

Analytische und Effektor-Studien von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten

DISSERTATION

zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ebru Ateş
aus Heilbronn

Würzburg 2010

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation.

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums.

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Annem..

..Babam

*„Es sind nicht die Erfolge, aus denen man lernt,
es sind die Fiaskos.“*

Gabrielle Boheur Chasnel

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von September 2006 bis Dezember 2009 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des spannenden Themas, für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die wertvollen Hilfestellungen.

Frau Dr. Gabi Korte, Andrea Dreiseitel und Herrn Dr. Sand von der Universität Regensburg möchte ich mich für die Unterstützung bei den Cannabinoid- und PhospholipaseA₂-Versuchen herzlich bedanken.

Herrn Dr. Roland Colditz aus der physikalischen Chemie der Universität Würzburg danke ich für die Überlassung der Gerätschaften zur Durchführung der Leitfähigkeitsmessungen und die fachlichen Diskussionen.

Bei Frau Prof. Dr. Lehmann und ihrem Arbeitskreis bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und wünsche allen weiterhin viel Erfolg an der Universität Würzburg.

Ein besonderer Dank geht an meine Forschungspraktikanten Cindy Uhlschmied, Andrea Seemann, Lukas Schmidt und Eva Hartlieb. Vielen Dank für Euer Engagement und Interesse an meiner Arbeit in die ich dank Euch viele Ideen mit einbeziehen konnte.

Meinen Arbeitskollegen möchte ich für die Zusammenarbeit in der leider kurzen Zeit danken. Besonderer Dank gilt dabei Helena Kroll für die Unterstützung bei der Auswertung der MS-Spektren. Dr. Wolfgang Hümmer gilt mein Dank für die Wartung der HPLC-MS/MS und PC's. Theresia Feuerbach danke ich besonders für die gute Zusammenarbeit im Aromalabor. Für den starken Zusammenhalt in unserem schönen Kellerbüro danke ich Claudia Freitag. Bei Dr. Michael Kempf bedanke ich mich für die Unterstützung bei den GC-MS-Messungen. Und außerdem möchte ich mich bei Iris Hasslauer für mein erstes Weihnachtsfest bedanken.

Herrn Dr. Bernd Reyer danke ich für das große IT-Engagement beim Einzug in den Keller, sodass wir problemlos weiterarbeiten konnten.

Ein ganz lieber Dank geht an die Mannschaft vom technischen Betrieb (Fritz, Thomas, Pierre und Herrn Hub) die uns den Alltag im Keller versüßt hat. Und nochmals vielen Dank für das Aufknacken meiner Tür.

Derya Keskin danke ich ganz besonders für Ihre Freundschaft, dass sie für mich ein Stück Familie in Würzburg ist und natürlich für ihre Geduld beim Korrekturlesen.

Meinen „Abi“ Sanja Locher und Anett Oehme möchte ich für die schöne Zeit, Eure motivierenden Worte, fachliche Diskussionen und Eure Freundschaft ganz herzlich danken. Schön, Euch beide kennengelernt zu haben. Danke!

Meinem Abi danke ich für die charakterliche Stärkung und Unterstützung. Ich danke meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben für ihre endlose Unterstützung, Motivation und Liebe. Danke, dass Ihr immer ganz fest an mich geglaubt habt.

Abkürzungsverzeichnis:

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
Abdh4	α/β -Hydrolase 4
Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
Acyl-CoA	Acyl-CoenzymA
ADP	Adenosindiphosphat
AEA	Anandamid
p-AEA	Phospho-Anandamid
p-R-mAEA	phosphoryliertes R-Methanandamid
2-AG	2-Arachidonoylglycerin
AHA	β -N-Acetylhexosaminidase
AMP	Adenosin-monophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APCI	Atmosphärendruck
APDS3	Aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Basenaustausch-Enzym
BG	Bestimmungsgrenze
br	breites Multiplett
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB	Cannabinoid
CDP-DAG	Cytidindiphosphat-diacylglycerin
CDP-EA	Cytidindiphosphat-Ethanolamin
CE	Kapillarelektrophorese
CI	chemische Ionisierung (Gaschromatographie)
CI	Konfidenzintervall (confidence interval) (Enzymversuche)
CMP	Cytidin 5'-phosphat
CO ₂	Kohlendioxid
CYP	Cytochrom P450
CytC	Cytochrom C
d	Duplett
DAD	Dioden-Array-Detektor
DBD-COCl	4-N-Chloroformylmethyl-N-methylamino-7-N,N-dimethylamino-sulfonyl-2,1,3-benzo-diazol
DCF	Dichlorfluorescein
d _f	Filmdicke der Trennphasen von Kapillartrennsäulen
δ	chemische Verschiebung delta
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Ditihio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
EA	Ethanolamin
EAP	Ethanolaminphosphat
EC	Enzyme Commission
EI	Elektronenstoßionisierung
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Em	Emission
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	und andere (et alii)
eV	Elektronenvolt
Ex	Extinktion
FAAH	Fettsäureamidhydrolase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flammenionisationsdetektor (flame ionization detector)
Fmol	Femtomol
FPD	Flammenphotometrischer Detektor (flame photometric detector)
GC	Gaschromatographie
Gew-%	Gewichtsprozent
GLP	Glycerinphospholipide
GNAPe	Glycerophospho-NAPE
GPCR	G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren
h	Stunde(n)
HexA/B	β -Hexosaminidase A/B
5-HPTE	5-Hydroperoxyeikosatetraenoat
Hz	Hertz
H ₂ DCFDA	2', 7' - Dichlorfluoresceindiacetat
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
I.D.	Innendurchmesser
i. d. R.	in der Regel
JNK	Jun N-terminalen Kinase
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante
K _m	Michaeliskonstante
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LDL	low-density-lipoproteinen
LOX	Lipoxygenase
[M]	Molekularmasse
m	Multipllett (bei NMR)
MAGL	Monoacylglycerolipase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
mg	Milligramm
MO	Mikroorganismen
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekülion
[M-H] ⁺	protoniertes Molekülion
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAE	<i>N</i> -Acyl-Ethanolamin
NAPE	<i>N</i> -Acyl-Phosphatidylethanolamin
NAPE-PLD	NAPE spezifische „Phospholipase-D“
NArPE	<i>N</i> -Arachidonoyl-phosphatidylethanolamin
NDGA	Nordihydroguarensäure
N-isoBOC	N-Isobutoxycarbonyl
nm	Nanometer
NMR	magnetische Kernresonanz (nuclear magnetic resonance)

NP-HPLC	Normalphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography)
NAEAP	<i>N</i> -Acetyl-Ethanolaminphosphat
NACeAP	<i>N</i> -Acyl-Ethanolaminphosphat
NACG	<i>N</i> -Acetyl-L-Glutaminsäure
NACG	<i>N</i> -Acetyl- β -D-glucosamin
NBEAP	<i>N</i> -Benzoyl-Ethanolaminphosphat
NGEA	<i>N</i> -Gluconyl-Ethanolamin
NLEA	<i>N</i> -Lactoyl-Ethanolamin
NLEAP	<i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat
NWG	Nachweisgrenze
OEA	<i>N</i> -Oleylethanolamin
$\bullet\text{O}_2^-$	Superoxidanionenradikal
p. a.	pro analysis
P-EA	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PGE2-G-d5	deutertes Prostaglandin-E2-glycerin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	Orthophosphat
PLA ₂	PhospholipaseA ₂
pNP	p-Nitrophenol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
pNP-NACG	p-Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosamin
PPAR- α	Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren
PSD	Phosphatidylserin-Decarboxylase
P-Ser	Phosphatidylserin
psi	Druckeinheit; 100 psi = 5170 Torr
PSS	Phosphatidylserin-Synthase
PTPN22	Proteintyrosinphosphatase N22
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Reversed Phase-High performance Liquid Chromatography)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (bei NMR)
[S]	Substratkonzentration
SC	Säulenchromatographie
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDC	L-Serin-Decarboxylase
SIM	Single ion modus
SIVA	Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse
SOD	Superoxiddismutase
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SRM	Single reaction monitoring
t	Tonnen
t	Triplet (bei NMR)
Tab.	Tabelle
THC	$\Delta^9(-)$ -Tetrahydrocannabinol
THF	Tetrahydrofuran
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TMSDM	Trimethylsilyldiazomethan
TRPV1	Vanilloid-Rezeptor Typ 1

u	atomare Masseneinheit (unified mass unit)
U	Unit (mmol/mg Protein)
UDP	Uridindiphosphat
UPLC	Ultra-Hochdruck-Flüssigchromatographie
UV	ultravioletter Spektralbereich
[v]	Geschwindigkeit
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
Wf	Wiederfindung
XDH	Xanthin-Dehydrogenase
XOD	Xanthin/Xanthinoxidase
ZNS	Zentralnervensystem
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μS	Mikrosiemens
Λ	Äquivalentleitfähigkeit

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VII
Summary.....	X
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Kenntnisstand.....	3
2.1 N-Acyl-Ethanolaminphosphate	3
2.2 Ethanolamin	3
2.2.1 Biosynthese.....	3
2.2.2 Abbau.....	5
2.3 N-Acylierte Verbindungen - Biosynthese und Funktion	5
2.3.1 Acylierung	5
2.3.2 Coenzym A	6
2.3.3 Acetyl-CoenzymA und Acyl-CoenzymA - Funktion und Wirkung.....	6
2.3.4 N-acylierte Verbindungen.....	7
2.3.4.1 Sphingolipide	7
2.3.4.2 Vorkommen von N-Acylethanolaminen.....	8
2.3.4.2.1 Biosynthese von N-Acylethanolaminen.....	8
2.3.4.2.2 N-Acylethanolamine als Endocannabinoide.....	11
2.3.4.3 (R)-Methyl-anandamid.....	13
2.4 Phosphorylierung.....	13
2.4.1 Themenrelevante phosphorylierte Verbindungen und ihre Wirkungen	14
2.4.1.1 Phosphoryliertes Anandamid und (R)-Methyl-anandamid.....	14
2.4.1.2 N-Lactoyl-Ethanolaminphosphat	15
2.4.1.3 N-Gluconyl-Ethanolaminphosphat	16
2.4.1.4 Ethanolaminphosphat, N-Acetyl- und N-Benzoyl-Ethanolaminphosphat	16
2.5 Analytik.....	17
2.5.1 Analytik von Ethanolaminphosphat (EAP)	17
2.5.2 Analytik von apolaren N-Acyl-Ethanolaminphosphaten.....	19
2.5.2.1 Probenvorbereitung und Aufreinigung	20

2.5.2.2	Trennung und Detektion.....	20
2.5.2.3	Analytik von phosphoryliertem Anandamid (pAEA)	24
2.5.2.4	Polare <i>N</i> -Acyl-Ethanolaminphosphate	24
2.5.2.5	<i>N</i> -Acyl-Ethanolamine.....	25
2.5.2.6	Analytik strukturähnlicher polarer Verbindungen	25
2.5.2.6.1	<i>N</i> -Acetyl-L-glutaminsäure	25
2.6	Enzyme	26
2.6.1	Alkalische Phosphatase	26
2.6.2	Phospholipase _{A2} , Lipoxygenase und Eicosanoide	28
2.6.2.1	Phospholipase _{A2}	28
2.6.2.2	Lipoxygenasen	28
2.6.2.2.1	Biologische Funktion der Lipoxygenase und ihrer Produkte.....	30
2.6.2.3	Eicosanoidbiosynthese und Funktionen der Eicosanoide im Organismus....	30
2.6.2.3.1	Physiologische Bedeutung der Eicosanoide.....	31
2.6.3	Xanthinoxidase.....	32
2.6.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies, physiologische Bedeutung <i>in vivo</i>	34
2.6.3.2	Physiologische Bedeutung der Xanthinoxidase und Harnsäure <i>in vivo</i>	35
2.6.4	β-N-Acetylhexosaminidase	35
2.7	Cannabinoid-Rezeptoren.....	37
2.7.1.1	Aktivierung der CB-Rezeptoren.....	38
2.7.1.2	Liganden der CB ₁ -Rezeptoren	39
2.8	Fermentation.....	41
2.8.1	Herstellung von Japanischem Reiswein – Sake	41
3	Ergebnisse und Diskussion.....	44
3.1	HPLC- ESI_{neg} -MS/MS-Analytik von Ethanolaminphosphat.....	44
3.2	Synthese und Reinigung von <i>N</i>-Acetyl-Ethanolaminphosphat.....	45
3.2.1	Synthese von <i>N</i> -Acetyl-Ethanolaminphosphat.....	45
3.2.2	LC-Reinigung mittels Ionenaustausch	46
3.3	Synthese und Reinigung von <i>N</i>-Benzoyl-Ethanolaminphosphat	46
3.3.1	Methode nach Cherbuliez und Rabinowitz 1956	46
3.3.2	Methode mit Benzoylchlorid und Triethylamin in Tetrahydrofuran	47
3.3.3	Reinigung von <i>N</i> -Benzoyl-Ethanolaminphosphat mittels präparativer HPLC	47

3.3.4	LC-Reinigung mittels Ionenaustausch.....	48
3.3.5	Reinigung von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat mittels Festphasen- extraktion (SPE).....	48
3.3.6	Reinigung von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat mittels SPE-Anionen- tauscherkartuschen.....	49
3.4	Analytik polarer <i>N</i>-Acyl-Ethanolaminphosphate-Methodenentwicklung	50
3.4.1	Derivatisierungstechniken für die Gaschromatographie.....	51
3.4.2	Derivatisierung von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat.....	51
3.4.2.1	Silylierung von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat.....	52
3.4.2.1.1	Identifizierung von Trimethylsilyl- <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	53
3.4.2.1.2	Ermittlung der Nachweisgrenze von Trimethylsilyl- <i>N</i> -Lactoyl-Ethanol- aminphosphat.....	54
3.4.2.2	Sonstige Derivatisierungen von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat.....	54
3.4.3	Flüssigchromatographie von <i>N</i> -Acyl-Ethanolaminphosphaten.....	55
3.4.3.1	Umkehrphasen-Flüssigchromatographie.....	55
3.4.3.2	Hydrophile Interaktions-Chromatographie.....	55
3.4.4	Ionenchromatographie.....	57
3.4.4.1	Analytik von <i>N</i> -Acyl-Ethanolaminphosphaten mittels Ionenchroma- tographie- Leitfähigkeitsdetektion.....	59
3.4.4.1.1	<i>N</i> -Acetyl-Ethanolaminphosphat (2).....	59
3.4.4.1.2	<i>N</i> -Benzoyl-Ethanolaminphosphat (3).....	60
3.4.4.1.3	<i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4).....	60
3.4.5	Extraktionsmethoden zur Isolierung von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4) aus Sake und Rotkohl.....	61
3.4.5.1	Probenvorbereitung.....	61
3.4.5.1.1	Wiederfindung nach LC-Aufarbeitung mittels Anionentauscher.....	61
3.4.5.1.2	Wiederfindung nach Aufarbeitung mittels Anionentauscher- Festphasenkartuschen (SPE).....	62
3.5	Screening von fermentierten Lebensmitteln	64
3.6	Stabilitätsstudien	64
3.6.1	Stabilitätsstudien: <i>N</i> -Acetyl-Ethanolaminphosphat, <i>N</i> -Benzoyl-Ethanol- aminphosphat und <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat.....	65
3.6.2	Stabilitätsstudien <i>N</i> -Acetyl-Ethanolamin und <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolamin.....	66

3.7	Biologische Eigenschaften.....	68
3.7.1	Alkalische Phosphatase	68
3.7.1.1	Bestimmung der Enzymaktivität	68
3.7.1.2	Substrateigenschaften	69
3.7.1.3	Inhibitorische Eigenschaften	69
3.7.2	PhospholipaseA ₂ -Inhibition	72
3.7.3	Lipoxygenase	74
3.7.4	Xanthinoxidase	76
3.7.5	β-N-Acetylhexosaminidase	78
3.7.5.1	Cannabinoid-Rezeptor	78
4	Material und Methoden	80
4.1	Materialien und Chemikalien	80
4.1.1	Chemikalien	80
4.1.2	Untersuchungsmaterial	80
4.1.3	Verbrauchsmaterial	80
4.2	Geräte	82
4.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	82
4.2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	82
4.2.3	Kapillargaschromatographie (HRGC)	83
4.2.4	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)	84
4.2.5	Ionenchromatographie	84
4.2.6	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	85
4.2.7	Sonstige Geräte	85
4.3	Methoden.....	86
4.3.1	Ethanolaminphosphat: Spektroskopische Daten	86
4.3.2	Synthese und Reinigung von <i>N</i> -Acetyl-Ethanolaminphosphat (2)	86
4.3.3	Synthese von <i>N</i> -Benzoyl-Ethanolaminphosphat (3)	88
4.3.3.1	Nach Cherbuliez und Rabinowitz 1956	88
4.3.3.2	Mit Benzoylchlorid und Triethylamin in Tetrahydrofuran	88
4.3.4	Reinigung von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4) mittels Festphasenextraktion (SPE)	89
4.3.5	Derivatisierung von <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4)	90

4.3.5.1	Silylierung.....	90
4.3.5.2	Methylierung.....	90
4.3.5.2.1	MeOH/BF ₃	90
4.3.5.2.2	Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH).....	91
4.3.5.2.3	Trimethylsilyl-diazomethan.....	91
4.3.5.2.4	Diazomethan.....	91
4.3.5.2.5	Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Methanol.....	92
4.3.5.2.6	Dimethylcarbonat (DMC) im Basischen und Sauren.....	92
4.3.5.2.7	Dimethylsulfat (DMS), katalysiert durch Tetrabutylammoniumsulfat (TBAH).....	92
4.3.5.2.8	Methyliodid.....	93
4.3.5.3	Acylierung mit Essigsäureanhydrid.....	93
4.3.5.4	Zweistufensynthese zum Phenyl-diazomethan.....	93
4.3.5.4.1	Phenyl-diazomethan.....	94
4.3.5.5	Benzylbromid.....	94
4.3.6	Flüssigchromatographie.....	94
4.3.6.1	Hydrophile-Interaktions-Chromatographie (HILIC).....	94
4.3.6.2	Ionenchromatographie.....	95
4.3.7	Versuche zur Isolierung von (4) aus Sake, Amasake, Nigorisake und Rotkohl.....	95
4.3.7.1	Isolierung mittels LC-Anionentauschermaterial und Bestimmung der Wiederfindung mittels Ionenchromatographie.....	96
4.3.7.2	Isolierung mittels Festphasenextraktion-Anionentauscherkartuschen und Bestimmung der Wiederfindung mittels Ionenchromatographie.....	97
4.3.8	Stabilitätsuntersuchungen.....	97
4.3.8.1	Stabilitätsuntersuchung phosphorylierter Verbindungen.....	97
4.3.8.2	Stabilitätsuntersuchungen nicht-phosphorylierter Verbindungen.....	98
4.3.9	Alkalische Phosphatase.....	98
4.3.9.1	Bestimmung der Enzymaktivität.....	98
4.3.9.2	Bestimmung der Substrateigenschaften von Ethanolaminphosphat, N-Acyl-Ethanolaminphosphatderivaten und p-Nitrophenylphosphat.....	99
4.3.9.3	Inhibition mit p-Nitrophenylphosphat.....	101
4.3.9.4	Bestimmung des Inhibitionstyps.....	101
4.3.10	Inhibition der Phospholipase A ₂	102
4.3.11	Lipoxygenase-Assay.....	103

4.3.12	Xanthinoxidase-Assay.....	105
4.3.12.1	Versuchsdurchführung: Bestimmung der Aktivität der Xanthinoxidase	107
4.3.12.2	Einfluss von Ethanolaminphosphat und <i>N</i> -Acyl-Ethanolaminphosphaten auf die Xanthinoxidase.....	107
4.3.13	β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase Assay.....	107
4.3.13.1	Aktivitätsbestimmung	107
4.3.13.2	Bestimmung der Wirkung von <i>N</i> -Acyl-Ethanolaminphosphaten auf die β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase	109
4.3.14	Cannabinoid-Rezeptor.....	110
5	Literatur	112
6	Strukturmatrix.....	130
7	Anhang.....	134

Zusammenfassung

Bei *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten handelt es sich um eine bislang wenig untersuchte Klasse polarer Substanzen, deren Erforschung aufgrund ihrer strukturellen Analogie zu apolaren, physiologisch wirksamen *N*-Acyl-Ethanolaminen von Interesse ist. Zu bearbeiten waren analytische Fragestellungen, die auch synthetische Aufgaben beinhalteten, wie Methodenentwicklung und Versuche zur Erfassung von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten in ausgewählten Lebensmitteln sowie strukturelle Studien zur „Bioaktivität“ der Verbindungen. Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es demzufolge, eine geeignete Methode für deren qualitative und quantitative Analytik zu entwickeln. Gleichzeitig wurden ausgewählte *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate synthetisiert.

Aufgrund des literaturbekannten Vorkommens von *N*-Acyl-Ethanolaminen in Wein wurden für die Lebensmitteluntersuchungen fermentierte Produkte, d.h. drei verschiedene Sake (Japanischer Reiswein) und ein fermentierter Rotkohl verwendet. Parallel zu diesen Untersuchungen erfolgten auch Studien zur Stabilität der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate.

Versuchsreihen zur Überprüfung potentieller „Bioaktivität“ umfassten Studien mit alkalischer Phosphatase, Phospholipase_{A2}, Lipoxygenase, Xanthinoxidase, β -N-Acetylhexosaminidase und dem Cannabinoidrezeptor-1.

Es lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

- Es erfolgten die Synthesen von *N*-Acetyl- und *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat; das uns verfügbare, verunreinigte *N*-Lactoyl-Derivat wurde gereinigt und wie die Synthese-Produkte spektroskopisch charakterisiert.
- Es gelang letzteres, als Trimethylsilyl-Derivat mit MSTFA zu derivatisieren und anschließend per GC-MS zu bestimmen.
- Die Trennung von *N*-Acetyl-, *N*-Benzoyl- und *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat sowie Ethanolaminphosphat war mittels HPLC an einer HILIC-Säule möglich. Die Detektion erfolgte massenspektrometrisch.
- Mit Hilfe der Ionenchromatographie (Leitfähigkeitsdetektion) ließen sich *N*-Acetyl- und *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat ohne vorherige Derivatisierung direkt analysieren. Mit einer Nachweisgrenze von 1.3 mg/L war diese Technik den vorgenannten Methoden im Hinblick auf die Empfindlichkeit weitaus überlegen.

- Die *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate erwiesen sich als sehr stabile Verbindungen. Für das *N*-Lactoyl-Derivat wurde eine auf Ionenaustauschchromatographie basierende Probenaufarbeitung für Lebensmittel entwickelt. Ein positiver Nachweis in den genannten Lebensmitteln gelang nicht.
- Tab. 1 gibt ein Überblick über die Ergebnisse der Enzymversuche und des Cannabinoidrezeptor-1 Kompetitionsversuchs.

Tab. 1 Zusammenfassung der Enzymversuche und kompetitiven Rezeptor-Bindungsstudie

	EAP	NAEAP	NBEAP	NLEAP
AP	Km: 1.9 ± 0.3 mM Vmax 0.02 IC50: $3.3 \text{ mM} \pm 0.1$ unkompetitiver Inhibitor	Km: 2.2 ± 0.5 mM Vmax 0.08 IC50: 4.2 ± 0.3 mM unkompetitiver Inhibitor	Km: 1.1 ± 0.2 mM Vmax 0.04 IC50: 5.9 ± 0.3 mM unkompetitiver Inhibitor	Km: 1.4 ± 0.2 mM Vmax 0.02 IC50: 5.8 ± 0.2 mM unkompetitiver Inhibitor
PLA₂	-	EC 50 Wert: 140 μ M (max. Hemmung 78 %)	EC 50 Wert: 136 μ M (max. Hemmung 63 %)	-
LOX	-	IC 50 Wert: 328 μ M (CI: 278-387 μ M)	IC 50 Wert: 394 μ M (CI: 350-445 μ M)	-
XOD	-	-	-	-
β-N-AcHex	-	-	-	-
CB1	Keine Konkurrenz mit ³ H-CP55940	Keine Konkurrenz mit ³ H-CP55940	Keine Konkurrenz mit ³ H-CP55940	Keine Konkurrenz mit ³ H-CP55940

AP, alkalische Phosphatase; PLA₂, Phospholipase A₂; LOX, Lipoxygenase; XOD, Xanthinoxidase; β -N-AcHex, β -N-Acetyl-Hexosaminidase; CB1, Cannabinoid Rezeptor 1; EAP, Ethanolaminphosphat; NAEAP, *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat; NBEAP, *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat; NLEAP, *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat.

- Die untersuchten *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate wurden von der alkalischen Phosphatase als Substrate erkannt. In Gegenwart von *p*-Nitrophenylphosphat zeigten alle Verbindungen unkompetitive Eigenschaften.
- Sowohl im PhospholipaseA₂- als auch im Lipoxygenase-Versuch erwiesen sich *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat und *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat als Inhibitoren.
- Die untersuchten *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate einschließlich Ethanolaminphosphat zeigten weder einen Effekt auf die Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidase, noch wirkten sie als Superoxidanionenfänger im Xanthinoxidase-Assay.

- In keinem Fall war eine kompetitive Eigenschaft am Cannabinoidrezeptor-1 feststellbar. Dies dürfte auf die hohe Polarität der Verbindungen zurückzuführen sein.

Summary

N-acyl-ethanolaminphosphates are a group of polar compounds that have rarely been studied as yet and whose investigation is attractive due to their structural analogy to nonpolar physiologically active *N*-acyl-ethanolamines. Main targets of this work comprised the synthesis of *N*-acyl-ethanolaminphosphates, elaboration of analytical methods to detect them in selected food samples and to perform effector studies.

Hence, the first goal was to establish a suitable method for the qualitative and quantitative analysis of *N*-acyl-ethanolaminphosphates. At the same time, the synthesis of selected compounds was performed.

Based on the published occurrence of *N*-acyl-ethanolamines in wine, selected fermented foods were chosen for the food screening, i.e. three samples of sake (Japanese rice wine) and one sample of fermented red cabbage. In addition, stability tests of *N*-acyl-ethanolaminphosphates were carried out.

The “bioactivity” potential of *N*-acyl-ethanolaminphosphates was checked by using alkaline phosphatase, phospholipaseA₂, lipoxygenase, xanthinoxidase, β-N-acetylhexos-aminidase and the cannabinoid receptor-1.

Following results can be summarized:

- The syntheses of *N*-acetyl- and *N*-benzoyl-ethanolaminphosphate were performed and the substances characterized; the *N*-lactoylderivate was already available in the laboratory, it was purified and also spectroscopically characterized.
- *N*-lactoyl-ethanolaminphosphate was derivatized with MSTFA and analyzed by GC-MS.
- The separation of *N*-acetyl-, *N*-benzoyl- und *N*-lactoyl-ethanolaminphosphate as well as ethanolaminphosphate was achieved by using HPLC with an HILIC-column, followed by mass spectrometric detection.
- Direct analysis without any derivatization of *N*-acetyl- and *N*-lactoyl-ethanolaminphosphate was achieved by ion chromatography (conductivity detection). With a limit of detection of 1.3 mg/L this method was much more sensitive than the GC-MS- and HPLC-MS methods.
- *N*-acyl-ethanolaminphosphates were found to be very stable compounds. Sample preparation of the *N*-lactoyl-derivate was successfully achieved by ion exchange

chromatography, but the targeted compound was not detected in any of the fermented foods under study.

- The results of the enzyme tests and the competitive studies with the cannabinoid receptor-1 are summarized in table 1:

Tab. 1 Summary of results achieved by enzyme tests and competitive binding assay studies

	EAP	NAEAP	NBEAP	NLEAP
AP	Km: 1.9 ± 0.3 mM Vmax 0.02 IC50: 3.3 mM \pm 0.1 uncompetitive inhibitor	Km: 2.2 ± 0.5 mM Vmax 0.08 IC50: 4.2 ± 0.3 mM uncompetitive inhibitor	Km: 1.1 ± 0.2 mM Vmax 0.04 IC50: 5.9 ± 0.3 mM uncompetitive inhibitor	Km: 1.4 ± 0.2 mM Vmax 0.02 IC50: 5.8 ± 0.2 mM uncompetitive Inhibitor
PLA₂	-	EC 50 value: 140 μ M (max. inhibition 78 %)	EC 50 value: 136 μ M (max. inhibition 63 %)	-
LOX	-	IC 50 value: 328 μ M (CI: 278-387 μ M)	IC 50 value: 394 μ M (CI: 350-445 μ M)	-
XOD	-	-	-	-
β-N-AcHex	-	-	-	-
CB1	no competition with 3 H-CP55940	no competition with 3 H-CP55940	no competition with 3 H-CP55940	no competition with 3 H-CP55940

AP, alkaline phosphatase; PLA₂, phospholipase A₂; LOX, lipoxygenase; XOD, xanthinoxidase; β -N-AcHex, β -N-acetylhexosaminidase; CB1, cannabinoid receptor 1; EAP, ethanolaminphosphate; NAEAP, *N*-acetyl-ethanolaminphosphate; NBEAP, *N*-benzoyl-ethanolaminphosphate; NLEAP, *N*-lactoyl-ethanolaminphosphate.

- The tested *N*-acyl-ethanolaminphosphates were recognized as substrates by alkaline phosphatase. In the presence of *p*-nitrophenyl phosphate, all compounds showed uncompetitive inhibition.
- *N*-acetyl-ethanolaminphosphate and *N*-benzoyl-ethanolaminphosphate were found to be inhibitors of phospholipaseA₂ and lipoxygenase.
- *N*-acyl-ethanolaminphosphates and ethanolaminphosphate did not exhibit any influence on the activity of β -N-acetylhexosaminidase or xanthinoxidase.
- The target compounds did not show competitive properties to the cannabinoid receptor-1. The high polarity of the substances might be the reason for this lack of activity.

1 Einleitung und Zielsetzung

Das Interesse an *N*-Acyl-Ethanolaminen und deren Derivaten steht im engen Zusammenhang mit der Entdeckung der Cannabinoid-Rezeptoren (CB-Rezeptoren) (Devane et al., 1988). Anandamid, das Ethanolamin-Derivat der Arachidonsäure, wurde als erster Vertreter der Stoffklasse als Endocannabinoid im Schweinegehirn entdeckt (Devane et al., 1992). Mittlerweile weiß man, dass neben Anandamid weitere *N*-Acyl-Ethanolamin-Derivate in Geweben vorkommen, die sowohl Affinität zu den beiden bekannten CB-Rezeptoren aufweisen, als auch gar keine. Weitere Eigenschaften dieser apolaren *N*-Acyl-Ethanolamine sind unter anderem die Aktivierung der Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptoren (PPAR- α) oder auch die Wirkung als Agonist des Vanilloid-Rezeptor Typs 1 (TRPV1) (Thabuis et al., 2008).

Anandamid und seine Strukturanaloga besitzen einen Festtsäurerest und sind dadurch apolare *N*-Acyl-Ethanolamine, die von polaren Vertretern zu unterscheiden sind. Als polares Analogon von Anandamid z.B. beschrieben Wissenschaftler die Synthese von phosphoryliertem Anandamid, welches als wasserlösliches Prodrug Anwendung finden kann (Juntunen et al., 2003).

Die Synthese von polaren *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten wurde bereits vor der Entdeckung von Anandamid beschrieben, jedoch sind damals keine Studien über die Eigenschaften dieser polaren Derivate durchgeführt worden (Cherbuliez und Rabinowitz 1956a).

Später wird in einem Patent von Rennes et al. (2005) auf die nichtphosphorylierte Vorstufe eines *N*-Acyl-Ethanolamins hingewiesen, welche den Geschmack von Nahrungsmitteln, Getränken, Arzneimitteln, Tabakwaren und Mundpflegemitteln verbessern soll. Im Patent wird eine Vielzahl von Ethanolaminderivaten beschrieben, unter anderem auch das phosphorylierte *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (Rennes et al., 2005).

N-Lactoyl-Ethanolamin hat man später als geschmacksmodulierende Substanz in Beerenausleseweinen entdeckt (de Rijke et al., 2006). In Hautpflegeprodukten zeigte die Verbindung eine kühlende Wirkung (Watson et al., 2008). *N*-Gluconyl-Ethanolamin wurde nachfolgend ebenfalls in Beerenausleseweinen entdeckt (de Rijke et al., 2007; de Rijke et al., 2008).

In einem weiteren Patent sind Ethanolaminphosphate beschrieben, welche mit Zuckerresten verknüpft sind. Dieser Substanzklasse hat man geschmacksverstärkende Eigenschaften zugeschrieben (Visser et al., 2006).

Aus diesen wenigen Beispielen wird deutlich, wie breit das Wirkungsspektrum von sowohl polaren als auch apolaren *N*-Acyl-Ethanolaminderivaten sein kann. Um insbesondere die polaren *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate besser charakterisieren zu können, ist die erste wichtige Aufgabe, eine geeignete Nachweismethode für diese Substanzklasse zu entwickeln. Die Analytik dieser Verbindungen wird durch ihre strukturellen Eigenschaften, d.h. unter anderem hohe Polarität und das Fehlen von UV-Aktivität, limitiert. Daher war es unsere erste Aufgabe, eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse derartiger Verbindungen zu etablieren, um anschließend mit einer ebenfalls zu entwickelnden Isolierungstechnik Lebensmittel auf das Vorhandensein von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten zu screenen. Aufgrund des Nachweises von *N*-Lactoyl-Ethanolamin (de Rijke et al., 2006) und *N*-Gluconyl-Ethanolamin (de Rijke et al., 2007; de Rijke et al., 2008) in Wein liegt die Vermutung nahe, dass polare *N*-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate in Fermentationsprozessen gebildet werden können. Ferner beschäftigten wir uns mit der Synthese von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten. Dies war erforderlich, um ein erweitertes Referenzmaterial zur besseren Charakterisierung dieser Substanzklasse in Händen zu haben.

Schließlich war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, diese polaren Verbindungen mittels verschiedener Enzymscreenings auf Ihre potentiellen Eigenschaften als Effektoren zu prüfen.

2 Kenntnisstand

2.1 *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate

In dieser Arbeit verwendete Strukturen gehören in die Klasse der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate (NAcEAP). Daneben wurden auch Versuche mit Ethanolaminphosphat (EAP) durchgeführt.

2.2 Ethanolamin

2.2.1 Biosynthese

Für die Synthese von Ethanolamin (EA) in Pflanzen (aber nicht in Säugetieren) sind direkte und indirekte Synthesewege beschrieben. Der direkte Weg ist auf die Decarboxylierung von L-Serin durch die L-Serin-Decarboxylase (SDC) (Abb. 2. 1) zurückzuführen. Serin-Decarboxylasen (SDCs) sind lösliche Proteine, die Pyridoxalphosphat als Kofaktor benötigen (Rontein et al., 2001). Die Decarboxylierung von Serin durch SDC wird als Hauptquelle der Ethanolaminsynthese in Pflanzen betrachtet (Rontein et al., 2003b).

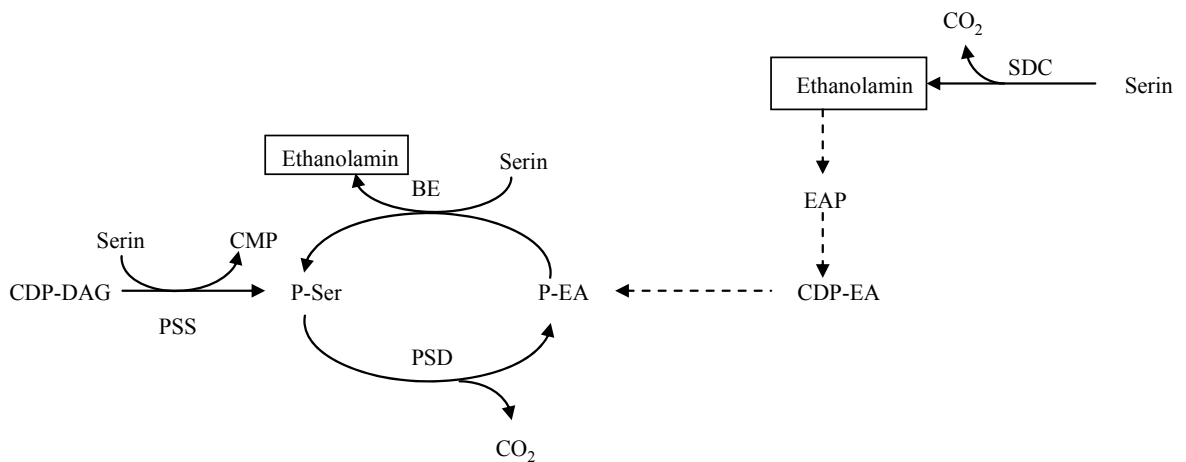


Abb. 2. 1 Biosynthesewege von Ethanolamin in der Pflanze (modifiziert nach Rontein, et al., 2003a). Die gestrichelten Linien stellen den „Kennedy-Weg“ dar. BE (Basenaustausch-Enzym), CDP-DAG (Cytidindiphosphat-diacylglycerin), CDP-EA (Cytidindiphosphat-Ethanolamin), CMP (Cytidin 5'-phosphat), CO₂ (Kohlendioxid), EAP (Ethanolaminphosphat), P-EA (Phosphatidylethanolamin), PSD (Phosphatidylserin-Decarboxylase), P-Ser (Phosphatidylserin), PSS (Phosphatidylserin-Synthase), SDC (Serin-Decarboxylase).

Der indirekte Syntheseweg von Ethanolamin (Abb. 2. 1) beginnt mit der Synthese von Phosphatidylserin (P-Ser), welches aus L-Serin über den Cytidindiphosphat-diacylglycerin-Weg (CDP-DAG) entsteht. Die dabei erforderliche Phosphatidylserinsynthet-

ase (PSS) konnte bisher nur aus Weizen isoliert werden (Delhaize et al., 1999). Im nächsten Schritt wird Phosphatidylserin (P-Ser) durch die Phosphatidylserin-Decarboxylase (PSD) zum Phosphatidylethanolamin (P-EA) decarboxyliert (Rontein, et al., 2003a). Durch eine enzymkatalysierte Basenaustauschreaktion mit L-Serin, wie z.B. die Reaktion des Basenaustauschenzyms (BE) in *Ricinus communis* (Shin und Moore, 1990), entstehen Ethanolamin und Phosphatidylserin (P-Ser) (Kent, 1995).

Phosphatidylethanolamin kann auch aus dem „Kennedy-Weg“ (Abb. 2. 1, unterbrochene Pfeile) hervorgehenden Cytidindiphosphat-Ethanolamin (CDP-EA) stammen (Kennedy und Weiss, 1956).

In Säugetierzellen ist die Synthese von Ethanolamin auch über Basenaustauschreaktionen beschrieben (Hübscher et al., 1959). Phosphatidylserin (P-Ser) wird über eine Calciumabhängige Basenaustauschreaktion (Abb. 2. 2, rechter Abschnitt) gebildet. Dabei kommt es zum Austausch einer polaren Kopfgruppe eines vorhandenen Phospholipids, wie z.B. Ethanolamin eines Phosphatidylethanolamins durch L-Serin; Ethanolamin wird frei. Für diese Basenaustauschreaktion mit Phosphatidylcholin (P-C) und Phosphatidylethanolamin (P-EA) sind die Enzyme Phosphatidylserin-Synthase 1 und 2 (PSS 1 und PSS 2) verantwortlich (Hübscher et al., 1959). Auch die Decarboxylierungsreaktion (Abb. 2. 2) von Phosphatidylserin (P-Ser) zu Phosphatidylethanolamin (P-EA) durch die Phosphatidylserin-Decarboxylase (PSD) ist in den Mitochondrien von Säugetieren bekannt (Borkenhagen, 1961).

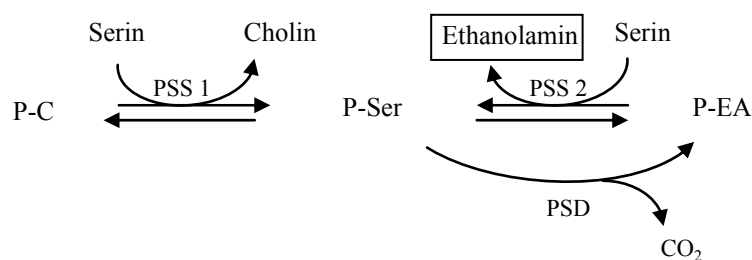


Abb. 2. 2 Auftreten von Ethanolamin im Lipidstoffwechsel von Säugetieren. (Schema modifiziert nach Borkenhagen, 1961 und Hübscher et al. 1959).

Die Synthese von Phosphatidylserin über den Cytidindiphosphat-Diacylglycerol-Weg (CDP-DAG-Weg) ist bei Säugern nicht bekannt (Vance, 2008).

Für Säugetiere ist der anabole Weg die Hauptquelle für Ethanolamin. Ein geringer Anteil wird über den Abbau von Sphingolipiden durch die Sphingosinphosphatlyase (Zhou et al., 1998; Van Veldhoven et al., 2000) gedeckt.

Decarboxylierungsreaktionen finden bei einer Vielzahl von Aminosäuren mit Hilfe von pyridoxalabhängigen Enzymen statt. Die entstehenden biogenen Amine wirken als Neurotransmitter und Gewebshormone oder sind Bestandteile von Coenzymen (z.B. Decarboxylierung von Histidin zu Histamin und Tyrosin zu Tyramin) (Löffler et al., 2007).

Ethanolamin ist essentieller Bestandteil für die Synthese von Cholin, Phosphatidylethanolamin und -cholin sowie bei einigen Arten für die Synthese der Glycinbetaine (Mudd und Datko 1989; Rhodes und Hanson 1993). Neben der Tatsache, dass Glycinbetaine für die Membranbiogenese von großer Bedeutung sind, gewinnen sie große Aufmerksamkeit aufgrund ihrer „technischen“ Funktionalität. Beispielsweise wirken Glycinbetaine als potenter Osmoseschutz, indem sie Schäden durch Stressfaktoren, wie hohe Salzkonzentrationen oder Dürre, abschwächen (Nomura et al., 1995; Sakamoto, und Murata, 2001; Rontein et al., 2002). Cholin ist des Weiteren ein essentieller Nährstoff für Mensch und Tier (Zeisel 2000; McNeil et al., 2001).

