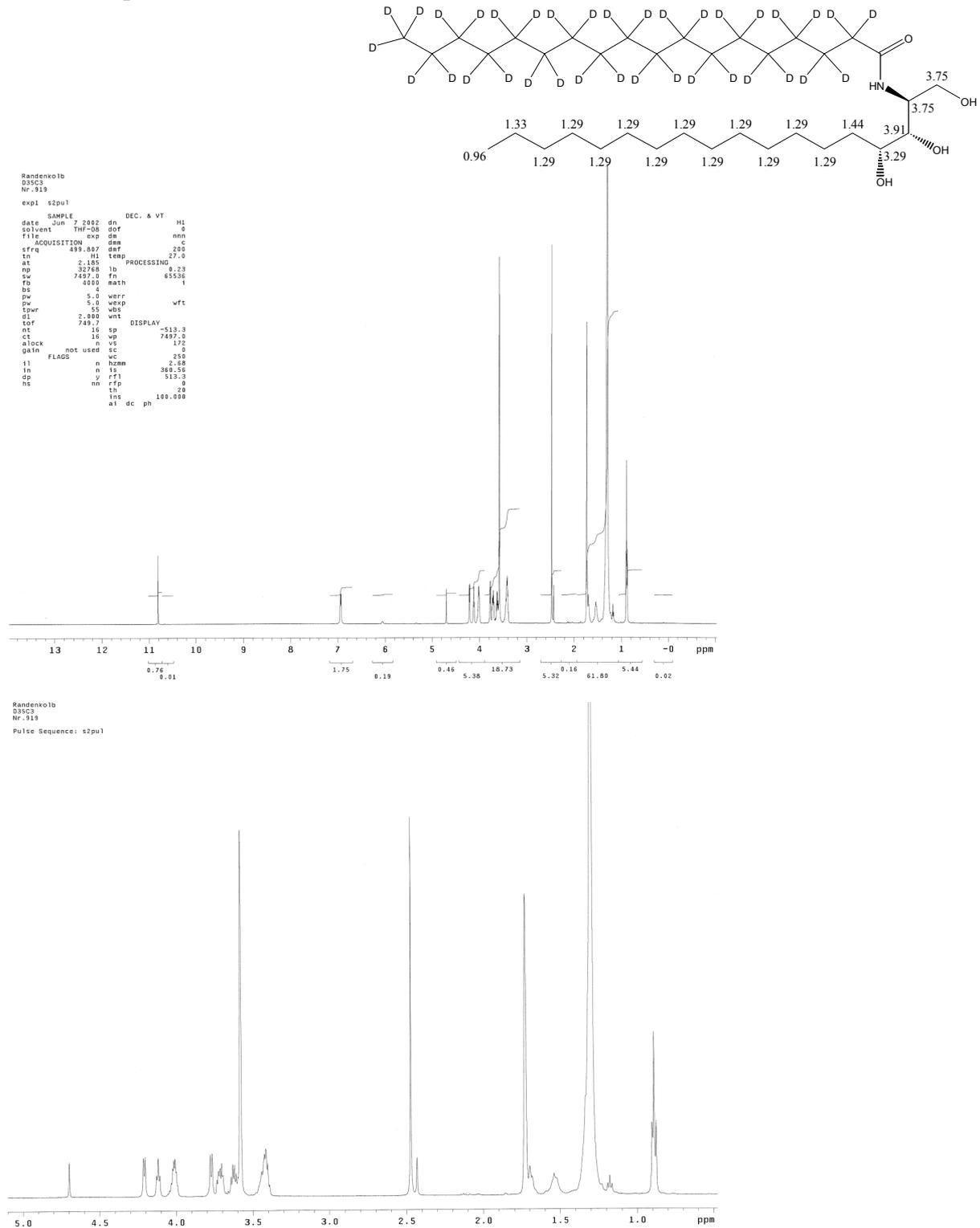
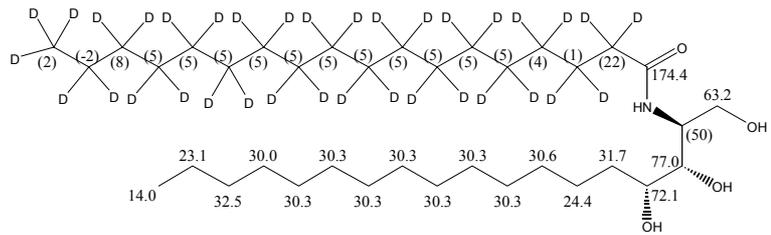
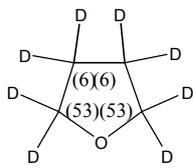
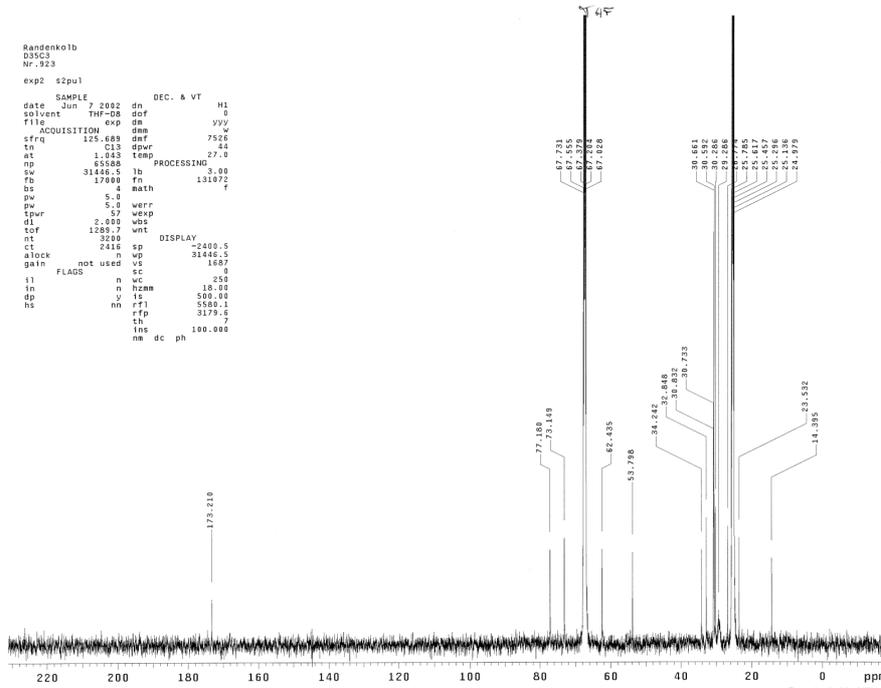
NMR-Spektren von d_{35} CER[NP] H^1 -NMR-Spektren

Abb. A 7 H^1 -NMR Spektren von d_{35} CER[NP] gelöst in d_8 -THF die Kohlenstoffatome der Strukturformel (oben rechts) tragen die mit ChemDraw berechneten chemischen Verschiebungen.

C^{13} -NMR-Spektren (in d_8 -THF)

```

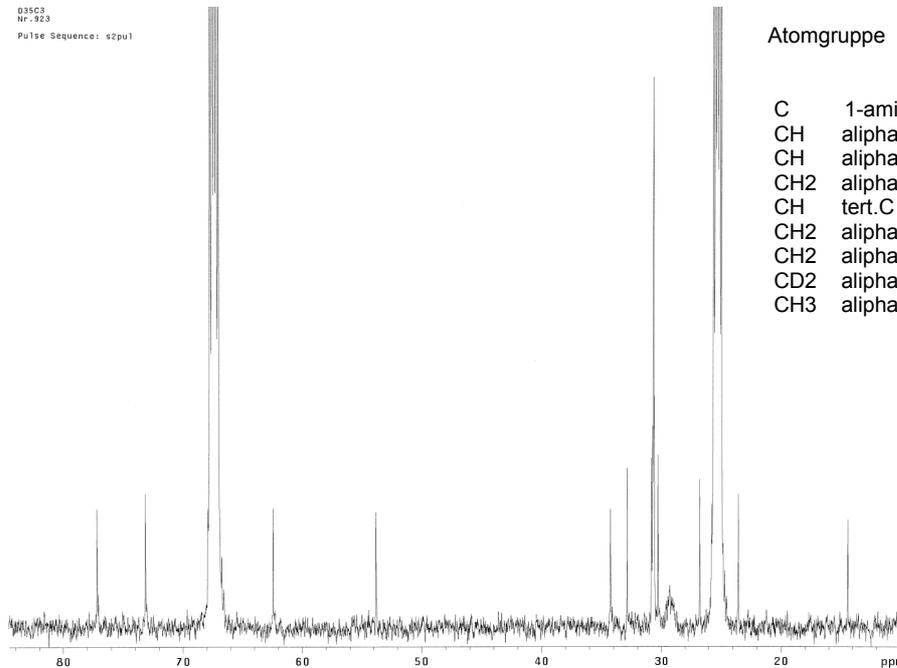
Randenkolb
035C3
Nr.-923
exp2 s2pu1
SAMPLE DEC. & VT H1
date Jun 7 2002 dn
solvent THF-d8 dot 0
file exp dm yyy
ACQUISITION dm
sfrq 125.689 dmf 7526
tn C13 dpuv 24
at 1.043 temp 27.0
np 85588 PROCESSING
sq 31466.5 lb 3.00
fb 17000 fn 131072
bz a match
pw 5.0
tpwr 5.0 werr
dl 2.443 wbt
tof 1289.7 wnt
nt 3280 DISPLAY
ct 2416 sp -2400.5
alock n wp 31466.5
gain not used vs 1687
i1 n wc 250
in n hzcm 18.00
dp v is 500.00
hs mh rft 5000.1
sh rfp 3179.5
ins sh 100.000
na dc ph
  
```



C13 NMR

```

035C3
Nr.-923
Pulse Sequence: s2pu1
  
```



Atomgruppe (Vorhersage)

Messung
(ppm rel. to TMS)

C	1-amide	(174.4)	173.21
CH	aliphatic	(77.0)	77.18 (sec.OH)
CH	aliphatic	(72.1)	73.15 (sec.OH)
CH2	aliphatic	(63.2)	62.44 (prim.OH)
CH	tert.C	(50)	53.80
CH2	aliphatic	(32.5)	34.24-24.99 (x12)
CH2	aliphatic	(23.1)	23.53
CD2	aliphatic	(22)	23.53
CH3	aliphatic	(14.0)	14.40

Abb. A 8 C^{13} -NMR-Spektren von d_{35} CER[NP] gelöst in d_8 -THF die Kohlenstoffatome der Strukturformel (oben rechts) tragen die mit ChemDraw berechneten chemischen Verschiebungen.

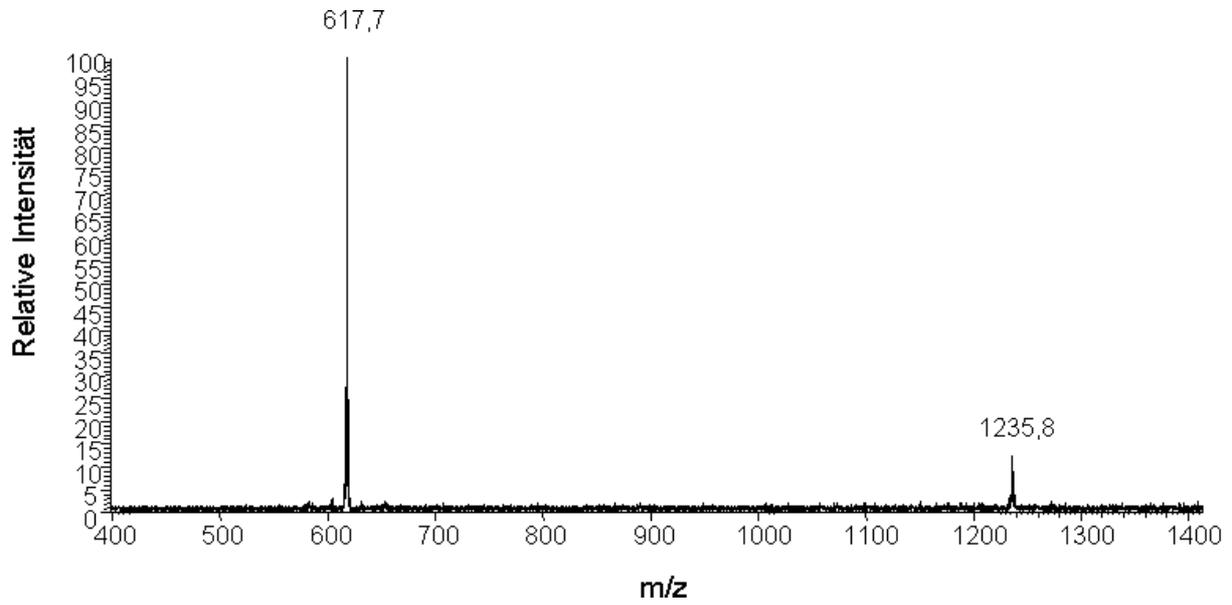
Massen-Spektren von d_{35} CER[NP]

Abb. A 9 Negativ Ionenmodus LCQ-Massenspektrum des d_{35} CER[NP]. 617,7 = $[M-H]^-$; 1235,8 = $[2 M-H]^-$.

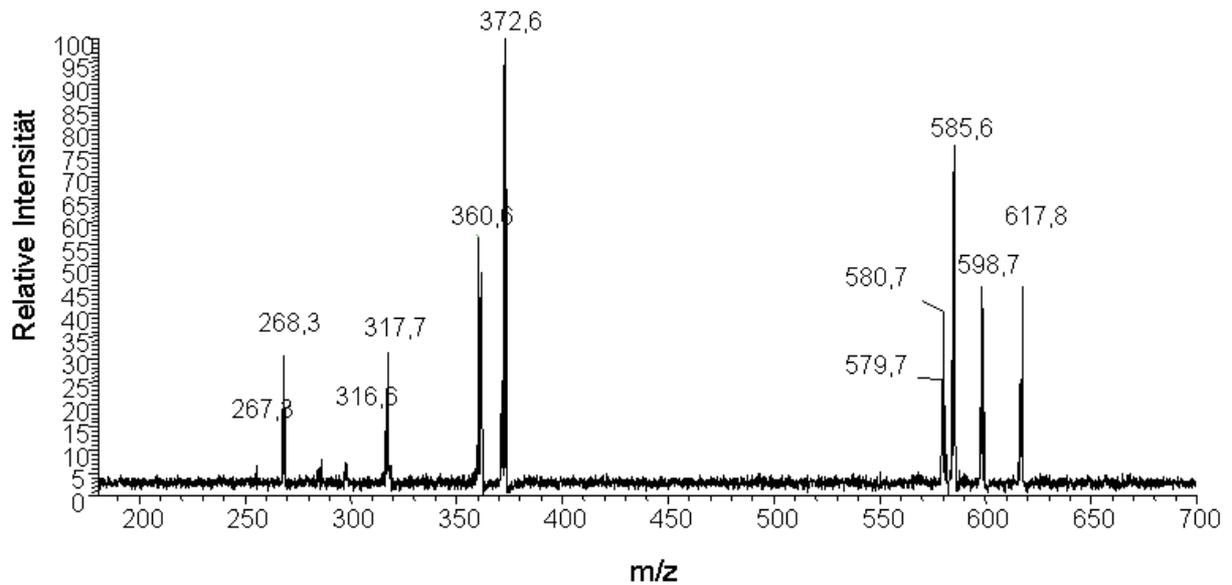


Abb. A 10 Tandem-Massenspektrum des d_{35} CER[NP] im Negativ-Ionen-Modus. Defragmentierung von 617,7.