2.2.2 Abbau

Der Abbau von Ethanolamin (EA) im Stoffwechsel erfolgt durch Monoaminoxidasen. Diese oxidieren EA zum Imin, welches nach hydrolytischer Spaltung in Aldehyd und Ammonium zerfällt. Der gebildete Aldehyd wird im Stoffwechsel weiter zur entsprechenden Carbonsäure dehydriert und im letzten Schritt in die β -Oxidation eingeleitet (Löffler et al., 2007).

2.3 N-Acylierte Verbindungen - Biosynthese und Funktion

2.3.1 Acylierung

Bei Acylierungsreaktionen kommt es zur Reaktion einer elektrophilen Acyl-Gruppe (-CO-R mit R= Alkyl, Hetaryl) mit Amino- (-NH), Hydroxyl- (-HO), Thiol- (-HS), oder einer geeigneten Kohlenwasserstoff- (HC-) Gruppe einer organische Verbindung. Bekannte chemische Acylierungsreaktionen führen z.B. durch die Acylierung von Alkoholen und Phenolen zu Carbonsäureestern (Schotten-Baumann und Einhorn-Reaktion), oder durch die Acylierung von Aromaten zu Ketonen (Friedel-Crafts-Reaktion).

Im Organismus finden enzymatische Acylierungsreaktionen statt. Die Acyl-Transferasen (Transacylasen) spielen hier eine wichtige Rolle bei Stoffwechselprozessen (Römpp A-C1, 1995).

2.3.2 Coenzym A

Die Coenzym A-Biosynthese erfolgt in jeder Stoffwechselzelle aus Pantothenensäure, Adenosintriphosphat (ATP) und Cysteamin. Im Intermediärstoffwechsel ist Coenzym A als Cofaktor z.B. im Tricarbonsäurecyclus, bei den Synthesen von Fettsäuren, Cholesterol und Ketonkörpern oder auch bei Acetylierungsreaktionen zu finden. Coenzym A ist in der Lage, mit Carboxylgruppen (-COOH) von Metaboliten (z.B. Fettsäuren) Thioesterbindungen über die SH-Gruppe einzugehen. Es entstehen energiereiche Verbindungen, die bei Hydrolyse vergleichbare Energie liefern wie bei einer ATP-Spaltung. Ohne die Aktivierung der Metabolite als Thioester wären diese reaktionsträger (Rehner und Daniel 2002).

2.3.3 Acetyl-CoenzymA und Acyl-CoenzymA - Funktion und Wirkung

Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA, aktivierte Essigsäure) ist über die SH-Gruppe des CoenzymA mit Essigsäure verestert. Es ist ein Stoffwechselprodukt des Fett- (β -Oxidation) und Kohlenhydratabbaus (Decarboxylierung von Pyruvat) sowie des Abbaus von bestimmten Aminosäuren (z.B. L-Alanin). Acetyl-CoA ist auch für die Neusynthese von Fettsäuren, Cholesterol und den Aufbau von Ketonkörpern (z.B. Acetacetat) zuständig.

Acetyl-CoA kann mit Hilfe von spezifischen Acyltransferasen Acetylgruppen übertragen. Acetylcholin und acetylierte Aminosucker entstehen auf diesem Weg. Die Acetylierung von Lysinresten in Histonen hat eine wichtige regulatorische Funktion in der Genaktivierung.

Beim Abbau von Acetyl-CoA im Citratcyclus entstehen Kohlenstoffdioxid (CO_2), Wasser (H_2O) und Energie. Acyl-CoenzymA (Acyl-CoA) ist eine Verbindung, in der eine Fettsäure an CoenzymA über eine Thioveresterung verknüpft ist. In der Triglycerinsynthese werden Fettsäuren, die durch Bindung an Coenzym A aktiviert vorliegen (Acyl-CoA), durch die Katalyse der Glycerophosphat-Acyltransferase an α -Glycerophosphat verestert. Neben der bereits beschriebenen Funktion in Zellmetabolismus sind

Acylierungsreaktion für die Regulation von Wachstum und Differenzierung in Zellen von großer Bedeutung. Beispielsweise bewirkt die Acylierung von Proteinen mit Palmitinsäure die Verankerung von Signalproteinen an Zellmembranen. Die Regulation von Membranrezeptoren oder die Neuordnung des Cytoskeletts nach Stimulierung wird auch durch Acylierungsreaktionen kontrolliert (Karlsons Biochemie, 2005; Löffler et al., 2007; Stryer Biochemie 2007).

Für die Eliminierung von α -Aminosäuren, aromatischen Aminen, Sulfonamiden und Hydrazinen im Stoffwechsel von Lebewesen werden diese in der Phase-II-Reaktion der Biotransformation acetyliert. Die für die Acetylierung durch Acetyl-CoA benötigten Acyltransferasen kommen in Mikrosomen, Mitochondrien und im Zytosol vor.

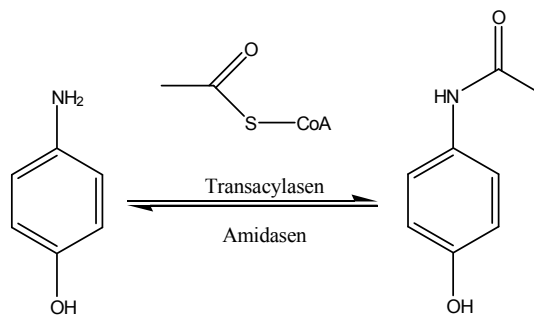


Abb. 2.3 Acylierung durch Transacylase und Acetyl-CoA und Deacylierung durch Amidasen. Reaktion von p-Aminophenol zu *N*-Acetyl-p-aminophenol (Schema modifiziert nach Dekant et al., 2005).

Die für die Elimination wichtige Hydrophilie wird jedoch bei der Acetylierung nicht immer erreicht, denn durch Amidasen kommt es öfters zur Entfernung der Acetylgruppen. Es stellt sich dadurch ein Gleichgewicht (Abb. 2. 3) zwischen den Aminen in freier Form und den dazugehörigen Amiden ein, welche abhängig vom Stoff und ihrer Spezies ist (Dekant et al., 2005).

2.3.4 *N*-acylierte Verbindungen

2.3.4.1 Sphingolipide

Die im Gebiet der Naturstoffe wohl bekanntesten und mengenmäßig am häufigsten vorkommenden *N*-acylierten Verbindungen sind die Sphingolipide (Abb. 2. 4). Sie sind Bestandteile biologischer Membranen. Ceramide stellen die einfachste Form *N*-acylierter Sphingolipide durch die Veresterung der Aminogruppe mit einer Fettsäure am

Aminodialkoholgerüst dar. Sphingomyeline sind im Vergleich zu den Ceramiden an der Hydroxylgruppe des Amido-alkoholgerüsts mit Phosphatidylcholin oder Ethanolamin verestert und kommen in den Myelinscheiden des Nervengewebes vor. Die im Zentralnervensystem vorliegenden Cerebroside sind stattdessen mit Galaktose oder Glukose verknüpft.

Sulfatide sind Cerebroside, die am C₃-Atom des Zuckermoleküls mit Schwefelsäure verestert sind.

Ganglioside, die bevorzugte Bausteine des Nervengewebes sind, besitzen an der Hydroxylgruppe einen verzweigten Oligosaccharidrest aus Glukose, Galaktose oder *N*-Acetylneuraminsäure (Löffler et al., 2007).

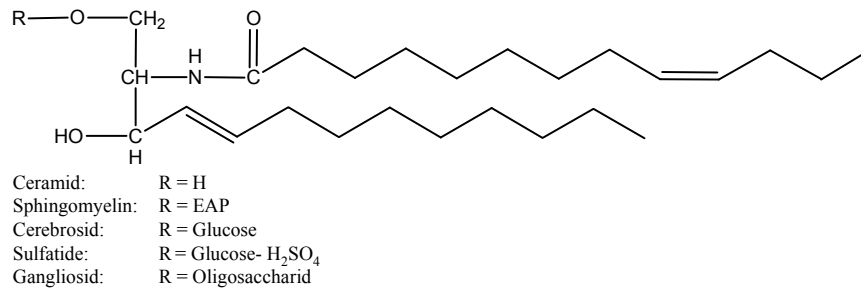


Abb. 2.4 Aufbau der Sphingolipide.

2.3.4.2 Vorkommen von *N*-Acylethanolaminen

Die Grundstruktur von *N*-Acyl-Ethanolaminen (NAE) besteht aus mit unterschiedlichen Fettsäuren *N*-acylierten Ethanolamin. Bislang hat man eine Vielzahl von NAEs im Gehirn von Säugern identifiziert. Die Fettsäurereste der NAEs stellten dabei hauptsächlich (Gehalt ≥ 25 % der Gesamt-NEAs) Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure dar (Koga et al., 1997; Mechoulam et al., 1998). Weitere im Gehirn nachweisbare NAEs sind *N*-Arachidonoyl-Ethanolamin (Anandamid), *N*-Linoyl-, *N*-Linolenyl-, *N*-Dihomo- γ -linolenyl- und *N*-Docosatetraenyl-Ethanolamin (Mechoulam et al., 1998). Auch im Anhangsgewebe des Gehirns sind NAEs gefunden worden (Koga et al., 1997).

2.3.4.2.1 Biosynthese von *N*-Acylethanolaminen

Die Biosynthese von AEA und anderer NAEs erfolgt durch die Hydrolyse ihrer *N*-Acylphosphatidylethanolamin-Vorstufen (NAPE).

Die Synthese von *N*-Arachidonoyl-phosphatidylethanolamin (NArPE), die Vorstufe von AEA, ist auf die calciumabhängige Enzymkatalyse einer Transacylase zurückzuführen

(Abb. 2. 5). Dabei kommt es zur *N*-Acylierung an Phosphatidylethanolamin mit Arachidonsäure an Position *sn1* eines Phospholipids. Die *N*-Acylierung findet dabei am Stickstoff von Ethanolaminphosphat (EAP) statt (Schmid, 2000). Die für die Bildung der NAPSs verantwortliche Transacylase (Cadas et al., 1997; Di Marzo et al., 1996) weist geringe Substratspezifität auf, d.h. dass die Substrate kaum einen unterschiedlichen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Zu den Substraten der Transacylase gehören die meisten Glycerinphospholipide (GLP) und jegliche Art von Fettsäuren, welche an die *sn1*-Position von GLP mit EAP verknüpft werden (Sugiura et al., 1996b).

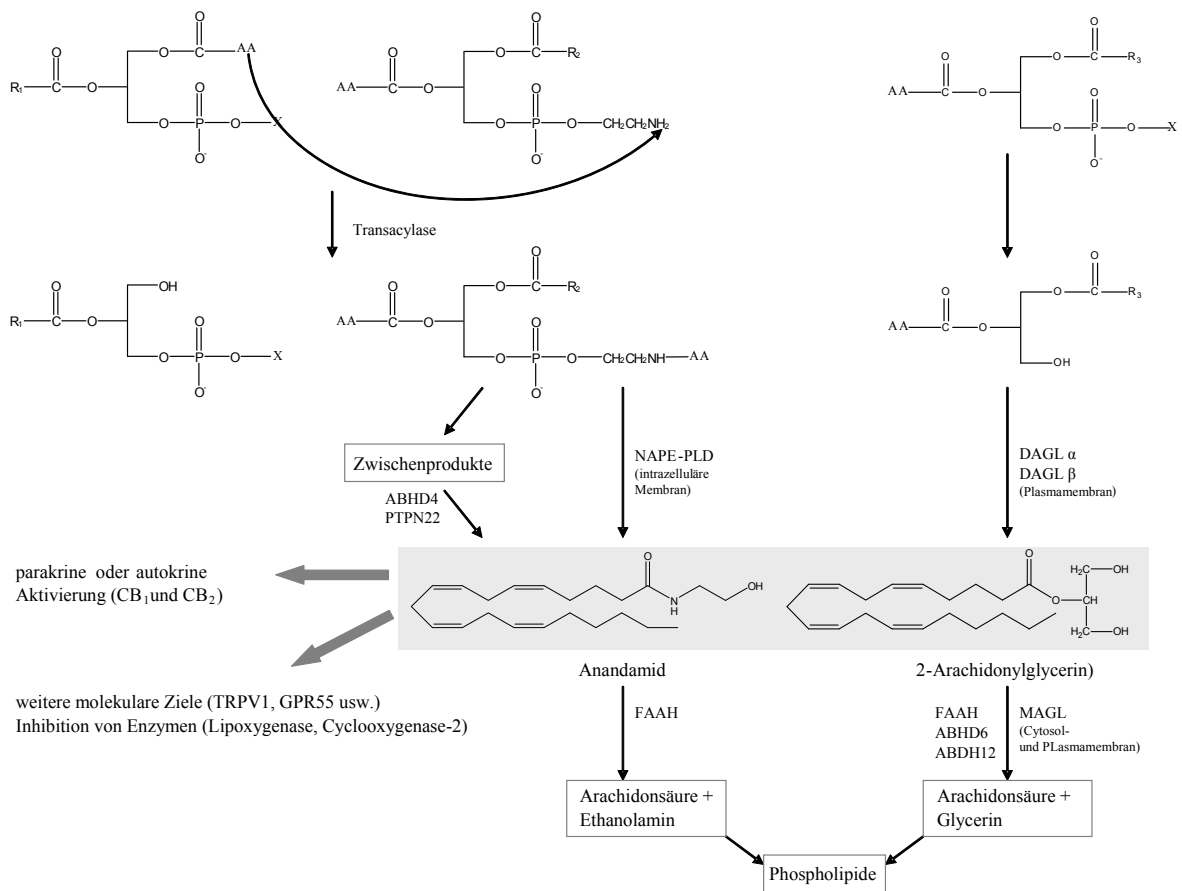


Abb. 2. 5 Biosynthese von Anandamid (AEA) und 2-Arachidonoylglycerin (modifiziert nach Banni und Di Marzo 2010).

Die Hydrolysereaktion von NAPes wird durch eine NAPE-spezifische „Phospholipase-D“ (NAPE-PLD) katalysiert (Sugiura et al., 1996c). Das Enzym ist kein Phospholipase D-ähnliches Enzym und wird in die Kategorie der Metallo-β-Lactamasen Phosphodiesterasen zugeordnet. Die NAPE-PLD ist für die Hydrolyse aller bisher untersuchten NAPes zuständig, dabei ist sie hinsichtlich der Reste an *sn1*, *sn2* oder den *N*-Acyrest unspezifisch. Die Art des Phospholipids hat jedoch einen Einfluss auf die En-

zymfunktion. Durch die Hydrolyse entsteht das entsprechende NAE und Phosphatidsäure (Okamoto, 2004). Leung und seine Arbeitsgruppe wiesen im Tierversuch mit NAPE-PLD-„knock-out“ Mäusen keine verringerten Gehalte an AEA in den meisten Geweben nach (Leung et al., 2006). Somit stand fest, dass es weitere Wege und verantwortliche Enzyme für die NAE-Biosynthese aus NApEs geben muss (Abb. 2. 5). Einer dieser Wege ist die Synthese der entsprechenden phospho-NAEs durch Phospholipase C und die anschließende Hydrolyse zu NAEs durch Proteintyrosinphosphatase N22 (PTPN22) (Liu et al., 2008). Als Ausgangssubstanz ist die Synthese von NAEs aus Glycerophospho-NApEs (GNApE) beschrieben. Im ersten Schritt kommt es zur Abspaltung der *sn*-1- und 2- *N*-Acylreste durch α/β -Hydrolase 4 (Abdh4), im nächsten Schritt entsteht durch die enzymkatalysierte Hydrolyse der Phosphodiesterase das NAE (Simon und Cravatt 2006). Ein anderer Weg ist die durch Lysophospholipase katalysierte Hydrolyse von 2-lyso-NApEs, welche anschließend von einer löslichen PhospholipaseA₂ in NAEs gespalten wird (Sun et al., 2004).

An *sn*2-Position mit Arachidonsäure acylierte Diacylglycerine (DAG) stellen die Vorstufe von 2-Arachidonoylglycerin (2-AG) (Struktur s. Abb. 2. 6) dar. In den meisten Zellen und Geweben hat man zwei selektive DAG-Lipasen (DAGL- α und DAGL- β), die an *sn*1-Position der DAG die Hydrolyse katalysieren, festgestellt (Bisogno et al., 2003).

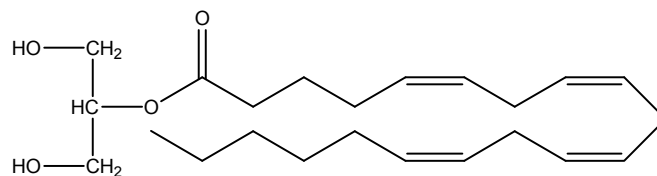


Abb. 2. 6 2-Arachidonoylglycerin (2-AG).

Der Inaktivierung von Anandamid und 2-AG erfolgt über die Fettsäureamidhydrolase (FAAH), welches das erste klonierte „endocannabinoide Enzym“ ist (Bracey et al., 2002). Substrate der FAAH sind verschiedene langkettige, bevorzugt ungesättigte Fettsäureamide, dazu gehören insbesondere auch Ethanolamide wie Anandamid, Oleoyl- und Palmitoylethanolamin, Taurinamide und primäre Amide. Auch langkettige Fettsäureester, wie das 2-AG und die weniger bekannten Endocannabinoide, wie das Virodhamin, werden von FAAH hydrolysiert (McKinney und Cravatt 2005). Die Monoacylglycerolipase (MAGL) (Karlsson et al., 1997; Dinh et al., 2002) und zwei weitere

α/β -Hydrolasen (AbdH 6 und 12) (Blankmann et al., 2007) sind weitere Enzyme, die 2-AG als Substrat erkennen und inaktivieren. Die durch die Hydrolyse von 2-AG und Anandamid frei werdende Arachidonsäure und wahrscheinlich auch Glycerin sowie Ethanol-amin werden schnell in Membranphospholipide eingebaut (Di Marzo et al., 1994; Di Marzo et al., 1998).

2.3.4.2.2 *N*-Acylethanolamine als Endocannabinoide

Nach erster Charakterisierung der Cannabinoid-Rezeptoren (CB-Rezeptoren) (Devane et al., 1988) mit anschließender Klonierung und molekularer Charakterisierung des Typ-1 Rezeptors CB₁ (frühere Bezeichnung zentraler Typ) (Matsuda et al., 1990) folgte die Entdeckung des CB₂-Rezeptors (frühere Bezeichnung peripherer Typ) (Munro et al., 1993) und dessen Vorkommen im Gehirn (Herkenham 1995). Infolge dieser neuen Erkenntnisse ergab sich der Zusammenhang mit den Wirkungen von $\Delta^9(-)$ -Tetrahydrocannabinol (THC) und Marihuana in zentralen und peripheren Geweben. Außerdem stellte man fest, dass es endogen gebildete Cannabinoide (Endocannabinoide) geben muss, die spezifisch für die CB-Rezeptoren sind (Di Marzo et al., 1998). Im Jahr 1992 gelang es, das erste Endocannabinoid im Schweinegehirn nachzuweisen. Dieses oben schon mehrfach genannte *N*-Arachidonoylethanolamin wurde Anandamid, nach dem sanskrit Wort Ananda = Glück, genannt (Devane et al., 1992). Im Tierversuch verursachte Anandamid die meisten typischen Verhaltensauffälligkeiten, wie die Störung des Bewegungsapparats im Freigelände und Ringimmobilitäts-Test, Schmerzunempfindlichkeit an einer heißen Platte und renale Hyperthermie, wie sie sämtlich durch THC ausgelöst werden (Mechoulam und Fride 1995).

Nach der Entdeckung von Anandamid und den CB-Rezeptoren folgten weitere Untersuchungen mit Endocannabinoiden und ähnlichen Strukturen. Heute weiß man, dass neben Anandamid und 2-Arachidonoylglycerin (2-AG) weitere NAEs in Geweben vorkommen, die sowohl höhere Affinität zu den beiden CB-Rezeptoren aufweisen, als auch gar keine. In Geweben finden sich mengenmäßig mehr langkettige NAEs als Anandamid. Ausnahmen stellen dabei ihre Homologen mit 3 bis 4 Doppelbindungen und 18 bis 20 Kohlenstoffatomen dar, welche auch eine Affinität zu den CB-Rezeptoren aufweisen. Die restlichen langkettigen NAEs üben biologische Funktionen über andere Rezeptoren aus. Als Beispiel sei hier *N*-Oleoylethanolamin (OEA) genannt. OEA ist unter anderem ein Appetitzügler, der durch die Aktivierung der Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren (PPAR- α) einen Einfluss auf den Fett- und Glukosemetabolismus

hat. Es ist auch als Agonist des Vanilloid-Rezeptor Typ 1 (TRPV1) beschrieben (Thabuis et al., 2008).

Das antiinflammatorisch wirkende *N*-Palmitoylethanolamin (PEA) übt seine Wirkung durch direkte Aktivierung des PPAR- α Rezeptors (LoVerme et al., 2005) und durch die Verstärkung der Affinität von Anandamid an CB₁, TRPV1- oder PPAR- γ -Rezeptoren aus (Costa et al., 2008). Die Wirkung von Anandamid beschränkt sich nicht nur auf die beiden CB-Rezeptoren, es hat des Weiteren einen Einfluss auf eine Vielzahl von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR) und Ionenkanälen. Diese werden teilweise aktiviert oder, wie in den meisten Fällen, inhibiert (Oz, 2006). Allerdings konnte *in vivo* mit einem speziell auf diese Ziele präparierten Mäusemodell nur die Aktivierung von TRPV1-Kanälen bestätigt werden (Starowicz et al., 2007).

Kongenere des 2-AG sind jedoch meistens inaktiv gegenüber CB-Rezeptoren (Sugiura et al., 1996a), jedoch steigern mehrere die von CB-Rezeptoren ausgelösten Wirkungen (Ben Shabat et al., 1998; Panikashvili et al., 2001).

Banni und Di Marzo fassten 2010 in einer Übersicht zusammen, dass der Gehalt an Anandamid, 2-AG und deren Kongenere durch eine gezielte Ernährung mit langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren und deren Vorstufen beeinflusst werden kann. Diese Änderungen wirken sich auch auf die von den Lipidmediatoren ausgelösten Wirkungen im Gemütszustand und insbesondere auf die Energiehomeostase aus. Es wird beschrieben, dass übermäßig erhöhte Endocannabinoid-Konzentrationen sowohl im Hypothalamus als auch in den visceralen Adipocytgeweben der Leber, Skelettmuskulatur und Pankreas ursächlich für Hyperphagia (appetitive Störungen) sind, was zu Adipositas, Dyslipidämie (Verschiebung der Zusammensetzung der Lipide im Plasma) und Insulinresistenz führt.

Im Tierversuch, in dem eine Leistungsminderung des Tiers erfolgte, um sie an stressige Situationen anzupassen, ist die Entwicklung von ängstlichen und depressionsähnlichen Verhaltenweisen möglicherweise auf den geringen Endocannabinoidtonus im Gehirn zurückzuführen. Es ist absehbar, dass in Zukunft Diäten mit gezielter Zusammensetzung an langkettigen und mehrfach ungesättigten Fettsäuren Alternativen für pharmakologische „Minderer“ (z.B. CB₁-Antagonisten) oder „Verstärker“ (z.B. Inhibitoren von Endocannabinoid-inaktivierenden Enzymen) der Endocannabinoidaktivität, metabolischen- bzw. affektiven neurologischen Störungen sein können. Zuvor ist allerdings noch eine Vielzahl von Studien erforderlich, bei denen berücksichtigt werden muss, dass Endocannabinoide und ähnliche Moleküle ihre Effekte nicht nur in einem zeitab-

hängigen, sondern auch seitenspezifischen Verhalten ausüben. Somit muss jede diätetische Veränderung auf ihre Gewebsspezifität überprüft werden, um die Zeit- und Seitenspezifität einer genauen endocannabinoiden Funktion wiederherzustellen.

Säuger besitzen eine große metabolische Anpassungsfähigkeit. Daher ist nicht auszuschließen, dass der Endocannabinoidgehalt in Geweben, die einer Langzeitdiätetischen Manipulation ausgesetzt sind, mit einem adaptiven Mechanismus dies ausgleichen kann. Es sind aus diesen Gründen weitere Untersuchungen für die eindeutige Beurteilung nötig, um beispielsweise den Einfluss von Langzeitdiätetischen Maßnahmen auf die Expression der CB-Rezeptoren, Endocannabinoid-Biosynthese und den Einfluss auf die EC-Abbauenden Enzyme zu ermitteln (Banni und Di Marzo 2010).

2.3.4.3 (R)-Methyl-anandamid

(R)-Methyl-anandamid ist ein synthetisiertes chirales Analogon von Anandamid. Es weist höhere Stabilität und eine stärkere Affinität gegenüber dem CB₁-Rezeptor als Anandamid auf (Abadji et al., 1994).

2.4 Phosphorylierung

Biochemische Modifikationen von Molekülen, wodurch diese neue Eigenschaften erhalten, sind bei allen Naturstoffen, unter anderem auch bei Aminosäuren (AS) von Proteinen zu beobachten. Diese Veränderungen können Acetylierung am Aminoende eines Proteins (erschwert den Proteinabbau), die Knüpfung mit Hydroxylgruppen (Kollagenstabilität), Kohlenhydrat-Einheiten (Erhöhung der Hydrophilie, so dass Wechselwirkungen mit anderen Proteinen möglich werden) oder Fettsäuren (Erhöhen der Hydrophobie) beinhalten.

Die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Proteinen bzw. Enzymen ist die häufigste Form der Modifikation an AS und findet an ihren Hydroxylresten statt, wodurch Stoffwechselwege und physiologische Prozesse schnell an- und abgeschaltet, bzw. Enzyme aktiviert oder deaktiviert werden können. Hormone, wie z.B. Insulin oder Glucagon, bewirken die Stimulation von Proteinkinasen, wodurch Phosphorylierungsreaktionen eingeleitet werden. Adenosintriphosphat (ATP) ist hierbei der am häufigsten gebrauchte Phosphordonor.

Die Aufgabe von Proteinphosphatasen dagegen ist die hydrolytische Spaltung von Phosphatresten (Dephosphorylierung), so dass Orthophosphat (P_i) entsteht und die mo-

difizierte Hydroxylgruppe wieder frei vorliegt. Somit werden die durch Proteinkinasen (Phosphorylierung) gestarteten Reaktionen und Signaltransduktionswege durch Proteinphosphatasen (Dephosphorylierung) abgeschaltet. Diese beiden Enzymklassen sind in der Regel sehr spezifisch, wodurch ihre Aktivität gezielt geregelt werden kann. Beide Reaktionswege sind unter physiologischen Bedingungen irreversibel und finden ohne die entsprechenden Enzyme nicht statt.

Die Dephosphorylierung von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) oder Adenosinmonophosphat (AMP) ist eine stark exergonische Reaktion. Da die im Organismus ablaufenden Prozesse den Gesetzen der Thermodynamik folgen, werden energieliefernde Reaktionen an endergone Reaktionen gekoppelt, die alleine entweder nur sehr langsam oder gar nicht stattfinden würden. Ein typisches Beispiel für eine derartige Kopplungsreaktion ist die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-phosphat im Kohlenhydratstoffwechsel (Glykolyse). Ohne ATP als Phosphordonor und die Katalyse der Hexokinase würde diese endergonische Reaktion nicht spontan ablaufen (Löffler et al., 2007; Stryer Biochemie 2007).

2.4.1 Themenrelevante phosphorylierte Verbindungen und ihre Wirkungen

2.4.1.1 Phosphoryliertes Anandamid und (*R*)-Methyl-anandamid

Phospho-Anandamid (pAEA) ist ein Zwischenprodukt in der Biosynthese von Anandamid. Nach Dephosphorylierung durch Phosphatasen, einschließlich der PTPN22, entsteht Anandamid (Abb. 2. 5) (Liu et al., 2008).

Anandamid und seine Derivate sind lipophil und daher wasserunlösliche Substanzen. Für pharmakologische Untersuchungen stellt die Wasserunlöslichkeit ein Problem dar. Daher ist es nötig, die Polarität dieser Substanzklasse z.B. durch Phosphorylierung zu erhöhen. So hat man zum Beispiel die Synthese von pAEA (Abb. 2. 7) aus dem N-Hydroxy-succinimidester der Arachidonsäure mit Ethanolaminphosphat zum p-AEA beschrieben (Sheskin et al, 1997).

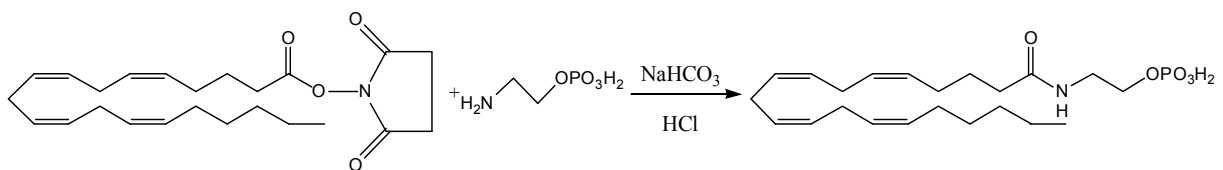


Abb. 2. 7 Synthese von Phospho-Anandamid (p-AEA) (modifiziert nach Sheskin et al., 1997).

Der von Juntunen et al. (2003) beschriebene Syntheseweg für pAEA (Abb. 2. 8) beginnt im ersten Schritt mit der Umsetzung von Arachidonsäure zum Amid. Im zweiten Schritt wird mit Di-tert-butyl-diisopropyl-phosphoramidit phosphoryliert, danach werden die t-Butyl-Reste am Phosphat abgespalten, wodurch pAEA entsteht. Durch den Einsatz von methyliertem Ethanolamin entsteht das phosphorylierte (*R*)-Methyl-anandamid (pRmAEA).

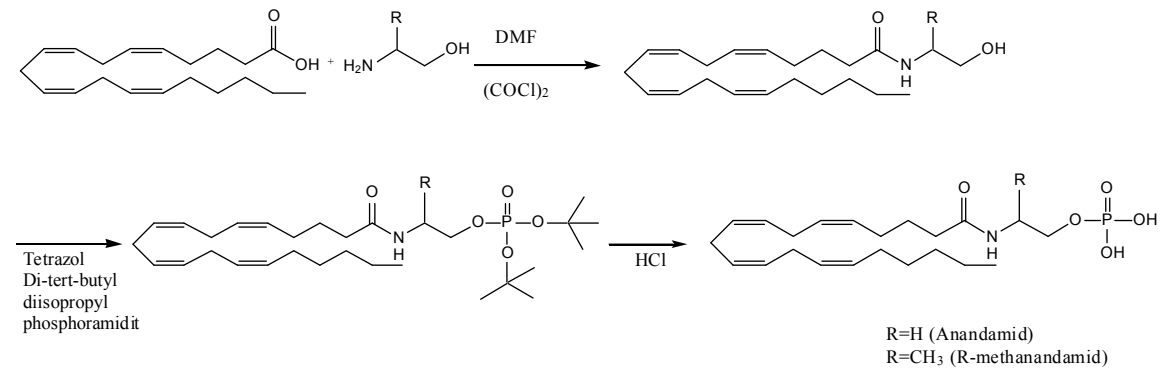


Abb. 2. 8 Synthese von Phospho-Anandamid und Phospho-(*R*)-Methyl-anandamid (modifiziert nach Juntunen et al., 2003).

Durch die Phosphorylierung wird die Wasserlöslichkeit der Substanzen erhöht. Weiterhin zeigten die beiden Verbindungen gute Stabilität in Pufferlösungen und wurden in Gegenwart von alkalischer Phosphatase bzw. in Leberhomogenat in ihre nicht-phosphorylierten Vorstufen hydrolysiert. Im Tierversuch bewirkten (*R*)-Methyl-anandamid und p-R-mAEA einen Druckabfall im Intraokulardruck-Versuch. Die Arbeitsgruppe beschreibt die Möglichkeit, diese phosphorylierten Verbindungen als gut wasserlösliche Prodrugs zu verwenden (Juntunen et al., 2003).

Zur Analytik von pAEA hat man kürzlich die Synthese von deuteriertem p-AEA als Standard beschrieben (Cheng et al., 2008).

2.4.1.2 *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat

Wie einleitend bereits erwähnt wurde, sind in einem Patent (Rennes et al., 2005) eine Vielzahl von Ethanolaminderivaten beschrieben, unter anderem auch das phosphorylierte *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (Struktur s. Abb. 2. 9), die den Geschmack von Nahrungsmitteln, Getränken, Arzneimitteln, Tabakwaren und Mundpflegemitteln verbessern sollen.

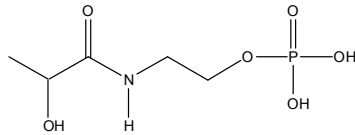


Abb. 2. 9 *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat.

Später berichtete die Forschergruppe von Givaudan über einen Versuch, in dem Ethanolamin-Derivate auf ihre kühlende Wirkung in Hautpflegeprodukten getestet wurden. Dabei hat man ethanolische Lösungen mit je 0.2 % Menthol und 0.2 % *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat vorbereitet und je am Unterarm in gleichen Mengen aufgetragen. Die Testpersonen empfanden dabei die ethanolische *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphatlösung kühlender als die ethanolische Menthollösung (Watson et al., 2008).

2.4.1.3 *N*-Gluconyl-Ethanolaminphosphat

Visser et al. (2006) stellten in ihrem Patent Ethanolaminphosphate vor, welche mit Zuckerresten, z.B. das *N*-Gluconyl-Ethanolaminphosphat (Abb. 2. 10), verknüpft sind. Im Patent wird die geschmacksverstärkende Eigenschaft dieser Substanzklasse beschrieben.

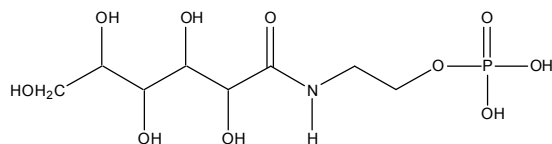


Abb. 2. 10 *N*-Gluconyl-Ethanolaminphosphat.

2.4.1.4 Ethanolaminphosphat, *N*-Acetyl- und *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat

Bereits vor rund 50 Jahren hat man über die Synthese von *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (NAEAP) und *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (NBEAP) (Strukturen s. Abb. 2. 11) berichtet (Cherbuliez und Rabinowitz 1956a).

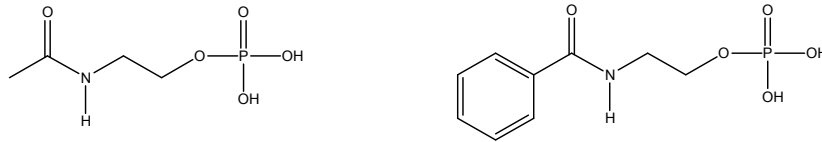


Abb. 2. 11 *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (links) und *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (rechts).

In einer Versuchsreihe zur Bestimmung der Hydrolyseeigenschaften (in 1N HCl bei pH 4.5 und 100 °C sowie 1N NaOH) von verschiedenen alkylierten Phosphorsäurederivaten wurde auch die Hydrolyse von EAP, NAEAP und NBEAP geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass eine freie oder acylierte Aminogruppe keinen großen Einfluss auf die Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung hat. Nur das Vorhandensein einer Carboxylgruppe oder eines Carboxylderivats in β -Position zum Sauerstoff der Phosphorsäureesterbindung zeigte dagegen einen starken Effekt auf die Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung (Cherbuliez und Rabinowitz 1956b).

2.5 Analytik

2.5.1 Analytik von Ethanolaminphosphat (EAP)

EAP wird, neben Aminosäuren und anderen biogenen Aminen, in der Metabolitenanalytik untersucht (Guo und Li 2009). Da EAP keine UV-Aktivität oder Fluoreszenz aufweist, ist eine vorherige Derivatisierung nötig. Derivatisierungen werden hauptsächlich am *N*-terminalen Ende durchgeführt. Allerdings ermöglicht eine Methode wie z.B. die Kapillarelektrophorese mit Kopplung an ein Massenspektrometer auch eine direkte Bestimmung von EAP. Im Folgenden sind gängige Analysetechniken beschrieben.

Eine Reihe von Methoden mit Aminosäureanalysatoren, die z.B. die Ninhydrinderivate (Abb. 2. 12) nach Retention an einer Kationenaustauschersäule trennen und anschließend bei 570 nm detektieren, sind beschrieben (Le Boucher et al., 1997). Die Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol (Abb. 2. 12) zur fluorimetrischen Detektion ist ebenfalls gängig (Gundlach et al., 1984). Die Derivatisierung mit markiertem Dansylchlorid (Abb. 2. 12) und anschließende Analyse mit RP-HPLC-FTICR-ESI_{pos}-MS ist eine weitere, jüngst beschriebene Analysenmöglichkeit (Guo und Li 2009). Ein weiteres, aktuell genanntes Derivatisierungsreagenz für EAP ist 3-Aminopyridyl-*N*-hydroxysuccinimidyl-carbamat (APDS) (Abb. 2. 12). Dieses wird zur Bestimmung von Aminopyridylderivaten mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS verwendet. Allerdings vermerk-

ten die Autoren geringe Nachweisempfindlichkeit, da vermutlich die Derivate im Reaktionsmedium instabil sind (Shimbo et al., 2009).

N-Isobutoxycarbonyl-Derivate (*N*-isoBOC) von EAP mit anschließender Methylierung durch Diazomethan (Abb. 2. 12) beschrieben Kataoka et al. (1988) für die Detektion via GC-FID; später berichteten die selben Autoren von einer empfindlicheren (Nachweisgrenze 30 pg) Detektion des gleichen Derivats mittels GC-FPD (Kataoka et al., 1989). Andere Autoren veresterten EAP an der Aminogruppe mit Isothiocyanat und führten dann eine zweifache Silylierung (BSTFA/TMCS) (Abb. 2. 12) am Phosphatrest durch. Es wurde berichtet, dass die Silylierung ohne Isothiocyanat zu instabilen Produkten führte (Harvey und Horning 1973).

Für die direkte Analytik ohne Derivatisierung eignen sich kapillarelektrophoretische Techniken. Die massenspektrometrische Detektion ist mittels CE-ESI_{pos}-MS-Kopplung möglich (Kato et al., 2009).

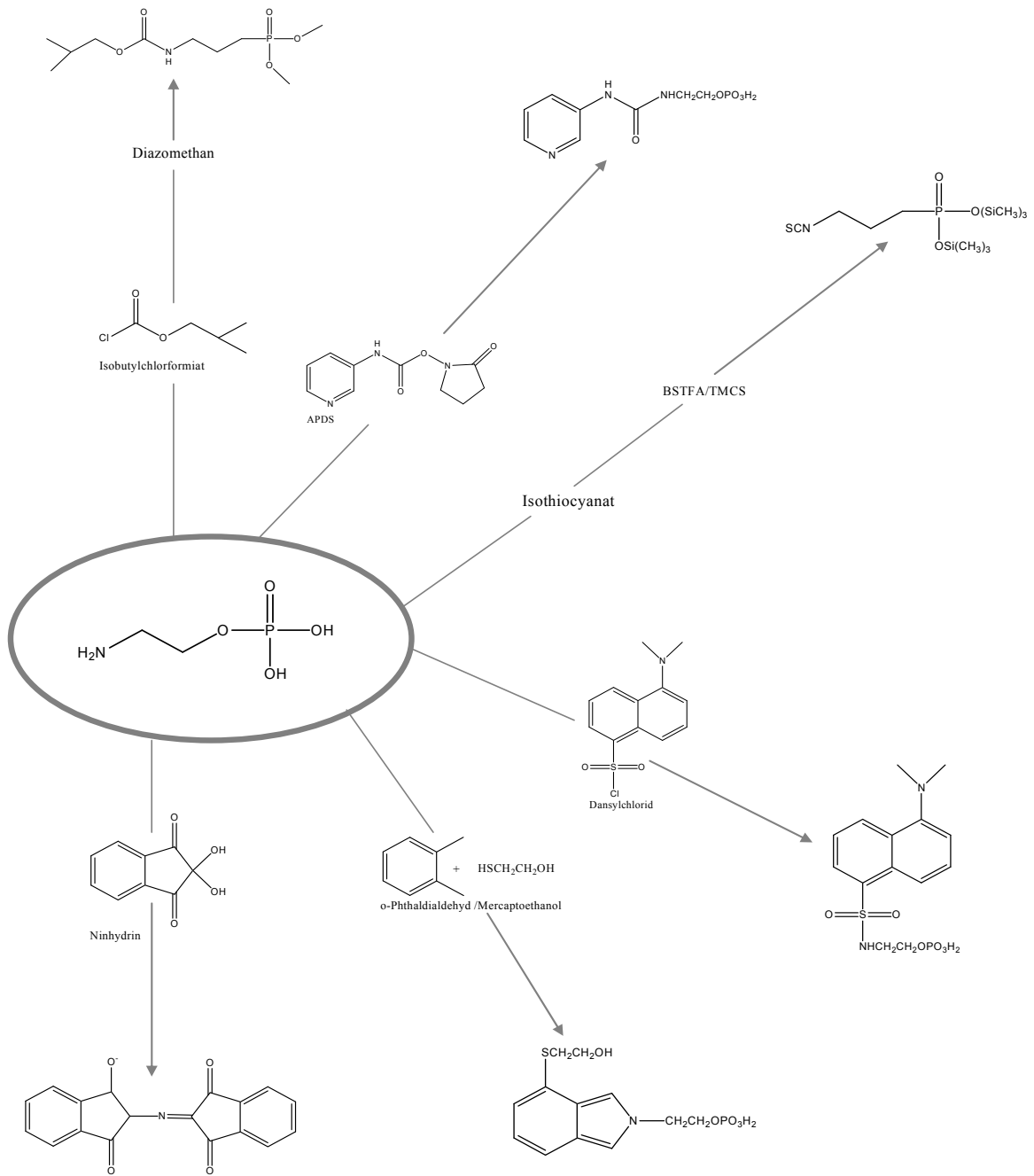


Abb. 2. 12 Schema verschiedener Möglichkeiten zur Derivatisierung von Ethanolaminphosphat als Grundlage dessen Analytik. Erläuterung siehe Text im Abschnitt 2.5.1.

2.5.2 Analytik von apolaren *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten

Wie oben ausgeführt wurde, stellen Endocannabinoide und strukturell verwandte Fettsäureamide eine wichtige Gruppe von apolaren phosphorylierten Ethanolamiden aufgrund ihrer physiologischen Wirkungsweisen dar. Daher ist es von Bedeutung, empfindliche analytische Methoden zu entwickeln, mit denen präzise Identifizierung und Quantifizierung der Verbindungen durchgeführt werden können. Da die Vertreter dieser Substanzklasse nicht flüchtig sind, keine Fluoreszenz besitzen und keine oder nur

schwache UV-Absorption zeigen, ist die Analytik erschwert. Grundsätzlich sind für die verschiedenen Detektionsmethoden in der Gas- und Flüssigkeitschromatographie vorherige Derivatisierungen nötig (Kingsley und Marnett 2009).