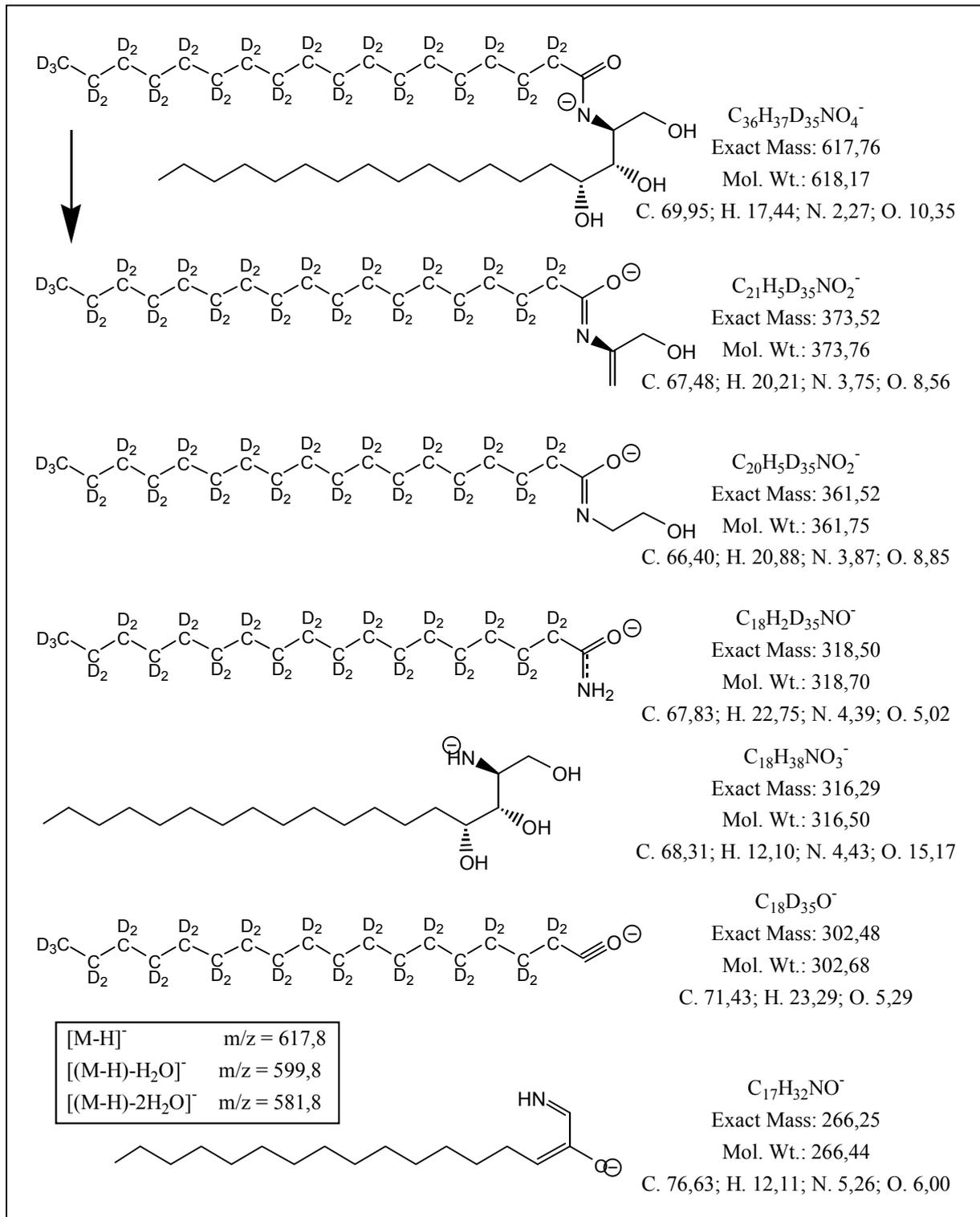
Fragmentierungsmuster von d_{35} CER[NP]

Abb. A 11 Die Interpretation der Massenspektren erfolgte mittels geeigneter Software (ChemDrawUltra) und unter Nutzung von Literaturangaben (Vietzke et al. 2000).

Die Zuordnung der Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) wurde mittels MS^n -Experimenten an d_{35} CER[NP] und an CER[NP] verifiziert.

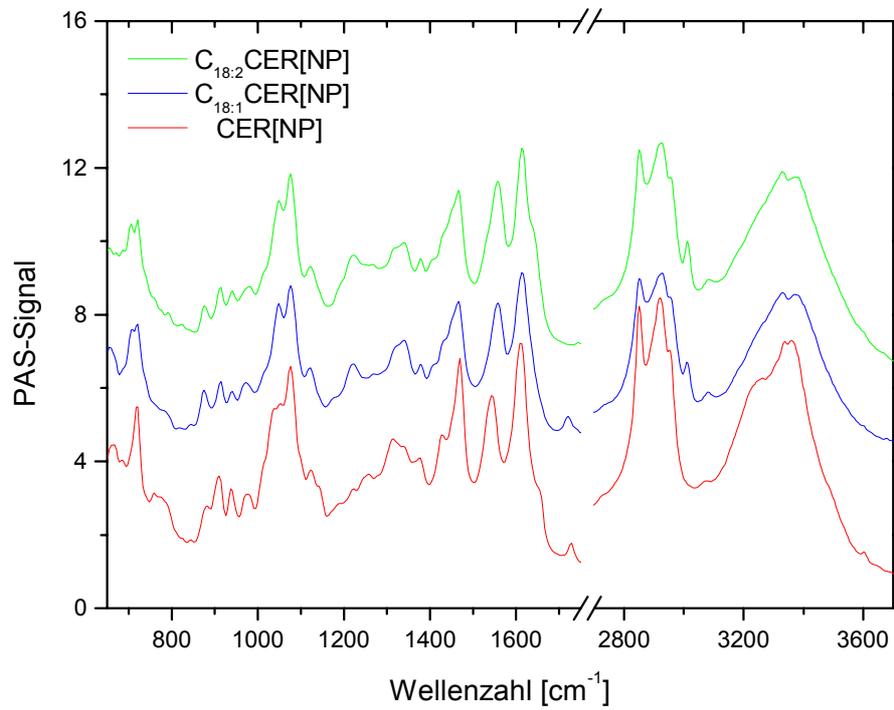
IR-PA-Spektren von $C_{18:1}$ CER[NP] und $C_{18:2}$ CER[NP]

Abb. A 12 FT-IR-PA-Spektren von $C_{18:2}$ CER[NP] (oben) und $C_{18:1}$ CER[NP] (mitte). Zum Vergleich das Spektrum von CER[NP] in der α -Modifikation (unten). Die abgebildeten Spektren wurden mit Step-Scan Technik mit einer Modulationsfrequenz von 45 Hz aufgenommen.

IR-Spektrum von AcylCER[NP]

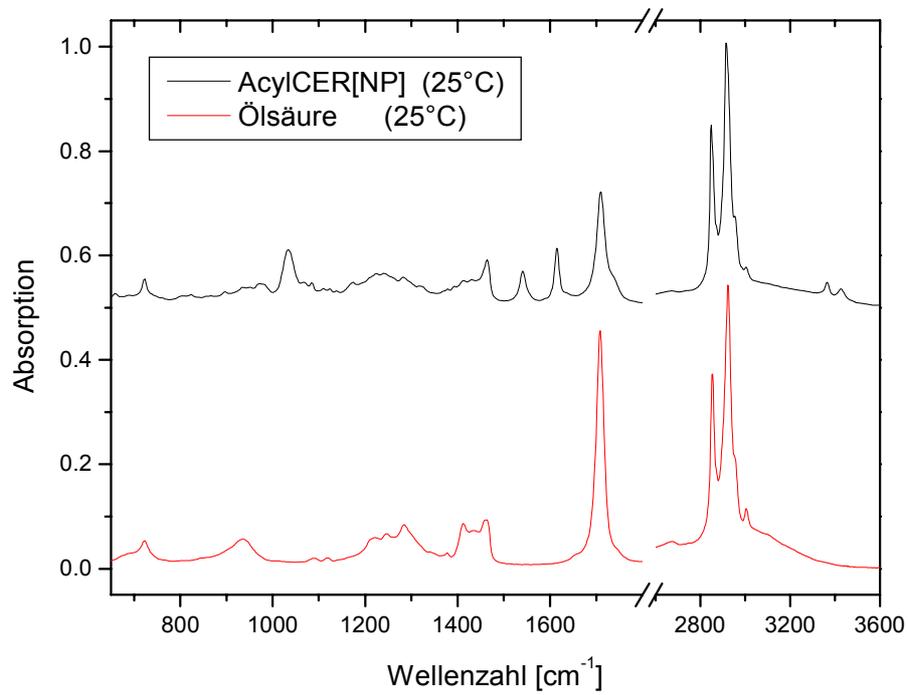


Abb. A 13 FT-IR-Spektrum (ATR) von AcylCER[NP] (oben) nach chromatographischer Abtrennung von CER[NP]. Das Spektrum der Ölsäure wurde als Referenz abgebildet (unten).

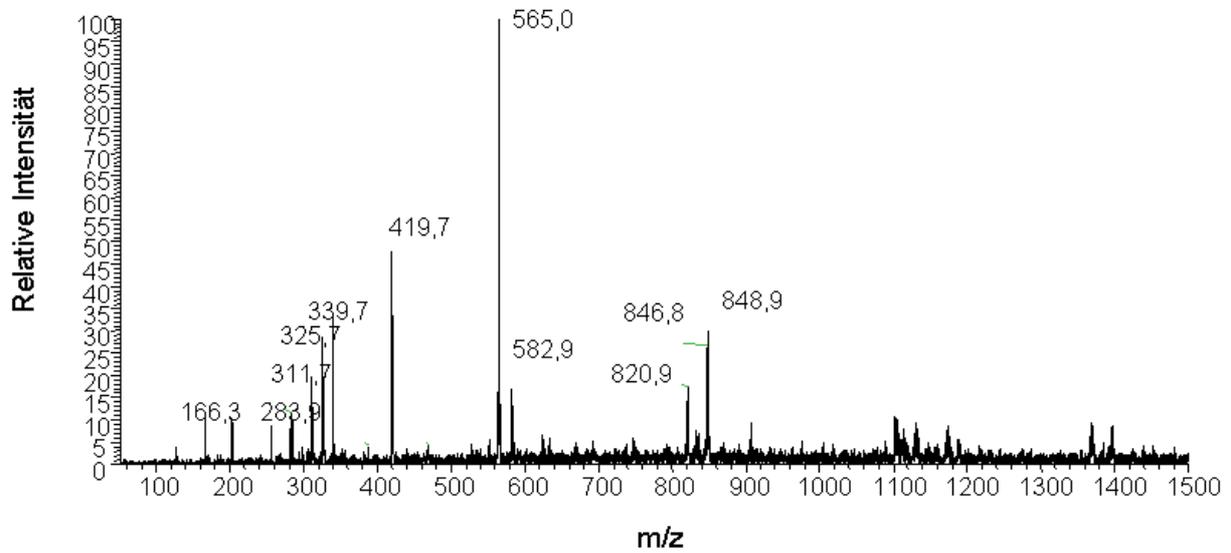
Massen-Spektrum von AcylCER[NP]

Abb. A 14 Negativ Ionenmodus LCQ-Massenspektrum einer thermisch behandelten Mischung aus Ölsäure und CER[NP] nach chromatischer Abtrennung von CER[NP].

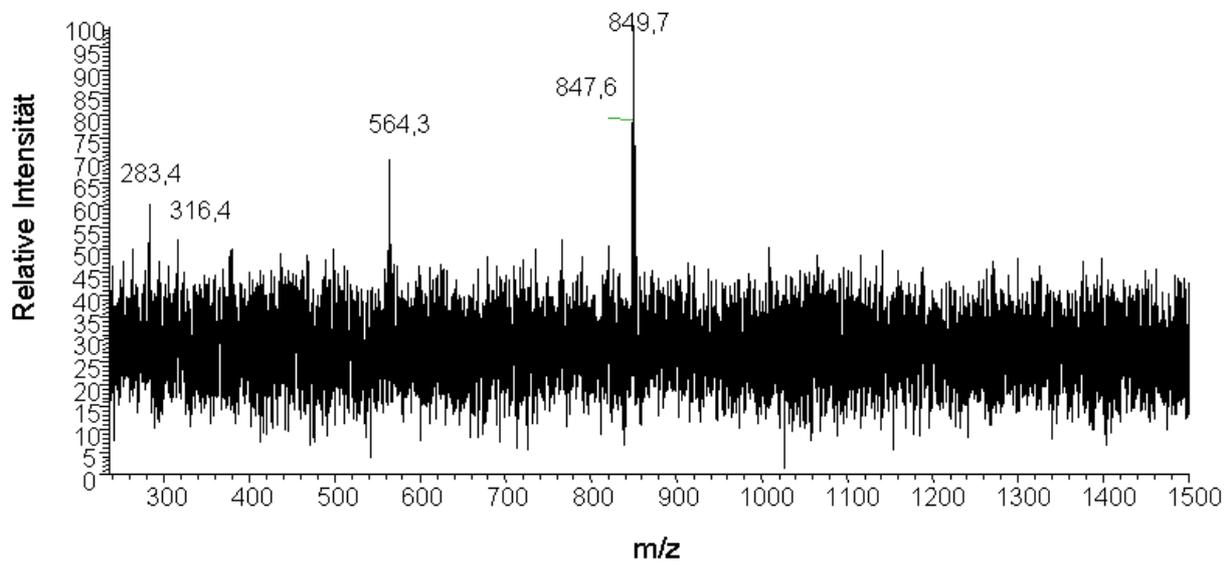


Abb. A 15 Negativ Ionenmodus LCQ-Tandem-Massenspektrum auf das m/z-Signals 548,9.

Malaprade-Spaltung von CER[NP]

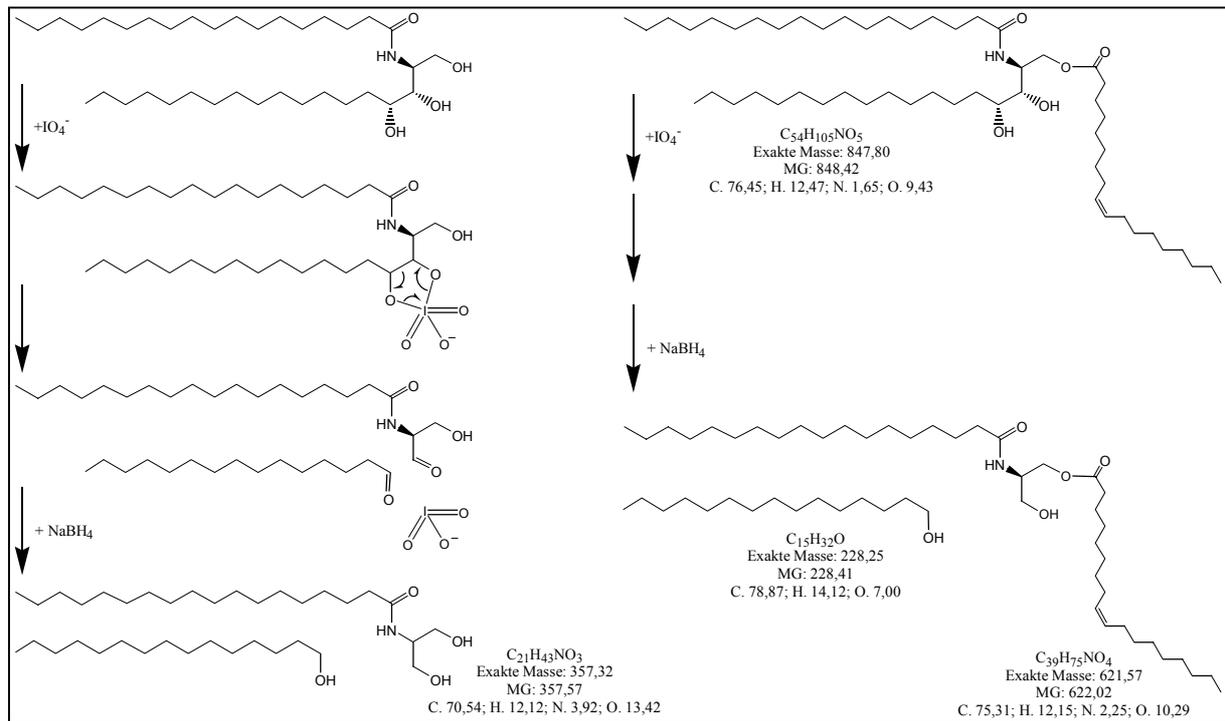


Abb. A 16 Reaktionsmechanismus der *Malaprade*-Spaltung von CER[NP] (links) und von AcylCER[NP] (links).

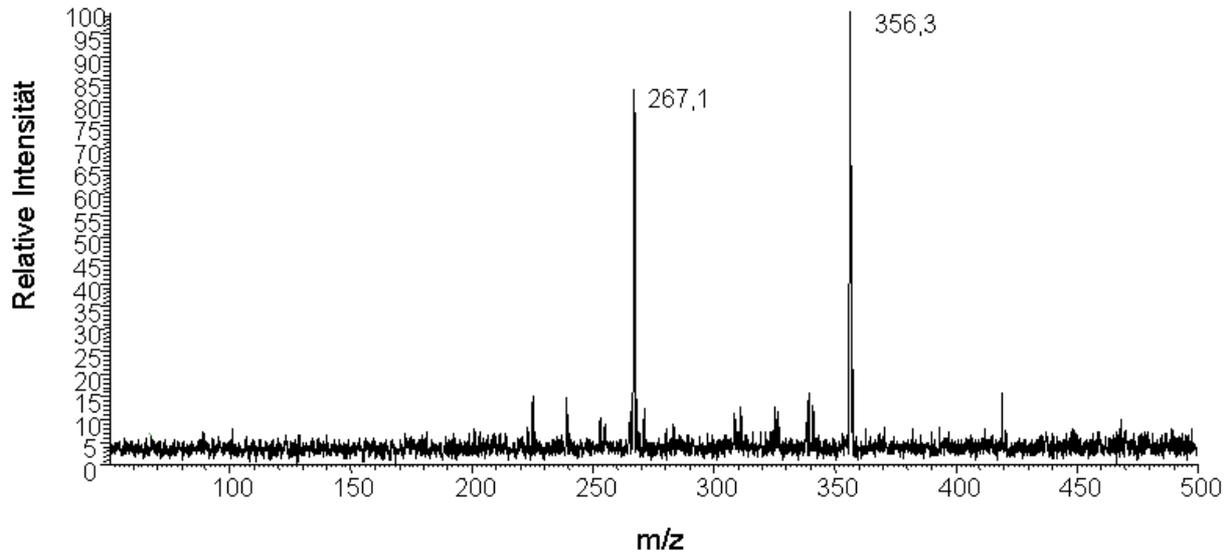


Abb. A 17 Negativ Ionenmodus LCQ-Massenspektrum nach *Malaprade*-Spaltung von CER[NP] und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid (NaBH_4).