2.5.2.1 Probenvorbereitung und Aufreinigung

Die Analytik von Endocannabinoiden und strukturell ähnlicher Verbindungen erfolgt üblicherweise aus Geweben. Solche Matrices stellen eine enorme analytische Herausforderung dar, da neben den Zielkomponenten eine Vielzahl von Lipiden und anderen Gewebsbestandteilen vorkommen.

Generell wird im ersten Schritt der Probenvorbereitung das Gewebe in einem organischen Lösungsmittel homogenisiert, gereinigt und anschließend der Analyt per Festphasenextraktion (SPE) oder einer „open-bed“ chromatographischen Methode isoliert.

Bei einer etwas aufwendigeren Aufreinigungsmethode wird das Gewebe zuerst in einem Lösungsmittelgemisch homogenisiert, anschließend zentrifugiert und die wässrige Phase über eine mit Kieselgel gepackte Säule fraktioniert. Dann folgt nach weiterer Reinigung der Zielfraktion (mit z.B. Anandamid und 2-AG) mittels Normalphasen(NP)-HPLC die Abtrennung der entsprechenden Teilfraktion, welche anschließend per GC-MS analysiert wird (Kirkham et al., 2002).

Die elegantere Form der Probenaufreinigung ist die mittels SPE. Die hierfür in Frage kommenden Kartuschen bestehen aus Kieselgel- (Schmid et al., 2000) oder RP-Phasen (Bazinet et al., 2005; Opitz et al., 2007). Andere Autoren verwendeten ein PolymyxinB Harz für die Adsorption von Anandamid und 2-AG aus biologischen Flüssigkeiten einschließlich Blutserum (Wang et al., 2000; Wang et al., 2001).

2.5.2.2 Trennung und Detektion

Zur Trennung und weiteren Analytik der Endocannabinoide und strukturverwandter Verbindungen sind eine Reihe von chromatographischen Methoden entwickelt worden. Diese lassen sich in drei Kategorien einteilen:

- die Auftrennung der derivatisierten Analyten per HPLC mit anschließender Fluoreszenz- oder UV-Detektion,
- die Auftrennung per GC mit MS-Detektion,
- die Trennung per LC mit MS- oder Tandem-MS-Detektion (Kingsley und Marnett 2009).

HPLC

Eine Vielzahl von HPLC-Methoden mit Fluoreszenz- oder UV-Detektion hat man in der Literatur beschrieben. Der Detektion ist, wie vorgängig erläutert, Derivatisierung vorgeschaltet. Solche Derivate können z.B. Dansylester (Abb. 2. 13) sein, die an einer C₁₈-Phase getrennt und bei 255 nm detektiert werden (Yagen und Burstein 2000).

Die Derivatisierung zu 4-*N*-Chloroformylmethyl-*N*-methylamino-7-*N,N*-dimethylamino-sulfonyl-2,1,3-benzo-diazol-Derivaten (DBD-COCl) ist aus verschiedenen Matrices, wie biologischen Flüssigkeiten (Wang et al., 2001), aus Rattengehirngewebe (Arai et al., 2000) oder beispielsweise aus Humanplasma (Schmidt et al., 2006) beschrieben. Dabei erfolgt die Trennung der Derivate an C₁₈-Säulen (Wang et al., 2001) oder mittels einem gekoppelten HPLC-Säulensystem, indem einer C₁₈-Säule eine Vortrennung an einer Phenylphasensäule vorangeschaltet ist (Arai et al., 2000). Beide Methoden erlauben Fluoreszenzdetektion (Extinktion bei 450 nm und Detektion bei 560 nm).

Solche HPLC-Techniken liefern empfindliche Nachweise bis in den fmol-Bereich (on-column). Trotzdem basieren heutzutage die meisten Analysenmethoden (aufgrund des Vorteils der Strukturinformation) auf GC-MS- oder LC-MS-Techniken (Kingsley und Marnett 2009).

GC-MS

Die Forschungsentwicklung im Bereich der Endocannabinoide beruht auf der GC-MS-Technik, mit deren Hilfe Anandamid entdeckt worden ist. Devane und seine Mitarbeiter haben nach Aufreinigung von Schweinegehirn die Anandamid enthaltende Fraktion trimethylsilyliert (Abb. 2. 13) und per GC-MS analysiert. Parallel erfolgte ein Kontrollversuch mit synthetisiertem Anandamid (Devane et al., 1992). Die Analytik von 2-AG aus Hundedarm ist, ebenfalls nach vorheriger Silylierung, auch per GC-MS durchgeführt worden (Mechoulam et al., 1995). Andere Autoren verwendeten zur Erfassung von NAEs aus Säugetiergehirn *tert*-Butyl-dimethylsilyl-Derivate für die GC-MS-Analytik. (Schmid et al., 1995) (Abb. 2. 13).

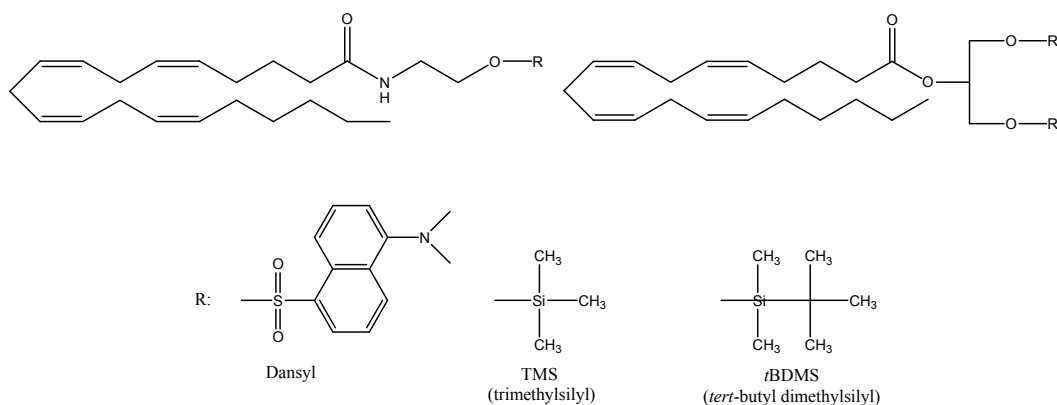


Abb. 2.13 Derivatisierungsgruppen für Anandamid und 2-AG.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die nichtflüchtigen Endocannabinoide zur GC-Analytik mit einer geeigneten GC-Derivatisierungsmethode funktionalisiert werden müssen. Nach Trennung per GC erfolgt die massenspektrometrische Detektion, entweder mit Elektronenstoß (EI)-oder mit chemischer Ionisierung (CI) (Kingsley et al., 2009).

LC-MS

Heutzutage stellen LC-MS-Techniken die gängigsten Analysemethoden für Endocannabinoide und strukturverwandte Moleküle dar. Aufgrund der Lipophilie dieser Substanzklasse werden HPLC-Trennungen an RP₁₈-Säulen durchgeführt. MS-Detektionen basieren auf der Ionisierung des Analyten. Unter Anwendung moderner Massenspektrometer liefern milde Ionisierungstechniken wie die Elektrospray-Ionisierung (ESI) und die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) ausreichende Ionisierungen der Endocannabinoide und ähnlicher Strukturen mit Nachweisgrenzen bis in den fmol-Bereich (on-column). Ionisierungsprodukte der Endocannabinoide und ähnlicher Strukturen sind protonierte Verbindungen $[M+H]^+$, Addukte von Metallionen wie z.B. Natrium oder Silber $[M+Na/Ag]^+$ oder Ammoniumkationen $[M+NH_4]^+$.

Zu Quantifizierungen werden oft SIM-Methoden beschrieben. Vorteilhafter sind dagegen (kostspieligere) Tandem-MS-Systeme im SRM-Modus. Im Vergleich zur SIM-Methode wird hier das Grundrauschen minimiert, wodurch es zur Steigerung von Empfindlichkeit und Präzision kommt (Kingsley et al., 2009). Hierzu seien im Folgenden einige einschlägige Beispiele genannt.

Ionisierungen zu protonierten Verbindungen $[M+H]^+$ wurden bei LC-APCI-MS-Methoden mit Messung im SIM-Modus beschrieben (Di Marzo et al., 2001). Richardson et al. (2007) berichteten über die Detektion von $[M+H]^+$ mittels LC-ESI_{pos}-MS/MS, bei der gleichzeitig acht Verbindungen an einer amidierten C₈-Säule getrennt und im SRM-Modus erfasst worden sind. Die erzielten Nachweisgrenzen lagen beispielsweise für Anandamid, OEA und PEA bei 25 fmol (on-column) und für 2-AG bei 250 fmol (on-column). Dagegen erreichte die von Lam et al. etablierte LC-ESI-MS/MS-Technik mit Ultra-Hochdruck-Flüssigchromatographie (UPLC) eine Nachweisgrenze für Anandamid von 0.055 fmol (on-column) (Lam et al., 2008).

Durch die Anreicherung von Natrium-Ionen in der mobilen Phase werden Metallkationen-Addukte $[M+Na]^+$ generiert. Kozak et al. (2000) beschrieben dies bei Verwendung einer C₁₈-Säule, in der unter anderem $[M+Na]^+$ -Ionen von Prostaglandinglycerolen und Ethanolamiden entstehen. Diese Ionen wurden dann im SIM-Modus massenspektrometrisch erfasst.

Die Affinität von Silberionen (Ag^+) an π -Elektronen ist in der Lipidchemie schon lange bekannt (Belitz et al., 2001). Diese Eigenschaft nutzen Analytiker auch für die Ionisierung von Endocannabinoiden und verwandten Strukturen zu $[M+Ag]^+$ -Ionen, jedoch ist diese Art der Ionisierung aufgrund der Anlagerung von Ag^+ an eine Doppelbindung nur für ungesättigte Lipide möglich. Schreiber et al. (2007) verwendeten solch eine Ionisierungsart in ihrem LC-ESI-MS/MS-System für die Elution an einer C₁₈-Säule mit einem Fließmittel aus Silberacetat-Ionen. Die Detektion erfolgte im SRM-Modus. Die Ionisierung zu $[M+Ag]^+$ -Ionen von Anandamid und 2-AG wurde schon vor einiger Zeit mit Nachweisgrenzen von 14 und 13 fmol (on column) beschrieben (Kingsley und Marnett 2003).

NH_4^+ -Ionen werden oft für die Ionisierung von oxygenierten Metaboliten von Anandamid und 2-AG eingesetzt. Für die Analytik von Prostaglandinglyceriden und Prostaglandinen per LC-ESI_{pos}-MS/MS erfolgte die Trennung der Substanzen an einer RP₁₈-Säule mit einem Ammoniumacetatpuffergemisch. Die erzeugten $[M+NH_4]^+$ -Derivate wurden im SRM-Modus bestimmt. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 5 und 20 fmol (on column) (Kingsley et al., 2005).

Quantifizierung

Die Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA) oder die Quantifizierung über eine Standardkurve stellen die gängigen Quantifizierungsmethoden dar.

SIVA sind nur in massenspektrometrischen Systemen anwendbar. Dabei wird vor der Probenvorbereitung die Probe mit einem markierten Standard versetzt. Als Standard werden nur Substanzen verwendet, die dem zu analysierenden Analyten strukturell gleich, aber mit unterschiedlichen Isotopen versehen sind. Neben den üblicherweise deuterierten Isotopen kann ein Isotopenstandard auch aus ^{15}N oder ^{18}O beinhalten (Kingsley et al., 2009). Wenn ein entsprechendes Stabilisotop kommerziell nicht verfügbar ist, bietet sich dessen Synthese z.B. aus Vorstufen an. Beispielsweise wird deuteriertes Prostaglandin-E2-glycerin (PGE2-G-d5) durch die Kondensation von Prostaglandin-E2 (PGE) mit deuteriertem Glycerin synthetisiert (Kozak et al., 2000). Weiterhin sind Synthesewege für deuterierte NAEs und MAGs beschrieben (Schmid et al., 2000).

Für die Quantifizierung über eine Standardkurve wird bei massenspektrometrischen Methoden oft parallel zu einer Standardkurve ein markierter interner Standard mit in die Probe gegeben. Die Auswertung erfolgt durch den Vergleich des Ergebnisses des unbekanntes Analyten mit der Standardkurve. Für diese Art der Quantifizierung ist eine zusätzliche Standardaddition angebracht, jedoch wird dies in der Literatur selten beschrieben. Die Gründe hierfür sind wahrscheinlich in der limitierten Menge an Probenmaterial zu suchen (Kingsley et al., 2009).

2.5.2.3 Analytik von phosphoryliertem Anandamid (pAEA)

Die Identifizierung von pAEA als Vorstufe von Anandamid im Rattengehirn erfolgte via HPLC-ESI-MS/MS bei Verwendung einer C_{18} -Säule mit einem Fließmittelgemisch bestehend aus 0.1 % Ameisensäure in Wasser und Methanol. Die Quantifizierung erfolgte mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA), wobei $[\text{}^2\text{H}_4]$ -AEA als interner Standard eingesetzt wurde (Liu et al., 2006). Nach der Synthese von deuteriertem pAEA konnten genauere Quantifizierungen durchgeführt werden (Cheng et al., 2008).

2.5.2.4 Polare *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate

Die Analytik von polaren *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten (NAcEAP) wie *N*-Lactoyl-, *N*-Acetyl-, *N*-Benzoyl- und *N*-Gluconyl-Ethanolaminphosphat ist in der Literatur nicht beschrieben.

2.5.2.5 *N*-Acyl-Ethanolamine

N-Lactoyl-Ethanolamin (NLEA) (Abb. 2. 14) wurde als geschmacksmodulierende Substanz in Beerenausleseweinen entdeckt. Die entwickelte LC-ESI_{pos}-MS/MS-Technik basiert auf der Trennung an einer C₁₈-Säule mit einem Ammoniumformiatpuffer/Acetonitril-Gemisch mit anschließender Detektion der Ionen im SRM-Modus. Es wurde eine Nachweisgrenze im SIM-Modus von 3 µg/L angegeben. Die Quantifizierung erfolgte über externe Kalibrierung mit NLEA (de Rijke et al., 2006).

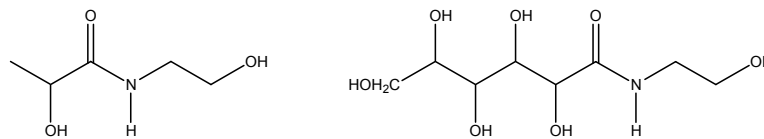


Abb. 2. 14 *N*-Lactoyl-Ethanolamin (links) und *N*-Gluconyl-Ethanolamin (rechts).

Auch *N*-Gluconyl-Ethanolamin (NGEA) (Abb. 2. 14) hat man später in zwei Beerenausleseweinen identifiziert. Nach Trennung an einer C₁₈-Säule mit einem Ammoniumformiatpuffer/Acetonitril-Gemisch konnten durch Addition von Chloroform die Cl⁻Addukte des NGEA im ESI_{neg}-Modus per Ionenfallen-MS bestimmt werden. Im Vergleich zu den Messungen im ESI_{pos}-Modus erhöhte dies die Empfindlichkeit um ein Zehnfaches. Die Nachweisgrenzen lagen ohne Cl⁻-Anlagerung bei 0.2 mg/L (Fullscan) und 0.025 mg/L (MS/MS), mit Cl⁻-Anlagerung bei 0.02 und 0.0025 mg/L (de Rijke et al., 2007; de Rijke et al., 2008).

2.5.2.6 Analytik strukturähnlicher polarer Verbindungen

2.5.2.6.1 *N*-Acetyl-L-glutaminsäure

Für die Analytik von *N*-Acetyl-L-glutaminsäure (NACG) sind in der Literatur eine Reihe von Analysenverfahren beschrieben. Dazu gehören RP-HPLC-Techniken mit Fluoreszenzdetektion durch enzymatische Deacylierung und anschließende Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (Nachweisgrenze 5 pmol) (Alonso und Rubio 1985) und die Analytik mittels Ionenpaarreagenz (Tetrabutyl-ammoniumhydroxid) per HPLC/UV-Detektion bei 210 nm (Nachweisgrenze 10 pmol) (Tavazzi et al., 2000). Die GC-MS-Analytik von NACG erfolgte nach Silylierung mit BSTFA/TMCS im SIM-Modus (Nachweisgrenze 3.5 ng) (Tuchman und Holzknicht 1990), HPLC-APCI-MS-

Messungen im positiven Modus $[M+H]^+$ (Nachweisgrenze 15 $\mu\text{g/mL}$) (Ma et al., 1999) und die Bestimmung von NAcG mittels HPLC-ESI-MS/MS mit einer Nachweisgrenze von 0.3 ng/mL (Hession et al., 2008).

2.6 Enzyme

Wie einleitend ausgeführt wurde, sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit für „Bioaktivitätsstudien“ einige Enzymversuche unter Anwendung von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten durchgeführt worden. Auf die entsprechenden Enzyme wird nachfolgend kurz eingegangen.

2.6.1 Alkalische Phosphatase

Phosphatasen sind im allgemeinen Enzyme, welche die Hydrolyse von Phosphorsäureestern oder organischen Phosphorverbindungen katalysieren. Somit werden sie in die Klasse der Hydrolasen (EC 3), spezieller den Esterasen (EC 3.1), zugeordnet. Phosphatasen kommen als Isoenzyme mit Molmassen zwischen 10000 und 100000 Da vor. Die monomeren und dimeren Enzyme weisen geringe Substratspezifität auf und werden anhand ihres pH-Optimums eingeteilt. Von besonderer Bedeutung ist neben der alkalischen Phosphatase (AP) (EC 3.1.3.1) die saure Phosphatase (EC 3.1.3.2). Die AP besteht aus drei genetisch determinierten Isoenzymen. Im Organismus des Menschen unterscheidet man Leber-, Nieren-, Knochen-, Darm- und Plazenta-AP. Außerdem existieren postgenetische Formen wie Gallengang- und Tumor-AP.

AP sind membrangebundene Enzyme, die im aktiven Zentrum Zink enthalten und für ihre Wirkung Magnesium benötigen (Römpp M-Pk, 1995; Neumeister et al., 1998).

Die Hydrolysereaktion von Phosphorsäureestern im aktiven Zentrum der alkalischen Phosphatase ist in Abb. 2. 15 dargestellt. Das Zink-(II)-Ionenpaar dient zur Bindung einer terminalen Phosphorgruppe. Durch den Angriff einer Serin-Hydroxylgruppe an die Phosphorylgruppe kommt es durch Bildung eines Phosphoserinrestes zur Übertragung der Phosphatgruppe auf das Enzym (s. b in Abb. 2. 15). Im nächsten Schritt (s. c in Abb. 2. 15) kommt es zur Hydrolyse des Phosphoserinrestes durch ein koordiniertes Hydroxidion, wodurch der katalytische Zyklus geschlossen wird (Lippard und Berg 1995).

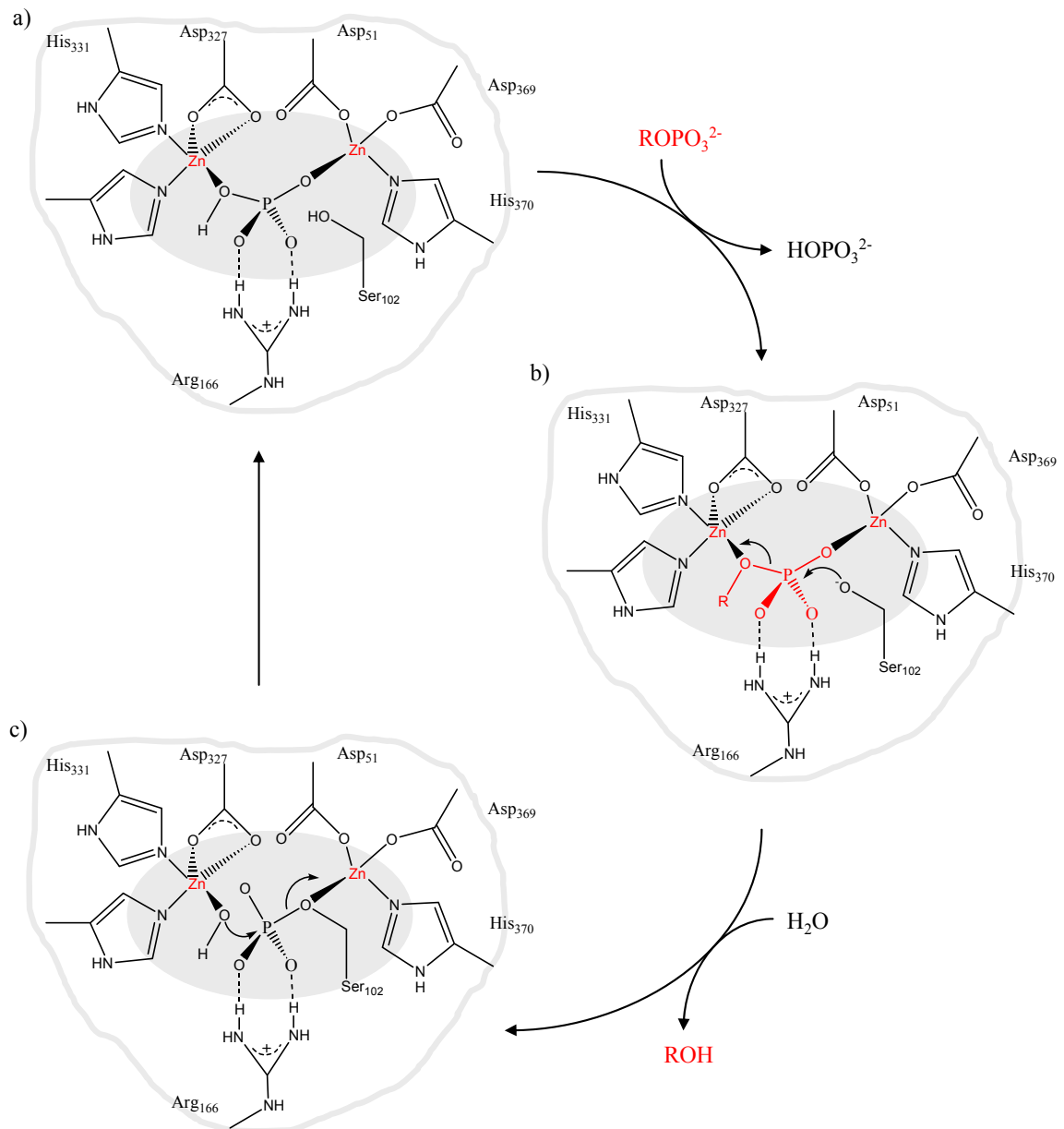


Abb. 2.15 Alkalische Phosphatase: Darstellung des aktiven Zentrums. Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern, modifiziert nach Lippard und Berg 1995.

Die AP ist an der Mineralisierung der Knochen beteiligt und kommt in den Osteoblasten vor. Die Hälfte der Gesamt-AP stammt aus den Knochen (bonespecific-AP), der Rest aus der Leber. Erkrankungen mit erhöhten AP-Werten sind unter anderem primäre Lebertumoren oder Skeletterkrankungen wie Rachitis oder Osteomalazie. Niedrige AP-Werte kommen z.B. bei Unterernährung, familiärer Hypophosphatasämie oder Hypothyreose vor (Thomas 1998).

Die AP ist hitzelabil und wird aus diesem Grund in der Lebensmittelchemie als Marker einer Erhitzung (z.B. von Milch) verwendet (Belitz et al., 2001).

2.6.2 PhospholipaseA₂, Lipoxygenase und Eicosanoide

2.6.2.1 PhospholipaseA₂

Die PhospholipaseA₂ (PLA₂) gehört in die Enzymklasse der Hydrolasen (EC 3.1.1.4) (Römpp M-Pk, 1995). PLA₂ leitet den Phospholipidabbau durch hydrolytische Spaltung der Fettsäure am C-Atom 2 (β -C-Atom) des Glycerins ein (s. Abb. 2. 17). Durch die Hydrolyse von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem der Arachidonsäure, initiiert die PLA₂ die Bildung von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen in tierischen Geweben. Diese Substanzen werden auch unter dem Begriff der Eicosanoide zusammengefasst (Rehner und Daniel 2002).

2.6.2.2 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOX) (EC 1.13.11.12) sind Dioxygenasen, die unter Beteiligung von Luftsauerstoff selektiv ungesättigte Fettsäuren mit einem 1-cis-4,-cis-Pentadiensystem zu Monohydroperoxiden umsetzen. Im aktiven Zentrum besitzen sie ein nicht-Häm-gebundenes-Eisen²⁺-Atom (inaktives Enzym), welches im Verlauf der Katalyse durch sein eigenes Hydroperoxid-Produkt zum Eisen³⁺ (aktives Enzym) oxidiert wird. Typische Substrate pflanzlicher LOX sind Linol- und Linolensäure. Tierische bzw. menschliche LOX bevorzugen Arachidonsäure als Substrat. Die LOX-Katalyse erfolgt regio- und stereoselektiv, so dass beispielsweise die LOX aus Tomaten 9-S-Hydroperoxid und das Enzym aus Sojabohnen 13-S-Hydroperoxid bilden (Belitz et al., 2001; Eisenbrand und Schreier A-L 2006).

Das von De Grooter et al. (1975) schon vor Jahren präsentierte Reaktionsschema für die Aktivierung der LOX und ihre katalytische Aktivität gemäß einem Radikalmechanismus (unter aeroben und anaeroben Bedingungen) hat Eingang in die Lehrbücher gefunden (Abb. 2. 16):

Aerobe Katalyse (Dioxygenase-Reaktion):

1. Enzymaktivierung: Hydroperoxide oxidieren das nicht-Häm-gebundene Fe²⁺ der LOX in die aktive Fe³⁺-Form.
2. H-Abstraktion und Oxidation zum H⁺ aus der Methylgruppe des 1,4-Pentadiensystems des Substrats (z.B. Linolsäure). LOX wird in die inaktive Fe²⁺-Form reduziert.

3. Umlagerung des enzymgebundenen Pentadienylradikals in ein konjugiertes Dien-system und Aufnahme von Sauerstoff. Ein Peroxyradikal entsteht.
4. Das Peroxyradikal wird durch die LOX reduziert. Oxidation LOX-Fe^{2+} in Fe^{3+} .
5. Freisetzung von Hydroperoxid nach H^+ -Anlagerung.

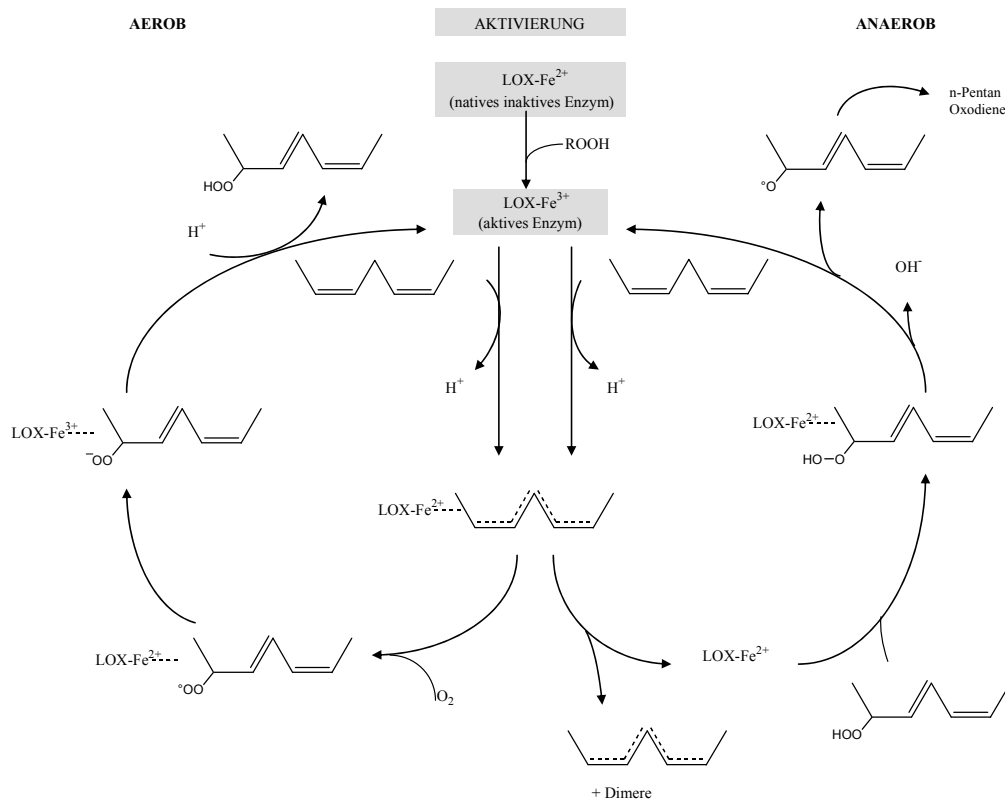


Abb. 2.16 LOX Aktivierung und katalytische Aktivität bei Fettsäuren unter aeroben und anaeroben Bedingungen, modifiziert nach De Groot et al., 1975.

Anaerobe Katalyse (Hydroperoxidase-reaktion):

1. Enzymaktivierung: Hydroperoxide oxidieren das nicht-Häm-gebundene LOX-Fe^{2+} in die aktive Fe^{3+} -Form.
2. H-Abstraktion und Oxidation zum H^+ aus der Methylgruppe des 1,4-Pentadiensystems des Substrats (z.B. Linolsäure). LOX wird in die inaktive Fe^{2+} -Form reduziert.
3. Dissoziation des Enzym-Fettsäureradikal-Komplexes. Fettsäureradikale, Dimere der Fettsäureradikale und inaktive LOX (Fe^{2+}) entstehen.
4. Enzymaktivierung: Hydroperoxide oxidieren das nicht-Häm-gebundene LOX-Fe^{2+} zur aktiven Fe^{3+} -Form. Hydroxyionen und Alkoxyradikale werden gebildet, welche zu Oxodienen und n-Pentan zerfallen können (De Groot et al., 1975; Garssen et al., 1971; Belitz et al., 2001).

2.6.2.2.1 Biologische Funktion der Lipoxygenase und ihrer Produkte

Lipoxygenasen sind in eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionen involviert. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Synthese von biologischen Mediatoren, die für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Ein biologischer Mediator in der Pflanze ist beispielsweise die Jasmonsäure, die aus Linolensäure gebildet wird (Grechkin 1998). In Wirbeltieren wird die Synthese von Leukotrienen (Rehner und Daniel 2002) oder Lipoxinen (Serhan 1997) von LOX katalysiert.

Durch Peroxidationsreaktionen der LOX bei Membran-Lipiden entstehen Gemische aus Hydroperoxiden, die Veränderungen der Membranstruktur bewirken (Rapoport und Schewe 1985).

Die LOX-15 kann low-density-lipoprotein (LDL) oxidieren, wodurch sie die Entstehung von Arteriosklerose initiiert (Feinmark und Cornicelli 1997).

2.6.2.3 Eicosanoidbiosynthese und Funktionen der Eicosanoide im Organismus

Eicosanoide entstehen aus mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren, insbesondere der Arachidonsäure (Arachidonsäurekaskade) (Abb. 2. 17). Nach Hydrolyse der Arachidonsäure durch die PLA₂ aus z.B. Phosphatidylinositol wird die Reaktion der Eicosanoide durch die Cyclooxygenase oder die 5-Lipoxygenase katalysiert. Durch die Cyclooxygenase entsteht aus der Arachidonsäure im ersten Schritt das Prostaglandin H₂, woraus sich dann weitere Prostaglandine und Thromboxane ableiten lassen. Durch die Katalyse der 5-LOX entsteht das 5-Hydroperoxyeikosatetraenoat (5-HPTE), wovon sich dann die Leukotriene ableiten (Rehner und Daniel 2002).

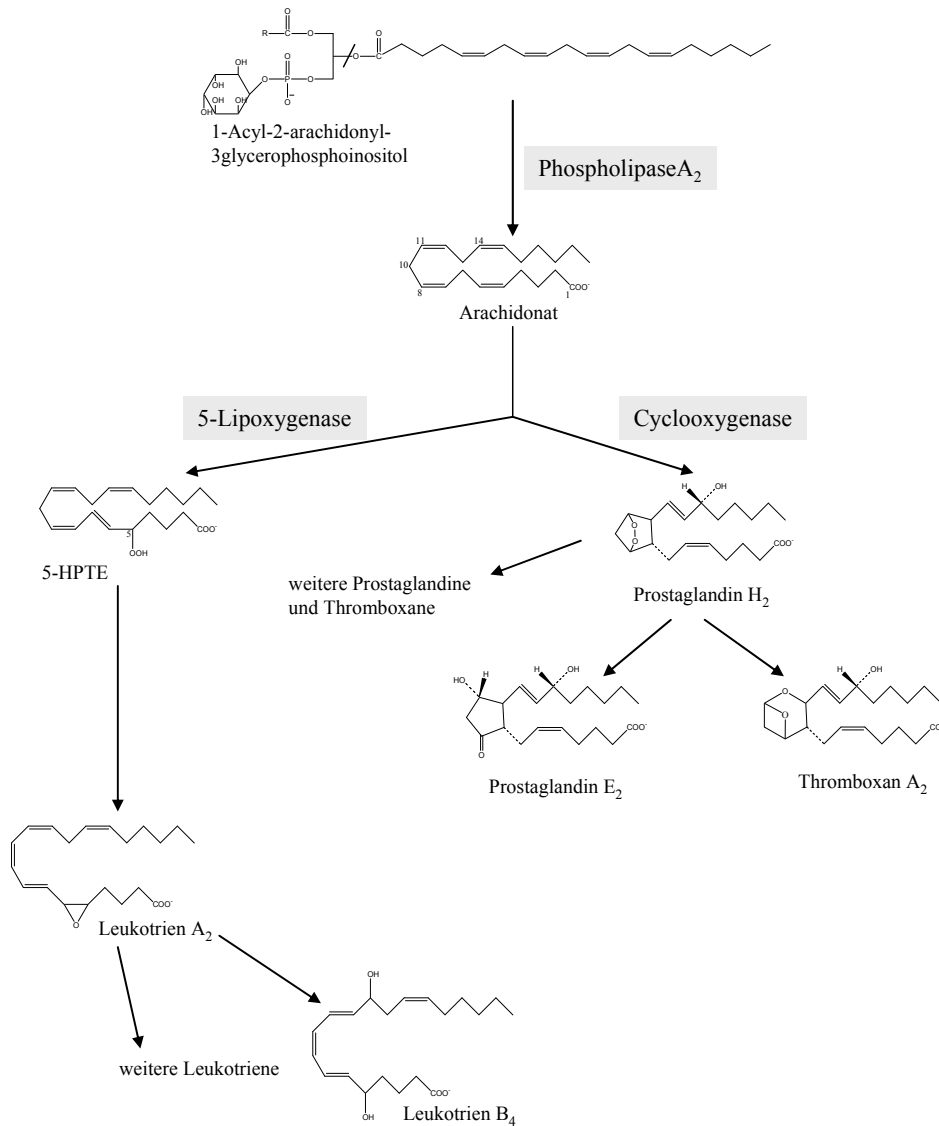


Abb. 2. 17 Schema Eicosanoidbiosynthese, modifiziert nach Rehner und Daniel 2002.

2.6.2.3.1 Physiologische Bedeutung der Eicosanoide

Eicosanoide sind Mediatoren, die hormonelle oder sonstige Signale modulieren. Die Synthese und Freisetzung der Eicosanoide ist auf neutrale Reize und andere Mediatoren wie z.B. Histamin und gastrointestinale Hormone (Bsp. Gastrin) zurückzuführen. Die biologische Wirkung der Eicosanoide ist bei weitem noch nicht geklärt. Ein einheitliches Wirkungsprinzip ist aufgrund der Komplexität nicht definierbar. Prostaglandine sind beispielsweise unter anderem auch für das Schmerzempfinden verantwortlich. In der Medizin werden daher Salicylate zur Blockierung der Prostaglandinsynthese verwendet (Rehner und Daniel 2002).

Erhöhte Werte von Leukotrienen werden unter anderem bei Erkrankungen der Lunge, bei Hautkrankheiten und entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt (Mayatepek und

Hoffmann 1995). Für die Behandlung von Asthma werden daher LOX-Inhibitoren oder Leukotrienrezeptor-Antagonisten eingesetzt, um die Leukotrienproduktion zu minimieren bzw. zu hemmen (Drazen et al., 1999).

2.6.3 Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase (XOD) gehört in die Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.17.3.2). Elektronenakzeptor der Enzymkatalyse ist Sauerstoff (O_2). XOD entsteht bei Sauerstoffarmut aus einer Xanthin-Dehydrogenase (XDH) (EC 1.1.1.204), die NAD^+ als Elektronen-Akzeptor verwendet (Eisenbrand und Schreier, M-Z 2006; Römpp T-Z, 1995).

XOD katalysiert die Spaltung einer C-H-Bindung mit Bildung einer C-OH-Bindung durch Sauerstofftransfer. Im Stoffwechsel ist die XOD in den Abbau von Purinnukleotiden involviert. Das beim Abbau der Purine entstehende Hypoxanthin wird durch XOD zu Xanthin und anschließend zu Harnsäure oxidiert, die renal ausgeschieden wird. Sauerstoff wird dabei in eine reaktive Sauerstoffspezies ($\cdot O_2^-$, Superoxidanionenradikal) (Abb. 2. 18) über einen Einelektronen-Reduktionsmechanismus überführt. Zwei Mol Superoxidanionenradikale können mit zwei Protonen durch die Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 reagieren (1), welcher anschließend durch Katalase in Wasser und Sauerstoff abgebaut wird (3) (Rehner und Daniel 2002; Stryer Biochemie, 2007).

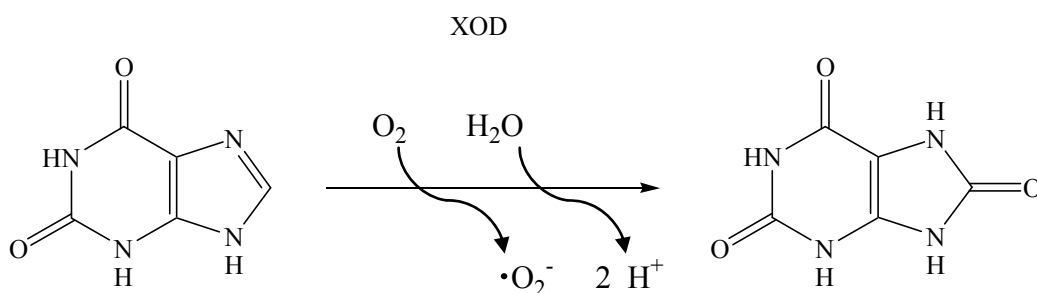
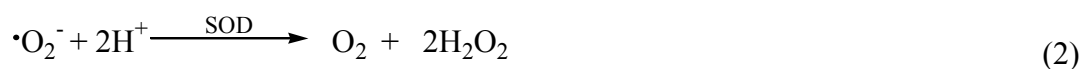


Abb. 2. 18 Abbau von Xanthin in Harnsäure. Entstehung von Superoxidradikalanion, modifiziert nach Rehner und Daniel 2002.



Enzyme der Xanthinoxidase-Familie besitzen einen Molybdänkern als $\text{Mo}^{\text{VI}}=\text{O}$, $=\text{S}$ -, OH und als Kofaktoren, Pyranopterin, FAD und zwei Schwefel-Eisen-Zentren [2-Fe-2S] des Ferredoxintyps, die an der Enzymkatalyse beteiligt sind (Hille 1996).

Die Hydroxylierungsreaktion der XOD erfolgt über die Molybdäneinheit und ist in Abb. 2. 19 dargestellt. Der Reaktionsmechanismus wird in folgende Schritte eingeteilt:

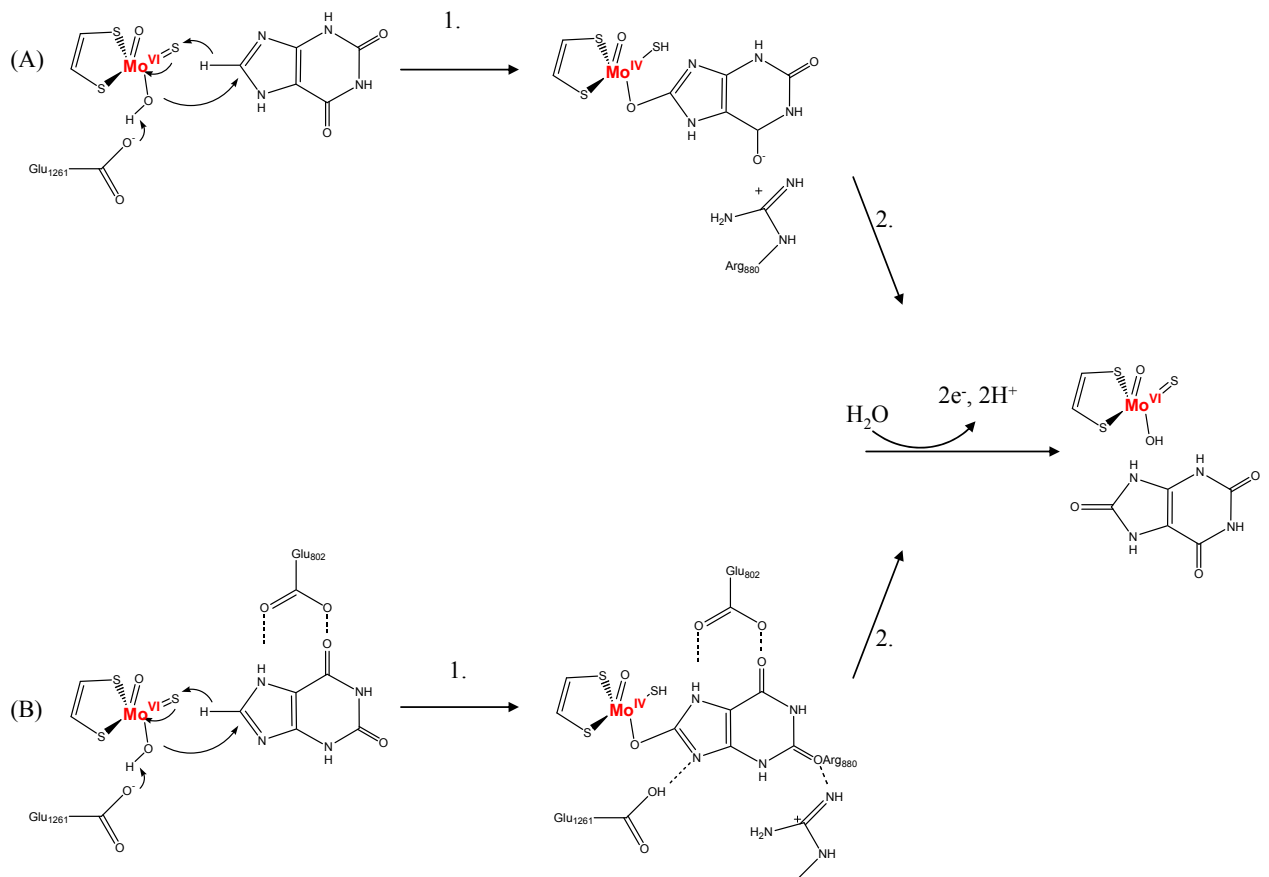


Abb. 2. 19 Reaktionsmechanismus der Xanthinoxidase. Substratbindungsmodelle im aktiven Zentrum nach (A) Pauff et al., 2007 und (B) Yamaguchi et al., 2007.