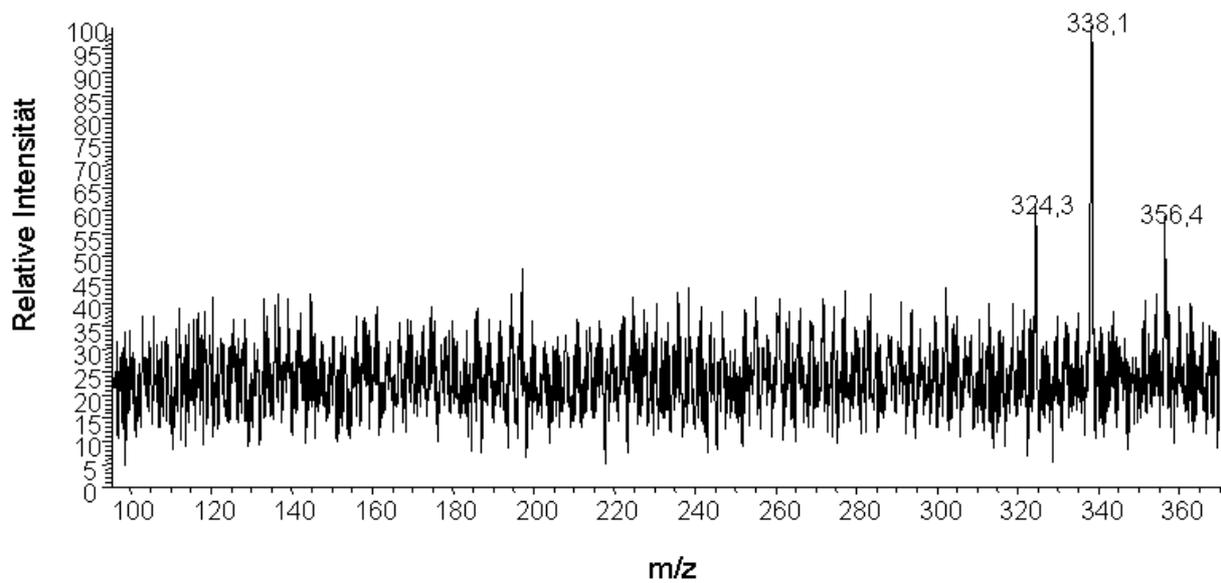
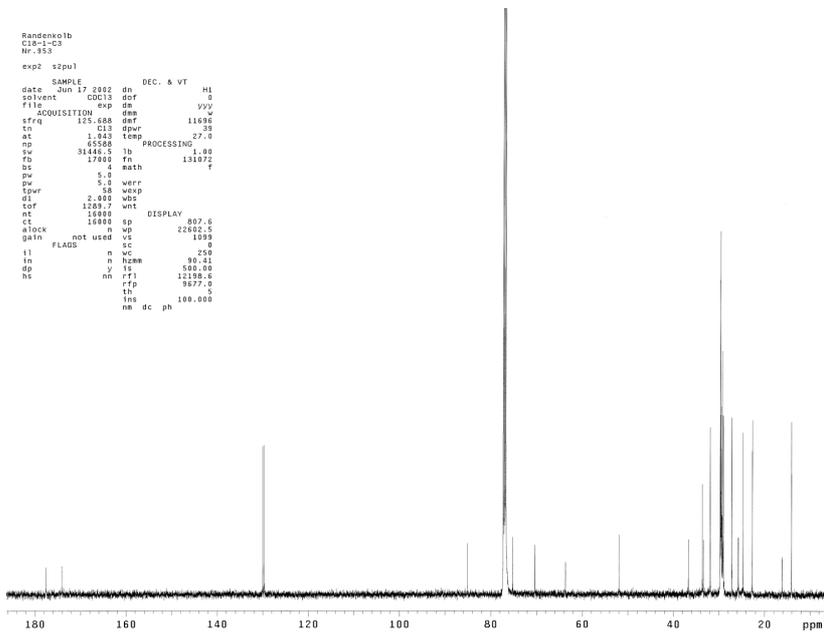
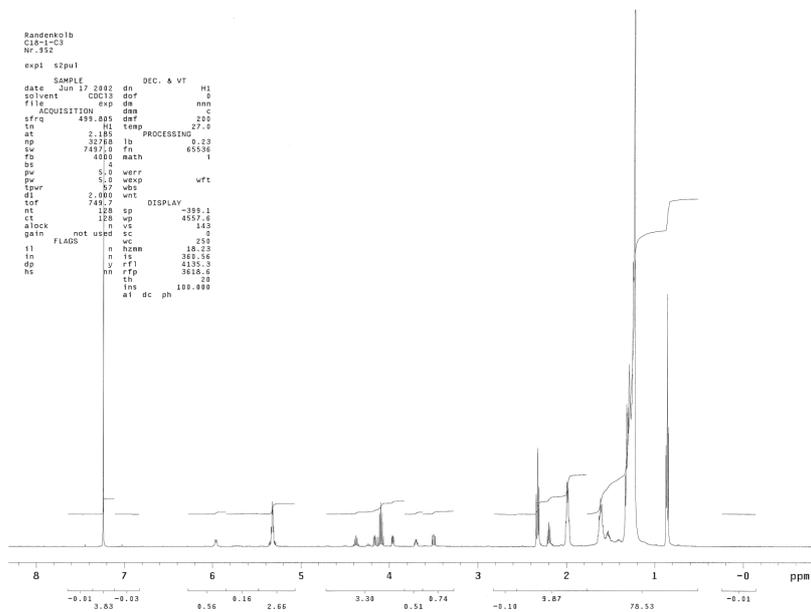


Abb. A 18 Tandem-Massenspektrum (Negativ-Ionen-Modus) nach *Malaprade*-Spaltung von CER[NP] und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid (NaBH_4). Defragmentierung des m/z-Signals 356.

NMR-Spektren von AcylCER[NP]

Abb. A 19 ^{13}C -NMR-Spektrum (in CDCl_3)Abb. A 20 ^1H -NMR-Spektren (in CDCl_3)