1. Reaktionsbeginn durch eine Basen-katalysierte Abstraktion eines Protons an der Mo-OH Gruppe durch Glutamat. Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff des Sauerstoffs auf das Substrat, begleitet von einem Wasserstofftransfer auf die Mo=S- Gruppe.

Die Bildung von Mo-SH führt zur Reduktion von Mo^{VI} in Mo^{IV} .

Für diesen Schritt der Substrathydroxylierung sind in der Literatur zwei mögliche Bindungsmodelle für das Substrat im aktiven Zentrum der Kuhmilch-XOD beschrieben, die jedoch keinen Unterschied im Reaktionsmechanismus ergeben:

- (A) Nach Pauff et al., 2007

(B) Nach Yamaguchi et al., 2007

2. Die Reaktion wird durch Elektronenübertragung von Molybdän an andere Redox-aktiven Zentren des Enzym und der Deprotonierung der $\text{Mo}^{\text{IV}}\text{-SH}$ Gruppe zu $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{=S}$ beendet. Harnsäure entsteht, wobei der Sauerstoff aus dem Wasser stammt.

Xanthinoxidase spielt eine wichtige Rolle als protektiver Regulator des Redoxpotentials der Zelle, da das Enzym sowohl für die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies als auch für die Entstehung antioxidativ wirkender Harnsäure verantwortlich ist. Harnsäure und deren Oxidationsprodukte wirken als potente Antioxidantien und Radikalfänger. Sie sind in der Lage, die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies und dadurch ausgelösten oxidativen Schäden zu schützen (Squadrito et al., 2000; Dröge 2002).

2.6.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies, physiologische Bedeutung *in vivo*

Das Superoxidanionradikal ($\bullet\text{O}_2^-$) zählt neben Hydroperoxyradikal ($\bullet\text{HO}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal ($\bullet\text{HO}$), Alkoxyradikal ($\bullet\text{RO}$), Peroxyradikalen ($\bullet\text{ROOH}$) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) zu der Gruppe der hoch reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxygen species“). Diese werden in jeder lebenden Zelle aus Sauerstoff gebildet (Eisenbrand und Schreier, M-Z 2006).

Die Abwehr der ROS kann, wie in Abschnitt 2.6.3 erläutert, durch Enzyme (SOD) oder durch antioxidativ wirkende Substanzen erfolgen. Dabei können diese endogenen Ursprungs sein (Glutathion, Harnsäure, Ubichinon u.a.) oder über die Nahrung aufgenommen werden (Ascorbinsäure, Carotinoide und Tocopherole) (Finkel und Holbrook 2000).

Man spricht von oxidativem Stress, wenn mehr reaktive Sauerstoffspezies als antioxidativ wirkende Enzyme oder Substanzen vorhanden sind. Dabei kann es zur Schädigung von DNA, Proteinen und Zellmembranlipiden kommen. Oxidativer Stress wird mit Stoffwechselstörungen bzw. verschiedenen Krankheitskomplexen in Verbindung gebracht. Dies sind unter anderem neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson, Down Syndrom und Alzheimer oder Herzkreislauf-Erkrankungen wie Arteriosklerose oder koronare Herzkrankheiten (Markesbery 1997; Valko et al., 2007).

Als „second messenger“ sind ROS im Stoffwechsel durch Redox-Reaktionen unter anderem in die Gentranskription, Signalübertragung in Zellen, Immunfunktion und Apoptose involviert (Valko et al., 2007).

2.6.3.2 Physiologische Bedeutung der Xanthinoxidase und Harnsäure *in vivo*

Xanthinoxidase

Der Mangel an XOD bewirkt eine Störung des Abbaus von Purinnucleotiden und die daraus entstehende Anreicherung von Hypoxanthin und Xanthin. Man spricht auch von Xanthinurie. Diese autosomal rezessive Fehlstörung führt zu Ablagerungen von Xanthinsteinen in der Niere und den ableitenden Harnwegen (Ichida et al., 1997).

Harnsäure

Hyperuricämie ist eine Erkrankung, die auf hohe Serum Harnsäure-Werte durch einen gestörten Purinabbau zurückzuführen ist. Man unterscheidet dabei zwei Formen: Die primäre (iodopathische) Form ist auf Enzymdefekte zurückzuführen, in der es zu Überaktivität wie z.B. der XOD kommt. Die sekundäre Form wird durch eine purinreiche Ernährung und bestimmte Medikamente verursacht (Becker und Jolly 2005).

Auf Einzelheiten braucht im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

2.6.4 β -N-Acetylhexosaminidase

Die β -N-Acetylhexosaminidase (AHA) (EC 3.2.1.52) gehört zu der Enzymklasse der Hydrolasen. Typische Substrate der AHA sind β -glykosidisch gebundene *N*-Acetylglucoside und *N*-Acetylgalactoside (Katalyse s. Abb. 2. 20) (Brenda Enzymes).

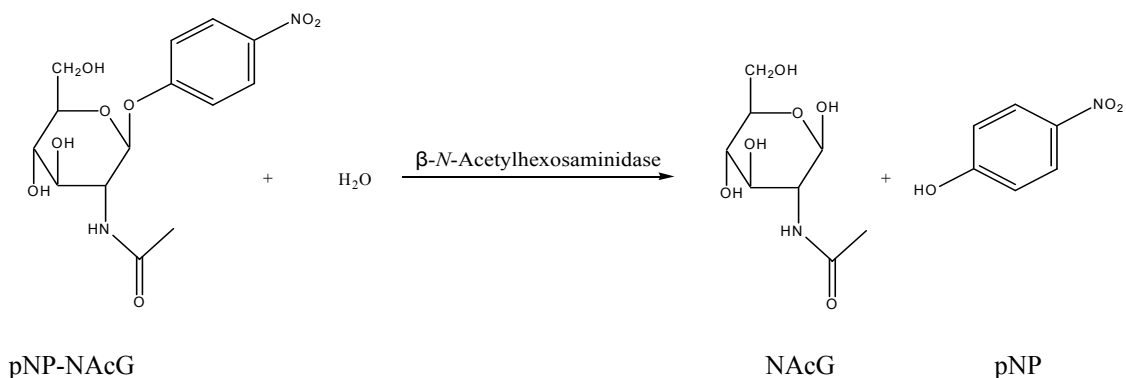


Abb. 2. 20 Schema: Enzymkatalyse der β -N-Acetylhexosaminidase. Substrat p-Nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamin (pNP-NAcG), Produkte p-Nitrophenol (pNP) und *N*-Acetyl- β -D-glucosamin (NAcG), modifiziert nach Borooah et al., 1961.

Drei Isoformen des dimeren Enzyms sind in der Literatur beschrieben: Die β -Hexosaminidase A (HexA), welches das Heterodimer der kovalent gebundenen α - und β -Kette darstellt, das homodimere Isoenzym β -Hexosaminidase B (HexB, $\beta\beta$) und die β -Hexosaminidase S (HexS, $\alpha\alpha$). Die α - und β -Untereinheiten sind zu 60 % in ihrer Primärstruktur identisch (Proia 1988). Trotzdem weisen die dimere HexA, HexB und HexS, welche jeweils zwei aktive Seiten in ihrer Untereinheit der Phasengrenzfläche besitzen, individuelle Substratspezifitäten auf. Die beiden aktiven Seiten des Homodimers HexB ($\beta\beta$) katalysieren die Spaltung ungeladener Substrate, dagegen können nur die α -Untereinheit enthaltenden HexA ($\alpha\beta$) und HexS ($\alpha\alpha$) zusätzlich die Spaltung negativ geladener Glukokonjugate bewirken (Kytzia und Sandhoff 1985).

Die Enzyme sind besonders wichtig beim Abbau von Glycerosphingolipiden, welche essentielle Membranbestandteile von Eukaryontenzellen sind (Kolter und Sandhoff 1999). Von den drei Isoenzymen ist nur das HexA in der Lage, das physiologisch bedeutendste Substrat, Gangliosid GM2, in signifikanten Raten abzubauen. Allerdings findet diese Reaktion an der Phasengrenze zwischen einer wasserlöslichen Exohydrolase und einem membraneingebauten Gangliosidsubstrat statt und benötigt einen Glykoproteinkofaktor, das GM2-Aktivatorprotein (GM2AP), als physiologisches Detergenz (Conzelmann und Sandhoff 1979). GM2AP wird auch als „Liftase“ bezeichnet, denn sie erkennt das Lipidsubstrat in der Membran und hebt sie daraus hervor, so dass das Enzym sie abbauen kann (Furst und Sandhoff 1992). Außerdem wird vermutet, das GM2AP die starre Konformation der Saccharid-Kopfgruppe am GM2 modifiziert, so dass die enzymatische Hydrolyse am N-terminalen Acetylgalactosamin erleichtert wird (Li et al., 1999).

Des Weiteren wird berichtet, dass die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen GM2 und der β -Hexosaminidase einen Einfluss auf den GM2-Abbau haben soll (Yadao et al., 1997; Xie et al., 1998).

Ein Defekt in einem der drei Polypeptide, welche in der Codierung des GM2-Abbaus, der Codierung der α - und β -Untereinheit der β -Hexosaminidase oder der GM2AP involviert sind, resultiert in einer Anreicherung von nicht abgebauten Glykolipiden in den lysosomalen Kompartimenten und führt dadurch zu schweren neurodegenerativen The-saurismosen, bekannt als GM2-Gangliosidose (Gravel et al., 2001; Kolter und Sandhoff 2006). Ein Defekt in der α -Kette resultiert in einem Defekt der HexA- und HexS-Funktion. Ein normaler oder leicht erhöhter Gehalt an HexB führt zur B-Variante einer GM2-Gangliosidose (Sandhoff 1969), sie wird beim Kind als „Tay-Sachs-Krankheit“

bezeichnet (Okada und O'Brien 1969). Die B1-Variante wird durch eine Nebenform HexA beschrieben, die keine Aktivität gegenüber dem neutralen Substrat Gangliosid GM2 oder einem negativ geladenen synthetischen Substrat (z.B. 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-6-sulfo- β -D-glucopyranosid (MUGS)) aufweist. Im Gegensatz dazu werden im Diagnoseversuch der B1-Variante ungeladene synthetische Substrate (z.B. 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (MUG)) gespalten (Kolter und Sandhoff 2006; Kytzia et al., 1983). Die 0-Variante, auch bekannt als „Sandhoff-Krankheit“, ist auf den Mangel der β -Kette und dem damit verbundenen Verlust der Aktivität von HexA und HexB zurückzuführen. Der Mangel an GM2AP führt zur AB-Variante der Gangliosidose, dabei sind normale Gehalte der β -Hexosaminidase zu finden (Conzelmann und Sandhoff 1978).

In der Literatur werden Therapieansätze für „Tay Sachs“- und „Sandhoff“-Erkrankungen unter anderem durch Einsatz von Substanzen, welche die Speicherung der Lipide im Zentralnervensystem verzögern, wie z.B. N-Butyldesoxyojirimycin (Platt et al., 1997), durch den Austausch von Enzym (Akeboshi et al., 2007) oder den Einsatz von chemischen Chaperonen (Tropak und Mauhran 2007) beschrieben.

2.7 Cannabinoid-Rezeptoren

Die Bezeichnung Cannabinoid-Rezeptor ist auf den ersten entdeckten Liganden aus der Pflanze *Cannabis sativa*, das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), zurückzuführen (Gaoni et al., 1964). Mit der Entdeckung des ersten Rezeptors CB₁ (Devane et al., 1988) ist das Interesse an der Forschung mit dem Cannabinoid-System geweckt worden. Auf der Suche nach endogen gebildeten Liganden entdeckte man das Anandamid (Devane et al., 1992) und weitere Strukturanaloga (siehe dazu Abschnitt 2.3.4.2.2).

Bis heute sind zwei Cannabinoid-Rezeptoren (CBR) CB₁ und CB₂ des Menschen beschrieben. Beide gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der CB₁-Rezeptor wird hauptsächlich im Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert (Matsuda et al., 1990), wo es durch die „lipid rafts“ wirkt (Bari et al., 2005). Der CB₁-Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle in der Neuroprotektion (Galve-Roperh et al., 2008) und auch bei der Nahrungsaufnahme (Richard et al., 2009).

Aufgrund der Erkenntnis, dass die Aktivität des Endocannabinoidsystems bei Adipositas erhöht ist, wird die pharmakologische Blockade als möglicher Ansatzpunkt zur Be-

handlung von Adipositas und ähnlichen metabolischen Funktionsstörungen angesehen (Di Marzo 2008).

Der CB₂-Rezeptor ist dagegen außerhalb des ZNS (Munro et al., 1993), d.h. hauptsächlich in den Zellen des Immunsystems zu finden, was auf eine Rolle in der Immunmodulation hinweist (Lynn und Herkenham 1994).

Im Jahr 2006 entdeckten Wissenschaftler einen Orphan-Rezeptor GPR55. Aufgrund ähnlicher Signaltransduktionswege wurde er als vermeintlicher CB-Rezeptor eingestuft (Baker et al., 2006). GPR55 wird durch einige CB-Liganden aktiviert, jedoch ist die Homologie der Aminosäuresequenz zu den beiden CBR sehr gering (Johns et al., 2007; Ryberg et al., 2007).

2.7.1.1 Aktivierung der CB-Rezeptoren

Wie erwähnt, gehören CBR in die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembran-Domänen und sind über ihre C-Terminale an G α i/o Protein gekoppelt. Signalübertragung über Gi führt zur Inhibierung der Adenylatcyclase in vielen Geweben und Zellen, jedoch sind auch Studien zur Stimulierung der Adenylatcyclase über Gs-Protein bekannt. Ca²⁺-Fluss und Stimulierung der Phospholipase A und C sind weitere Eigenschaften, die durch die Aktivierung des Rezeptors bewiesen sind. Stimulierung der beiden CBR führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinase (mitogen-activated-protein-Kinase) und der Jun N-terminalen Kinase (JNK). Diese leiten die Wege zur Regulation von nuklearen Transkriptionsfaktoren ein (Howlett 2005).

Vergleicht man die Aminosäuresequenz beider Rezeptoren (CB₁ und CB₂), so ist nur eine 48 %ige Übereinstimmung zu erkennen, wohingegen GPCR in der Regel 70 - 80 %ige Übereinstimmung zeigen (Howlett et al., 2002).

Im Gegensatz zu den klassischen Neurotransmittern wie Catecholamine werden die Endocannabinoide trotz ihrer Lipophilie nicht im Inneren synaptischer Vesikel gespeichert. Daraus lässt sich schließen, dass das Endocannabinoid-System nach Bedarf funktioniert, d.h. dass Endocannabinoide je nach physiologischer oder pathophysiologischer Stimulation synthetisiert werden (De Petrocellis et al., 2004).

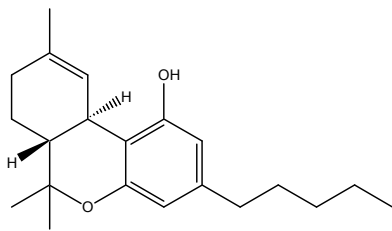
2.7.1.2 Liganden der CB₁-Rezeptoren

Die Liganden für den CB₁-Rezeptor sind sowohl strukturell als auch pharmakologisch unterschiedlich. Dabei gibt es Liganden mit agonistischer und antagonistischer bzw. invers-agonistischer Wirkung.

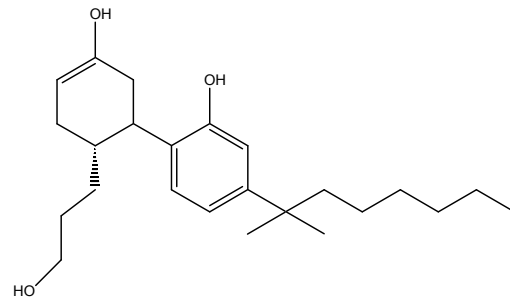
Agonisten des CB₁-Rezeptors

Die Agonisten werden aufgrund ihrer Struktur in vier Gruppen eingeteilt (Howlett et al., 2002; Pertwee 2006):

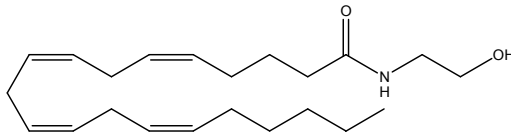
1. Klassische Cannabinoide (C.): natürliche Komponenten der Pflanze *Cannabis sativa* wie THC und seine strukturverwandten synthetischen Derivate (z.B. HU-210).
2. Nichtklassische C., welche den klassischen C. bis auf das Fehlen des Dihydropropanrings (z.B. CP940) ähneln.
3. Eicosanoide, Derivate der Arachidonsäure (z.B. AEA und 2-AG).
4. Aminoalkylindole z.B. WIN 55212-2 und verwandte Strukturen.



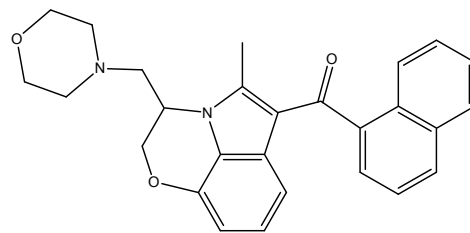
THC



HU-210



Anandamid



WIN 55212-2

Abb. 2. 21 Strukturformeln von CB₁-Agonisten.

Antagonisten bzw. inverse Agonisten des CB₁-Rezeptors

Die gängigste Gruppe von Antagonisten für CB₁-Rezeptoren sind die Diarylpyrazole, die sich deutlich von den vier Gruppen der Agonisten unterscheiden. Genauer werden

sie als inverse Agonisten eingeteilt. Rimonabant (SR141716) stellt den Prototyp dieser Verbindungsklasse dar (Howlett et al., 2002). Außerdem gibt es noch Antagonisten, die in ihrer Struktur den Agonisten ähneln, z.B. der neutrale Antagonist O-2050 (Garnder und Mallet 2006).

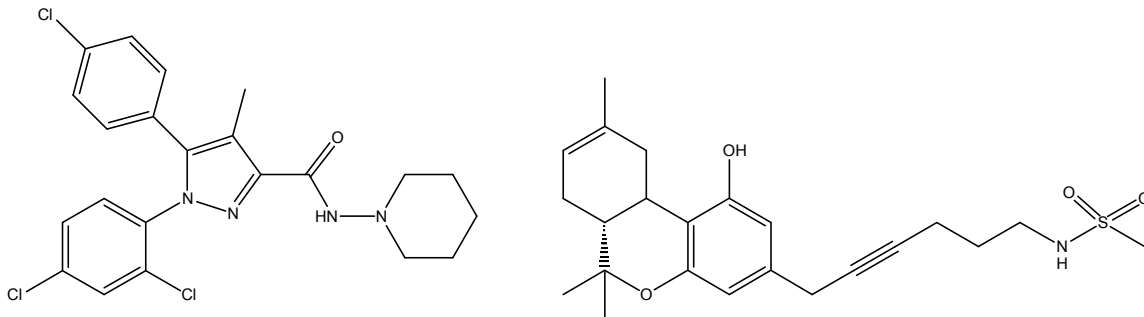


Abb. 2. 22 Strukturen des inversen Agonisten Rimonabant (links) und Antagonist O-2050 (rechts) des CB₁-Rezeptors, modifiziert nach Hudson et al., 2010.

Der inverse Agonist des CB₁-Rezeptors: Rimonabant

Rimonabant (SR141716) ist der als erstes beschriebene Antagonist, genauer inverse Agonist des CB₁-Rezeptors (Rinaldi-Carmona et al., 1994). In einer Reihe von klinischen Studien hat man die Aktivitätsschwächung des CB₁-Rezeptors und die dadurch resultierende signifikante Gewichtsreduktion und Verringerung des Hüftumfangs gezeigt. Weitere Auswirkungen der Rimonabantgabe waren die Verbesserung der Serumlipid-Werte und die Insulinregulation mit damit verbundener Kontrolle des Zuckerspiegels bei Patienten mit Typ 2-Diabetes (Van Gaal et al., 2005; Després et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006; Scheen et al., 2006). Allerdings führt die Behandlung mit Rimonabant zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, die man in drei Gruppen einteilen kann: (1) psychische Veränderungen, wie Depressionen, Angstzustände und Verwirrtheit; (2) Funktionsstörungen des Gastrointestinal-Trakts, die mit Brechreiz einhergehen; (3) neurologische Veränderungen wie Kopfschmerzen und Schwindelgefühl (Després et al., 2005; Ducobu und Sternon 2005; Gelfand und Cannon 2006). Am 13 Juni 2007 nahm demzufolge die U.S. Food and Drug Administration (FDA) aufgrund der hohen Risiken und der Suizidgefahr, die durch Rimonabant besteht, die Freigabe in den USA zurück (Food and Drug Administration, 2007). 2008 zog der Hersteller (Sanofi Aventis) Rimonabant vom europäischen Markt (Sanofi-Aventis, 2008).

2.8 Fermentation

Von den in dieser Arbeit untersuchten fermentierten Lebensmitteln sei nur kurz auf den japanischen Reiswein (Sake) als in westlichen Ländern eher exotisches Produkt eingegangen.

2.8.1 Herstellung von Japanischem Reiswein – Sake

Die Herstellung dieses alkoholischen Nationalgetränks hat eine über 2000 Jahre alte Tradition in Japan. Für die Gewinnung werden folgende Prozesse durchlaufen:

1. Polieren: Am Anfang der Sake-Herstellung wird der Reis poliert. Dies ist ein qualitätsbestimmender Schritt, denn dadurch werden die unerwünschten äußeren Schichten entfernt. Je stärker der Reis poliert wird, desto besser ist am Ende die Sakequalität. Das Polieren muss langsam und vorsichtig durchgeführt werden, damit der Reis nicht überhitzt wird und bricht.

2. Waschen und einweichen: Die Reiskörner werden anschließend mit Wasser gewaschen, um die Polierreste zu entfernen. Danach wird der Reis in Wasser eingeweicht, bis er die gewünschte Menge an Wasser aufgenommen hat.

3. Dämpfen: Am nächsten Tag wird der gequollene Reis zur Sterilisierung für 50 Minuten in einen kontinuierlichen Dämpfer gestellt. Der Reis soll anschließend eine feste Hülle haben und innen weich sein. Das macht ihn bereit für die spätere Einwirkung des Koji-Schimmels. Ein Teil des gedämpften Reises wird anschließend für die Herstellung des Koji-Schimmels verwendet, der Rest geht direkt in den Gärprozess ein.

4. Koji-Herstellung: Dies ist das Herzstück der Sakeherstellung. Die Koji-Herstellung dauert insgesamt zwei Tage und Nächte und hat großen Einfluss auf das Aromaprofil des Sake. Für die Koji-Herstellung wird ca. 20 % des vorher gedämpften Reises mit Koji-Sporen (*Aspergillus oryzae*) besprüht; dies geschieht in einem flachen Tunnel, dem „*toko*“. Dieser Schritt wird in einem bestimmten Koji-Kultur-Raum, dem „*Koji-muro*“, mit jeweils hoher Temperatur und Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Abends sammeln sich die Arbeiter um den *toko* und kneten den *Koji* sanft, um ihn aufzuweichen und sorgfältig zu mischen. Am nächsten Morgen (2. Tag) wird der *Koji* aus dem *toko* in eine Spezial-Box, den „*tana*“, überführt, an diesem Punkt erreicht der *Koji* seine Höchstleistung. Am Nachmittag wird der *Koji* auf einen erhitzten Tisch gegeben. Am Morgen des dritten Tages wird der gedämpfte *Koji* dem *Koji-muro* entnommen. Die Sake-Brauer geben den

Koji in langen, wirbelnden Reihen auf eine Ablage. Bei genauerem Hinsehen ist zu erkennen, wie der *Koji* die Reiskörner mit seinen kronenbesetzten Filamenten umwickelt hat. Die Filamente enthalten Enzyme, die Stärke in Glukose spalten. Der *Koji* ist nun für den Brauprozess am nächsten Tag bereit.

5. Startermaische (Shubo): Hierbei handelt es sich um die Einmischung des Getreidekorns. Der vorbereitete *Koji*, gedämpfter Reis und Wasser werden in einen Tank gegeben. Dann fügt man noch Milchsäure und ein reines Hefekonzentrat hinzu. Die Enzyme der *Koji* beginnen mit dem Stärkeabbau. Die Hefe verwendet die abgespaltene Glukose als Nahrung, und es kommt zur Vermehrung der Hefe. Dieser Abschnitt dauert 14 Tage.

Fermentation: Nach zwei Wochen im *Shubo* hat die Hefe den größten Anteil an Glukose umgesetzt. Der *Shubo* wird in einen größeren Tank umgefüllt und es wird nochmals *Koji*, gedämpfter Reis und Wasser hinzugefügt. Man nennt diese Mischung „*Maromi*“. Wenn das *Maromi* sein volles Volumen (2.5 t Reis, 4 t Wasser) erreicht hat, beginnt die Fermentation. Die Hefe bezieht neue Energie aus der erneut frei werdenden Glukose und beginnt Alkohol und die typischen Sake-Aromen und geschmacksgebenden Komponenten zu produzieren. Der wichtigste Faktor dieses Prozesses ist die Temperatur, die < 28 °C gehalten wird, was optimal für die Hefe und die Aromabildung des Sakes ist.

6. Auspressen: Nach ca. 21 bis 25 Tagen besitzt die *Maromi*-Maische zwischen 18 und 20 % Alkohol und das Aroma- und Geschmacksprofil ist voll entwickelt, so dass der Sake nun abgepresst werden kann. Durch Pressen bzw. Filtration wird der klare Sake erhalten.

7. Nachbehandlung: Bevor der Sake in Flaschen abgefüllt werden kann, wird noch vorhandener Bodensatz entfernt, erstmalig pasteurisiert, Wasser zugegeben, um den Alkoholgehalt einzustellen und dann in einem Tank gelagert. Je nach Sake-Qualität kann die Dauer der Lagerung 6 Monate bis 2 Jahre betragen (Römpp Pi-S 1995; Miyasaka Brewing Company, Ltd. 2010).

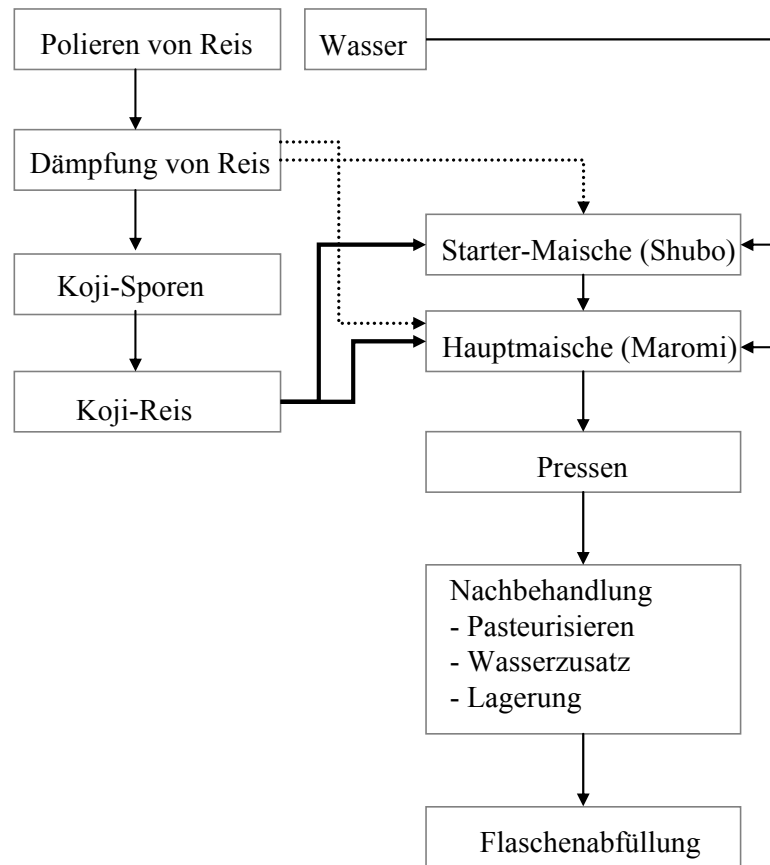


Abb. 2. 23 Schematische Darstellung der Herstellung von Sake.

Die Durchschnittswerte für die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe eines Sakes sind in Tab. 2. 1 dargestellt.

Tab. 2. 1 Inhaltsstoffe eines Sake. Nach Römpp Pi-S, 1995

Inhaltsstoff	Menge
Gesamtzucker (als Glukose)	4.2 g/100 mL
direkt vergärbarer Zucker (als Glukose)	3.46 g/100 mL
Gesamte organische Säuren	115.2 mg/100 mL
Glutaminsäure	20.2 mg/100 mL
Gesamt-Stickstoff	72.6 mg/100 mL
Formol-Stickstoff	28.8 mg/100 mL
Alkohol	15 Vol.-%

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 HPLC- ESI_{neg}-MS/MS-Analytik von Ethanolaminphosphat

Ethanolaminphosphat (**1**), Grundbaustein der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten NAcEAP-Derivate (**2 - 4**), wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC- ESI_{neg}-MS/MS) untersucht. Das Fragmentierungsmuster von (**1**) wurde als Referenz für die leichtere Identifizierung der NAcEAP-Derivate (**2 - 4**) verwendet, da für diese noch keine Literaturdaten bekannt sind.

EAP (**1**) wurde in Wasser gelöst und mittels HPLC- ESI_{neg}-MS/MS [140 @ 20 eV] (HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2) untersucht. Bei der ESI_{neg}-HPLC-MS/MS-Messung ergaben sich folgende Fragmente: m/z (%) 79.2 (100); 97.8 (3); 140.1 (10). Das Fragmentierungsmuster ist durch die Spaltung der Esterbindung zum Phosphatrest charakterisiert. Die Zuordnung der Fragmente ist im Massenspektrum in Abb. 3. 1 dargestellt.

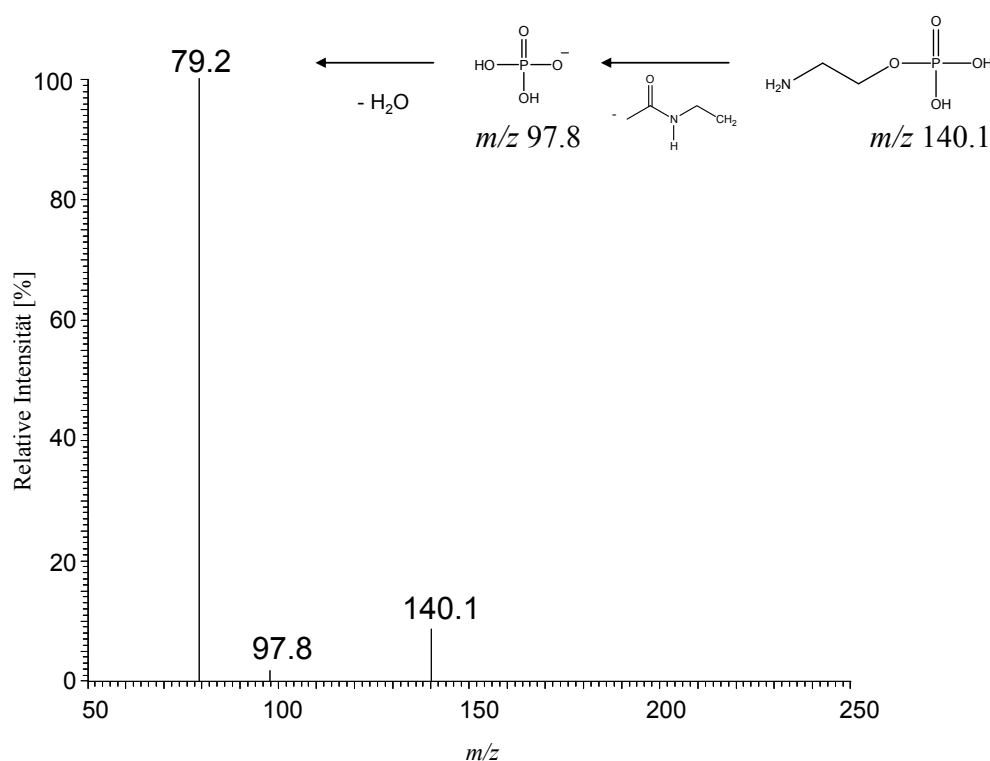


Abb. 3. 1 ESI_{neg}-HPLC-MS/MS-Spektrum von Ethanolaminphosphat (**1**) in Wasser. Zuordnung der m/z Fragmente. Precursorion ist m/z 140.1, Produktionsfragmente sind m/z 97.8 und m/z 79.2. m/z = Masse/Ladung. HPLC-ESI-MS/MS-Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2.

3.2 Synthese und Reinigung von *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat

3.2.1 Synthese von *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat

Die Synthese von *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (NAEAP) (**2**) erfolgte nach der Vorschrift von Cherbuliez und Rabinowitz (1956) mit Ethanolaminphosphat (**1**) und Acetanhydrid als Edukte. NAEAP (**2**) wird dabei als Bariumsalz gefällt. Die genaue Versuchsdurchführung ist im Abschnitt 4.3.2 zusammengefasst.

Anschließend wurde das Syntheseprodukt in Wasser gelöst und per Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-ESI_{neg}-MS) im Fullscan-Modus nach der *m/z* 182 von NAEAP (**2**) untersucht. Da sich *m/z* 182 detektieren liess, wurde zur eindeutigen Identifizierung das Syntheseprodukt weiter mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI_{neg}-MS/MS) [182 @ 20 eV] analysiert.

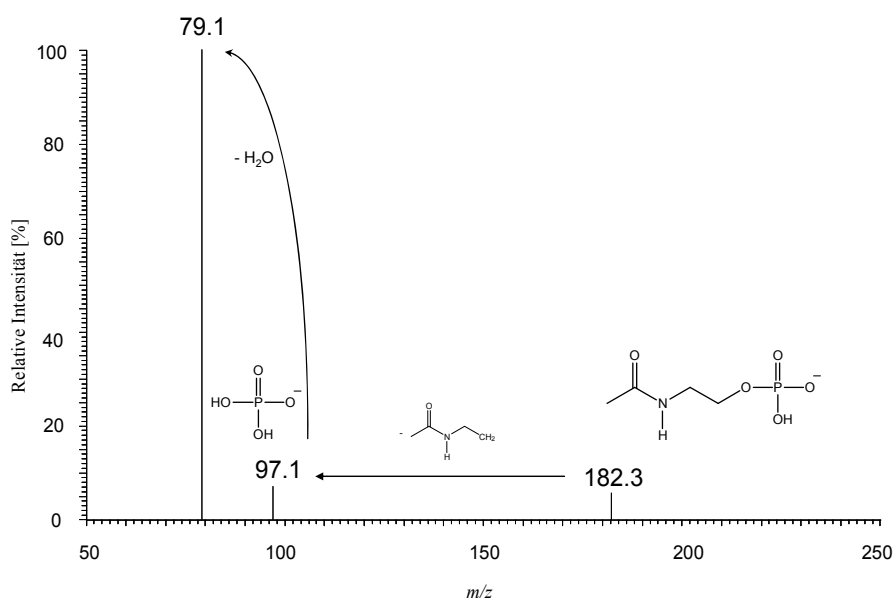


Abb. 3. 2 HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Spektrum von *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (**2**) nach Fragmentierung. Precursorion ist *m/z* 182.3, Produktionenfragmente sind *m/z* 97.1 und *m/z* 79.1. *m/z*= Masse/Ladung. HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2.

Bei der HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Messung ergaben sich folgende Fragmente: *m/z* [%] 79.1 (100); 97.1 (10), 182.3 (9) (Abb. 3. 2). Das MS-Spektrum ist bis auf unterschiedliche Precursorionen identisch mit dem MS-Spektrum von EAP (**1**) (Vergleich Abb. 3. 1), somit konnte massenspektrometrisch NAEAP (**2**) identifiziert werden, woraus sich der Syntheseweg nach Cherbuliez und Rabinowitz als erfolgreich erwies. Die Reinheit des Syntheseprodukts wurde per HPLC-ESI_{neg}-MS bestimmt (HPLC Bedingungen siehe

4.2.2, HPLC System 2) (Cherbuliez und Rabinowitz 1956): Reinheit Syntheseprodukt NAEAP (**2**): 37 %

Für die Synthese wurde EAP (**1**) als Edukt eingesetzt, dieses war als Hauptverunreinigung im Syntheseprodukt zu finden. Eine Reinheit von 37 % war nicht ausreichend zur Durchführung weiterer Untersuchungen mit NAEAP (**2**), somit wurde eine geeignete Reinigungsmethode etabliert (Abschnitt 3.2.2).

3.2.2 LC-Reinigung mittels Ionenaustausch

NAEAP (**2**) ist nur in Wasser sehr gut löslich, daher war die Verwendung von organischen Lösungsmitteln nicht möglich. Eine Reinigung mittels Kieselgelfraktionierung war aufgrund mangelnder Interaktion mit dem Säulenmaterial nicht anwendbar. Auch die präparative HPLC-UV war aufgrund fehlender UV-Aktivität von NAEAP (**2**) nicht durchführbar. Die Struktur von (**2**) erlaubte jedoch Wechselwirkungen mit ionischen Austauscherharzen. Die HPLC-MS/MS-Analyse hatte gezeigt, dass (**1**) als Hauptverunreinigung im Syntheseprodukt auftrat. EAP (**1**) besitzt im Gegensatz zu NAEAP (**2**) eine freie Aminogruppe (NH_2 -) und konnte somit als erstes über diese an eine Kationentauschersäule (Dowex[®] 50WX8) gebunden werden. NAEAP (**2**) besitzt dagegen keine freie NH_2 -Gruppe und eluierte in den Fraktionen „Probenaufgabe“ und „Waschen“. Die Reinigungsparameter sind in Kapitel 4.3.2 zusammengefasst.

Mit diesem Analysenschritt wurde die Reinheit von NAEAP (**2**) auf 76.7 % erhöht. (Kontrolle: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS, HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2).

In einem Folgeschritt wurde - unter Bindung an den Phosphatrest - über eine Anionentauschersäule (Dowex[®] 1X8) weiter aufgereinigt. Der genaue Ablauf ist in Kapitel 4.3.2 zusammengefasst. Hiermit ist schließlich ein Reinheitsgrad von 93.8 % (Kontrolle: HPLC-MS, HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2) erzielt worden.

3.3 Synthese und Reinigung von *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat

3.3.1 Methode nach Cherbuliez und Rabinowitz 1956

Die Synthese von *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (NBEAP) (**3**) wurde zunächst nach der Vorschrift von Cherbuliez und Rabinowitz (1956) (s. Kapitel 4.3.3) versucht, führte jedoch trotz mehrfacher Wiederholung jeweils nur zu Spuren an (**3**). Den möglichen Ursachen wurde nicht weiter nachgegangen.

3.3.2 Methode mit Benzoylchlorid und Triethylamin in Tetrahydrofuran

Alternativ wurde für die Synthese von NBEAP (**3**) eine Estersynthese von Aminen mit Alkanoylchloriden zu Amiden durchgeführt (Abb. 3. 1). Dazu wurde die Reaktion von Ethanolaminphosphat (**1**) mit Benzoylchlorid und Triethylamin in Tetrahydrofuran (THF) gewählt (s. Kapitel 4.3.3). Triethylamin erfüllt die Funktion als Base, um frei werdendes HCl zu neutralisieren, wobei THF als Lösungsmittel dient (Vollhardt und Schore 1995). Dieser Weg führte zum gewünschten Produkt (**3**) (Kontrolle: HPLC-ESI_{neg}-MS und HPLC-ESI_{neg}-MS/MS [244 @ 20 eV]; HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2).

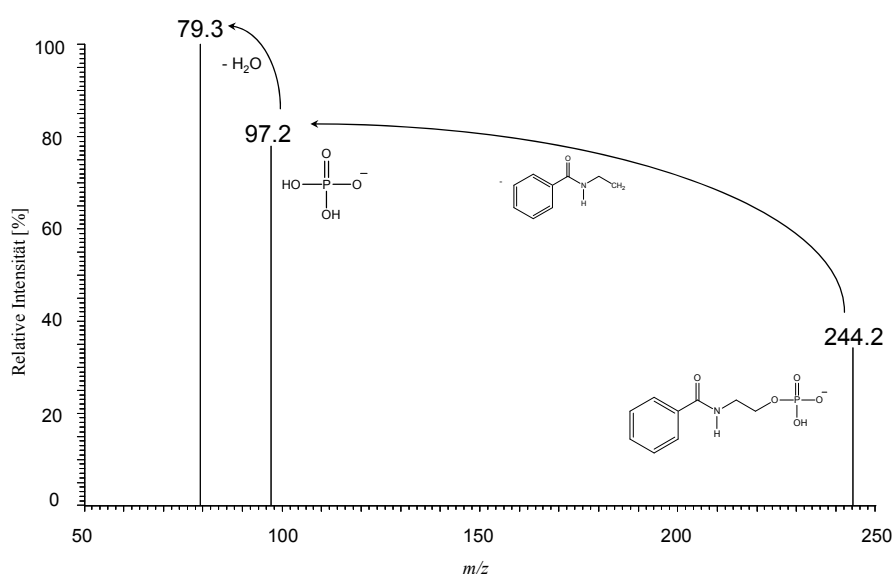


Abb. 3. 3 HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Spektrum von *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**) nach Fragmentierung. Precursorion ist m/z 244.2, Produktionsfragmente sind m/z 97.1 und m/z 79.1. m/z = Masse/Ladung. HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2.

Bei der HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Messung ergaben sich folgende Fragmente: m/z (%) 79.1 (100); 97.1 (80), 244.2 (40) (Abb. 3. 3). Das MS-Spektrum war bis auf unterschiedliche Precursorionen vergleichbar mit demjenigen von EAP (**1**) (Abb. 3. 1) und NAEAP (**2**) (Abb. 3. 2). Allerdings lag die Reinheit von NBEAP (**3**) bei nur 10 %; wie bereits bei der Synthese von NAEAP (**2**) war EAP (**1**) Hauptprodukt.

3.3.3 Reinigung von *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat mittels präparativer HPLC

Aufgrund der Benzoylgruppe war eine Reinigung mittels präparativer HPLC (HPLC Bedingungen siehe 4.2.1, HPLC System 1) prinzipiell möglich, jedoch erwies sich die-

ses Vorgehen als sehr uneffektiv, da nach 20 HPLC-Läufen die Ausbeute bei nur 1-2 mg (**3**) lag. Aufgrund des damit verbundenen hohen Zeitaufwands und des enormen Verbrauchs an Lösungsmitteln wurde im Folgenden analog zur Reinigung von NAEAP (**2**) vorgegangen (siehe 3.3.4).

3.3.4 LC-Reinigung mittels Ionenaustausch

Das Syntheseprodukt NBEAP (**3**) wurde über eine Kationentauschersäule gereinigt (Prinzip siehe 3.2.2). Die Aufreinigung ist in Kapitel 4.3.3 beschrieben und führte zu einer Reinheit von 90.1 %.

3.3.5 Reinigung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat mittels Festphasenextraktion (SPE)

N-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (NLEAP) (**4**) war als Industriespende im Labor vorhanden. Die HPLC-ESI_{neg}-MS-Analyse (HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2) ergab, dass im Produkt neben m/z 212 für NLEAP (**4**) auch eine Verunreinigung mit m/z 327 vorlag (s. Abb. 3. 4).

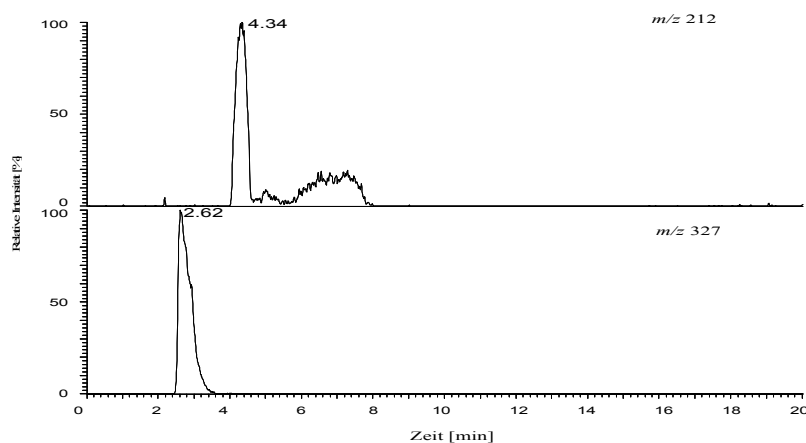


Abb. 3. 4 HPLC-ESI_{neg}-MS-Chromatogramm von uns verfügbarem *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**). m/z = Masse/Ladung. HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 3.

Zu deren Charakterisierung wurden HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Messungen durchgeführt (HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 3). Das MS-Spektrum und die Zuordnung der Fragmente ist in Abb. 3. 5 dargestellt. Folgende Fragmente waren im Spektrum enthalten: m/z (%) 79.2 (60); 97.2 (18); 212.2 (100); 327.3 (12). Das Fragmenten-

tierungsmuster (m/z 327, 212, 97, 79) deutet auf eine ähnliche Struktur wie NLEAP (**4**) hin, da es die für NAcEAP (**2** - **4**) typischen Fragmente mit m/z 97 und 79 aufweist. Das Molekül mit m/z 327 ist wahrscheinlich ein NLEAP (**4**) mit einem zweiten *N*-Lactoyl-Ethanolamin (**5**) am Phosphorsäurerest verknüpft, welches vermutlich als Nebenprodukt bei der Synthese von NLEAP (**4**) entstanden ist. Als Produktreinheit (**4**) wurden 39.6 % ermittelt, damit war auch in diesem Fall weitere Reinigung erforderlich.

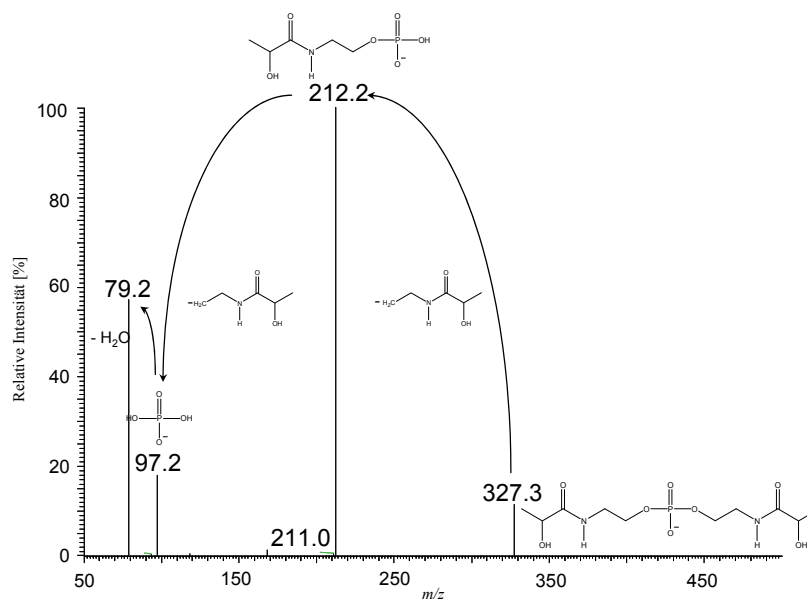


Abb. 3. 5 HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Spektrum von vermutlich *N*-di-Lactoyl-Ethanolaminphosphat nach Fragmentierung. Precursorion ist m/z 327.3, Produktionsfragmente sind m/z 212.2, m/z 97.1 und m/z 79.1. m/z = Masse/Ladung. HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2.

3.3.6 Reinigung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat mittels SPE-Anionentauscherkartuschen

Für die Reinigung von NLEAP (**4**) wurde nach dem vorgängig geschilderten Prinzip, d.h. unter Nutzung des Phosphorsäurerestes, wie bei NAEAP (**2**) (3.2.2) und NBEAP (**3**) (3.3.3), vorgegangen. Allerdings konnte in diesem Fall das stark basische Anionentauschermaterial Dowex[®] 1X8 nicht verwendet werden, da es sowohl NLEAP (**4**) als auch die Verunreinigung bindet. Demzufolge wurden schwache Anionentauscher-Festphasenkartuschen (Discovery[®] DSC-NH₂ SPE) eingesetzt. In Anlehnung an die drei pK_s-Werte (Abb. 3. 6) der Phosphorsäure (Riedel, 1999) wurde die Reinigung mittels SPE-Kartuschen durchgeführt.

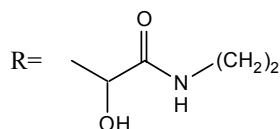
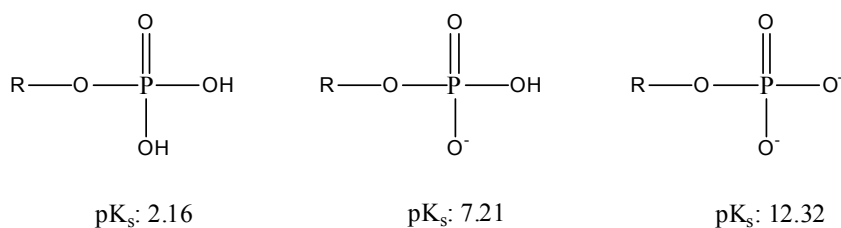


Abb. 3. 6 Protonierung am Phosphatrest von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**) in Anlehnung an pK_s -Werte der Phosphorsäure. Durchführung siehe 4.3.4.

Die Verunreinigung besitzt nur eine freie Hydroxylgruppe und um diese vollständig an das Anionentauschermaterial binden zu können, muss der pH-Wert über 12.32 (3. pK_s -Wert der Phosphorsäure) liegen. Beim pH von 7.21 liegt die Verunreinigung protoniert vor und kann nicht an die Festphase binden. NLEAP (**4**) ist bei pH 7.21 deprotoniert, bindet an das Anionentauschermaterial und kann so von der Verunreinigung abgetrennt werden. Die genaue Durchführung der Reinigung von NLEAP (**4**) ist in Kapitel 4.3.4 zusammengefasst. Durch dieses Vorgehen ist für (**4**) ein Reinheitsgrad von 88.4 % erreicht worden (Kontrolle: HPLC-ESI_{neg}-MS mit folgenden Fragmenten im MS/MS-Spektrum: m/z (%) 79.2 (100); 97.2 (80); 212.2 (100)).

3.4 Analytik polarer *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate-Methodenentwicklung

In der Literatur ist, über die Analytik der themenrelevanten NAcEAP nichts bekannt. Die NAcEAP (**2 - 4**) weisen folgende Eigenschaften auf, welche maßgebend für ihre Analytik sind: polar; unlöslich in organischen Lösungsmitteln; UV-inaktiv; nichtflüchtig. Diese Charakteristika erschweren die Methodenentwicklung zur Analytik dieser Verbindungsklasse. Wenige Daten sind für ähnliche Strukturen bekannt:

Die Analytik von Ethanolaminphosphat (**1**) ist im Kenntnissstand (Abschnitt 2.5.1) bereits erläutert worden, an dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass zur Analyse von EAP (**1**) eine vorherige Derivatisierung nötig ist. Die meisten Modifizierungen erfolgen dabei am N-terminalen Ende. Die NH_2 -Gruppe ist jedoch bei den NAcEAP (**2 - 4**) bereits acyliert und kann somit nicht analog EAP (**1**) derivatisiert werden.

Ein weiteres Beispiel ähnlicher Strukturen sind die nicht phosphorylierten *N*-Acyl-Ethanolamine. *N*-Lactoyl-Ethanolamin (**5**) wurde beispielsweise in Rotwein mit einem Gehalt von 0.4 - 2.5 mg/L mittels LC-MS/MS identifiziert (de Rijke et al., 2006). *N*-Gluconyl-Ethanolamin hat man ebenfalls via LC-MS/MS in Rotwein mit Gehalten von 1.1 und 4 µg/L gefunden (de Rijke et al., 2007). Da der Phosphatrest einen beträchtlichen Einfluss auf die Polarität der NAcEAP (**2** - **4**) hat, ließ sich die Analytik der *N*-Acyl-Ethanolamine nicht auf die NAcEAP (**2** - **4**) übertragen.

Als weitere strukturverwandte Gruppe ist noch die einleitend bereits mehrfach erwähnte Klasse der *N*-Acyl-Fettsäuramide, wie z.B. Anandamid, zu nennen (s. 2.5.2). Diese Verbindungen haben jedoch eine apolare Struktur, so dass die hierfür etablierte Analytik ebenfalls nicht anwendbar war.

Demzufolge war zur Erfassung der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate (**2** - **4**), unter denen aufgrund des Vorkommens von (**5**) in Rotwein dessen phosphoryliertes Derivat (**4**) von besonderem Interesse war, eine neue Analytik zu entwickeln. Ein Ziel war es dabei insbesondere auch, eine möglichst niedrige Nachweisgrenze* zu erreichen, um anschließend die Detektion der potentiell in fermentierten Lebensmitteln vorkommenden NAcEAP (**2** - **4**) zu erleichtern.

Als Analysetechniken kamen die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS) und die Ionenchromatographie mit Leitfähigkeitsdetektion in Frage. Die Methodenentwicklung erfolgte mit der Verbindung (**4**).

3.4.1 Derivatisierungstechniken für die Gaschromatographie

Damit eine Verbindung gaschromatographisch erfasst werden kann, muss diese ausreichend flüchtig sein. Durch geeignete Derivatisierung lassen sich nichtflüchtige Verbindungen in GC-gängige umwandeln.

3.4.2 Derivatisierung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat

Die hohe Polarität von NLEAP (**4**) ist hauptsächlich auf den Phosphorsäurerest zurückzuführen. Daher stellen die Hydroxylgruppen am Phosphat den Ausgangspunkt der Derivatisierung von NLEAP (**4**) dar.

*Die Nachweisgrenze wird definiert als die kleinste Konzentration einer Verbindung, die mit einer Analysenmethode noch detektiert werden kann. Ein Signal/Rauschverhältnis von 3:1 gibt den Wert für die Nachweisgrenze an (Coleman et al., 2001). Die Bestimmungsgrenze dagegen wird definiert als die kleinste Konzentration mit welcher reproduzierbare Quantifikationen durchgeführt werden können. Sie wird als die doppelte Menge der Nachweisgrenze bestimmt (Hädrich und Vogelsang 1996).

3.4.2.1 Silylierung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat

Silylierungsreaktionen müssen in wasserfreiem Medium durchgeführt werden, da sonst das Silylierungsreagenz mit dem Wasser und nicht mit dem Zielmolekül reagiert. Da NLEAP (**4**) am besten in Wasser und Methanol löslich ist, musste ein alternatives organisches Lösungsmittel verwendet werden, welches nicht mit dem Silylierungsreagenz reagiert. Als geeignet erwies sich Pyridin, das als Lösungsmittel für die Silylierung eingeführt ist (Blau und Halket 1997).

Eine Vielzahl von Silylierungsreagenzien sind für Silylierungsreaktionen erhältlich. Für die Silylierung von NLEAP (**4**) wurden folgende Reagenzien verwendet: BSTFA (N,O-Bis[trimethylsilyl]rifluoracetamid), MBDSTFA (N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid), MSTFA (N-Methyl-N-trimethyl-silyl-trifluoracetamid), TMCS (Trimethylchlorsilan) und TSIM (N-Trimethylsilylimidazol) (Strukturen siehe Kapitel 4.1.1 Tab. 4. 1).

Nach Silylierung wurde per Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) (GC-MS Bedingungen siehe 4.2.4, HRGC-MS System 1) das Reaktionsgemisch festgelegt. Durch Variation der Reaktionszeit zwischen 30 min bis 4 h und Variation der Reaktionstemperatur (30 - 100 °C) wurden die optimalen Bedingungen untersucht. Längere Reaktionszeiten als 30 min und hohe Temperaturen zeigten keinen verbessernden Effekt (Daten nicht gezeigt) auf die Silylierung, so dass diese schließlich mit MSTFA bei 60 °C und 30 min durchgeführt wurde (Durchführung siehe Kapitel 4.3.5.1). Das erhaltene GC-MS-Spektrum ist in Abbildung Abb. 3. 7 dargestellt.

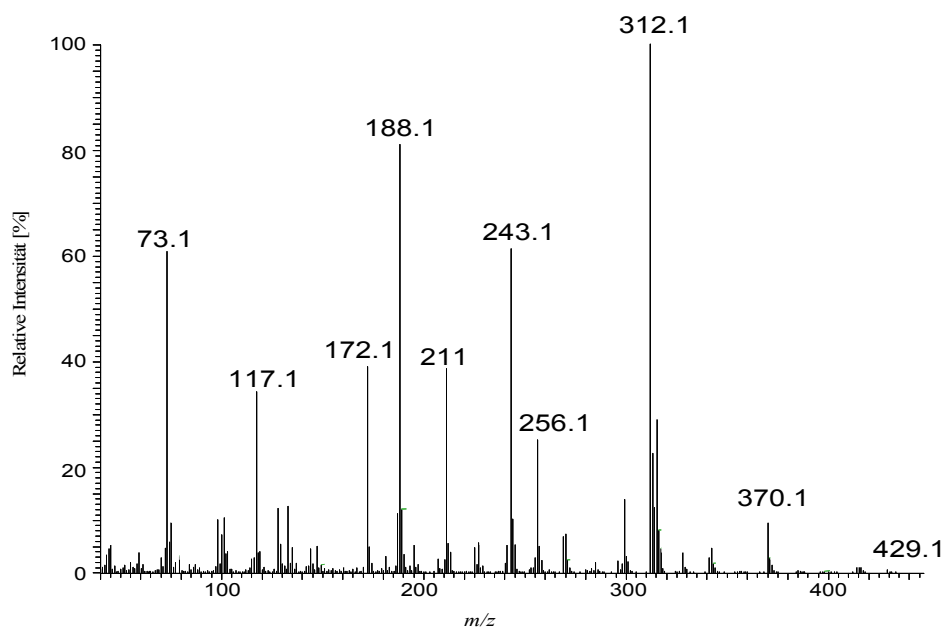


Abb. 3. 7 GC-MS-Spektrum von silyliertem *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**6**). Durchführung der Silylierung siehe 4.3.5.1. (GC-MS Bedingungen siehe 4.2.4, GC-MS System 1).

Folgende Fragmente sind im GC-MS-Spektrum vorhanden: m/z (%) 73.1 (60), 117.1 (35), 172.1 (40), 188.1 (85), 243.1 (62), 256.1 (27), 312.1 (100), 370.1 (10), 429.1 (2).

3.4.2.1.1 Identifizierung von Trimethylsilyl-*N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Abb. 3. 8 gibt einen Überblick über potentielle Strukturen der mittels GC-MS mit Elektronen-Ionisierung (EI) entstandenen Fragmente.

Das Elternion von Trimethylsilyl-NLEAP (**6**) ist m/z 429.1. Das Bruchstück m/z 211 ist das Fragmentation von NLEAP, m/z 73.1 ist ein typischer Trimethylsilyl-Rest (Waller, 1972). Durch eine α -Spaltung am Carbonyl-C-Atom (C=O) können die Fragmente mit m/z 117 und m/z 312 erklärt werden. Die Fragmente m/z 172 und m/z 257 sind ebenfalls in Abb. 3. 8 dargestellt.

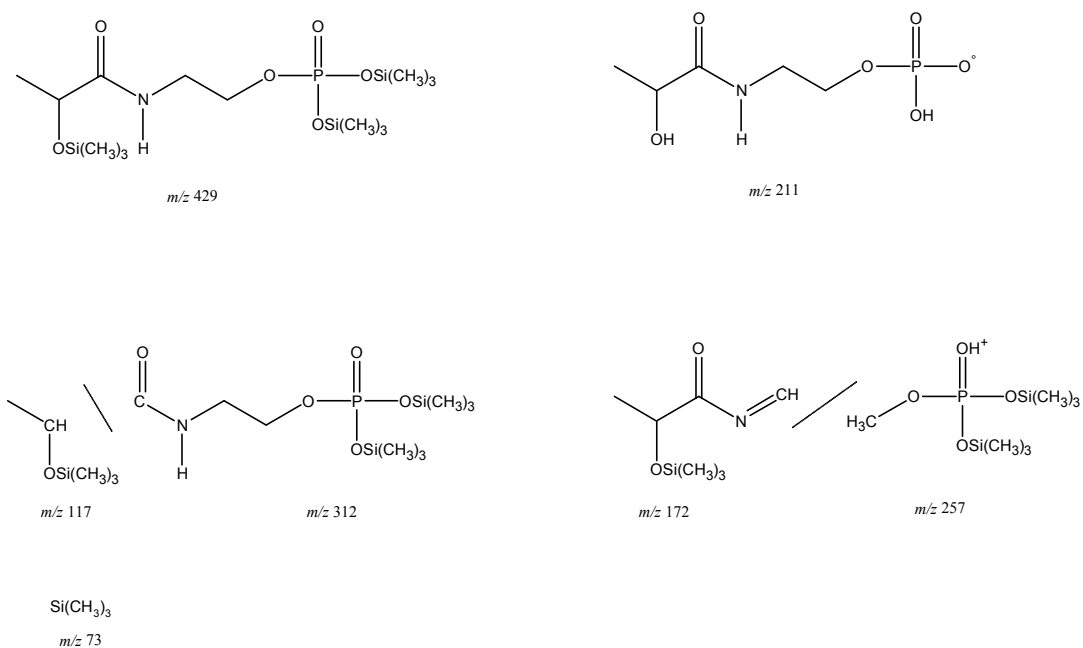


Abb. 3. 8 Mögliche Strukturen der Fragmente von Trimethylsilyl-*N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**6**) nach EI-Ionisierung (GC-MS).

Durch EI unterliegen Trimethylsilylderivate einer Vielzahl von intramolekularen Wanderungen und Umlagerungen (Draffan et al., 1968; Petersson et al., 1972a; Petersson et al., 1972b). Ein bekannter Umlagerungsmechanismus ist die nach McLafferty benannte

McLafferty-Umlagerung. Dabei kommt es zur Wanderung des γ -H-Atoms über einen sterisch günstigen Übergangszustand zu einer ungesättigten Gruppe (z.B. Carbonyl) mit einer β -Spaltung (McLafferty und Tureček 1993). In Abb. 3. 8 ist dies schematisch für Trimethylsilyl-NLEAP (**6**) dargestellt, wodurch m/z 243 und m/z 188 erklärt werden können (Abb. 3. 9) gezeigt.

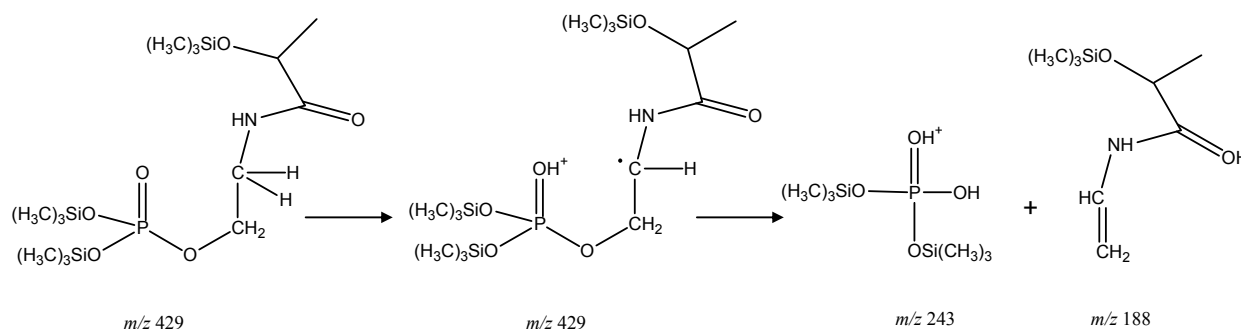


Abb. 3. 9 McLafferty-Umlagerung von Trimethylsilyl-N-Lactoyl-Ethanolaminophosphat (**6**).

3.4.2.1.2 Ermittlung der Nachweisgrenze von Trimethylsilyl-N-Lactoyl-Ethanolaminophosphat

Durch Silylierung war es demzufolge möglich, NLEAP (**4**) GC-gängig zu machen.

Die Ermittlung der NWG wurde über das Verhältnis von Peak zum Rauschen ermittelt: NWG für Trimethylsilyl-NLEAP (**6**): 54.2 mg/L

Der Grund für diesen hohen NWG-Wert dürfte in der geringen Löslichkeit von NLEAP in Pyridin liegen. Dieses unbefriedigende Ergebniss war vielfach reproduzierbar und schloß weitere Anstrengungen, die Silylierung als geeignete Derivatisierung von NLEAP (**4**) einzusetzen, aus.

3.4.2.2 Sonstige Derivatisierungen von N-Lactoyl-Ethanolaminophosphat

Zur Derivatisierung von NLEAP (**4**) wurden demzufolge weitere Derivatisierungsmöglichkeiten wie Methylierung, Acylierung und Benzylierung geprüft. (Durchführungen siehe Abschnitte 4.3.5.2 - 4.3.5.5).

Die Analytik dieser derivatisierten Ansätze mittels GC-MS (GC-MS Bedingungen siehe 4.2.4, GC-MS System 1) ergab trotz vielfacher Versuche keine entsprechenden derivatisierten Produkte von NLEAP (**4**). Auf eine Darstellung wurde dementsprechend verzichtet.

3.4.3 Flüssigchromatographie von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten

In der HPLC-Analytik werden meist sogenannte Umkehrphasen-Säulen (RP-Säulen, reversed phase) verwendet. Dreiviertel aller HPLC-Trennungen werden an Umkehrphasen durchgeführt (Skoog und Leary 1996).

Die Anwendung der Hydrophilen-Interaktions-Chromatographie (HILIC) mit sogenannten HILIC-Säulen ist für die Auftrennung polarer Verbindungen wie z.B. Aminosäuren (Kato et al., 2009) oder organische Säuren (Guo et al., 2007) in der Literatur bekannt. Im Folgenden wird die Analytik von EAP (**1**) und der NAcEAP-Derivate (**2 - 4**) mittels RP- und HILIC-Trennung und anschließender massenspektrometrischer Detektion behandelt.

3.4.3.1 Umkehrphasen-Flüssigchromatographie

Mit C18-Kohlenstoffketten modifiziertes Kieselgel stellt die stationäre Phase von RP₁₈-Säulen für die Flüssigkeitschromatographie dar (Skoog and Leary, 1996).

Es wurde untersucht, ob RP₁₈-Phasen für die Trennung von EAP (**1**) und den NAcEAP-Derivaten (**2 - 4**) geeignet ist. Das Fließmittel wurde mit einem Gradientensystem von organisch auf wässrige Zusammensetzung eingesetzt (HPLC Bedingungen siehe 4.2.2, HPLC System 2). Es zeigte sich, dass Ethanolaminphosphat (**1**) und die NAcEAP-Derivate (**2 - 4**) keine Retention an einer RP₁₈-Säule aufweisen. Offensichtlich waren aufgrund der hohen Polarität der untersuchten Verbindungen (**1 - 4**) keine Wechselwirkungen zwischen Analyt und der stationären Phase möglich, wodurch keine Retention der Verbindungen an einer RP₁₈-Phase zu verzeichnen war.

3.4.3.2 Hydrophile Interaktions-Chromatographie

Die Hydrophile-Interaktions-Chromatographie (HILIC) stellt eine Alternative zur Normal-Phasen (NP)-Chromatographie für stark polare Verbindungen dar. In der NP-Chromatographie werden nicht-wässrige Fließmittel verwendet (Skoog und Leary, 1996), im Gegensatz dazu setzt man für die Trennung an HILIC-Säulen Puffersysteme in Kombination mit einem organischen Lösungsmittel, meist Acetonitril, ein. Die stationäre Phase besteht bei HILIC-Säulen, ebenso wie bei flüssigkeitschromatographischen Normalphasen-Säulen, aus polaren Gruppen. Diese sind entweder an Silika oder an Polymere gebunden. Abb. 3.10 zeigt beispielhaft eine funktionelle

Gruppe vom Sulfobetain-Typ, die häufig in HILIC-Säulen zu finden ist. Die zwitterionische Struktur ist charakteristisch für das Trennprinzip der HILIC.

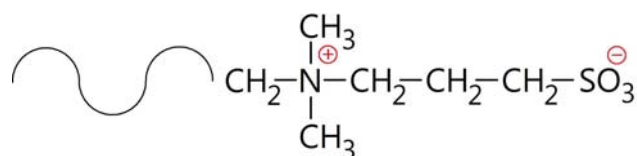


Abb. 3.10 Beispiel einer funktionellen Gruppe der stationären Phase einer HILIC-Säule: Sulfobetain Typ.

Die Hauptfunktion der stationären Phase in diesem Prozess ist es, Wasser zu binden. Durch die Migration polarer Verbindungen in diese extrem polare Phase werden diese auf der Säule zurückgehalten. Unpolare Substanzen werden dagegen aufgrund des jeweiligen unpolaren Anteils im Eluenten bevorzugt von der Säule eluiert. Das Trennprinzip der HILIC lässt sich demnach als Verteilungschromatographie zwischen einer stark polaren stationären und einer, je nach Methode, unterschiedlich stark unpolaren flüssigen Phase beschreiben. Es treten schwache elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den zu analysierenden Substanzen und den zwitterionischen funktionellen Gruppen der stationären Phase auf. Durch die Anwendung verschiedener Puffersysteme kann das Fließmittel auf einen für die zu trennenden Substanzen günstigen pH-Wert eingestellt werden, der je nach Säule im Bereich von 1 - 12 variieren kann (SeQuant™, 2008).

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften einer HILIC-Säule wurde diese zur Trennung der NAcEAP-Derivate (**2 - 4**) und EAP (**1**) eingesetzt. Für eine optimale Trennung der Verbindungen wurden die in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen HPLC-Parameter und HPLC System 3 gewählt.

In Abb. 3.11 sind die Spuren der m/z von EAP (**1**) und den drei NAcEAP-Derivaten (**2 - 4**) in einem HPLC-Esi_{neg}-MS-Chromatogramm gelegt. Im Vergleich zur RP-Phase trat hier Retention aller Substanzen auf. Man sieht deutlich, dass sich die drei Derivate untereinander und von EAP (**1**) trennen lassen.

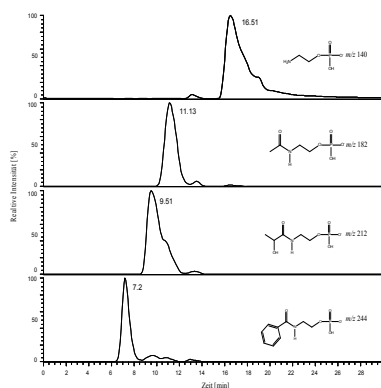
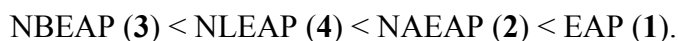


Abb. 3. 11 HPLC-MS-Chromatogramme von Ethanolaminphosphat (**1**), *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (**2**), *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**) und *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**). HPLC-Bedingungen 4.2.2, HPLC-System 3 und MS ESI_{neg} Detektion im SIM Modus *m/z* 140, 182, 212, 244. *m/z* Masse/Ladung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.6.1.

Folgende Elutionsreihe ergab sich für die analysierten Verbindungen:



EAP (**1**) zeigte demzufolge die stärkste Wechselwirkung mit der HILIC Phase, was auf die freie Aminogruppe in (**1**) zurückzuführen ist.

Mit der Hydrophilen-Interaktions-Chromatographie (HILIC) war es also möglich, eine flüssigchromatographische Trennung der Verbindungen (**1** - **4**) zu erzielen. Allerdings ergab die mittels HPLC-MS für NLEAP bestimmte NWG von 23 mg/L einen unattraktiv hohen Wert.

Diese analytische Methode war damit für den geplanten Nachweis von NLEAP aus fermentierten Lebensmitteln nicht anzuwenden, jedoch war sie zur Untersuchung der Stabilität der einzelnen Verbindungen (mit EAP (**1**) als internem Standard) geeignet (vgl. Abschnitt 3.6).

3.4.4 Ionenchromatographie

Eine weitere Möglichkeit der flüssigchromatographischen Analytik der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate (**2** - **4**) ist die Ionenchromatographie. Dabei werden die Substanzen an einer ionisch geladenen Säule, in unserem Fall eine Anionensäule, getrennt und anschließend direkt von einem Leitfähigkeitsdetektor erfasst. Die Wechselwirkung zwischen Analyt und stationärer Phase findet dabei über den negativ geladenen Phosphorsäurerest der NAcEAP-Derivate (**2** - **4**) statt.

Um die Eignung eines Leitfähigkeitsdetektors zu testen, erfolgte eine vorherige Messung der Leitfähigkeiten der einzelnen Verbindungen in Wasser mittels einer Leitfähigkeitselektrode. Im Anhang Tab. 7. 1 sind die jeweiligen Werte der Leitfähigkeitsmessung zusammengefasst. Folgende Reihe ergab sich für die Leitfähigkeit der Referenzsubstanzen:

$$\text{EAP (1)} < \text{NLEAP (4)} < \text{NAEAP (2)} < \text{NBEAP (3)}.$$

Es muss darauf hingewiesen werden, dass die hier ermittelten Werte nur als Richtwerte anzusehen sind, weil für den direkten Vergleich von Leitfähigkeiten verschiedener Substanzen untereinander die Kenntnis der so genannten Äquivalentleitfähigkeit (Λ) notwendig ist (Buchberger, 1998). Diese konnte nicht bestimmt werden, da keine Informationen über die Äquivalentzahl der NAcEAP (2 - 4) und EAP (1) vorliegen.

Da aber alle vier zu untersuchenden Verbindungen eine Phosphatgruppe aufweisen, wird von einer ähnlichen Äquivalentzahl ausgegangen, und es sollte somit möglich sein, die molaren Leitfähigkeiten zum Vergleich heranzuziehen.

Die Messergebnisse zeigen (Anhang Tab. 7. 1), dass die Detektion von EAP (1) mittels Leitfähigkeit als problematisch angesehen werden muss, da die Substanz eine sehr geringe molare Leitfähigkeit aufweist und somit nicht empfindlich erfasst werden kann. Somit entfällt EAP (1) als mögliche Standardsubstanz für die ionenchromatographische Analyse der NAcEAP-Derivate (2 - 4) mit Leitfähigkeitsdetektion. Als Grund für die geringe Leitfähigkeit von EAP (1) im Vergleich zu den NAcEAP-Derivaten (2 - 4) ist die zwitterionische Struktur anzunehmen. Auch Aminosäuren zeigen keine Leitfähigkeit in ihrer zwitterionischen Form (Römpp T-Z, 1995).

In der Literatur wird die ionenchromatographische Bestimmung von EAP (1) mit Fluoreszenz- und UV-Detektionen beschrieben (siehe Kapitel 2.5.1).

Anhand dieses Vorversuchs konnte die Leitfähigkeitsdetektion als eine alternative Detektionsmöglichkeit für NAEAP (2), NBEAP (3) und NLEAP (4) in Betracht gezogen werden.

3.4.4.1 Analytik von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten mittels Ionenchromatographie- Leitfähigkeitsdetektion

Für die ionenchromatographische Analytik wurde im Folgenden eine Trennung der Verbindungen (**2** - **4**) an einer Anionentauschersäule (Asupp15) mit anschließender Leitfähigkeitsdetektion durchgeführt (IC-Bedingungen siehe 4.2.5).

3.4.4.1.1 *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (**2**)

NAEAP (**2**) wurde gemäß den in Abschnitt 4.2.5 genannten IC-Bedingungen mittels IC-Leitfähigkeitsdetektion analysiert. Das Ionenchromatogramm von NAEAP (**2**) ist in Abb. 3.12 dargestellt. Mit einer Retentionszeit von ca. 20 min wird deutlich, dass die verwendete Säule eine gute Grundlage zur Abtrennung von Matrixbestandteilen aus Lebensmitteln liefert. Für die eindeutige Eignung muss die Wiederfindung von NAEAP (**2**) aus den entsprechenden Lebensmitteln durchgeführt werden.

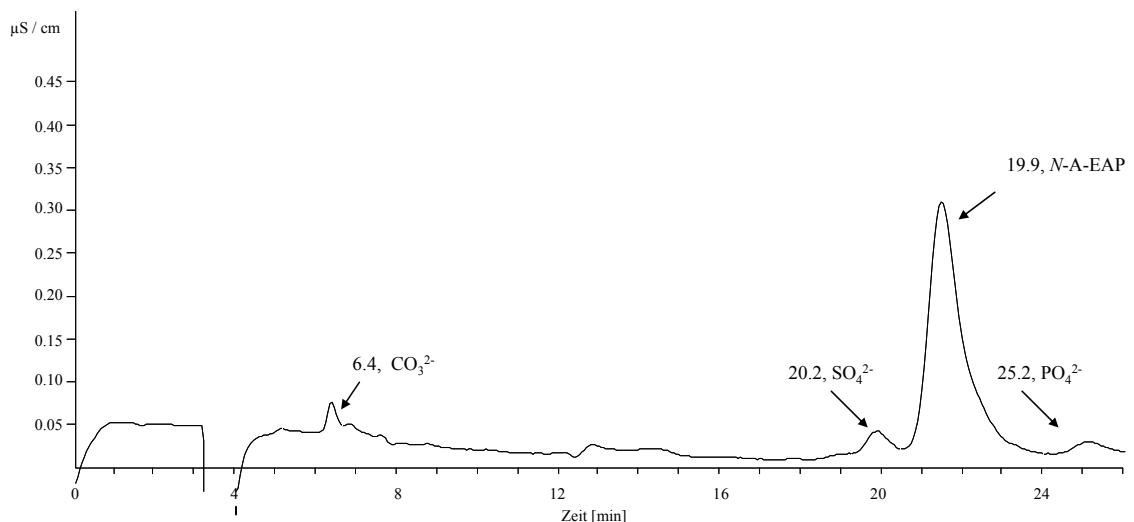


Abb. 3.12 Ionenchromatogramm von NAEAP (**2**). IC-Bedingungen siehe 4.2.5.

Die Ermittlung der NWG (Signal/Rausch 3:1) und BG (Signal/Rausch 5:1) für NAEAP (**2**) ergab folgendes Ergebnis:

NWG: 1,5 mg/L

BG: 3 mg/L

3.4.4.1.2 *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**)

N-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**) wurde ebenfalls gemäß den in Abschnitt 4.2.5 aufgeführten IC-Bedingungen analysiert. Aufgrund der Ergebnisse des Leitfähigkeitsvorversuchs (s. 3.4.4 bzw. Anhang Tab. 7. 1) sollte NBEAP (**3**) vom Detektor gut erfasst werden; allerdings konnte kein Peak im Ionenchromatogramm dem NBEAP (**3**) zugeordnet werden (Vergleich Abb. 3. 13).

Die im Vorversuch festgestellte hohe Leitfähigkeit ist wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Chloridionen im Syntheseprodukt zurückzuführen. Dies wird durch den intensiven Cl^- Peak im Chromatogramm (siehe Abb. 3. 13) bestätigt. Somit lässt sich für NBEAP (**3**) zusammenfassen, dass keine Detektion mittels Leitfähigkeitsdetektor möglich war.

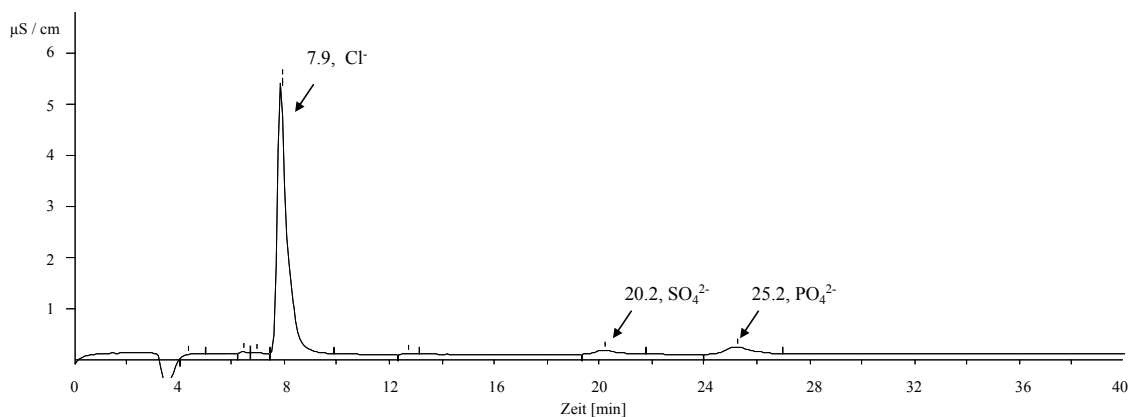


Abb. 3. 13 Ionenchromatogramm von NBEAP (**3**). IC-Bedingungen siehe 4.2.5.

3.4.4.1.3 *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**)

Die Retentionszeit von NLEAP (**4**) gemäß den in Abschnitt 4.2.5 aufgeführten IC-Bedingungen lag bei ca. 32 min (Abb. 3. 14).

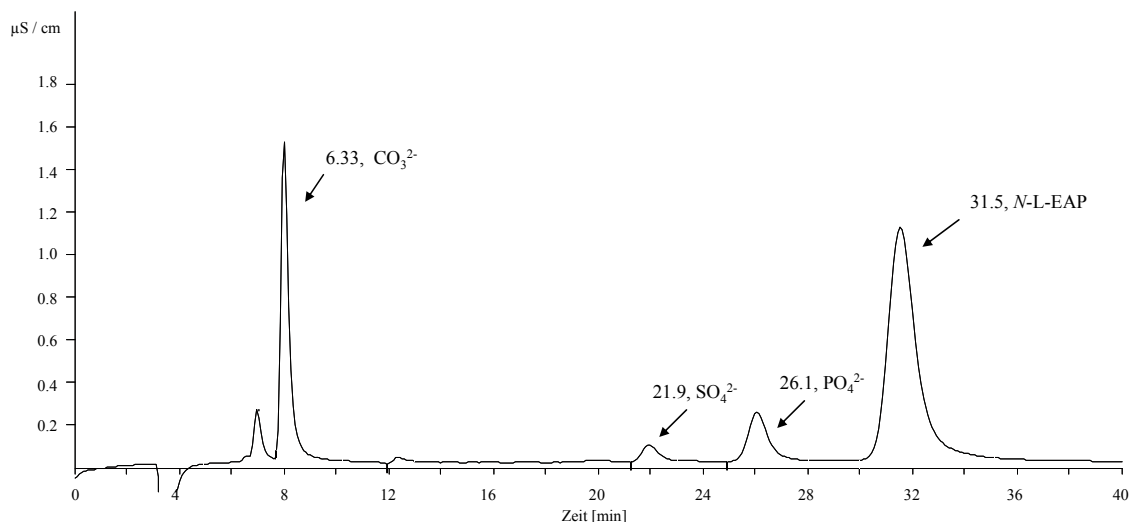


Abb. 3. 14 Ionenchromatogramm von NLEAP (**4**) IC Bedingungen s. 4.2.5.

Die Ermittlung der NWG (Signal/Rausch 3:1) und BG (Signal/Rausch 5:1) für NLEAP (4) ergab:

NWG: 1,4 mg/L

BG: 2,7 mg/L

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass im Vergleich zu den mit mittels GC-MS-Analytik erhaltenen Werten mit Hilfe der Ionenchromatographie wesentlich niedrigere NWG und BG für NLEAP zu erreichen waren.

3.4.5 Extraktionsmethoden zur Isolierung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4) aus Sake und Rotkohl

3.4.5.1 Probenvorbereitung

Ein Teilziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der NLEAP (4) aus fermentierten Lebensmitteln isoliert, detektiert und anschließend möglichst quantifiziert werden kann. Für die Analytik wurde die vorgängig aufgeführte, erstmalig entwickelte Ionenchromatographie-Leitfähigkeitsdetektion angewendet (s. Kapitel 3.4.4).