AFM

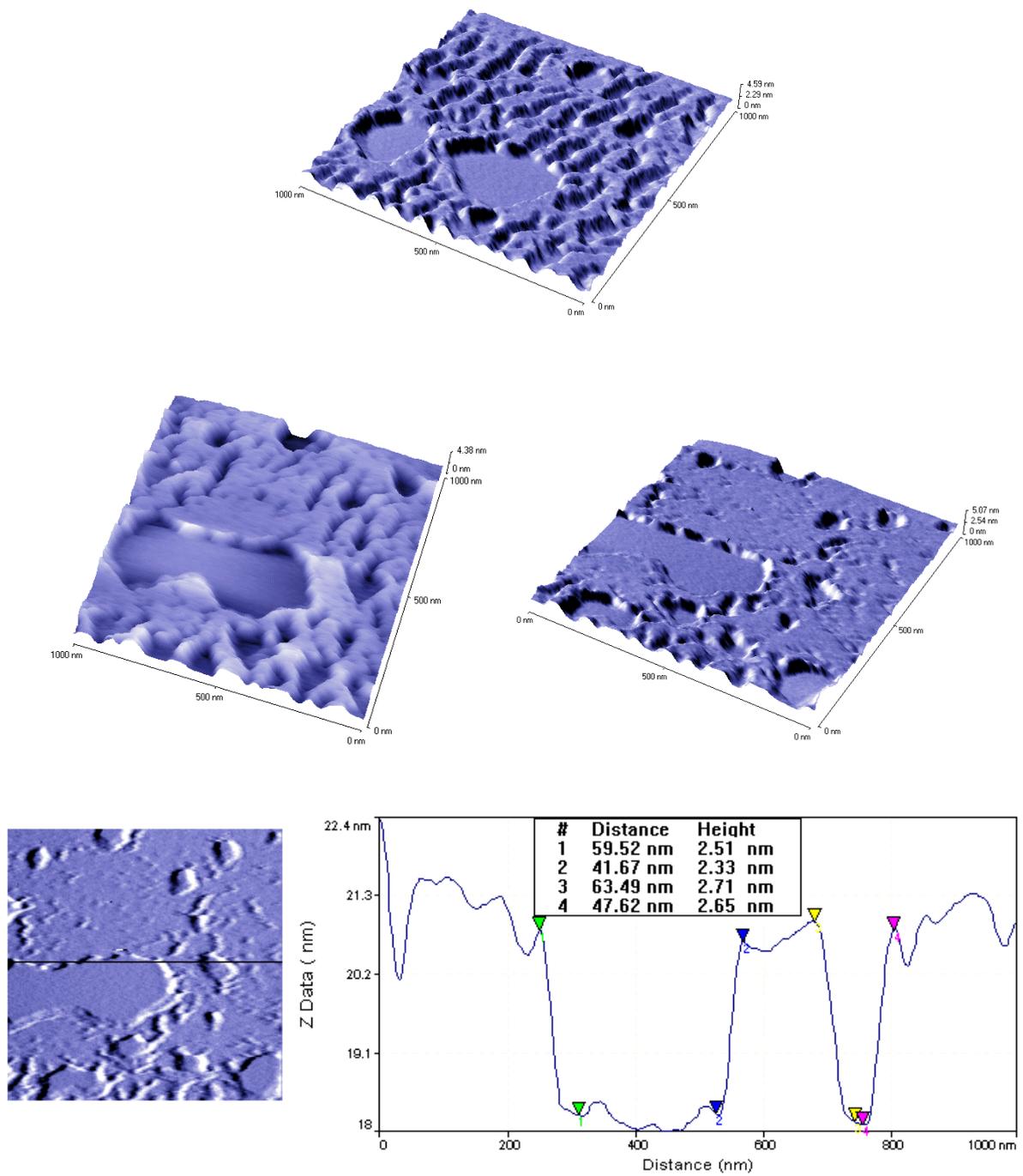


Abb. A 21 AFM-Aufnahmen abgeschiedener Lipidschichten aus einer äquimolaren Mischung von Ölsäure und CER[NP].

Röntgenkonturplots der hydratisierten Glycolipide

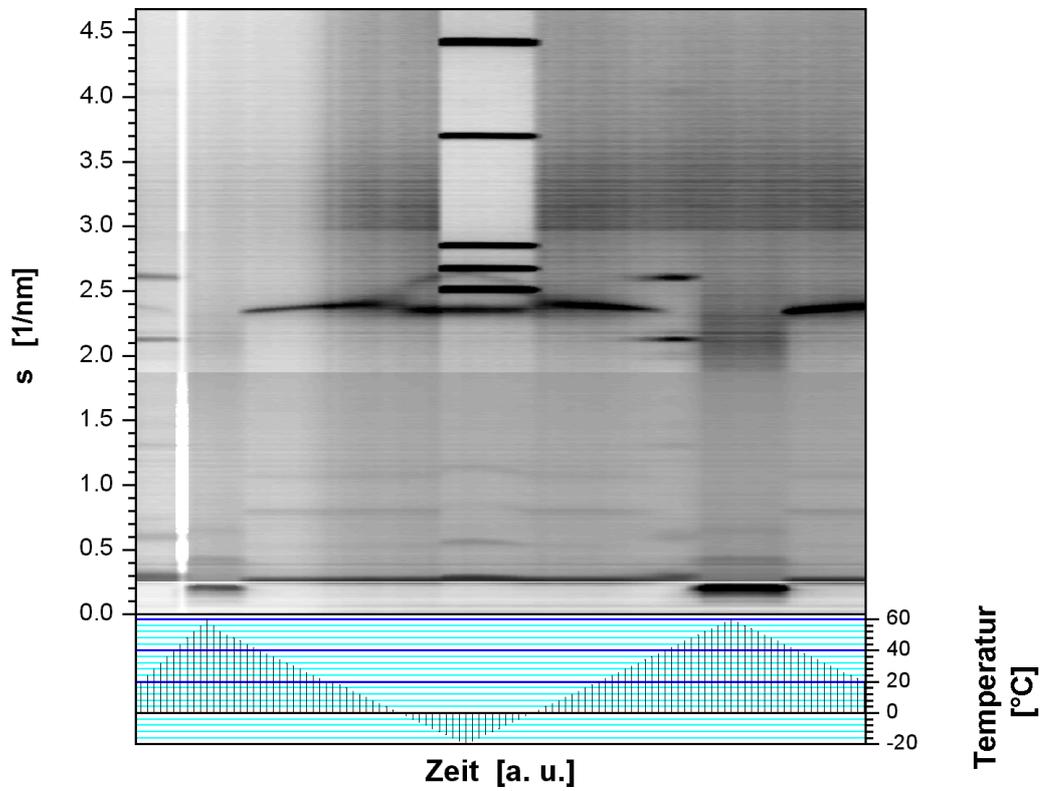


Abb. A 22 Röntgenkonturplot des hydratisierten Gal 16-0 (75 m% PBS).

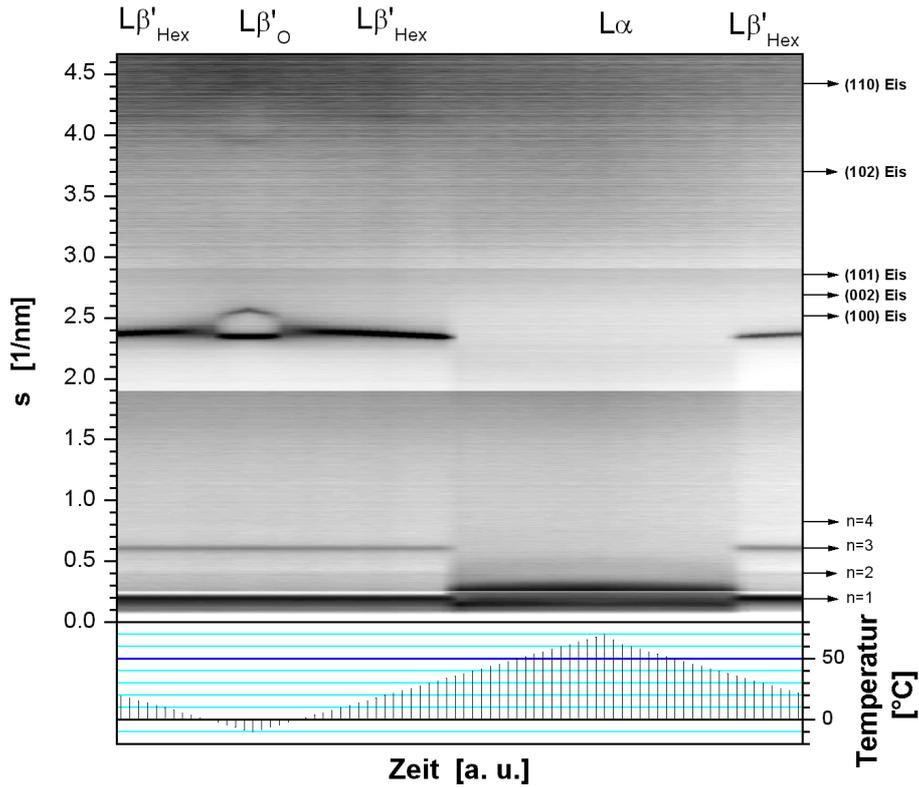


Abb. A 23 Röntgenkonturplot des hydratisierten Gal 16-2 (75 m% PBS).