Für das Screening von fermentierten Lebensmitteln standen verschiedene Sake zur Verfügung: Ein Produkt, das traditionell mit *Aspergillus oryzae* und Hefen fermentiert und anschließend filtriert wurde, ein Nigorisake, der analog zu Sake hergestellt ist, aber nicht filtriert wurde, und ein Amasake, bei dessen Herstellung nur *Aspergillus oryzae*, aber keine Hefe zugesetzt wurde, so dass dieser keinen Alkohol enthielt. Als weiteres fermentiertes Lebensmittel wurde fermentierter Rotkohl gewählt. Zur Isolierung von (4) wurde geprüft, ob klassische Säulenchromatographie (SC) mit Anionentauschermaterial oder Anionentauscher-Festphasenkartuschen (SPE) effektiver ist. Die Arbeitsschritte sind in Kapitel 4.3.7 beschrieben.

3.4.5.1.1 Wiederfindung nach LC-Aufarbeitung mittels Anionentauscher

Zur Bestimmung der Wiederfindung von NLEAP (4) aus den drei verschiedenen Sakeproben (Sake, Nigorisake und Amasake) und dem fermentiertem Rotkohl mittels LC-Anionentauscherharz Dowex 1X8 wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Parallel wurde ein Ansatz mit NLEAP (4) ohne Matrix angesetzt, um die Affinität der

Verbindung für das Austauschermaterial zu bestimmen. Die ermittelten Wiederfindungsraten sind in Abb. 3. 15 dargestellt. (Durchführung siehe Abschnitt 4.3.7.1).

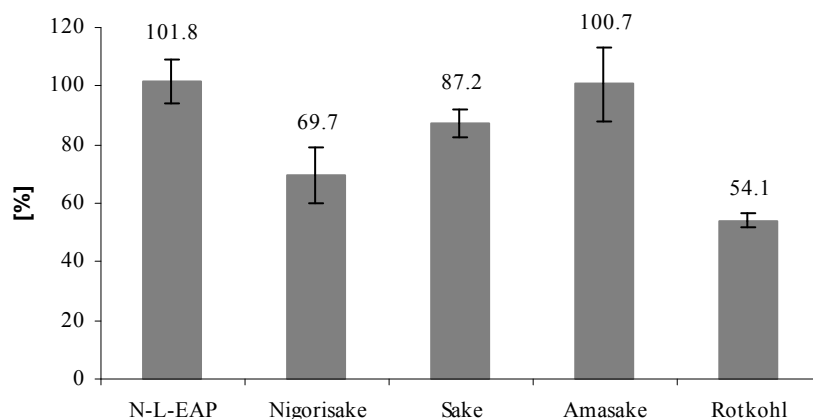


Abb. 3. 15 Wiederfindungsraten nach LC-Isolierung von NLEAP (4) aus fermentierten Lebensmitteln mittels Anionentauscher. Durchführung siehe 4.3.7.1.

Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 54.1 % (Rotkohl) und 100.7 % (Amasake).

3.4.5.1.2 Wiederfindung nach Aufarbeitung mittels Anionentauscher-Festphasenkartuschen (SPE)

Zur Bestimmung der Wiederfindung von NLEAP (4) aus den Sake-Proben und fermentiertem Rotkohl mittels Anionentauscher-Festphasenkartuschen (DSC-NH₂) (SPE) wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Parallel wurde ein Ansatz mit der Referenz von NLEAP (4) ohne Matrix angesetzt, um die Affinität der Verbindung für das Austauschermaterial zu bestimmen. (Durchführung siehe Abschnitt 4.3.7.2). Die Wiederfindungsraten sind in Abb. 3. 16 dargestellt.

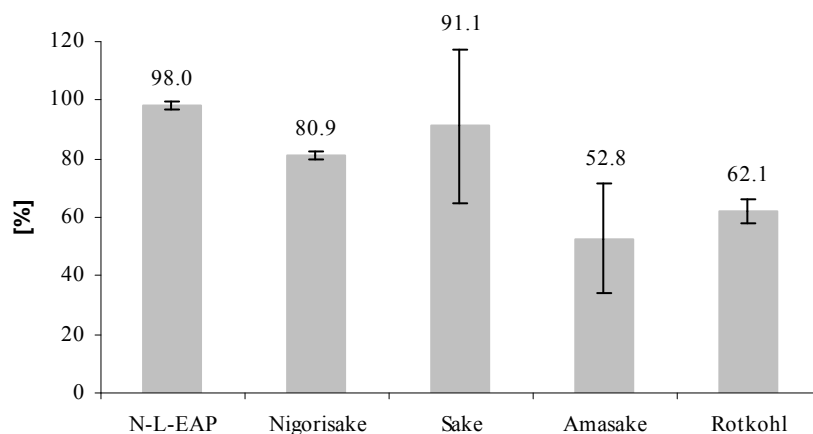


Abb. 3. 16 Wiederfindungsraten nach Isolierung von NLEAP (4) aus fermentierten Lebensmitteln mittels SPE Anionentauscherkartuschen. Durchführung siehe 4.3.7.2.

Die Wiederfindungsraten lagen ähnlich wie in der vorangegangenen Versuchsreihe, d.h. zwischen 52.8 % (Amasake) und 91.1 % (Sake).

Tab. 3. 1 gibt einen vergleichenden Überblick über die Ergebnisse der Wiederfindungsstudien. Die Wiederfindungsrate von NLEAP (4) ohne Matrix war bei beiden Methoden sehr gut (101.8 % mittels LC und 98.0 % mittels SPE). Damit war die grundsätzliche Eignung des Vorgehens belegt.

Tab. 3. 1 Vergleich der Wiederfindungsraten der Isolierung von NLEAP (4) mittels Säulenchromatographie (LC) und Anionentauscher Festphasenkartuschen (SPE)

Probe	LC [%]	SPE [%]
NLEAP ohne Matrix	101.8 ± 7.4	98.0 ± 1.4
Nigorisake	69.7 ± 9.5	80.9 ± 1.3
Sake	87.2 ± 4.5	91.1 ± 26.3
Amasake	100.7 ± 12.7	52.8 ± 18.7
Rotkohl	54.1 ± 2.4	62.1 ± 4.2

Aus Tab. 3. 1 geht hervor, dass höhere Wiederfindungsraten durch die Anwendung von SPE-Kartuschen- mit Ausnahme der Isolierung von NLEAP (4) aus Amasake- erzielt wurden. Die höchste Wiederfindungsrate (91.1 %) ergab sich bei Anwendung der SPE mit dem Sake. Dies dürfte auf die klare Lösung des Produktes zurückzuführen sein. Nigorisake und Amasake wurden zwar vor der Anwendung filtriert, um noch vorhandene Trübstoffe zu entfernen, jedoch war dies offensichtlich nicht ausreichend, da es während der Aufreinigung mittels SPE öfters zum Verstopfen der Kartuschen kam.

Die Isolierung von NLEAP (4) aus Nigorisake mittels LC wurde ebenfalls durch Trübstoffe erschwert (Wf 69.7 %), wohingegen die Wiederfindungsrate aus dem Amasake mittels LC sehr gut war (100.7 %). Die Isolierung von NLEAP (4) aus Rotkohl lieferte bei beiden Isolierungsmethoden nur befriedigende Ergebnisse (54.1 % LC und 62.1 % SPE). Fermentierter Rotkohl, wie auch fermentiertes Sauerkraut, enthält sehr viel NaCl (1.4 – 1.9 % Abtropfgewicht) (Belitz, 2001). Es ist vom Hersteller bekannt (Merck, Ionentauscher und Adsorberharze), dass das Säulenmaterial Chloridionen mit höherer Selektivität als Phosphat bindet, wodurch offensichtlich Bindungsstellen für

NLEAP (4) blockiert wurden. Zwar wurde der Gehalt an Säulenmaterial im Vergleich zu den Anwendungen mit den Sakeproben höher gehalten, jedoch war dies nicht ausreichend hilfreich zur Erzielung einer höheren Wiederfindungsrate.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Isolierung von NLEAP (4) aus ähnlichen Matrices unterschiedliche Anforderungen (z.B. Menge an Säulenmaterial) und somit differierenden Resultate lieferte. Daher sind die hier dargestellten Isolierungsmethoden bei der Übertragung auf andere Lebensmittel aus vergleichbaren und/oder aus anderen Lebensmittelgruppen neu zu überprüfen, individuell an die Matrix anzupassen und, wenn möglich, mit einem isotope markierten Standard zu erweitern.

3.5 Screening von fermentierten Lebensmitteln

Die für die Wiederfindung verwendeten fermentierten Lebensmittel (Sake, Nigorisake, Amasake und Rotkohl) wurden auf das Vorhandensein von NLEAP (4) untersucht (IC Bedingungen siehe 4.2.5). Die Studien erfolgten sowohl per LC als auch SPE (siehe Abschnitt 4.3.7).

Trotz mehrfach durchgeführter Analytik konnte in keiner der untersuchten Proben NLEAP (4) nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass dieses negative Ergebnis auf mangelnde Stabilität der Zielverbindung zurückzuführen ist, wurden für die im Rahmen dieser Arbeit interessierenden *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate (2 – 4) ausführliche Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt, über die nachfolgend berichtet wird.

3.6 Stabilitätsstudien

Während der Probenvorbereitung zur Isolierung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4) aus fermentierten Lebensmitteln durchläuft dieses verschiedene pH-Werte, mit unterschiedlich langer Dauer. Es liegen keine Literaturdaten über die Stabilität von NLEAP (4) und den hier untersuchten anderen Derivaten unter diesen Bedingungen vor, so dass es insbesondere auch unter den im Abschnitt 3.5 genannten Gesichtspunkten von Interesse war, sich mit der Frage der Stabilität von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten zu beschäftigen. Für die Stabilitätsstudien von NAEAP (2), NBEAP (3) und NLEAP (4) wurden folgende Puffer und Temperaturen für 24 Tage gewählt:

- pH 3/ 25 °C Ammoniumformiatpuffer 50mM

- pH 7.4/ 37 °C Natriumcarbonatpuffer 50mM
- pH 10/ 25 °C Natriumcarbonatpuffer 50mM.

3.6.1 Stabilitätsstudien: *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat, *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat und *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat

Die Stabilitätsuntersuchungen wurden in mindestens doppelten Ansätzen durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-MS/MS nach Zusatz von EAP (1) als Standard. Zur Berechnung wurde der Quotient aus Area_(N_{Ac}EAP) und Area_(EAP) gebildet (vgl. Bedingungen in Abschnitt 4.2.2, HPLC System 3). In Abb. 3. 17 sind die für NLEAP (4) nach Inkubation in den verschiedenen Puffern erhaltenen Ergebnisse graphisch dargestellt. Einzeldaten finden sich im Anhang in Tab. 7. 2 für pH 3/25 °C, Tab. 7. 3 für pH 7.4/37 °C und Tab. 7. 4 für pH 10/25 °C).

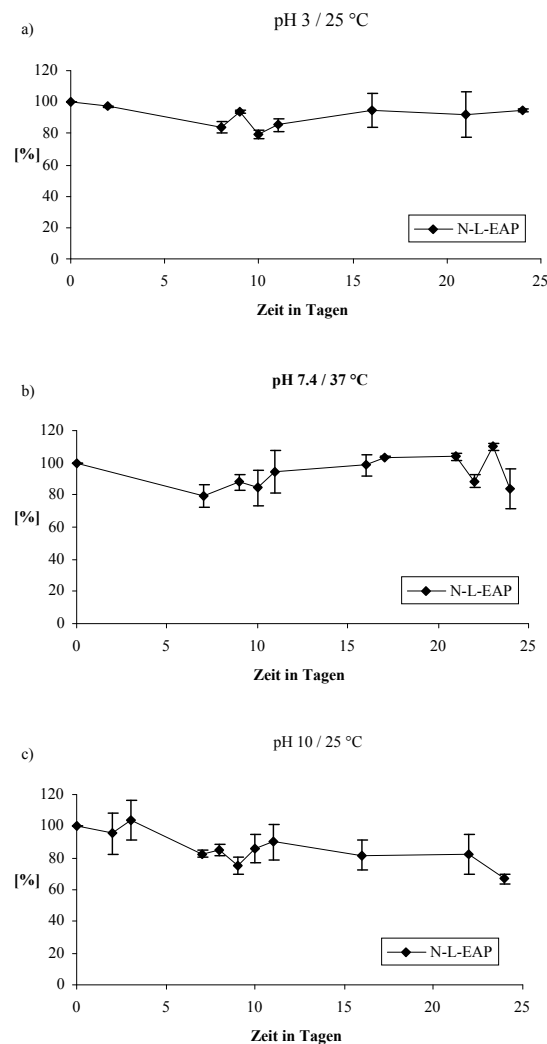


Abb. 3. 17 Stabilität von NLEAP (4) a) bei pH 3/ 25 °C, b) bei pH 7.4/ 37 °C, c) bei pH 10/ 25 °C. HPLC Bedingungen vgl Abschnitt 4.2.2, HPLC System 3.

Aus Abb. 3. 17 geht hervor, dass (4) eine sehr stabile Verbindung ist; lediglich bei pH 10 /25 °C war nach ca. 10-15 Tagen eine Abnahme der Stabilität zu verzeichnen. Aus dem jeweiligen Graphen wird an den Schwankungen der Messergebnisse deutlich, wie kritisch die Analytik dieser polaren Verbindungen ist.

Betrachtet man zum Vergleich die Ergebnisse für die Stabilität von phosphoryliertem Anandamid (p-AEA) und phosphorylierten (*R*)-Methyl-anandamid (p-RAEA)(als zwar apolare, aber doch strukturverwandte Verbindungen), so gibt die Literatur in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 2.4 (p-AEA) und 3.1 (p-RAEA) Tagen und in 185 mM Boratpuffer pH 7.4 eine $t_{1/2}$ von 11.9 (p-AEA) und 13.9 (p-RAEA) an (Juntunen et al., 2003). Daraus folgt, dass das hier untersuchte polare Derivat (4) stabiler als die literaturbekannten apolaren Derivate ist.

3.6.2 Stabilitätsstudien *N*-Acetyl-Ethanolamin und *N*-Lactoyl-Ethanolamin

In Analogie zu den für Anandamid und dessen Methylderivat publizierten Ergebnissen (Cabral et al., 1995) lag die Vermutung nahe, dass die nichtphosphorylierten Vorstufen der NAcEAP-Derivate (2 - 4) eine geringere Stabilität als die phosphorylierten aufweisen sollten. Als repräsentative Beispiele wurden *N*-Acetyl-Ethanolamin (NAEA) (8) und *N*-Lactoyl-Ethanolamin (NLEA) (5) herangezogen. Als Standard diente Ethanolamin (9). Die HPLC-ESI-MS/MS-Messungen erfolgten in diesem Fall mit positiver Ionisierung (im Vergleich zu den phosphorylierten Verbindungen ist eine Ionisierung in negativen-Modus nicht möglich). Exemplarisch ist die graphische Auswertung von NLEA (5) in Abb. 3.18 dargestellt. Die Auswertungen für NAEA (8) und NLEA (5) sind im Anhang in Tab. 7. 2 für pH 3/25 °C, Tab. 7. 3 für pH 7.4/37 °C und Tab. 7. 4 für pH 10/25 °C aufgelistet.

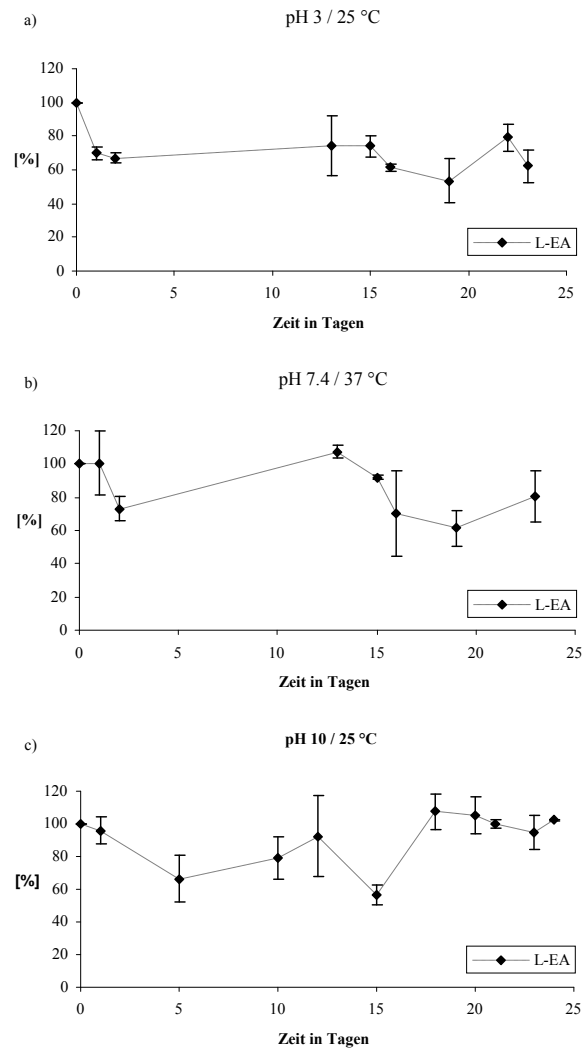


Abb. 3.18 Stabilität von L-EA (5) a) bei pH 3/ 25 °C, b) bei pH 7.4/ 37 °C, c) bei pH 10/ 25 °C.

Die Analytik der nichtphosphorylierten Verbindungen erwies sich schwieriger als die der phosphorylierten Derivate. Ursächlich verantwortlich ist hierfür die gerätespezifische Sensitivität der Ionisierung im positiven Modus. Es wurde zwar mit dreifach höheren Mengen an Substanz im Vergleich zu den phosphorylierten Verbindungen gearbeitet, dennoch ergaben sich hohe Schwankungen, wie auch aus der Darstellung in Abb. 3.18 hervorgeht (Vergleich Abschnitt 4.3.10).

Die nicht phosphorylierten Vorstufen von NAEAP (2) und NLEAP (4) erwiesen sich bei den Studien als überraschend stabil.

Aufgrund dieser und der vorgängig aufgeführten Ergebnisse ist demzufolge das negative Ergebnis des Lebensmittelscreenings (vgl. Abschnitt 3.5) nicht auf eine Instabilität der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphate zurückzuführen. So lässt sich nur festhalten, dass diese Verbindungen in den geprüften Lebensmitteln im untersuchten Meßbereich (bis ca. 1 mg/L) nicht vorkommen.

3.7 Biologische Eigenschaften

3.7.1 Alkalische Phosphatase

Zur Bearbeitung eines weiteren Ziels der vorliegenden Arbeit, nämlich einige biologische Eigenschaften der Targetverbindungen zu erkunden, erfolgen mehrere Versuchsreihen unter Anwendung ausgewählter Enzyme. Über die bei diesen Studien erzielten Ergebnisse wird nachfolgend berichtet. In der ersten Versuchsreihe wurde alkalische Phosphatase eingesetzt. Wie einleitend ausgeführt, gehört die alkalische Phosphatase (AP) in die Enzymklasse der Hydrolasen, speziell der Esterasen. Die monomeren und dimeren Enzyme weisen geringe Substratspezifität auf und sind Biokatalysatoren, welche die Hydrolyse von Phosphorsäureestern oder organischen Phosphorverbindungen katalysieren (Römpp M-Pk, 1995; Neumeister et al., 1998).

Zur näheren Charakterisierung der Substrateigenschaften von EAP (1), NAEAP (2), NBEAP (3) und NLEAP (4) für die alkalische Phosphatase wurden die K_m - und V_{max} -Werte nach Michaelis Menten bestimmt (Copeland 2000). Als Enzym diente die alkalische Phosphatase aus Rinderdarmzellen.

3.7.1.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Mit p-Nitrophenylphosphat (pNPP) (10) als Substrat wurde die Enzymaktivität nach Walter und Schütt (1974) bestimmt (Durchführung Abschnitt 4.3.9.1). AP spaltet pNPP (10) in p-Nitrophenol (pNP) (11) und Phosphat. Die Hydrolyserate wird durch die Messung von freiem pNP (11) bei 405 nm bestimmt (Abb. 3. 19).

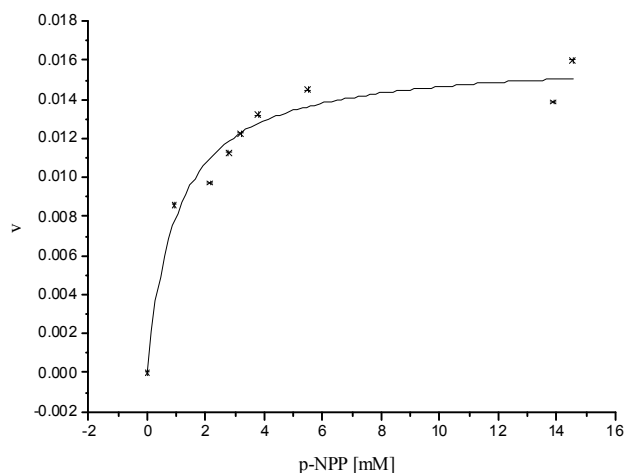


Abb. 3. 19 Alkalische Phosphatase: Ermittlung von K_m und V_{max} durch Auftragen der Konzentration von pNPP (10) [mM] (x-Achse) gegen die Geschwindigkeit [v] (y-Achse).

3.7.1.2 Substrateigenschaften

Nach Bestimmung der Enzymaktivität mit pNPP (**10**) wurde die Eignung der Zielverbindungen als Substrate für die AP geprüft (Durchführung vgl. Abschnitt 4.3.9.2). Da sich im Gegensatz zu pNPP (**10**) die Hydrolyseprodukte der Targetsubstanzen photometrisch nicht vermessen ließen, wurde freies Phosphat durch die Reaktion mit Ammoniumolybdat-Malachitgrün bei 660 nm bestimmt (Baykov et al., 1988; Chalvardijan und Rudnicki 1970; Lanzetta et al., 1979).

Für die Untersuchung der Substrateigenschaften von EAP (**1**) und der NAcEAP-Derivate (**2 - 4**) wurden in Mehrfachmessungen die jeweiligen Substratkonzentrationen variiert und die Enzymmenge konstant gehalten. Die graphische Auswertung im Softwareprogramm Origin[®] erfolgte durch das Auftragen der Substratkonzentration gegen die Geschwindigkeit. Die Datenauswertung nach Michaelis und Menten gibt die K_m - und V_{max} -Werte des Substrats an (Copeland 2000). Die erzielten Ergebnisse sind nachfolgend zusammen mit den bei Inhibierungsstudien erhaltenen Resultaten in Tab. 3. 2 zusammengefasst.

3.7.1.3 Inhibitorische Eigenschaften

Nach Ermittlung der maximalen Hydrolysegeschwindigkeit der AP wurden Versuche zu inhibierenden Eigenschaften mehrerer Zielverbindungen in Gegenwart von pNPP (**10**) durchgeführt. Zur Bestimmung der Inhibitionseigenschaften wurde die Menge an Substrat (hier pNPP (**10**)) und Enzym konstant gehalten und die Konzentration an Inhibitor (hier EAP (**1**) bzw. NAcEAP-Derivate (**2 - 4**)) variiert. Zur Bestimmung der Inhibition wurde frei werdendes p-Nitrophenol (**11**) bei 405 nm bestimmt. Als Wert für die Inhibitoreigenschaften ist die mittlere inhibitorische Konzentration, der IC 50 Wert, angegeben. Dieser Wert gibt die Inhibitorkonzentration an, bei dem es zu 50 % iger Inhibition der Enzymaktivität kommt (Copeland 2000). Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels GraphPadPrism[®].

In Abb. 3. 20 ist die graphische Auswertung für die Bestimmung des IC50-Wertes am Beispiel von NAEAP (**2**) dargestellt. Die Ergebnisse dieser und der anderen untersuchten Verbindungen sind in Tab. 3. 2 zusammengefasst.

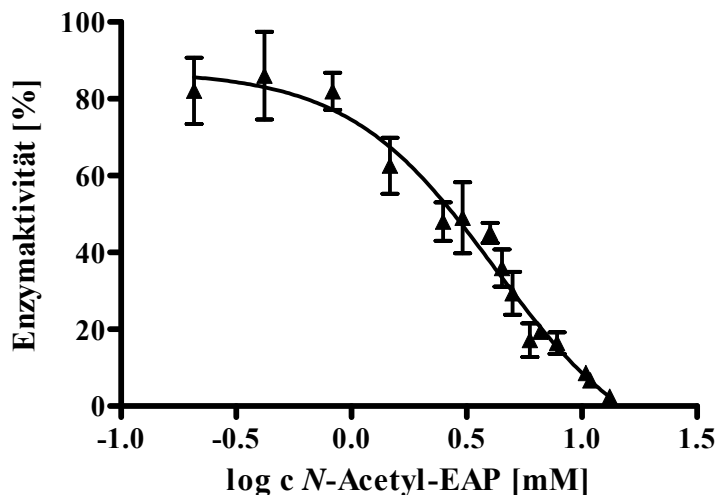


Abb. 3. 20 Dosis-Wirkungskurve: Inhibition der Aktivität der alkalischen Phosphatase durch NAEAP (2). Ermittlung des IC₅₀ Wertes von NAEAP (2). Durchführung s. Abschnitt 4.3.9.3.

Nach Ermittlung der IC₅₀-Werte für EAP (1) und die NAcEAP-Derivate (2 - 4) wurde anschließend der Inhibitionstyp für die jeweilige Verbindung bestimmt. Hierin wurde die Konzentration an Inhibitor (hier EAP (1) bzw. NAcEAP-Derivate (2 - 4)) so gewählt, dass die Konzentration an Inhibitor im Bereich einer 30 - 70 % igen Inhibierung lag (Copeland, 2000).

Folgende Konzentrationen wurden für diese Versuchsdurchführung gewählt: 0, 30, 40 und 60 % Inhibition durch EAP (1) bzw. die jeweiligen NAcEAP-Derivate (2 - 4). Anschließend wurde jede Konzentrationsreihe an Inhibitor mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substrat (pNPP (10)) versetzt, die Enzymkonzentration wurde dabei konstant gehalten. Die erhaltenen Daten wurden anschließend nach Lineweaver-Burk linearisiert. Durch die graphische Darstellung der doppelt-reziproken Auftragung und Linearisierung entstehen charakteristische Muster für jeden Inhibitionstyp (kompetitiv, nichtkompetitiv und unkompetitiv). Die Auswertung ist am Beispiel von Ethanolaminphosphat (1) in Abb. 3. 21 dargestellt.

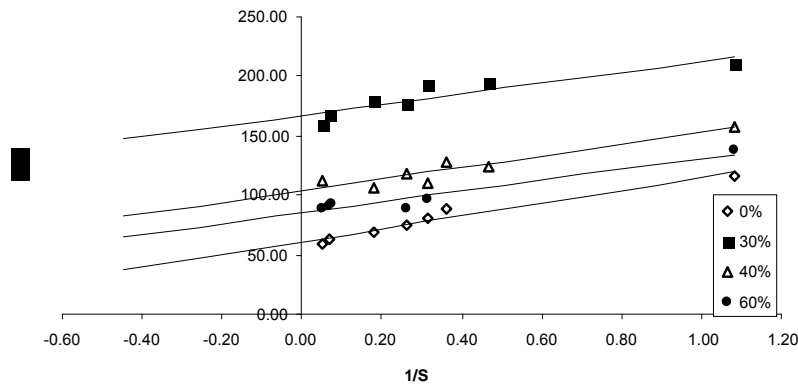


Abb. 3. 21 Lineweaver-Burk-Plott der Inhibition von alkalischen Phosphatase: Ermittlung des Inhibitionstyps von Ethanolaminphosphat (1). 0 % EAP (1)(◇), 30 % EAP (1) (■), 40 % EAP (1) (△), 60 % EAP (1) (●). X-Achse [1/S], y-Achse [1/v].

Graphische Charakteristika einer unkompetitiven Inhibition zeichnen sich durch eine Serie an parallel verlaufenden Linien aus, welche die y-Achse schneiden. Das Ergebnis der graphischen Darstellung ist typisch für einen unkompetitiven Inhibitor. Sowohl das Geschwindigkeitsmaximum (V_{\max}) als auch der K_m -Wert werden durch einen unkompetitiven Inhibitor verändert.

Die Bindungseigenschaften unkompetitiver Inhibitoren sind fast ausschließlich an den Enzym-Substratkomplex orientiert, in unserem Beispiel an den Komplex pNPP mit der alkalischen Phosphatase, statt dass sie an das Enzym selber ausgerichtet sind (Copeland, 2000).

In Tab. 3. 2 sind die Ergebnisse der Enzymversuche mit der alkalischen Phosphatase und EAP (1) sowie den *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten (2 - 4) zusammengefasst.

Tab. 3. 2 Zusammenfassung der Ergebnisse der alkalischen-Phosphatase-Assays mit pNPP (10), EAP (1) sowie *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphaten (2 - 4)

	K_m [mM]	V_{\max}	IC 50 [mM]	Inhibitionstyp
pNPP (10)	1.0 ± 0.2	0.02	-	-
EAP (1)	1.9 ± 0.3	0.08	3.3 ± 0.1	unkompetitiv
NAEAP (2)	2.2 ± 0.5	0.04	4.2 ± 0.3	unkompetitiv
NBEAP (3)	1.1 ± 0.2	0.04	5.9 ± 0.3	unkompetitiv
NLEAP (4)	1.4 ± 0.2	0.02	5.8 ± 0.2	unkompetitiv

Bei einem Vergleich der in Tab. 3. 2 aufgeführten K_m -Werte ergibt sich folgende Affinitätsreihe der Verbindungen zu der AP:



Aus dieser Anordnung wird deutlich, dass die unpolarsten Verbindungen pNPP (10) und NBEAP (3) die höchste Affinität für die AP zeigen. (Die apolaren Eigenschaften von pNPP (10) und NBEAP (3) sind auf ihren aromatischen Ring zurückzuführen). EAP (1) und NAEAP (2) besitzen die geringste Affinität in der Versuchsreihe.

Aus den in Tab. 3. 2 zusammengefassten Ergebnissen lässt sich folgende Geschwindigkeitsreihe der Substratsättigung aufstellen:



Dies bedeutet, dass die Substratsättigung mit EAP (1) am längsten dauert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NBEAP (3) die besten und NAEAP (2) die schlechtesten Substrateigenschaften für alkalische Phosphatase zeigt. Alle Ergebnisse liegen im mM-Bereich, was zum Beispiel für NBEAP (3) einem Gehalt von ca. 244 mg/kg Körpergewicht entspricht. Dies ist ein sehr hoher Wert, der aus physiologischer Sicht praktisch nicht realisierbar ist. Daten zur Bioverfügbarkeit von *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten im Humanstoffwechsel liegen bislang nicht vor. Für EAP (1) findet man in der Literatur eine Angabe von 5.1 $\mu\text{mol/L}$ Plasma (Durchschnittswert für Frauen und Männer, $n=37$) (McGale et al., 1977).

3.7.2 Phospholipase A_2 -Inhibition

Die Phospholipase A_2 (PLA $_2$) gehört in die Familie der Hydrolasen, speziell der Esterasen, welche spezifisch die Hydrolyse von Fettsäuren an sn2-Position von Triglyceriden katalysieren (Römpp M-Pk, 1995). Die PLA $_2$ leitet durch die Spaltung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem Arachidonsäure, die Eicosanoidbiosynthese ein (Rhener und Daniel 2002).

Der Einfluss von EAP (1) und der NAcEAP-Derivate (2 - 4) auf die PLA $_2$ wurde mit einem *in vitro* Enzym-Assay Kit (PLA $_2$ (Type V) (Inhibitor Screening Assay Kit von

Cayman Chemicals) getestet. Die Versuchsdurchführung basiert auf der Ellman-Methode (Ellman et al., 1961). Dabei wird als Substrat für die PLA₂ Diheptanoyl-thiophosphatidylcholin eingesetzt. Die PLA₂ spaltet das Substrat an der Position *sn*-2, wobei ein freier Thiolrest und Fettsäure entstehen. 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) diente als Nachweisreagenz, indem es zu 2 Mol 5-Thio-2-nitrobenzoesäure aufgespalten wurde, wobei das eine Molekül an die freie Thiolgruppe bindet und die andere 5-Thio-2-nitrobenzoesäure frei steht und eine Absorption bei 412 nm aufweist (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 4.3.10).

Der Einfluss von Ethanolaminphosphat (**1**), *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (**2**), *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**) und *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**) wurde im Konzentrationsbereich von 0.2 µM bis 2376 µM überprüft. Die genaue Durchführung ist im Kapitel 4.3.10 angegeben.

In Abb. 3. 22 ist exemplarisch die graphische Auswertung der für NBEAP (**3**) ermittelten Werte dargestellt. Gezeigt ist die Konzentration an NBEAP (**3**) (x- Achse), die gegen die Enzymaktivität (y-Achse) aufgetragen ist.

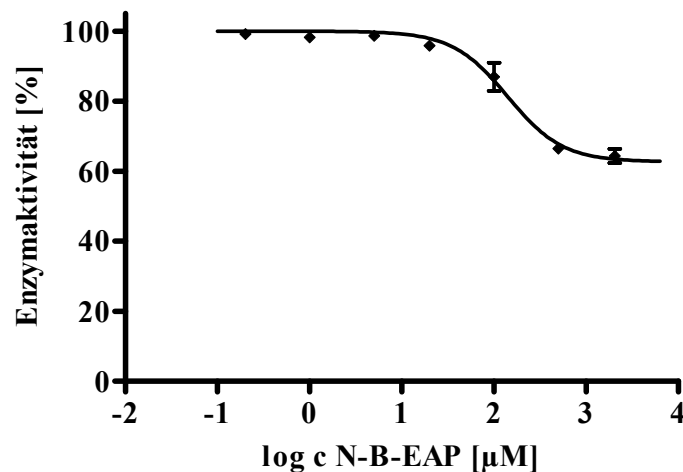


Abb. 3. 22 Graphische Darstellung der Inhibition der PLA₂ durch *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**). x-Achse Konzentration an NBEAP (µM). y-Achse Enzymaktivität. EC 50 Wert: 136 µM, maximale Inhibition 63 %. Durchführung siehe 4.3.10.

Aus einer solchen Grafik lassen sich der EC-50 Wert (mittlere effektive Konzentration) und der maximale Hemmwert der PLA₂ ablesen. Die Bestimmung eines IC-50 Wertes ist in diesem Fall nicht möglich, da der IC-50 Wert den Wert angibt, bei dem es zu Inhibierung der Enzymaktivität um 50 % kommt (Copeland 2000). Da hier aber nur eine maximale Hemmwirkung angegeben werden kann, welche über 50 % liegt, wird zur Auswertung des Ergebnisses der EC-50 Wert angegeben.

In Tab. 3. 3 sind die Ergebnisse der mittels GraphPad-Prism durchgeführten graphischen Auswertungen zusammengefasst. Die ermittelten Werte von NAEAP (2) und NBEAP (4) sind im Anhang aufgelistet (Tab. 7. 7).

Tab. 3. 3 Ergebnisse der Inhibition der Aktivität von PhospholipaseA₂ durch EAP (1) und der *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphate (2 – 4). Angegeben sind die maximale Hemmung der PLA₂ und die dazugehörigen EC 50 Werte

	EC 50 [μM]	STABW [μM]	Maximale Hemmung [%]
EAP (1)	-	-	-
NAEAP (2)	136	± 1.9	78 %
NBEAP (3)	140	± 2.3	63 %
NLEAP (4)	-	-	-

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass EAP (1) und NLEAP (4) in dem Testbereich (0.2 - 2376 μM) keinen hemmenden Einfluss auf die PLA₂ - Aktivität aufweisen.

Die beiden anderen NAcEAP-Derivate (2 und 3) zeigten dagegen einen hemmenden Effekt auf die Aktivität der PLA₂. Mit NAEAP (2) wurde eine maximale Hemmung von 78 % mit einem EC-50 Wert von 140 μM erreicht. NBEAP (3) zeigte einen etwas geringeren EC-50 Wert mit einer maximalen Hemmwirkung von 63 % auf die PLA₂.

Interessant ist, dass NLEAP (4) keinen Effekt auf die PLA₂ zeigte, obwohl die Struktur sich bis auf ein weiteres Kohlenstoffatom und eine Hydroxylgruppe nicht stark unterscheiden. Die Hydroxylgruppe dürfte für die fehlende Wirkung verantwortlich sein.

EAP (1) zeigt vermutlich aufgrund seiner freien Aminogruppe keinen inhibierenden Effekt.

Auch bei diesem Versuchsansatz ist die Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus noch offen.

3.7.3 Lipoxygenase

Lipoxygenasen (LOX) gehören in die Klasse der Dioxygenasen. In der Eicosanoid-Kaskade ist die LOX der PLA₂ nachgeschaltet. Als Substrate akzeptiert LOX nur ungesättigte Fettsäuren mit einem 1-cis-4,-cis-Pentadiensystem, deren Dioxygenierung zu Monohydroperoxiden sie unter Beteiligung von Sauerstoff katalysiert. Bevorzugte Substrate pflanzlicher LOX sind demgemäß Linol- und Linolensäure, im tierischen bzw.

Humangewebe ist Arachidonsäure Substrat der LOX-Katalyse (Belitz et al., 2001; Eisenbrand und Schreier A-L 2006).

In einer weiteren Versuchsreihe waren Ethanolaminphosphat (**1**), NAEAP (**2**), NBEAP (**3**) und NLEAP (**4**) als potentielle LOX-Inhibitoren zu prüfen. Dabei wurde unter aeroben Bedingungen mit Soja-LOX-5 und Arachidonsäure als Substrat gearbeitet. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte dabei fluorimetrisch mit 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H2DCFDA) nach einer jüngst beschriebenen Methode (Pufahl et al., 2007), die gemäß Angaben von Locher (2011) optimiert wurde.

Zur Etablierung des Enzymsystems wurde zunächst Nordihydroguaretsäure (NDGA) (**12**) als bekannter unspezifischer LOX-Inhibitor eingesetzt (Gronert et al., 1995). Die Versuchsdurchführung erfolgte im Konzentrationsbereich jeweils von 0 μM bis 1000 μM Targets substanz (**1 - 4**). Die ermittelten Fluoreszenz-Daten wurden gegen die Konzentration der jeweiligen Zielsubstanz (**1 - 4**) in einer Dosis-Wirkungskurve aufgetragen (Exemplarisches Beispiel in Abb. 3. 23); daraus erfolgte die Bestimmung der IC-50 Werte (Tab. 3. 4) (Die genaue Versuchsdurchführung ist im Abschnitt 4.3.11 angegeben). Auch im pflanzlichen Fettsäureabbau nach Zerstörung des Zellverbandes folgt die LOX-Katalyse einer vorangegangenen Glyko- bzw. Phospholipidspaltung, in diesem Fall katalysiert durch Acylhydrolasen.

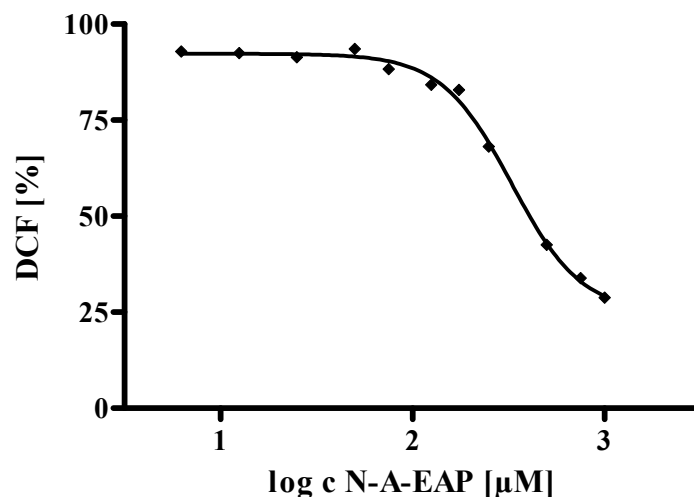


Abb. 3. 23 Im fluorimetrischen LOX-Test mit NAEAP (**2**) ermittelte Dosis-Wirkungskurve. Versuchsdurchführung siehe 4.3.11.

Tab. 3. 4 Bei der LOX-Katalyse für die Zielsubstanzen [EAP (**1**); *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphate (**2** – **4**)] ermittelte IC-50 Werte. (Referenzinhibitor, NDGA) Angegeben sind die jeweiligen Konfidenzintervalle (CI)

	IC 50 [μM]	CI 95 % [μM]
EAP (1)	-	-
NAEAP (2)	328	278 - 387
NBEAP (3)	394	350 - 445
NLEAP (4)	-	-
NDGA (12)	38.2	35.3 – 41.2

Aus der in Tab. 3. 4 aufgeführten Zusammenstellung geht hervor, dass EAP (**1**) und NLEAP (**4**) keine LOX-Inhibitorwirkung zeigten. Die Verbindungen NAEAP (**2**) und NBEAP (**3**) erwiesen sich als schwache Inhibitoren der LOX. Mit einer gegenüber NDGA (als bekannten Referenzinhibitor) etwa zehnfach niedrigeren Effektivität haben die erzielten Ergebnisse lediglich akademisches Interesse. Wie auch bei den vorgängig beschriebenen Resultaten (vgl. Anandamid und dessen Phosphat) ist die Ursache für die geringe Aktivität in der hohen Polarität unserer Zielverbindungen zu suchen.

3.7.4 Xanthinoxidase

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Ethanolaminphosphat (**1**) und die Zielkomponenten (**2-4**) auf ihre Fähigkeit, Superoxidanionen abzufangen bzw. die Xanthinoxidase zu hemmen, untersucht.

Xanthinoxidase setzt Xanthin (**12**) in Harnsäure (**13**) unter Bildung von Superoxidanionen ($\cdot\text{O}^{2-}$) um, wobei unter Sauerstoffmangel bevorzugt Hydroxylradikale ($\cdot\text{HO}$) gebildet werden (Kuppusamy und Zweier 1989). Die Bildung der Superoxidanionen wurde indirekt durch die Reduktion von Cytochrom C (CytoC) bestimmt. Dabei wird durch das Superoxidanion das dreiwertige Eisen im CytoC zu zweiwertigem Eisen reduziert (McCord und Fridovich 1968), welches bei 550 nm (Extinktionskoeffizient $\epsilon = 19.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) photometrisch erfasst werden kann (Chance 1957).

Zur Überprüfung der Durchführbarkeit wurde zunächst Allopurinol (**14**) als bekannter Inhibitor (Feigelson et al., 1957) der Xanthinoxidase eingesetzt. Nach Etablierung der Methode (Daten nicht gezeigt), wurde diese analog zum Allopurinol (**14**) mit den Zielsubstanzen im Bereich von 0 μM bis 1000 μM durchgeführt.

Es erwies sich rasch, wie exemplarisch in Abb. 3. 24 für NAEAP (2) dargestellt ist und dessen Ergebnisse auch auf alle anderen geprüften Substanzen übertragbar sind (Daten nicht gezeigt), dass keine der Zielverbindungen Inhibitorwirkung auf die Xanthinoxidase zeigte.

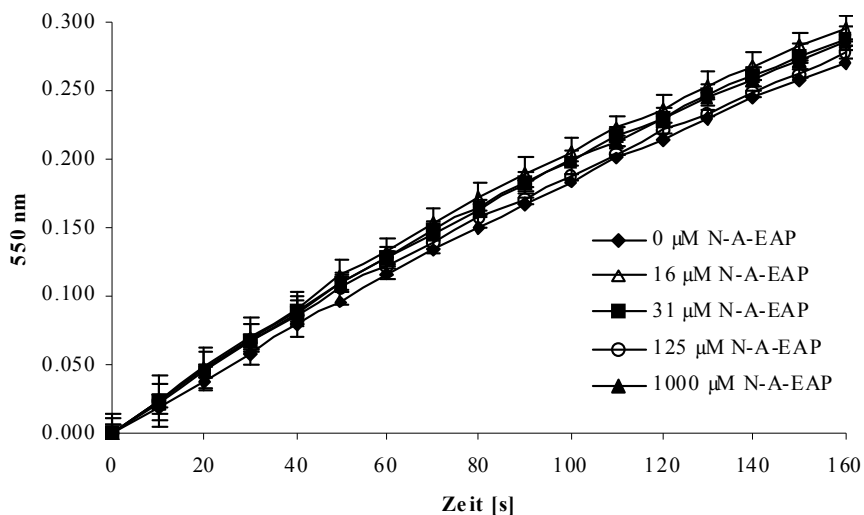


Abb. 3. 24 Einfluss von *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (2) auf die Xanthinoxidase-Katalyse (Experimentelle Angaben in Abschnitt 4.3.12.2).

Dieses Ergebnis ist für EAP (1) insofern überraschend als diese Verbindung in der Literatur als Superoxidationenfänger beschrieben ist. In einem Xanthinoxidase-Assay mit einer unserer Versuchsanordnung analogen Methode hat man schon vor einigen Jahren gezeigt, dass EAP (1) im Bereich von 2.5 - 20 mM als $O_2^{\cdot-}$ -Radikalfänger wirkt (Gordon et al., 1991). Da jedoch aus physiologischer Sicht ein mmolarer Bereich schwer realisierbar ist (entspricht für EAP (1) 0.7 – 2.8 g/kg Körpergewicht), hatten wir unsere Methodik realitätsnäher, d.h. auf den μ molaren Bereich von 16 - 1000 μ M (beispielsweise für EAP (1) 2.2 – 141 mg/Kg Körpergewicht) ausgelegt. Für EAP (1) wird in der Literatur ein Wert von 5.1 μ mol/L Plasma (Durchschnittswert für Frauen und Männer, n= 37) angegeben (McGale et al., 1977).

Aufgrund der erzielten Ergebnisse machte es keinen Sinn, unsere durch die Enzymauswahl (Xanthinoxidase aus Rinderserum) eingeschränkt aussagekräftigen Daten - wie ursprünglich geplant- mit humaner Xanthinoxidase im ex vivo-Zellversuch zu übertragen.

3.7.5 β -N-Acetylhexosaminidase

Die β -N-Acetylhexosaminidase (AcHex) (EC 3.2.1.52) gehört zu der Enzymklasse der Hydrolasen. Substrate der AcHex sind vorzugsweise β -glykosidisch gebundene N-Acetylglucoside und N-Acetylgalactoside (Katalyse s. Abb. 2. 20) (Brenda Enzymes). Zur Aktivitätsbestimmung diente als Substrat p-Nitrophenyl-N-acetyl-glucosaminid (pNP-NAG) (**15**). AcHex katalysiert die Spaltung des Substrats in N-Acetyl-glucosamin (**17**) und p-Nitrophenol (pNP) (**10**) (Reaktionsmechanismus siehe Abb. 2. 20). Durch die Extinktionszunahme von pNP bei 405 nm wird die Enzymaktivität einfach bestimmt (Borooh et al., 1961). Die genaue Durchführung ist im Kapitel 4.3.13 zusammengefasst.

Analog zu den bei Xanthinoxidase erhaltenen Ergebnissen wurde auch bei dieser Versuchsreihe keine Beeinflussung der Enzymaktivität infolge der Verwendung unserer Zielverbindungen (**1** – **4**) festgestellt. Vergleichbare Literaturdaten fehlen in diesem Fall.

3.7.5.1 Cannabinoid-Rezeptor

Mit einem kompetitiven Radioligand-Bindungsassay wurde die Affinität von Ethanolaminphosphat (**1**) und den NAcEAP-Derivaten (**2** - **4**) für den CB₁-Rezeptor getestet. ³H-CP55940 wurde als radioaktiv markierter Ligand (Agonist) verwendet. Die genaue Versuchsdurchführung ist im Kapitel 4.3.14 beschrieben.

Die Auswertung erfolgte über die Messung der Radioaktivität (Daten nicht angezeigt). Kommt es zur Abnahme in Gegenwart von Ethanolaminphosphat (**1**) oder eines der NAcEAP-Derivate (**2** - **4**), dann ist ein kompetitiver Effekt dieser auf den markierten Liganden nachweisbar.

In Abb. 3. 25 ist exemplarisch die graphische Auswertung der Eigenschaften von NBEAP (**3**) auf den ³H-CP55940 Liganden dargestellt.

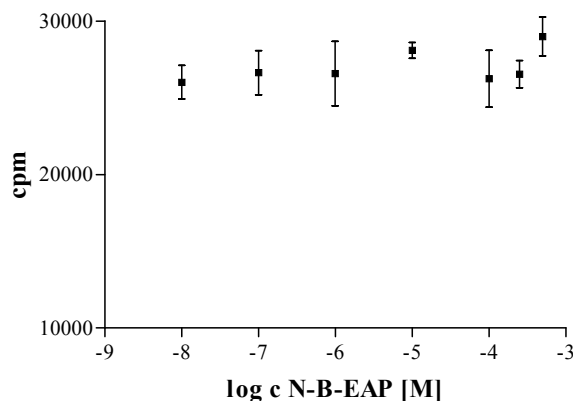


Abb. 3. 25 Messung der Radioaktivität (in cpm), CB Rezeptor mit ^3H -Ligand und NBEAP (**3**) als potentielltem Kompetitor.

Die mit NBEAP (**3**) durchgeführte Versuchsreihe ergab keine Abnahme der Radioaktivität durch den Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an NBEAP (**3**). Somit war keine Kompetition durch NBEAP (**3**) nachweisbar. Auch die anderen untersuchten Verbindungen (**1**, **2**, **4**) zeigten das gleiche Ergebnis wie NBEAP (**3**) (Daten nicht gezeigt). Infolgedessen ist festzuhalten, dass unsere Zielkomponenten (**1** – **4**) keinen kompetitiven Effekt im CB_1 Bindungsassay zeigen.

Ethanolamin (**9**) ist Strukturbestandteil von Anandamid. Jedoch ist für die Affinität von Anandamid zum CB-Rezeptor neben dem Ethanolamidrest der unpolare Rest von großer Bedeutung (Regio 2002). Auch die Bindung von THC beruht auf das Vorhandensein einer langen Kohlenstoffkette, die an Position 3 des Dihydrobenzopyranrings verknüpft und eine Hydroxylgruppe in Position 1 oder 11 aufweist (Razdan 1986; Mechoulam et al., 1987). Somit lässt sich der fehlende kompetitive Effekt auf die hohe Polarität der Verbindungen (**1** - **4**) zurückführen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien und Chemikalien

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p. a. - Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Extrasynthese (Lyon, Frankreich), EurisoTop (Gif sur Yvette, Frankreich), BD Bioscience (Heidelberg), Gruessing (Filsum), Serva (Heidelberg) und Apin Chemicals Ltd. (Abingdon, UK) bezogen. *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**) stand dem Labor als Industriespende zur Verfügung, *N*-Acetyl- (**2**) und- *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**) wurden synthetisiert (Vergleich Abschnitte 4.3.2 und 4.3.3). Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Reinstwasser stammte aus der hauseigenen Millipore™-Aufbereitungsanlage (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Für HPLC-DAD- und HPLC-MS(MS)-Analysen wurden „gradient grade“-Lösungsmittel von Acros Organics (Geel, Belgien) und Merck (LiChrosolv®), Darmstadt) verwendet. Reinstgase lieferten die Firmen Linde (Berlin) und Messer Griesheim (Frankfurt).

4.1.2 Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Lebensmittel waren Industriespenden bzw. stammten aus dem Internethandel. Dabei handelte es sich um japanische Reisweine, Sake, Amasake, Nigorisake, und einen mit Milchsäurebakterien fermentierten Rotkohl. Für die „Bioaktivitätsstudien“ wurden alkalische Phosphatase (Rinder Darmzellen), Xanthinoxidase (Rindereserum) und *N*-Acetyl-glucosaminidase (Rinder Nieren) sowie Lipoxygenase Typ V (Sojabohne) von Sigma-Aldrich (Schnelldorf) bezogen. Für die Untersuchungen am Cannabinoid-Rezeptor wurden Membran-Preparationen des rekombinanten humanen Cannabinoidrezeptors 1 (Chem-1-Zellen) von Millipore (Schwalbach) bezogen. [³H]-CP55940 stammte von der Firma PerkinElmer (Boston, MA, USA) und nicht markiertes CP5940 von Sigma-Aldrich (Schnelldorf).

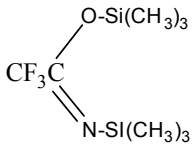
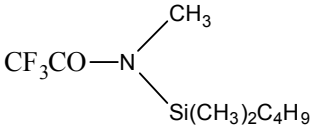
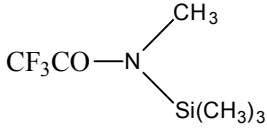
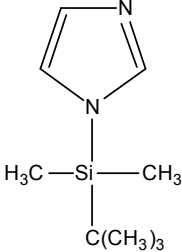
4.1.3 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Roth (Karlsruhe), Fisher-Scientific (Ulm) und Hartenstein (Würzburg) erworben. HPLC-Zubehör wurde von Wicom (Hep-

penheim), GC-Zubehör von CTZ (Kriftel) bezogen. Der stark saure Kationentauscher Dowex[®] 50WX8 (200 - 400 mesh) und das stark basische Anionentauschermaterial Dowex[®] 1X8 (200 - 400 mesh) stammten von der der Firma Sigma Aldrich. Für die Festphasenextraktion wurden schwache Anionentauscherkartuschen Discovery[®] DSC-NH₂ (1 g Adsorbens, 6 mL Volumen) der Firma Supelco verwendet. Die funktionelle Gruppe hierbei stellt die polymergebundene Aminopropylenphase dar. Die zur Derivatisierung verwendeten Silylierungsreagenzien wurden von Sigma Aldrich bezogen.

In Tab. 4. 1 sind die verwendeten Silylierungsreagenzien aufgelistet.

Tab. 4. 1 Für die in Versuchsreihen mit *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**) eingesetzten Silylierungsreagenzien

Silylierungsreagenz	Struktur
BSTFA N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid	
MBDSTFA N-Methyl-N-tert-Butyldimethylsilyl-trifluoracetamid	
MSTFA N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid	
TMCS Trimethylchlorsilan	$(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$
TSIM N-Trimethylsilyl-imidazol	

4.2 Geräte

4.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC 1

Gerät:	Präparative HPLC (Knauer)
Pumpen:	2 x Knauer HPLC 64-Pumpen mit präparativen Pumpenkopf
Gradientenformer:	Knauer HPLC Software
Injektor:	Rheodyne 7725 mit 1mL-Probenschleife
Trennsäule:	XBridge, Waters
Fließmittel:	A: 0.1 % Ameisensäure in Millipore Wasser B: Acetonitril
Gradient:	Linear, 30 - 80 % B in 25 min
Wellenlänge:	254 nm

4.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC-System 2

Gerät:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems, Bensheim)
Pumpe:	Applied Biosystems 140b Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Bensheim)
Autosampler:	Spark Holland Triathlon mit automatischer Injektion (Emmen, Niederlande)
Trennsäule:	Atlantis (RP ₁₈), 150 mm x 3.9 mm, 3 µm
Fließmittel:	A: 0.1 % Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluß:	0,2 mL/min
Injektionsvolumen:	5 µL
Gradient:	Linear, 99 - 40 % B in 15 min

HPLC-System 3

Gerät:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems, Bensheim)
Pumpe:	Applied Biosystems 140b Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Bensheim)

Autosampler:	Spark Holland Triathlon mit automatischer Injektion (Emmen, Niederlande)
Trennsäule:	SeQuant zic [®] -HILIC, 150 mm x 2.1 mm, 3.5 μ m, 100 Å
Fließmittel:	40 % 50 mM Ammoniumformiatpuffer pH 3 60 % Acetonitril
Fluß:	0,1 mL/min
Injektionsvolumen:	5 μ L
Isokratisch:	30 min

Massenspektrometer

Gerät:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 μ m I.D.) (J&W, Folsom,)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250 °C
Kapillarspannung:	3,2 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 Skalenteile)
Messbereich:	m/z 150 - 1500 (Full Scan Modus)
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 0,27 Pa (2,0 mTorr)
Kollisionsenergie:	20 bis 50 eV
Multiplierspannung:	1450 V für ESI-MS, 1 750 V für ESI-MS/MS

Die Datenauswertung erfolgte mit Xcalibur[™] Software Version 1.2 (Thermo Fisher, Dreieich) nach Konvertierung.

4.2.3 Kapillargaschromatographie (HRGC)

HRGC-System 1

Gerät:	Carlo Erba Instruments
Injektor:	Split/Splitlessinjektor (Split 1:20), Temperatur 250 °C
Trennsäule:	J & W DB-5 (30 m x 0,25 mm I.D., d_f 0,25 μ m)
Trärgas:	2,0 mL/min Helium 5.0, konstanter Fluß
Make-up Gas:	30 mL/min Stickstoff 5.9
Brennergase:	30 mL/min Wasserstoff 5.0, 300mL/min gereinigte Luft

Temperaturprogramm: 60 °C, 5 °C/min, 300 °C, 10 min isotherm

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 310 °C

4.2.4 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

HRGC-System 2

Gerät: HP Agilent 6890 Series (Agilent Technologies Inc., Wilmington, USA)

Injektor: Split/Splitlessinjektor (Split 1:20), Temperatur 250 °C

Autosampler: Agilent 7683 Series Injektor

Trennsäule: J & W DB-1 (30 m x 0,25 mm I.D., d_f 0,25 μ m)

Trärgas: 2,0 mL/min Helium 5.0, konstanter Fluß

Temperaturprogramm: 60 °C, 5 °C/min, 300 °C, 10 min isotherm

Massenspektrometer

Gerät: Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, USA)

Ionenquelle: Elektronenstoßionisation (EI) mit 70 eV

Temperatur: Ionenquelle 220 °C, Transferline 300 °C

Quellendruck: $1 \cdot 10^{-5}$ mbar

Multiplizier: 1800 V

Massenbereich: m/z 38 bis 450 amu

Die Datenaufnahme erfolgte mit Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA); nach Konvertierung mit File Converter (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) erfolgte die Datenauswertung mit Xcalibur[™] Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

4.2.5 Ionenchromatographie

IC - System

Gerät: 792 Basic IC von Metrohm (Filderstadt)

Trennsäule: Metrosep A Supp 15-250, Metrohm (Filderstadt)

Fließmittel: 5,0 mmol/L Natriumcarbonat; 0,3 mmol/L Natriumhydroxid

Detektor: Leitfähigkeitsdetektor mit chemischer Suppression

Injektionsvolumen: 20 μ L

Fluß:	0,7 mL/min
Isokratisch:	20 min

Datenaufnahmen und -auswertung erfolgten mit Metrodata 792 PC Software 1.0 (Metrohm CH-9101 Herisau; Schweiz).

4.2.6 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-System

Gerät:	Bruker Avance 400 MHz Spektrometer (Rheinstetten)
Lösungsmittel:	0,5 % Wasser- d_2 (D_2O , 99,97 % D)

Datenaufnahmen und -auswertung erfolgten mittels Mestre-C 4.4.1.0 Software (Santiago de Compostela, Spanien). Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. Als interner Standard dienten bei den 1H -NMR-Spektren Tetramethylsilan ($\delta_{TMS} = 0,0$ ppm) bzw. die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels ($\delta_{DMSO-d_6} = 2,50$ ppm, $\delta_{D_2O} = 4,79$ ppm). Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett (Feinstruktur) und br = Multiplett (breit). Die Kopplungskonstante J ist in Hertz (Hz) angegeben.

4.2.7 Sonstige Geräte

Cell Harvester:	Inotech cell harvester, Dietkon, Schweiz
Lyophilisator:	Christ Alpha1-4; 0,063 mbar, Christ (Osterode)
Magnetrührer:	IKAMAG [®] RH, IKA Labortechnik (Staufen)
Mixer:	Mixi 700
pH-Meter:	Labor-pH-Meter, Knick (Berlin)
Photometer:	Varian, Cary 50 Bio UV Visible Spectrophotometer
Plattenlesegerät:	FluoStar Galaxy, BMG Labtech GmbH (Offenburg)
Rotavapor:	Büchi Vakuum System B-173, Vakuum Controller B-720, Büchi-Rotavapor (Konstanz)
Szintillator:	Win Spectral 1414 Flüssigszintillationstähler, PerkinElmer, Wallac GmbH (Freiburg)
Trockenschrank:	Memmert, Modell 400 (Schwabach)

Ultraschallbad:	Branson 1210, G. Heinemann (Schwäbisch-Gmünd)
Vakuumkammer:	Supelco Preppy (Bellefonte, USA)
Waagen:	Mettler PL 300 Analysenwaage, Mettler-Toledo (Gießen); Mettler AT 21 Comparator, Mettler-Toledo (Gießen); Sartorius BP 210 S Analysenwaage, Sartorius AG (Göttingen)
Zentrifuge:	EBA12, Hettich Zentrifugen Hettich (Tuttlingen)

4.3 Methoden

4.3.1 Ethanolaminphosphat: Spektroskopische Daten

LC-ESI_{neg}-MS/MS (140 @ 20 eV): m/z (%) 79.2 (100); 97.8 (3); 140.1 (10).

¹H-NMR: (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 3.21 [t, *J* = 4.94 Hz, 2H, H₂-C-N], 4.03 [m, *J* = 6.23, 16.51 Hz, 2H, H₂-C-O].

¹³C-NMR:(400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 40.10 [CH₂-N], 61.42 [CH₂-O].

4.3.2 Synthese und Reinigung von *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (2)

Die Synthese von (2) erfolgte nach der Vorschrift von Cherbuliez und Rabinowitz (1956). Hierzu wurden 2,4 g Ethanolaminphosphat (1) (17 mmol) in 20 mL wasserfreies Pyridin gegeben. Unter Rühren setzte man 10 mL Acetanhydrid (90 mmol) zu und rührte für vier Stunden unter Rückfluss bei 60 °C. Nach dem Abkühlen wurde am Rotationsverdampfer bei 85 °C und vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Der Niederschlag wurde in wenig Wasser aufgenommen und mit gesättigter Bariumhydroxidlösung gegen Phenolphthalein neutralisiert. Nach Filtration erfolgte Einengen des Filtrats am Rotationsverdampfer bei 85 °C und vermindertem Druck bis zur Trockne, Aufnahme in ca. 25 mL Wasser und Zugabe von 100 mL Ethanol. Nach drei Tagen Lagerung im Gefrierschrank bei -18 °C kristallisierte das Bariumsalz des *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphats (2) aus. Der erhaltene Feststoff wurde an der Luft getrocknet. Ausbeute: 5 g.

Reinigung von NAEAP (2):

Vor der Reinigung des erhaltenen (2) über eine Kationentauschersäule (Dowex 50WX8) wurden 10 g Säulenmaterial wie folgt konditioniert:

- 10 g Säulenmaterial in Millipore Wasser vorquellen
- Umfüllen in eine Glassäule 35 x 5,5 cm I.D.
- 30 mL Millipore Wasser
- 30 mL 2 N NaOH
- 30 mL Millipore Wasser
- 30 mL 2 N HCl
- 30 mL Millipore Wasser

Danach erfolgte die Reinigung von 200 mg (2) (in 5 mL 0.1 N HCl) wie folgt:

Probenaufgabe: 3 x
Waschen: 35 mL Millipore Wasser
Elution: 30 mL 4 N $\text{NH}_3 \times \text{H}_2\text{O}$

Die Flussrate wurde mit Druck bei 2 mL/min gehalten. Die Fraktionen „Probenaufgabe“ und „Waschen“ wurden vereinigt und bei max. 50 °C unter verminderten Druck eingengt. Anschließend erfolgte weitere Reinigung an einer Anionentauschersäule (Dowex 1X8), welche zuvor wie folgt konditioniert wurde:

- 8 g Säulenmaterial in Millipore Wasser vorquellen
- Umfüllen in eine Glassäule 35 x 5,5 cm I.D.
- 30 mL Millipore Wasser
- 30 mL 0.1 N HCl
- 30 mL Millipore Wasser
- 30 mL 0.1 N NaOH
- 30 mL Millipore Wasser

40 mg des Feststoffs nach Aufreinigung an der Kationentauschersäule (Dowex 50WX8) wurden in 5 mL 0.1 N NaOH gelöst und wie folgt weitergereinigt:

- Probenaufgabe: 3 x
- Waschen: 30 mL Millipore Wasser
- Elution: 50 mL 0.1 N HCl

Die Flussrate wurde mit Druck bei 2 mL/min gehalten. Die Elutionsfraktion wurde unter Vakuum eingengt und anschließend über Kieselgel getrocknet. Ausbeute ca. 30 mg. Spektroskopische Daten:

LC-ESI_{neg}-MS/MS (182 @ 20 eV): m/z [%] 79.1 (100); 97.1 (10), 182.3 (9).

¹H-NMR: (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 1.96 [s, 3H, H₃-C], 3.375 [t, *J* = 5.24 Hz, 2H, H₂-C-N], 3.91 [m, *J* = 6.51, 17.6 Hz, 2H, H₂-C-O].

¹³C-NMR: (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 21.86 [C-H₃], 40.01 [CH₂-N], 64.22 [CH₂-O], 174.46 [C=O].

4.3.3 Synthese von *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (3)

4.3.3.1 Nach Cherbuliez und Rabinowitz 1956

0.52 g Ethanolaminphosphat (1) und 3.2 g Bariumhydroxid wurden mit 1 mL Benzoylchlorid vermischt. Anschließend wurde 15 mL Millipore-Wasser hinzugegeben und für drei Stunden gerührt. Die ausgefallenen Kristalle wurden über einen Faltenfilter abgetrennt und in 100 mL heißem Wasser gelöst, danach wurde erneut filtriert und nach dem Abkühlen in 50 mL Ethanol gelöst. Nach Aufbewahrung der Lösung über vier Tage im Gefrierschrank wurde filtriert und die Lösung unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Niederschlag wurde in wenig Wasser gelöst und mit 50 mL Ethanol vermengt. Die erneut ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert und an der Luft getrocknet. Ausbeute ca. 0.12 g.

4.3.3.2 Mit Benzoylchlorid und Triethylamin in Tetrahydrofuran

Synthese:

In einer Mischung von 0,5 g Ethanolaminphosphat (1) (3.5 mmol) mit 5 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) wurde unter Rühren 1 mL Triethylamin zugegeben. Danach fügte man 0,5 mL Benzoylchlorid (3 mmol) dem hinzu und rührte ca. 20 Stunden. Anschließend wurden 2,5 mL Wasser zugegeben und die entstehenden Phasen getrennt.

Die wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer bei 50 °C unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt, der Rückstand an der Luft getrocknet. Ausbeute: 0.3 g.

Reinigung von NBEAP (3):

Das gemäß 4.3.3.2 gewonnen (3) wurde über eine Kationentauschersäule (Dowex 50WX8) gereinigt. 30 g Säulenmaterial wurden zuvor wie folgt konditioniert:

- 30 g Säulenmaterial in Millipore Wasser vorquellen
- Umfüllen in eine Glassäule 35 x 5,5 cm I.D.
- 100 mL Millipore Wasser
- 100 mL 2 N NaOH
- 100 mL Millipore Wasser
- 100 mL 2 N HCl
- 100 mL Millipore Wasser

Nach Konditionierung des Säulenmaterials erfolgte die Reinigung von 80 mg Syntheseprodukt (3) gelöst in 5 mL 0.1 N HCl wie folgt:

- Probenaufgabe: 3 x
- Waschen: 120 mL Millipore Wasser
- Elution: 120 mL 4 N NH₃

Die Flussrate wurde mit Druck bei 2 mL/min gehalten. Die Fraktionen „Probenaufgabe“ und „Waschen“ wurden vereinigt und unter Vakuum eingengt. Das gereinigte (3) wurde über Kieselgel getrocknet. Spektroskopische Daten:

LC-ESI_{neg}-MS/MS (244 @ 20 eV): *m/z* (%) 79.1 (100); 97.1 (80), 244.2 (40).

¹³C-NMR: (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 40.00 [CH₂-N], 61.61 [CH₂-O], 127.12 [2,6], 128.76 [3,4,5], 171.2 [C=O].

4.3.4 Reinigung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4) mittels Festphasenextraktion (SPE)

Die Konditionierung der Festphasenkartuschen erfolgte mit 6 mL Methanol und 12 mL

50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7.2. Anschließend wurde wie folgt aufgereinigt:

- Probenaufgabe: in 50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7.2, 3x
- Waschen: 35 mL Methanol
- Elution: 35 mL 1mol/L Ameisensäure

In der Elutionsfraktion befand sich (**4**). Spektroskopische Daten:

LC-ESI_{neg}-MS/MS (212 @ 20 eV): m/z (%) 79.2 (100); 97.2 (80); 212.2 (100).

¹H-NMR: (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 1.28 [d, J = 6.84 Hz, 3H, H₃-C], 3.41 [t, J = 5.07 Hz, 2H, H₂-C-N], 3.92 [m, J = 6.18, 17.24 Hz, 2H, H₂-C-O], 4.18 [dd, J = 6.84, 20.49 Hz, 1H, H-C-CH₃].

¹³C-NMR: (400 MHz, D₂O) δ [ppm] = 19.56 [C-H₃], 39.40 [CH₂-N], 64.32 [CH₂-O], 67.7 [C-OH], 177.89 [C=O].

4.3.5 Derivatisierung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (**4**)

4.3.5.1 Silylierung

Silylierungen von (**4**) (1mg/L) erfolgten in wasserfreiem Pyridin. Es wurde 1:1 mit dem Silylierungsreagenz vermischt (Endkonzentration von 0.5 mg/mL). Der Einfluss der Reaktionstemperatur wurde bei 30 °, 50 °, 60 °, 70 ° und 100 °C getestet, wobei parallel die Reaktionszeit zwischen 30 min und 4 Stunden variiert wurde. Kontrollen wurden jeweils mit p-OH-Benzoessäure durchgeführt.

4.3.5.2 Methylierung

Die analytischen Kontrollen der nachfolgend berichteten Methylierungsversuche erfolgten jeweils mittels p-OH-Benzoessäure.

4.3.5.2.1 MeOH/BF₃

100 μ L einer 1 g/L *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphatlösung (**4**) (4.7 mmol) in Methanol wurden mit 1000 μ L Methanol/BF₃ Lösung versetzt und 10 min bei 60 °C stehen gelassen.

4.3.5.2.2 Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)

Für die Reaktion mit TMSH wurden wasserfreies Methanol und wasserfreies Pyridin jeweils als Lösungsmittel für (4) (1 g/L) (4.7 mmol). Je 500 μL der Lösungen wurden mit 250 μL TMSH Lösung in Methanol (25 % w/w) versetzt und 30 min bei 25 °C gerührt.

4.3.5.2.3 Trimethylsilyl-diazomethan

100 μL Toluol und 50 μL einer Lösung von (4) (1g/L) (4.7 mmol) in Methanol wurden mit 50 μL der TMSDM Lösung in Diethylether (2 M) versetzt. Der Einfluss der Reaktionszeit (nach 30 min und 120 min) und der Einfluss der Reaktionstemperatur (bei 25 und 50 °C) wurden jeweils geprüft.

4.3.5.2.4 Diazomethan

4.3.5.2.4.1 Etherische Diazomethan-Lösung

In einem Scheidetrichter wurden 75 mL Diethylether, 15 mL einer eisgekühlten 40 %igen KOH-Lösung vorgelegt, 4 g (42 mmol) *N*-Nitrosomethylharnstoff in kleinen Aliquoten zugegeben und vorsichtig geschüttelt. Durch Kühlung mit Eis wurde die Temperatur im Scheidetrichter unter 5 °C gehalten (Organikum, 1996). Zur Trocknung wurde der organischen Phase 10 g KOH zugegeben und für drei Stunden in den Kühlschrank gestellt. Die getrocknete Diazomethanlösung wurde mit 75 mL Diethylether verdünnt und direkt zur Methylierung verwendet:

Zu einer Lösung von (4) in Methanol (7 μmol) wurde bis zur anhaltenden Gelbfärbung die Diazomethan-Diethylether-Lösung zupipettiert. Mit Stickstoff wurde das Lösungsmittel entfernt und danach mit 500 μL Diethylether aufgenommen.

4.3.5.2.4.2 Diazomethangas

Für die Herstellung von Diazomethangas wurde eine Apparatur vorbereitet mit zwei Glasgefäßen einer Stickstoffzufuhr und einer Vorrichtung um das entstandene Gas in die Probe zu führen. Glasgefäß Nr. 1 diente als Zwischenstück. Gefäß Nr.2 diente der Diazomethangasgeneration. Dieses Gefäß war mit einer Klemme an die Apparatur verbunden.

Das aus der Reaktion von *N*-Nitrosomethylharnstoff (100 mg [1 mmol] in 2 mL Diethylether) mit KOH (50 %) (1 mL) generierte Diazomethan wurde mit einem Stickstoffstrom in ein Reaktionsgefäß mit einer methanolischen Lösung von (4) (1 mg/L) eingeleitet. Einleitung bis zur permanenten Gelbfärbung.

4.3.5.2.5 Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Methanol

2.13 mg (10 μ mol) (4) wurden in 20 mL wasserfreiem Methanol gelöst und mit 10.2 mg (50 μ mol) DCC versetzt. Der Ansatz wurde 5 Tage bei 25 °C gerührt.

4.3.5.2.6 Dimethylcarbonat (DMC) im Basischen und Sauren

Methylierung im Basischen:

3.8 mg (18 μ mol) (4) wurden in 1 mL DMF gelöst, mit 5 μ L Dimethylcarbonat DMC (50 μ mol) versetzt und mit 1 mg K_2CO_3 versetzt. Nach einer Stunde bei 100 °C wurde überschüssiges DMC durch den Zusatz von 2.7 mg (30 μ mol) Butandiol entfernt (Tundo et al., 2002).

Methylierung im Sauren:

2.13 mg (10 μ mol) (4), 1.8 mg (90 μ mol) DMC und 1.7 mg (10 μ mol) *p*-Toluolsulfonsäure wurden in 1 mL Methanol gelöst. Bei 120 °C wurde für drei Stunden unter Rückflusskühlung gerührt. Anschließend wurde auf einen schwach basischen Anionentauscher DSC-NH₂, den man vorher mit 4 mL Methanol und 4 mL NH₄OAC (pH 7.4) vorkonditioniert wurde, gegeben und mit 1 mL Methanol eluiert (Tundo et al., 2002). Parallel wurde ein Blindversuch durchgeführt in dem kein (4) enthalten war.

4.3.5.2.7 Dimethylsulfat (DMS), katalysiert durch Tetrabutylammoniumsulfat (TBAH)

100 μ L einer Lösung von 5.4 mg (25 μ mol) (4) in 1 mL DMF wurden mit 95.5 μ L (600 μ M) DMS und 40 μ L (80 mmol) Tetrabutylammoniumsulfat (TBAH) 40 % in DMF für 1 h bei 120 °C unter Rückflusskühlung gerührt (Blau und King 1977).

4.3.5.2.8 Methyljodid

100 μL (0.5 mmol) einer Lösung von (4) in wasserfreiem Pyridin wurden mit 300 μL (1 mmol) Methyljodid-Lösung und 5 mg K_2CO_3 vermischt. Die Umsetzung erfolgte bei 25 °C und 50 °C. Die Reaktionszeit wurde von 1 bis 3 h variiert (Blau und King 1977).

4.3.5.3 Acylierung mit Essigsäureanhydrid

10 μL einer 1 mg/mL Lösung von (4) (0.5 μmol) wurden in wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 100 μL (1 μmol) Acetanhydrid bei 50 ° und 100 °C zwischen 30 min und 10 h stehen gelassen. Danach wurde unter Stickstoffstrom und milder Hitze eingeeengt und in 100 μL Chloroform aufgenommen (Blau und King 1977).

4.3.5.4 Zweistufensynthese zum Phenyl Diazomethan

1. Stufe: Herstellung von Benzaldehyd-tosylhydrazon (nach Creary, 1986).

In einem 50 mL Erlenmeyerkolben wurden 3.7 g (20 mmol) p-Toluolsulfonylhydrazin mit 5 mL Methanol gerührt. Schnell wurden 2.1 g (20 mmol) Benzaldehyd zugegeben. Nach einigen Minuten fiel das Benzaldehyd-tosylhydrazon aus. Zum Kühlen wurde der Kolben in ein Eisbad gestellt, anschließend filtriert, der Rückstand mit kaltem Methanol gewaschen und das Filtrat unter Vakuum getrocknet. Ausbeute: 4.8 g.

2. Stufe: Herstellung von Phenyl Diazomethan (nach kombinierter Methode von Wulfmann 1988 und Jonczyk und Wiostowska 1978).

In einem 250 mL Rundkolben wurden 400 mg synthetisiertes Benzaldehyd-tosylhydrazon, 20 mL Toluol, 20 mL 14 % NaOH und 80 mg Benzyltriethylammoniumchlorid (BTMACl) bei 60 °C für 2 h gerührt. Nach Abtrennung der wässrigen Phase mit Hilfe eines Scheidetrichters wurde die organische Phase mit 10 mL Wasser dreimal gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet (Wulfmann 1988; Jonczyk und Wiostowska 1978). Die Lösung war bei -18 °C Lagerung für einen Monat haltbar.

4.3.5.4.1 Phenyldiazomethan

50 μL einer 1 mg/mL (2.5 μmol) Lösung von (4) in Methanol wurden mit 500 μL der Phenyldiazomethanlösung versetzt. Durch Variation der Reaktionszeit (bei Raumtemperatur) wurde nach 10, 60 und 120 min durch Einlass von Stickstoffgas bei 40 °C das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wurde in 1 mL Hexan wieder aufgenommen.

4.3.5.5 Benzylbromid

500 μL (4) in Methanol (1 mg/mL) (0.5 μmol) wurden mit 500 μL Benzylbromid (2 μmol) und 100 mg K_2CO_3 versetzt. Bei 65 °C wurde die Reaktion durch Variation der Reaktionszeit bei 15, 30 und 60 min geprüft (Blau und King 1977).

4.3.6 Flüssigchromatographie

4.3.6.1 Hydrophile-Interaktions-Chromatographie (HILIC)

Für die Analytik der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate (2 - 4) sowie EAP (1) per HILIC wurden als Fließmittel Ammoniumacetatpuffer/Acetonitril und Ammoniumformiatpuffer/Acetonitril untersucht. Dazu wurden 2.1 mg (4), 1.3 mg *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (2), 1.3 mg *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (3) und 1,6 mg Ethanolaminphosphat (1) eingewogen, und in 1.5 mL LC-Wasser gelöst und vor der Messung mikrofiltriert.

Pufferlösungen:

50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 5: In einem 200 mL Meßkolben wurden 2 mL 5 M Ammoniumacetatlösung ca. 170 mL LC-Wasser versetzt und mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt. Anschließend wurde mit LC-Wasser zur Marke aufgefüllt und die Lösung unmittelbar vor der Messung mit Helium entgast.

50 mM Ammoniumformiatpuffer pH 3: In einem 200 mL Meßkolben wurden 1 mL 10 M Ammoniumformiatlösung mit ca. 170 mL LC-Wasser versetzt und mit konzentrierter Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Anschließend wurde mit LC-Wasser zur Marke aufgefüllt und die Lösung unmittelbar vor der Messung mit Helium entgast.

4.3.6.2 Ionenchromatographie

Lösungen für die Ionenchromatographie:

50 mmol/L Schwefelsäure (Regenerierlösung für den Suppressor)

Zu ca. 900 mL Millipore - Wasser wurden in einem 1000 mL Messkolben 2,8 mL konzentrierte Schwefelsäure (18 mol/L) gegeben und für 15 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde mit Millipore - Wasser zur Marke aufgefüllt.

Fließmittel für die Ionenchromatographie (5,0 mmol/L Na₂CO₃, 0,3 mmol/L NaOH)

Vor dem Lösen der Salze wurde 1 l Millipore - Wasser für ca. 15 min mit Helium entgast. Anschließend wurden in einem 1 l Meßkolben 530 mg Na₂CO₃ (wasserfrei) und 11 mg NaOH in dem zuvor entgasten Millipore - Wasser gelöst und bis zur Marke aufgefüllt. Vor der Messung wurde die Lösung mikrofiltriert.

Für die Analytik der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate (**2** - **4**) per Ionenchromatographie wurde als Fließmittel eine wässrige Natriumcarbonat-Lösung mit Natriumhydroxid verwendet. Dazu wurden jeweils Stammlösungen mit 50 mg/L (**2**), (**3**) sowie (**4**) hergestellt und vor der Messung mikrofiltriert.

4.3.7 Versuche zur Isolierung von (**4**) aus Sake, Amasake, Nigorisake und Rotkohl

Für die Isolierung von (**4**) aus den genannten Lebensmitteln wurden zwei unterschiedliche Systeme (Festphasenextraktion und Säulenchromatographie) mit dem gleichen Prinzip (Ionenbindung) verwendet.

Probenvorbereitung:

Die Überprüfung der Effektivität beider Systeme erfolgte anhand von Bestimmungen der Wiederfindung von (**4**). Der untersuchte Sake wies keine Trübungen auf und wurde nach Entfernen des Alkohols (bei 40 °C im Vakuum) lyophilisiert. Der Nigorisake und Amasake wurden je durch einen Faltenfilter filtriert, bei 40 °C wurde im Vakuum der Alkohol entfernt und durch Gefriertrocknung das Wasser entzogen. Es wurde jeweils 10 mL der eben erwähnten Lebensmittel so behandelt. Mit Hilfe eines Stabmixers wurde

Rotkohl homogenisiert. 10 g dieses Homogenats wurden über einen Faltenfilter filtriert, gewaschen, erneut filtriert und anschließend mittels Membranfilter filtriert; schließlich erfolgte Lyophilisierung. Die jeweiligen Lebensmittel wurden nach der Einwaage bzw. Abmessung mit je 0.64 mg (4) versetzt. Parallel wurde eine Versuchsreihe mit NLEAP (4) (0.64 mg) ohne Matrix durchgeführt. Es wurden je Isolierungsmethode (LC siehe Abschnitt 4.3.7.1 und SPE siehe Abschnitt 4.3.7.2) zwei Ansätze jeder Probe durchgeführt.

4.3.7.1 Isolierung mittels LC-Anionentauschermaterial und Bestimmung der Wiederfindung mittels Ionenchromatographie

Für die Säulenchromatographie (LC) wurden die lyophilisierten Proben (Abschnitt 4.3.7, Probenvorbereitung) in 0.1 N HCl gelöst und der pH überprüft. Die Wiederfindung von NLEAP (4) ohne Matrix wurde ebenfalls in 0.1 N HCl gelöst. Es erfolgte die Aufarbeitung wie in Tab. 4. 2 dargestellt.

Tab. 4. 2 Schema zur LC-Isolierung von (4) aus Sake, Nigorisake, Amasake und Rotkohl mittels LC (Anionentauschermaterial Dowex 1X8):

	NLEAP	Sake	Amasake	Nigorisake	Rotkohl
Dowex 1X8	10 g	10 g	10 g	10 g	40 g
Konditionieren:					
0.1 N HCl	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	120 mL
Millipore Wasser	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	120 mL
0.1 N NaOH	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	120 mL
Millipore Wasser	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	120 mL
0.1 N NaOH	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	120 mL
Probenaufgabe in 0.1 N NaOH	3 mal	3 mal	3 mal	3 mal	6 mal
Waschen mit Millipore Wasser	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	200 mL
Elution mit 0.1 N HCl	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	200 mL

Die Fraktionen Probenaufgabe, Waschen und Elution wurden auf ein Volumen von 10 mL eingengt bzw. aufgefüllt, mikrofiltriert und per Ionenchromatographie (Bedingungen siehe 4.2.5) gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen an der IC durchgeführt.

Für die Auswertung der Wiederfindung wurde eine Standardlösung mit 0.64 mg/mL als 100 % Wert gesetzt.

4.3.7.2 Isolierung mittels Festphasenextraktion-Anionentauscherkartuschen und Bestimmung der Wiederfindung mittels Ionenchromatographie

Für die Festphasenextraktion wurden die lyophilisierten Proben (Abschnitt 4.3.7, Probenvorbereitung) in NH₄OAc Puffer pH 7.4 gelöst und der pH überprüft. Die Wiederfindung von NLEAP (4) ohne Matrix wurde ebenfalls im NH₄OAc Puffer pH 7.2 gelöst. Es erfolgte die Aufarbeitung wie in Tab. 4. 3 dargestellt

Tab. 4. 3 Schema zur Isolierung von *N*-Lactoyl-Ethanolaminphosphat (4) aus Sake, Nigorisake, Amasake und Rotkohl mit Festphasenextraktion (Anionentauscherkartuschen Supelco DSC-NH2)

	NLEAP	Sake	Amasake	Nigorisake	Rotkohl
Konditionieren: Methanol NH₄OAc Puffer pH 7.4	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL
	12 mL	12 mL	12 mL	12 mL	12 mL
Probenaufgabe in NH₄OAc Puffer pH 7.4	3 mal	3 mal	3 mal	3 mal	3 mal
Waschen mit NH₄OAc Puffer pH 7.4	35 mL	35 mL	35 mL	35 mL	35 mL
Elution mit 1 mol/L HCOOH	35 mL	35 mL	35 mL	35 mL	35 mL

Die Fraktionen Probenaufgabe, Waschen und Elution wurden auf ein Volumen von 10 mL eingengt bzw. aufgefüllt, mikrofiltriert und per Ionenchromatographie analysiert. Es wurden Dreifachbestimmungen mittels IC durchgeführt. Für die Auswertung der Wiederfindung wurde eine Standardlösung mit 0.64 mg/mL als 100 % gesetzt.