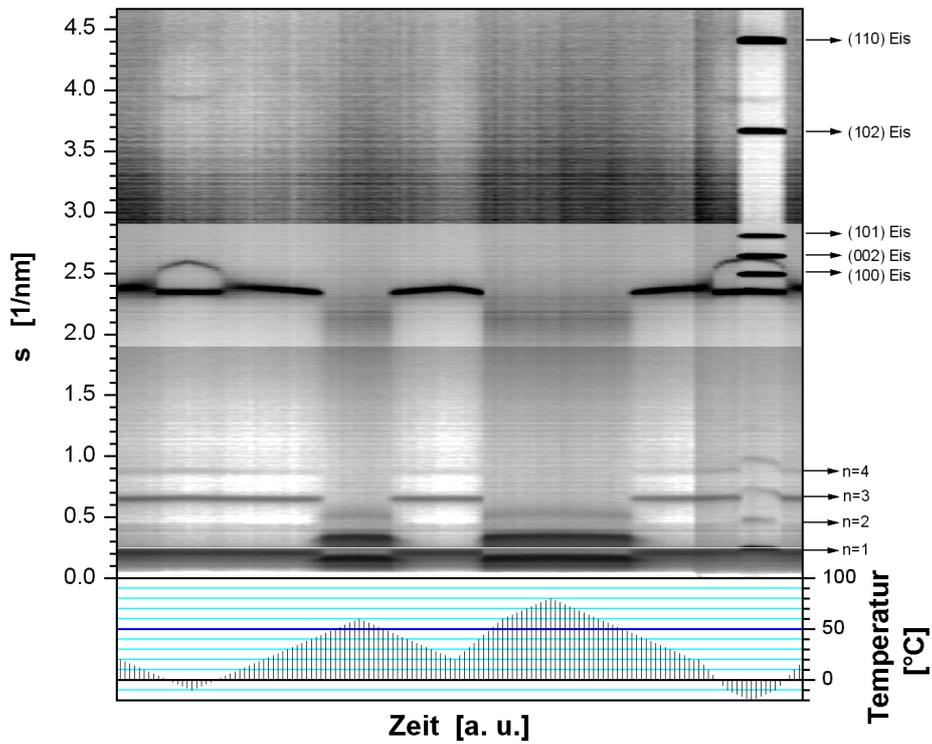


Abb. A 24 Röntgenkonturplot des hydratisierten MS 51 (75 m% PBS).

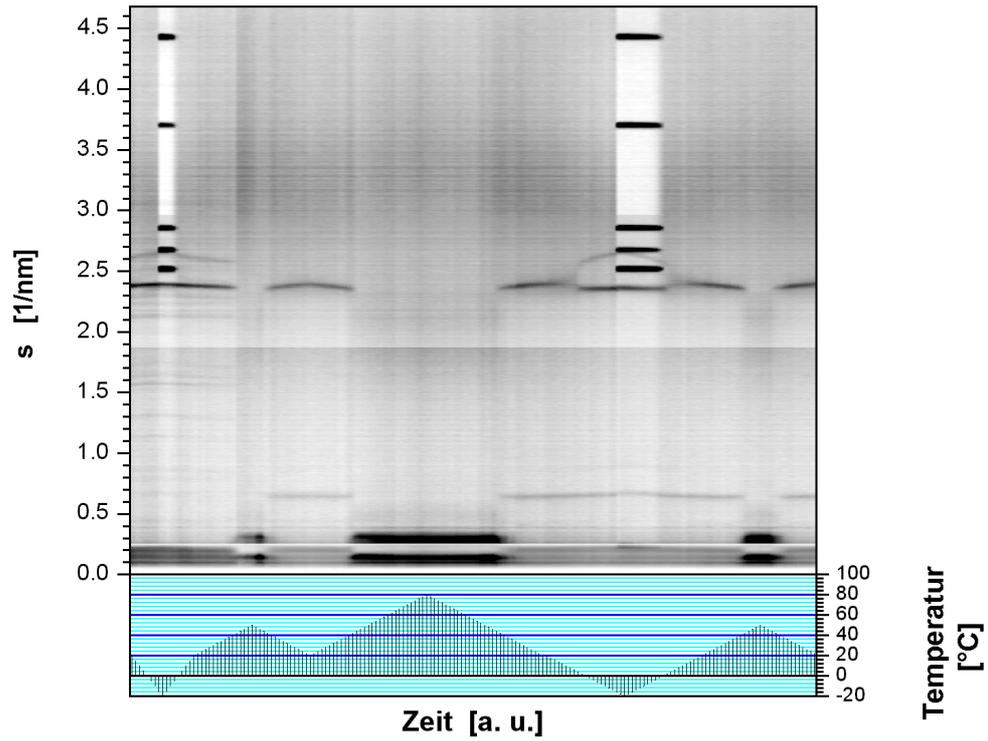


Abb. A 25 Röntgenkonturplot des hydratisierten MS 88 (85 m% PBS).

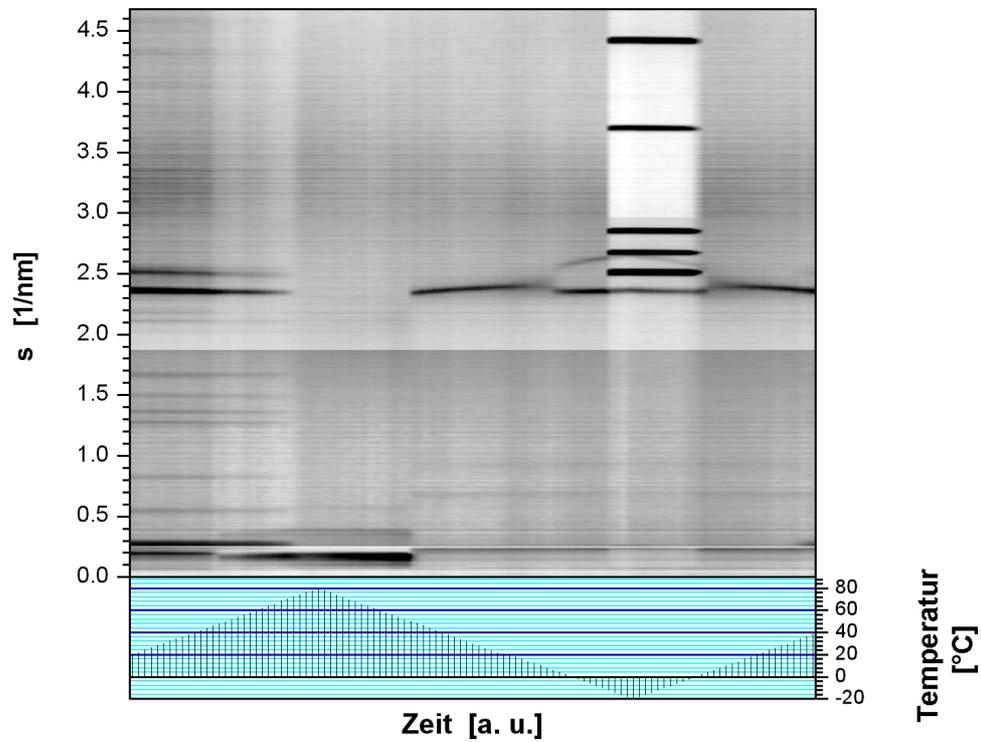


Abb. A 26 Röntgenkonturplot des hydratisierten MS 87 (85 m% PBS).

Übersicht der verwendeten Software

OPUS (Optical User Software)

Programm zur Spektrometersteuerung und Spektrenauswertung.

Betriebssystem: Win2000, OS/2, kommerziell erhältliches Produkt der Fa. Bruker, Ettlingen, Deutschland.

WinXPow

Programm zur Diffraktometersteuerung und Auswertung.

Betriebssystem: WinNT, kommerziell erhältliches Produkt der Fa. STOE & CIE, Darmstadt, Deutschland.

VisXPow

Programm zur Diffraktometersteuerung, Auswertung und Export von Röntgendaten.

Betriebssystem: MSDOS, Kommerziell erhältliches Produkt der Fa. STOE & CIE, Darmstadt, Deutschland.

OTO2ASC

Programm zur Normierung und Export der experimentellen Daten am DESY Hamburg.

ORIGIN

Programm zur Analyse und graphischen Präsentation wissenschaftlicher Daten, Peak Fitting Module.

Betriebssystem Windows 98/NT/2000, Kommerzielles Produkt der Fa. Microcal Software, Inc. Northampton, MA, USA.

Origin-Programm zum Einlesen und Normieren von Röntgendaten im ASCII-Format. Autor: Dirk Wötzel, Dr. G. Förster

Origin-Programm zur Gitter-Berechnung und graphischen Indizierung von Röntgenreflexen nach Vand (1948), Autor: Dr. Günter Förster

Contour plot, Origin-Template zur graphischen Darstellung von Röntgendaten. Autor: Dr. Günter Förster

CS Chem Office

Programmpaket zur Moleküldarstellung, Simulation und Berechnung von

Moleküleigenschaften. (ChemDrawUltra, Chem3DPro) Betriebssystem: Win2000/NT, Kommerziell erhältliches Produkt der CambridgeSoft Corporation, Cambridge, MA, USA.

WebLabViewer Lite

Programm zur Moleküldarstellung und Simulation.

Betriebssystem: Win2000/NT, Freeware, Molecular Simulations Inc. (MSI, Accelrys).

Verzeichnis der Publikationen und Vorträge

Originalarbeiten

1. Neubert,R., Raith,K., Raudenkolb,S., Wartewig,S.; Thermal degradation of ceramides as studied by mass spectrometry and vibrational spectroscopy. Anal. Com. 35 (1998) 161-164
2. Tandon,P., Raudenkolb,S., Neubert,R.H.H., Rettig,W., Wartewig,S.; X-ray diffraction and spectroscopic studies of oleic acid-sodium oleate. Chem. Phys. Lipids 109 (2001) 37-45
3. Raudenkolb,S., Wartewig,S., Neubert,R.H.H.; Polymorphism of Ceramide 3. Part 2: A vibrational spectroscopic and X-Ray powder diffraction investigation of N-Octadecanoylphytyosphingosine and the analogous specifically deuterated d₃₅-derivative. (eingereicht) Chem. Phys. Lipids (2002).
4. Raudenkolb,S., Hübner,W., Rettig,W., Wartewig,S., Neubert,R.H.H., Polymorphism of Ceramide 3. Part 1: An Investigation focused on the Head group of N-Octadecanoylphytyosphingosine. (akzeptiert) Chem. Phys. Lipids (2002)

Kurzpublikationen

1. Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W.; Influence of unsaturated fatty acids on the phase behaviour of ceramide III. Chem. Phys. Lipids 107 (1) (2000) 56-57
2. Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W.; Phase behaviour of stratum corneum lipids. Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 333 (1) (2000) 65
3. Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W., Hauser,A.; Phase behaviour of ceramide III influenced by oleic acid. Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.334 (2) (2001) 80, T62
4. Raudenkolb,S., Wartewig,S.; Wechselwirkungen von Stratum corneum Lipiden. In Neubert,R.H.H.; Dermatopharmazeutisch orientierte Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Biopharmazie am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität. Swiss Pharma 5a (2002) 19-20
5. Raudenkolb,S., Wartewig,S., Neubert,R.H.H., Brezesinski,G.; An investigation on the gel and fluid crystalline phases of ceramide water mixture. (eingereicht) HASYLAB-Report (2002)

Vorträge und Posterpräsentationen

1. Neubert,R., Raudenkolb,S., Rettig,W., Wötzel,D., Wartewig,S.; Differential scanning calorimetry studies on lipids of stratum corneum. 2nd International Conference on Applications of Biocalorimetry (28.-31.03.1999) Halle/Saale, Poster
2. Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W.; Phase behaviour of stratum corneum lipids. 2nd European Graduate Student Meeting (03.-05.03.2000) Frankfurt, Poster & Vortrag
3. Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W.; Phase behaviour of ceramide/acid-soap system. Interactions of Biopolymers with model membranes. International Bunsen Discussion Meeting (26.-29.03.2000) Halle/Saale, Poster
4. Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Rettig,W.; Influence of unsaturated fatty acids on the phase behaviour of ceramide III. 41th International Conference on the Biochemistry of Lipids (13.-16.09.2000) Halle/Saale, Poster
5. Raudenkolb,S.; Molekulare Organisation der Stratum corneum Lipide, Universität Leipzig, FB Physik. Kolloquium „Stratum corneum“ (11.10.2000) Vortrag
6. Raudenkolb,S., Neubert,R., Wartewig,S., Förster,G., Hauser,A.; Phase behaviour of ceramide III influenced by oleic acid. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V. (10.-13.10.2001) Halle/Saale, Poster
7. Raudenkolb,S., Wartewig,S., Hübner,W., Neubert,R.; Polymorphism of ceramide III as studied by vibrational spectroscopy. 4th International Conference on Perspectives in Percutaneous Penetration (02.-06.04.2002) Antibes/Juan-les-Pins, Poster
8. Raudenkolb,S., Wartewig,S., Hübner,W., Neubert,R.; Phase transitions of stratum corneum ceramide studied by X-ray powder diffraction, FT-IR and FT-Raman spectroscopy. 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (08.-11.04.2002) Florenz, Poster
9. Raudenkolb,S.; Neue Mess- und Auswertemethoden zur Aufklärung von Lipid-Polymorphismen. Bayer AG, (10.06.2002) Bitterfeld, Vortrag

Lebenslauf

Name: Steve Raudenkolb
Geburtsdatum: 11.05.1975
Geburtsort: Rodewisch (Vogtl.)

Schulbildung

01.09.1981-28.06.1991 Zehnklassige allgemeinbildende polytechnische Oberschule
„Gotthold Ephraim Lessing“ in Lengenfeld (Vogtl.)
26.08.1991-29.06.1993 Erweiterte Oberschule / Gymnasium
„Johann Wolfgang von Goethe“ in Reichenbach (Vogtl.)
29.06.1993 Abitur

Grundwehrdienst

01.07.1993-30.06.1994 Grundwehrdienst in der Bundeswehr, Schneeberg (Erzgeb.)

Berufsausbildung

01.10.1994-04.09.1998 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität
Halle Wittenberg
05.09.1996 Abschluss des 1. Abschnitts der pharmazeutischen Prüfung
04.09.1998 Abschluss des 2. Abschnitts der pharmazeutischen Prüfung
01.10.1998-31.03.1999 Pharmaziepraktikum an der Martin-Luther-Universität Halle
Wittenberg, Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
01.04.1999-30.09.1999 Pharmaziepraktikum in der Halloren-Apotheke in Halle
04.10.1999 Diplom mit der Note „sehr gut“
13.10.1999 Abschluss des 3. Abschnitts der pharmazeutischen Prüfung
04.11.1999 Erteilung der Approbation

Berufstätigkeit

01.10.1999-30.09.2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-
Universität Halle Wittenberg am Institut für Pharmazeutische
Technologie und Biopharmazie

Sonstiges

01.10.1989-30.06.1993 Mitarbeiter im Bezirksförderklub Chemie
Technische Universität Chemnitz, FB Chemie
Betreuer: Prof. Dr. habil Marx und Dr. G. Treffer

Seit 01.01.2000 Mitglied der Pharmazeutischen Gesellschaft e.V.,
Fachgruppen Pharmazeutische Technologie und
Pharmazeutische Chemie

Seit 01.03.2001 Weiterbildung zum Fachapotheker für pharmazeutische
Analytik

.....

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Reinhard Neubert für die Überlassung des interessanten Themas, die Schaffung guter Arbeitsbedingungen und die gewährten Freiräume bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Siegfried Wartewig danke ich für ständige Diskussionsbereitschaft bei spektroskopischen und physikalischen Problemstellungen und die Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Günter Förster danke ich für konstruktive Diskussionen und die wertvolle Einarbeitung in die Methodik der Röntgenpulverdiffraktometrie. Herrn Dipl. Phys. Dirk Wötzel danke ich für die Überlassung der Röntgendaten des trockenen CER[AS] und des Programms zum Einlesen und Normieren der Röntgendaten.

Bei Herrn Professor Dr. habil. Bodo Dobner und Mitarbeitern bedanke ich mich für die Unterstützung der synthetischen und analytischen Arbeiten.

Herrn Dr. Wigand Hübner danke ich für die konstruktiven Diskussionen bei der Interpretation der IR-spektroskopischen Ergebnisse an CER[NP]. Frau Sigrid Schaller sei für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der IR-Messungen gedankt.

Die Durchführung der Röntgenaufnahmen am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg wurde mir von Herrn Dr. habil. Gerald Brezesinski und Mitarbeitern (Max Planck Institut für Mikrostrukturphysik, Golm) ermöglicht.

Herrn Dr. Anton Hauser danke ich für die AFM-Aufnahmen an den CER[NP]/Ölsäure-Mischungen.

Herrn Dr. Willi Rettig und Frau Mannd (Inst. f. pharmazeut. Chemie) sei für die Durchführung der DSC-Messungen gedankt.

Des Weiteren bedanke ich mich bei all denjenigen, die mich im Verlaufe meiner Promotion unterstützten und am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 (2) b der Promotionsordnung der Fakultät, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

.....
Steve Raudenkolb