4.3.8 Stabilitätsuntersuchungen

4.3.8.1 Stabilitätsuntersuchung phosphorylierter Verbindungen

Die Stabilität von (2), (3) und (4) wurde in 50 mM Formiatpuffer (pH 3) bei 25 °C, 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7.4) bei 37 °C und in 50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 10) bei 25 °C durchgeführt. Die Probennahme erfolgte je nach Versuchsansatz für

insgesamt 24 Tage. Zu je 100 μL Probe wurden 100 μL 50 mM Ethanolaminphosphat (1) als Standardsubstanz zupipettiert. Je Substanz wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und gemäß HPLC-Bedingungen 4.2.2 und HPLC-System 3 vermessen.

4.3.8.2 Stabilitätsuntersuchungen nicht-phosphorylierter Verbindungen

Die Stabilität von 145 mM (2) und 150 mM (4) wurde in 50 mM Formiatpuffer (pH 3) bei 25 °C, 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7.4) bei 37 °C und in 50 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 10) bei 25 °C durchgeführt. Die Probennahme erfolgte je nach Versuchsansatz für insgesamt 24 Tage. Zu je 100 μL wurden je 100 μL 50 mM Ethanolamin (9) als Standardsubstanz zupipettiert. Je Substanz wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und gemäß HPLC-Bedingungen 4.2.2 und HPLC-System 3 vermessen.

4.3.9 Alkalische Phosphatase

4.3.9.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivität von AP wurde mit pNPP (10) als Substrat gemäß Walter und Schütt (1974) bestimmt. Anhand der Messung des Produktes pNP (11) bei 405 nm ließ sich berechnen:

$$\text{Units/mL Enzym} = \frac{(\Delta A_{405\text{nm}} \text{ Test} - \Delta A_{405\text{nm}} \text{ Blind}) * (3.1)}{(18.5) * (0.1)}$$

3.1 = Endvolumen Assay (in Milliliter)

18.5 = Millimolarer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm

0.1 = Enzymvolumen (in Milliliter).

Folgende Lösungen wurden für die Aktivitätsbestimmung vorbereitet:

Triethanolaminphosphatpuffer pH 9.8/37 °C: In einem 100 mL Meßkolben wurden in 80 mL Millipore-Wasser 17.5 g NaCl (3 M), 101.4 mg $\text{MgCl}_2 * 6 \text{H}_2\text{O}$ (5 mM), 2.7 mg ZnCl_2 (0.2 mM) und 396 μL Triethanolamin (30 mM) gelöst, auf 37 °C temperiert und der pH Wert auf 9.8 eingestellt. Nach Abkühlen wurde auf 100 mL Endvolumen aufgefüllt.

p-Nitrophenylphosphat-Lösung

557 mg pNPP (**10**) (150 mM) wurden in 10 mL Millipore-Wasser gelöst.

Alkalische Phosphatase aus „bovine intestinal mucosa“

Die alkalische Phosphatase wurde in Triethanolaminphosphatpuffer gelöst.

Tab. 4.4 Pipettierschema: Durchführung der Aktivitätsbestimmung in einer 3 mL-Quarzglasküvette

	Test [μL]	Blind [μL]
Triethanolamin-phosphatpuffer pH 9.8/37°C	2700	2800
p-NPP	300	300
Alkalische Phosphatase	100	-
	Absorptionsmessung bei 405 nm, 37 °C, 5 min	

4.3.9.2 Bestimmung der Substrateigenschaften von Ethanolaminphosphat, N-Acyl-Ethanolaminphosphatderivaten und p-Nitrophenylphosphat.

Die Enzymkinetik wurde durch Bestimmung von K_m und V_{max} untersucht. p-Nitrophenylphosphat (**10**) als Substrat für die AP konnte direkt durch Absorption bei 405 nm bestimmt werden. Die Phosphathydrolyse an EAP (**1**) und die NAcEAP-Derivate (**2** - **4**) wurde indirekt mit Ammoniummolybdat/Malachitgrünreagenz als Färbereagenz bestimmt. Die Enzymmenge wurde konstant gehalten und die Menge an Substrat jeweils variiert. Nach Auftragen der Substratkonzentration [S] die gegen die Geschwindigkeit [v] aus der Steigung der jeweiligen Gerade ließen sich K_m - und V_{max} -Wert graphisch darstellen und berechnen.

Folgende Lösungen wurden für die Bestimmung von K_m und V_{max} vorbereitet:

Färbereagenz zur Bestimmung von Phosphat:

Das Färbereagenz wurde nach den Vorschriften von Lanzetta et al., und Boykov et al., (Lanzetta et al., 1979; Boykov et al., 1988) hergestellt. Anstelle von Sterox wurde Tween 20 verwendet (Chalvardijan und Rudnicki, 1970).

Lösung A: 126.6 mg Malachitgrünoxalat in 100 mL Millipore-Wasser

- (0.045 % Malachitgrün)
- Lösung B: 2.6 g Ammoniummolybdat in 100 mL 4 N HCl
(4.2 % Malachitgrün)
- Lösung C: 1.36 mL Tween 20 in 100 mL Millipore – Wasser
(1.5 % Tween 20)
- Lösung D: 3 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B, 30 min rühren, filtrieren.
- Reagenz 1: 1 mL Lösung C in 50 mL Lösung D.
- Citronensäure: 34 g Citronensäure*3 Na*H₂O in 66 mL Millipore-Wasser
(34 % Citronensäure)
- Reagenz 1 war für ca. 10 Tage im Kühlschrank (4 °C) haltbar.

Substratlösungen:

Stammlösung an Substraten (**1 - 4**):

100 µL Stammlösung + 1700 µL Triethanolaminpuffer pH 9.8/37 °C.

Blank: 450 µL + 50 µL Triethanolaminpuffer pH 9.8/37 °C (Blankmix)

Test: 450 µL + 50 µL AP (Testmix)

Inkubation von Blankmix und Testmix bei pH 37 °C. Probennahme (10 µL) nach 1, 2, 3, 4, 15, 30 und 60 min. Die Messungen wurden in Halbmikroküvetten durchgeführt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Pipettierschema der Phosphatbestimmung ist in Tab. 4. 5 dargestellt.

Tab. 4.5 Pipettierschema der Phosphatbestimmung

	Test [μL]	Blind [μL]
1N HCl	10	10
Triethanolaminpuffer pH 9.8/37 °C	30	30
Blankmix	-	10
Testmix	10	-
Reagenz 1	800	800
	Inkubation 1 min	
Citronensäure	100	100
	Farbentwicklung: 30 min	
	Absorptionsmessung bei 660 nm	

4.3.9.3 Inhibition mit p-Nitrophenylphosphat

Für die Inhibitionsversuche wurde die Konzentration an Enzym (0.05 U/mL) und Substrat (p-Nitrophenylphosphat) (14.6 mM) konstant gehalten. Die Konzentration an pNPP (**10**) lag dabei im V_{\max} . Die Konzentration an den potentiellen Inhibitoren (**1 - 4**) wurde jeweils variiert (0.04 – 15 mM) (die Auswertung erfolgte graphisch durch Auftragen der Inhibitorkonzentration [I] gegen die Geschwindigkeit [v]).

4.3.9.4 Bestimmung des Inhibitionstyps

Für die Ermittlung des Inhibitionstyps wurden der Bereich von 30 - 75 % Enzyminhibierung gewählt (Copeland 2000). Für die Messungen wurden jeweils die Konzentration an Inhibitor und die Enzymmenge (0.05 U/mL) konstant gehalten und die Menge an p-NPP (**10**) variiert. Die Auswertung erfolgte durch das Auftragen von $[1/S]$ gegen $[1/v]$. Aufgrund des Verlaufs der Geraden war der Inhibitionstyp zu bestimmen.

4.3.10 Inhibition der Phospholipase A₂

Die Durchführung der Inhibitionsversuche der Phospholipase A₂ durch (1) bzw. (2 - 4) erfolgte mit dem Enzymkit sPLA₂ (Type V) Inhibitor Screening Assay Kit von Cayman Chemicals. Als Substrat für die PLA₂ diente Diheptanoyl-thio-phosphatidylcholin.

Folgende Lösungen wurden für die Aktivitätsbestimmung vorbereitet:

25 mM Tris-HCl pH 7.5 Assay – Puffer: 3 mL des gelieferten Assay Puffers wurden in 27 mL HPLC-grade Wasser gelöst.

Der Puffer setzt sich aus 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl, 0.3 mM Triton-X und 1 mg/mL BSA zusammen. Laut Hersteller ist der Puffer bei 4 °C für mindestens zwei Monate haltbar.

5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) – Lösung: Das in dem Kit enthaltene DTNB wurde in 1 mL HPLC-grade Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf Eis im Dunkeln gelagert und innerhalb von acht Stunden verbraucht.

Diheptanoyl-thio-phosphatidylcholin – Substratlösung: Das im Kit enthaltene Diheptanoyl-thio-phosphatidylcholin wurde in 12 mL Assay Puffer gelöst und entsprach somit einer Konzentration von 1.66 mM.

Humane sPLA₂ (Type V) – Enzymlösung: 20 µL der Enzymlösung aus dem Kit wurden mit 980 µL des Assay Puffers gemischt. Die Enzymlösung wurde auf Eis gelagert und war laut Hersteller für vier Stunden stabil.

EAP und N-Acetyl-Ethanolaminphosphatderivate (2 - 4): Die einzelnen Substanzen wurden im Assay Puffer verdünnt.

Die Versuchsdurchführungen zur Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften von N-Acetyl-Ethanolaminphosphaten erfolgten gemäß Angaben in Tab. 4. 6. Es erfolgten Dreifachmessungen.

Tab. 4. 6 Pipettierschema für die Durchführung des PLA₂ Assays zur Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften von EAP (1) bzw. den NAcEAP-Derivaten (2 - 4)

	Enzymaktivitäts- Wells [µL]	Blind-Werte Wells [µL]	Inhibitor- Wells[µL]
sPLA₂	10	-	10
Assay Puffer	10	20	-
Inhibitorlösung	-	-	10
Substratlösung	200	200	200
	30 sec Platte automatisches schütteln Inkubation: 15 min bei 25 °C mit Plattenabdeckung Nach 15 min Plattenabdeckung entfernen		
DTNB Lösung	10	10	10
	Vorsichtig Platte 30 sec automatisch schütteln Nach einer Minute Absorption zwischen 405 - 420 nm messen		

4.3.11 Lipoxygenase-Assay

Die Bildung des cis, trans-Hydroperoxidderivats der Arachidonsäure wurde indirekt durch die Oxidation des Farbreagenzes 2', 7'- Dichlorfluorescein - diacetat (H₂DCFDA) fluorimetrisch bei einer Extinktion von 485 nm, Emission von 520 nm und Raumtemperatur über mindestens 30 min verfolgt. Versuchsdurchführung erfolgte bei pH 9.0 in Sauerstoff-gesättigtem 0.1 M Phosphatpuffer. Alle Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

Lösungen für die Aktivitätsbestimmung der Lipoxygenase und Inhibition durch N-Acetyl-Ethanolaminphosphat / Ethanolaminphosphat bzw. NDGA:

100 mM Dikaliumhydrogenphosphatpuffer (K₂HPO₄) pH 9: 1.74 g K₂HPO₄ wurden in 100 mL Millipore Wasser gelöst. Der pH Wert des Puffers war 9.0.

Nordihydroguajaretsäure (NDGA): Nordihydroguajaretsäure (NDGA) (12), wurde in DMSO gelöst und die Verdünnungen mit Phosphatpuffer hergestellt. Die Stammlösungen wurden zwischen 1 µM und 48 µM hergestellt und anschließend 50 µL ins Well pipettiert (Endkonzentrationen pro Well zwischen 0.25 µM und 12 µM).

EAP (1) und N-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate (2 - 4): Ethanolaminphosphat (1) und die N-Acylethanolaminphosphatderivate (2 - 4) wurden direkt im Phosphatpuffer gelöst. Es wurden Stammlösungen zwischen 2.5 μM und 400 μM hergestellt. Pro Well wurden 50 μL der Stammlösung pipettiert (Endkonzentrationen pro Well zwischen 0.625 μM und 1000 μM).

Substratmischung für die Lipoxygenase: Für die Substratmischung wurde eine 16 mM Arachidonsäurelösung (AA) in Ethanol und eine 16 mM Lösung des Färbereagenzes 2', 7'- Dichlorofluorescein-diacetat (H_2DCFDA) in DMSO Phosphatpuffer (DMSO - Gehalt im Well 0,1 %) verwendet.

Die Substratmischung wurde wie folgt hergestellt:

Tab. 4. 7 Zusammensetzung der Substratmischung für die Versuchsdurchführung mit der LOX

V [μL]	Lösung [konz.]
40	AA [16 mM]
40	H_2DCFDA [16 mM]
1920	Phosphatpuffer [100 mM]

Pro Well wurden 50 μL der Substratmischung pipettiert.

Lipoxygenaselösung

Für die Enzymlösung wurde der Soja – LOX V (701000 U/mg bzw. 3,6 mg Protein/mL) verwendet. Die Enzymlösung wurde so hergestellt, dass die Endkonzentration je Well 25 U betrug. Pro Well wurde per automatischer Injektion am Plattenlesegerät 100 μL der Enzymlösung injiziert und die Reaktion gestartet. Die Aktivitätsbestimmung der Lipoxygenase und Inhibition durch (2 - 4), (1) bzw. NDGA (12) ist in Tab. 4. 8 dargestellt.

Tab. 4.8 Pipettierschema für die Durchführung der Lipoxygenase Versuche nach 4.3.11

	Aktivität [μL]	Blind [μL]	Test
<i>N</i>-Acyl-Ethanolaminphosphat/ Ethanolaminphosphat bzw. NDGA	-	-	50
Phosphatpuffer pH 9	50	50	-
Substratmischung	50	50	50
Lipoxygenase	100	100	100
	Fluoreszenzmessung Ex 485 Em 520 30 min	Fluoreszenzmessung Ex 485 Em 520 30 min	Fluoreszenzmessung Ex 485 Em 520 30 min

4.3.12 Xanthinoxidase-Assay

Die Aktivitätsbestimmung der Xanthinoxidase erfolgte anhand der Detektion der gebildeten Harnsäure (**13**) bei 290 nm. Die gebildeten Superoxidanionen wurden indirekt durch Reduktion von dreiwertigem Eisens zum zweiwertigen Eisen im Cytochrom C bei 550 nm spektralphotometrisch erfasst.

Folgende Lösungen wurden für die Versuchsdurchführung vorbereitet:

Enzymaktivität:

50 mM Kaliumdihydrogenphosphat – Puffer: In einem 200 mL Meßkolben wurden 1.36 g KH_2PO_4 in 190 mL Millipore -Wasser gelöst, mit 1 M KOH auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt und auf 200 mL aufgefüllt.

0.15 mM Xanthinlösung für die Aktivitätsbestimmung (Substrat): In einem Becherglas wurden 2.28 mg Xanthin (**13**) in wenig 1 M NaOH gelöst und anschließend 90 mL Millipore - Wasser zugegeben, mit 0.1 M HCl auf pH 7.5 eingestellt, in einen 100 mL Meßkolben umgefüllt und bis zur Marke aufgefüllt.

Xanthinoxidase-Lösung: Es wurde eine Xanthinoxidase Lösung mit 0.1 - 0.2 U/mL in KH_2PO_4 – Puffer pH 7.5 hergestellt.

Inhibitionsversuche:

Phosphatpuffer pH 7.4: 0.87 g K_2HPO_4 und 0.68 g KH_2PO_4 wurden in jeweils 50 mL Millipore Wasser gelöst (Konzentration 100 mM). Anschließend wurde in die K_2HPO_4 -Lösung KH_2PO_4 -Lösung langsam hinzuge tropft bis man einen pH von 7.4 eingestellt hatte. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer pH-Meßelektrode überprüft.

3.4 mM Xanthinlösung (13) für die Inhibitionsversuche (Substrat): 12.9 mg Xanthin (13) in 25 mL 0.1 M NaOH gelöst, ergaben eine Endkonzentration von 3.4 mM Xanthin (13).

200 μ M Cytochrom C Lösung: 12.4 mg Cytochrom C in 2 mL Puffer pH 7.4 gelöst, ergaben Endkonzentration von 200 μ M.

Xanthin/Cytochrom C Mischung (Mischung 1): 100 μ L der 3.4 mM Xanthinlösung (12), 100 μ L der 200 μ M Cytochrom C Lösung wurden mit 300 μ L Puffer pH 7.4 vermischt. Von dieser Mischung wurden 50 μ L in jedes Well pipettiert (Endkonzentration pro Well Xanthin 170 μ M und 100 μ M Cytochrom C).

Xanthinoxidaselösung: 50 μ L Xanthinoxidase wurden in 500 μ L Puffer pH 7.4 gelöst (Konzentration 1.45 U/mL). Aus dieser Stammlösung wurden 40 μ L entnommen mit 960 μ L Puffer pH 7.4 vermischt und jeweils 100 μ L in jedes Well automatisch injiziert (Konzentration pro Well 6 mU).

100 mM Allopurinol: 6.8 mg Allopurinol (23) in 500 μ L DMSO gelöst, ergaben eine 100 mM Stammlösung. Die einzelnen Verdünnungen wurden anschließend in Puffer pH 7.4 gelöst. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit einer Endkonzentration im Well zwischen 500 und 7.8 μ M hergestellt.

Ethanolaminphosphat und *N*-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate: Die jeweiligen Konzentrationen wurden in Puffer pH 7.4 hergestellt. 50 μ L der jeweiligen Lösung wurden pro Well pipettiert.

4.3.12.1 Versuchsdurchführung: Bestimmung der Aktivität der Xanthinoxidase

In einer 3 mL Volumen Quarzglaszuvette wurde der Versuch wie folgt durchgeführt:

Tab. 4.9 Pipettierschema zur Bestimmung der Aktivität der Xanthinoxidase

	Testmessung [mL]	Blankmessung [mL]
KH₂PO₄-Puffer pH 7.5	1.9	1.9
Xanthinlösung	1.0	1.0
Millipore Wasser	–	0.1
XOD-Stammlösung	0.1	–

4.3.12.2 Einfluss von Ethanolaminphosphat und *N*-Acyl-Ethanolaminphosphaten auf die Xanthinoxidase

Die Superoxidationdetektion erfolgte durch die Redox-Reaktion mit dem Cytochrom C-Eisen bei 550 nm für 5 min. Endvolumen pro Well war 200 μ L.

Tab. 4.10 Pipettierschema für die Inhibitionsversuche bzw. Superoxidationfangreaktion

	Testmessung [μ L]	Endkonzentration im Well
Xanthin/CytC Mischung	50	170 μ M Xanthin 100 μ M CytC
Inhibitor	50	je nach Verdünnung
XOD	100	6 mU
Detektion	5 min bei 550 nm	

4.3.13 β -*N*-Acetylhexosaminidase Assay

4.3.13.1 Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität der β -*N*-Acetylhexosaminidase wurde nach den Vorschrift von Bessey et al. (1946) und Borooch et al. (1961) bestimmt. Als Substrat diente p-Nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-glucosamin (pNPP-NAcG) (**16**). Nach Hydrolyse des Substrats werden *N*-Acetyl- β -D-glucosamin (NAcG) (**17**), p-Nitrophenol (**11**) und Phosphat frei. P-

Nitrophenol (**11**) absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm, über die Extinktion konnte der Gehalt an p-Nitrophenol (**11**) und somit die Enzymaktivität errechnet werden.

Folgende Lösungen wurden für die Aktivitätsbestimmung und Einflussbestimmung auf die β -N-Acetylhexosaminidase durch Ethanolaminphosphat und den N-Acyl-Ethanolaminphosphatderivaten hergestellt:

100 mM Citratpuffer pH 4.25: In einem Becherglas wurden 2.1 g Citronensäure, 0.6 g NaCl und 0.02 g BSA in 90 mL Millipore Wasser gelöst mit 1 N NaOH auf pH 4.25 eingestellt und in einem 100 mL Meßkolben bis zur Marke aufgefüllt.

10 mM p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamin (pNP-NAcG): 3.4 mg p-NP-NAcG (**24**) wurden in 1 mL Millipore - Wasser gelöst. Die Endkonzentration betrug 10 mM.

200 mM Boratpuffer pH 9.8: 1.24 g Borsäure wurden in 100 mL Millipore Wasser gelöst.

β -N-Acetylhexosaminidase: β -N-Acetylhexosaminidase wurde in einer Konzentration von 0.05 U/mL in kaltem Citratpuffer pH 4.25 gelöst.

Ethanolaminphosphat (**1**) bzw. N-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate: Es wurden Verdünnungsreihen zwischen 0.0625 und 50 mM in Citratpuffer pH 4.25 hergestellt. Je 20 μ L wurden pro Well pipettiert, dies entspricht Endkonzentrationen zwischen 0.006 und 5 mM/Well.

Die Aktivitätsbestimmung der β -N-Acetylhexosaminidase ist in Tab. 4. 11 dargestellt. Dabei wurde parallel ein Blindwert bestimmt.

Tab. 4. 11 Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidase

	Test [μ L]	Blind [μ L]
Citratpuffer pH 4.25	20	20
pNP-NAcG	25	25
	Mischen	
β-N-Acetylhexosaminidase	5	-
	Mischen 10 min Inkubation	
Boratpuffer pH 9.8	150	150
β-N-Acetylhexosaminidase	-	5
	Absorptionsmessung bei 405nm	

Die Berechnung der Aktivität erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\text{Units/mL Enzym} = \frac{(\Delta A_{405\text{nm}} \text{ Test} - \Delta A_{405\text{nm}}) * (0.2)}{(10) * (18.5) * (0.005)}$$

0.2 = Endvolumen Assay (in Milliliter)

10 = Reaktionszeit Assay (in Minuten)

18.5 = Millimolarer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm

0.005 = Enzymvolumen (in Milliliter)

Definition Unit:

Ein Unit hydrolysiert 1 μ mol von p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamin (**16**) pro Minute bei einem pH Wert von 4.25 bei 25 °C

4.3.13.2 Bestimmung der Wirkung von N-Acyl-Ethanolaminphosphaten auf die β -N-Acetylhexosaminidase

Analog zur Aktivitätsbestimmung wurde auch der Einfluss von (1) bzw. (2 - 4) vorgegangen. Die Extinktion bei 405 nm ohne (1) bzw. (2 - 4) wurde nach Subtraktion des Blindwertes als 100 % Wert gesetzt.

Um den Einfluss von (1) bzw. (2 - 4) auf die Enzymaktivität zu überprüfen, wurde deren Extinktion nach Abzug des Blindwertes jeweils vom 100 %-Wert subtrahiert und als Prozentwert zum 100 %-Wert dargestellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen im Konzentrationsbereich von 0.006 mM bis 2.5 mM durchgeführt.

Tab. 4. 12 Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidase nach Zusatz von N-Acyl-Ethanolaminphosphatderivaten bzw. Ethanolaminphosphat (1)

	Test [μ L]	Blind [μ L]	Konzentrationen
Ethanolaminphosphat bzw. N-Acyl-Ethanolaminphosphat in Citratpuffer pH 4.25	20	-	0.006 - 5 mM
p-NP-NAG	25	25	1.25 mM
	Mischen	Mischen	
β-N-Acetylhexosaminidase	5	-	0.05 U/mL
	Mischen 10 min Inkubation	Mischen 10 min Inkubation	
Boratpuffer pH 9.8	150	150	
β-N-Acetylhexosaminidase	-	5	0.05 U/mL
	Absorptionsmessung bei 405 nm	Absorptionsmessung bei 405 nm	

4.3.14 Cannabinoid-Rezeptor

Der ChemiSCREEN™ Membran Preparation recombinant human CB₁ Cananabinoidrezeptor Assay (Chemicon International a Seriologicals Company) wurde verwendet, um Kompetitionsversuche durch (1) und (2 - 4) mit ³H-CP55940, dem markierten synthetischen Agonisten des CB₁ Rezeptors, zu testen.

Folgende Lösungen wurden für die Versuchsdurchführung vorbereitet:

Bindungs – Puffer: 50 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, 0.2 % BSA, pH 7.4 wurden filtriert und bei 4 °C gelagert.

Wasch – Puffer: 50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 0.1 % BSA, pH 7.4 wurden filtriert und bei 4 °C gelagert.

Assay – Puffer: 50 mM HEPES, 0.5 % BSA, pH 7.4 wurden filtriert und bei 4 °C gelagert.

Ethanolaminphosphat, N-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate: Die Substanzen (1 - 4) wurden jeweils in Bindungs-Puffer gelöst und Verdünnungen (2, 20, 200, 2000, 5000 und 10000 µM) hergestellt. 10 µL der Verdünnungen wurden pro Well pipettiert.

Konzentrationen pro Well: Die Sättigungseigenschaften des CB₁ wurden mit CP55940 Konzentrationen 1-12.5 nm und 10 µg CB₁ getestet. Für die Radioligand-Rezeptor-Versuche wurden in eine 96 Well Platte 100 µL der Membranpreparation (Endkonzentration pro Well 10 µg, bzw. 1 Unit), 80 µL Assay - Puffer, 10 µL der zu testenden Substanzlösungen im Assay-Puffer ((1), (2 - 4), Endkonzentration im Well 0.1, 1, 10, 100, 250 und 500 µM in Bindungspuffer) und 10 µL ³H-CP55940 in DMSO (Endkonzentration pro Well 12,5 nm) pipettiert und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert (Endkonzentrationen DMSO 5 % (v/v), Ethanol 0.28 % (v/v)). Die spezifische Bindung der eingesetzten Substanz in ihrer jeweiligen Konzentration wurde als Totalbindung abzüglich der Bindung in Gegenwart des nicht markierten CP55940-Liganden für jede Konzentration ³H-CP55940 ermittelt.

Durch Filtration durch mittels GF/C Filtermat A, welches vorher für eine Stunde in einen 0.33 % Polyethylenimin-Puffer lag, wurde mit Hilfe eines 96-Cell Harvesters die Reaktion beendet. Der Filter wurde mehrmals mit destilliertem Wasser und anschließend mit Assay-Puffer gewaschen, bei 60 °C eine Stunde getrocknet und in Szintillationsgefäße überführt. 4 mL Rotiszint eco plus-Cocktail wurde in jedes Gefäß zugegeben und die Radioaktivität am folgenden Tag im Szintillationszähler gemessen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

5 Literatur

Abadji, V.; Lin, S.; Taha, G.; Stevenson, L.A.; Pertwee, R.G.; Makriyannis, A. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *Journal of Medicinal Chemistry*. 37, 1889-1893, **1994**.

Akeboshi, H.; Chiba, Y.; Kasahara, Y.; Takashiba, M.; Takaoka, Y.; Ohsawa, M.; Tajima, Y.; Kawashima, I.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Sakuraba, H.; Jigami, Y. Production of recombinant β -Hexosaminidase A, a Potential Enzyme for Replacement Therapy for Tay-Sachs and Sandhoff Diseases, in the Methylotrophic Yeast *Ogataea minuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 4805-4812, **2007**.

Alonso, E. und Rubio, V. Determination of N-Acetyl-L-glutamate using High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*. 146, 252-259, **1985**.

Arai, Y.; Fukushima, T.; Shirao, M.; Yang, X.; Imai, K. Sensitive determination of anandamide in rat brain utilizing a coupled-column HPLC with fluorimetric detection. *Biomedical Chromatography*. 14, 118-124, **2000**.

Baker, D.; Pryce, G.; Davies, W.L.; Hiley, C.R. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Science*. 27, 1-4, **2006**.

Banni, S. und Di Marzo, V. Effect in dietary fat on endocannabinoids and related mediators: Consequences on energy homeostasis, inflammation and mood. *Molecular Nutrition and Food Research*. 54, 82-92, **2010**.

Bari, M.; Battista, N.; Fezza, F.; Finazzi-Agro, A., Maccarrone, M., 2005. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 280, 12212–12220, **2005**.

Baykov, A.A.; Evtushenko, O.A.; Avaeva, S.M. A Malachit Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphate-Based Enzyme Immunoassay. *Analytical Biochemistry*. 171, 266-270, **1988**.

Bazinet, R.P.; Lee, H.J.; Felder, C.C.; Porter, A.C.; Rapoport, S.I.; Rosenberger, T.A. rapid high-energy microwave fixation required to determine the anandamide (N-arachidonylethanolamine) concentration of rat brain. *Neurochemical Research*. 30, 597-601, **2005**.

Becker, M.A. und Jolly, M. Clinical Gout and the pathogenesis of hyperuricemia. In *Arthritis and Allied Conditions*, 15th. ed. **2005**.

Belitz, H.D.; Grosch, W.; Schieberle, R. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Fünfte Auflage. Springer-Verlag Berlin. **2001**.

Ben-Shabat, S.; Frider, E.; Sheskin, T.; Tamiri, T.; Rhee, M.H, Vogel, Z.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V.; Mechoulam, R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoylglycerol cannabinoid activity. *European Journal of Pharmacology*. 353, 23-31, **1998**.

- Bessey, O.A.; Lowry, O.H.; Brock, M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry*. 164, 321-329, **1946**.
- Bisogno, T.; Howell, F.; Williams, G.; Minassi, A.; Cascio, G.; Ligresti, A.; Matias, I.; Schiano-Moriello, A.; Paul, P.; Williams, E.J.; Gangadharan, G.; Hobbs, C.; Di Marzo, V.; Patrick Doherty, P. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *Journal of Cell Biology*. 163, 463-468, **2003**.
- Blankman, J.; Simon, G.; Cravatt, B. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chemistry and Biology*. 14 (12), 1347-1356, **2007**.
- Blau K. und Halket, J. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. 2nd Edition. John Wiley and Sons. **1997**.
- Blau, K. und King, G.S. *Handbook of Derivatives for Chromatography*. Heyden London. **1977**.
- Borkenhagen, L.F.E.; Kennedy, E.P.; Fielding, Enzymatic formation and decarboxylation of phosphatidylserine. *Journal of biological chemistry*. 236, 28-32. **1961**.
- Borooh, J.; Leaback, D.H.; Walker, P.G. Studies on Glucosaminidase. *Biochemical Journal*. 78, 106-110, **1961**.
- Bracey, M.H.; Hanson, M.A.; Masuda, K.R.; Stevens, R.C.; Cravatt, B.F. Structural Adaptations in a Membrane Enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*. 298, 1793-1796, **2002**.
- Brenda Enzymes. www.brenda-enzymes.org (Zugriff am 23.2.2010).
- Buchberger W. *Elektrochemische Analyseverfahren; Grundlagen, Instrumentation, Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. **1998**.
- Cabral, G.A.; Toney, D.M.; Fischer-Stenger, K.; Harrison, M.P.; Marciano-Cabral, F. Anandamide inhibits macrophage-mediated killing of tumor necrosis factor-sensitive cells. *Life Sciences*. 56, 2065-2072, **1995**.
- Cadas, H.; di Tamaso, E.; Piomelli, D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *Journal of Neuroscience*. 17, 1226-1242, **1997**.
- Chalvardijan, A. und Rudnicki, E. Determination of Lipid Phosphorous in the nanomolar range. *Analytical Biochemistry*. 36, 225-226, **1970**.
- Chance, B. Techniques for the Assay of the respiratory enzymes. *Methods in Enzymology*. 4, 273-329, **1957**.

- Cheng, K.; Saha, B.; Mahadevan, A.; Razdan, R.K.; Kunos, G.; Jacobs, A.E.; Rice, K.C. Synthesis of 2-(5Z,8Z,11Z,14Z)-lycosa-5,8,11,14-tetraenamidoethyl-d₄ dihydrogen phosphate, tetra-deuterated pAEA. *Journal of Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 51, 389-390, **2008**.
- Cherbuliez, E. und Rabinowitz, J. Formation and transformation of esters. VIII. Preparation of aminoalkylphosphoric acids and their N-acylated derivatives. *Helvetica Chimica Acta*. 39, 1455-61, **1956a**.
- Cherbuliez, E. und Rabinowitz, J. Formation and transformation of esters. X. Structural factors of alkaline labilization of monoalkyl (monoaryl) phosphoric functions. *Helvetica Chimica Acta*. 39, 1844-55, **1956b**.
- Chu, C.J.; Huang, S.M.; De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Ewing, S.A.; Miller, J.D.; Zipkin, R.E.; Daddario, N.; Appendino, G.; Di Marzo, V.; Walker, J. M. N-Oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 13633-13639, **2003**.
- Coleman, J.; Wrzosek, T.; Roman, R.; Peterson, J.; McAllister, P. Setting system suitability criteria for detectability in high-performance liquid chromatography methods using signal-to-noise ratio statistical tolerance intervals. *Journal of Chromatography A*. 917, 23-27, **2001**.
- Copeland, R.A. *Enzymes – A practical Introduction to structure, mechanism, and data analysis*. Second Edition. Wiley-VCH, Weinheim. **2000**.
- Conzelmann, E. und Sandhoff, K. AB variant of infantile GM2 gangliosidosis: deficiency of a factor necessary for stimulation of hexosaminidase A-catalyzed degradation of ganglioside GM2 and glycolipid GA2. *Proceedings of the National Academy of Science USA* .75, 3979-3983, **1978**.
- Conzelmann, E. und Sandhoff, K. Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. *Hoppe Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 360, 1837-1849, **1979**.
- Costa, B.; Comelli, F.; Bettoni, I.; Colleoni, M.; Giagnoni, G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*. 139, 541-550, **2008**.
- Creary, X. *Organic Synthesis*. John Wiley and Sons. New York. 64, 207-216, **1986**.
- Dekant, Wolfgang und Vamvakas, Spiros. „Toxikologie – Eine Einführung für Chemiker, Biologen und Pharmazeuten“ 2. Auflage. Elsevier GmbH, München, **2005**.
- Delhaize, E.; Hebb, D.M.; Richards, K.D.; Lin, J.M.; Ryan, P.R.E.; Gardner, R.C. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 7082-7088, **1999**.

- Després, J.P.; Golay, A.; Sjöström, L.; Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *New England Journal of Medicine*. 353, 2121-2134, **2005**.
- Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*. 258 (5090), 1946-1949, **1992**.
- Devane, W.A.; Dysarz, F.A.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Howlett, A.C. Determination and characterization of a Cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*. 34 (5), 605-613, **1988**.
- De Groot, J.J.M.C.; Veldink, G.A.; Vliegenhart, J.F.G.; Boldingh, J.; Wever, R.; van Gelder, B.F. Demonstration by EPR Spectroscopy of the functional role of iron in soya-bean Lipoxygenase-1. *Biochimica et Biophysica Acta*. 377, 71-79, **1975**.
- De Petrocellis L.; Cascio, M.G.; Di Marzo, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British Journal of Pharmacology*. 141, 765-74, **2004**.
- De Rijke, E.; Ruisch, B.J.; Bouter, N.; König, T. Liquid chromatography with accurate mass measurement on a triple quadrupole mass spectrometer for the identification and quantification of N-lactoyl-ethanolamine in wine. *Molecular Nutrition and Food Research*. 50, 351-355, **2006**.
- De Rijke, E.; Bouter, N.; Ruisch, B.J.; Haiber, S.; König, T. Identification of *N*-glucosyl ethanolamine in wine by negative electrospray ionization with post-column chloride attachment and accurate mass determination on a triple-quadrupole mass spectrometer. *Journal of Chromatography A*. 1156, 296-303, **2007**.
- De Rijke, E.; Bouter, N.; Ruisch, B.J.; Haiber, S.; König, T. Erratum to "Identification of *N*-glucosyl ethanolamine in wine by negative electrospray ionization with post-column chloride attachment and accurate mass determination on a triple-quadrupole mass spectrometer". [*Journal of Chromatography A* 1156 (2007) 296–303] *Journal of Chromatography A*. 1205, 191, **2008**.
- Dinh, T. P.; Carpenter, D.; Leslie, F.M.; Freund, T.F.; Katona, I.; Sensi, S.L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 99, 10819-10824, **2002**.
- Di Marzo, V. CB₁ receptor antagonism: biological basis for metabolic effects. *Drug Discovery Today*. 13, 1026-1041, **2008**.
- Di Marzo, V.; Bisogno, T.; Sugiura, T.; Melck, D.; De Petrocellis, L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with Anandamide. *The Biochemical Journal*. 331, 15-19, **1998**.
- Di Marzo, V.; De Petrocellis, L.; Sugiura, T.; Waku, K. Potential biosynthetic connections between the two cannabinimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-

- glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 227, 281-288, **1996**.
- Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas H, Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J.C.; Piomelli, D. Formation and inactivation endogenous cannaboid anandamide in central neurons. *Nature*. 372, 686-691, **1994**.
- Di Marzo, V.; Goparaju, S.K.; Wang, L.; Liu, J.; Batkai, S.; Jarai, Z.; Fezza, F.; Miura, G.I.; Palmiter, R.D.; Sugiurak, T.; Kunos, G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*. 410, 822-825, **2001**.
- Draffan, G.H.; Stillwel, R.N.; McClosekey, J.A. Electron-Impact induced rearrangement of trimethylsilyl groups in long chain compounds. *Organic Mass Spectrometry*. 1, 669-685, **1968**.
- Drazen, J.M.; Israel, E; O'Byrne, PM. Treatment of Asthma with drugs modifying the leukotrien pathway. *New England Journal of Medicine*. 340, 197-206, **1999**.
- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82, 47-95, **2002**.
- Ducobu, J. und Sternon, J. Rimonabant (Acomplia), specific inhibitor of the endocannabinoid system. *Revue Médicale de Bruxelles*. 26, 165–168, **2005**.
- Eisenbrand, G. und Schreier, P. *Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie A-L*. Thieme Verlag Stuttgart. **2006**.
- Eisenbrand, G. und Schreier, P. *Römpp Lexikon der Lebensmittelchemie M-Z*. Thieme Verlag Stuttgart. **2006**.
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr.; Feather-Stone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88–95, **1961**,
- Feigelson, P.; Davidson, J.D.; Robins, R.K. Pyrazolpyrimidines as inhibitors and substrates of xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 226, 993-1000, **1957**.
- Feinmark, S.J. und Cornicelli, J.A. Is there a role for 15-lipoxygenase in atherogenesis? *Biochemical Pharmacology*. 54, 953-959, **1997**.
- Finkel und Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408, 239-247, **2000**.
- Food and Drug Administration (FDA). Briefing Document. Advisory Committee – June 13, 2007. Available in: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/07/briefing/2007-4306b1-fda-backgrounder.pdf>. **2007**.
- Furst, W. und Sandhoff, K. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1126, 1-16, **1992**.

- Galve-Roperh, I.; Aguado, T.; Palazuelos, J.; Guzmán, M. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Current Pharmaceutical Design*. 14, 2279–2288, **2008**.
- Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of American Chemical Society*. 86, 1646–1647, **1964**.
- Garnder A. und Mallet P.E. Suppression of feeding, drinking, and locomotion by a putative cannabinoid receptor ‘silent antagonist’. *European Journal of Pharmacology*. 530, 103–106, **2006**.
- Garssen, G.J.; Vliegenhart, J.F.G.; Boldingh, J. The Origin and Structures of Dimeric Fatty Acids from the Anaerobic Reaction between Soya-bean Lipoxygenase, Linoleic Acid and its Hydroperoxide. *The Biochemical Journal*. 130, 435-442, **1971**.
- Gelfand, E.V. und Cannon, C.P. Rimonabant: a cannabinoid receptor type 1 blocker for management of multiple cardiometabolic risk factors. *Journal of the American Collage of Cardiology*. 47, 1919–1926, **2006**.
- Gordon, L.I.; Weiss, D; Prachand, S; Weitzman, S.A. Scavenging of superoxide anion by phosphorylethanolamine: Studies in Human Neutrophils and in a cell free system. *Free Radical Research Communications*. 15, 65-71, **1991**.
- Gravel, R.A.; Clarke, J.T.R.; Kaback, M.M.; Mahuran,D.; Sandhoff, K.;Suzuki, K.The GM2 gangliosidoses. In Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.: Valle, D. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th Edition. McGraw-Hill, New York, Vol. 2, Ch. 92, 2839–2879, **1995**.
- Gravel, R.A.; Kaback, M.; Proia, R.L.; Sandhoff, K.; Suzuki, K.;; The GM2 Gangliosidoses. In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.; Valle, D. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases oh Inherited Disease*. Mc Graw-Hill, New York. 3827-3876, **2001**.
- Grechkin, A. Recent developments in biochemistry of the plant Lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research*. 37, 317-352, **1998**.
- Gronert, K.; Virk, S.M.; Herman, C.A. Endogeneous sulfidopeptide leukotriene synthesis and 12-lipoxygenase activity in bulfrog (*Rana catesbeiana*) erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1255, 311-319, **1995**.
- Gundlach, G.; Käbisch, A.; Voegeli, R.; Pralle, H.; Hartenfels, S. Determination of Phosphoethanolamine in Urin or in the presence of High Taurine concentrations. *Analytical Biochemistry*. 142, 511-514, **1984**.
- Guo, K. und Li, L. Differential ¹²C-/¹³C-Isotope Dansylation Labeling and Fast Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Absolute and Relative Quantification of the Metabolome. *Analytical Chemistry*. 81, 3919-3932, **2009**.
- Guo, Y.; Srinivasan, S.; Gaiki, S. Investigating the Effect of Chromatographic Conditions on Retention of organic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography using a Design experiment. *Chromatographia*. 66, 469-474, **2007**.

- Hädrich und Vogelsang. Concept`96 for the determination of detection, identification and quantification limit [in food analysis]. *Deutsche Lebensmittelrundschau*. 92, 341-350, **1996**.
- Harvey, D.J. und Horning, M.G. Derivatives for the characterization of alkyl- und aminoalkylphosphonates by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 79, 65-74, **1973**.
- Herkenham, M. Localization of cannabioid receptors in brain and periphery. *Neuroscience Perspectives; Cannabioid Receptors*. 145-166, **1995**.
- Hession, A.O.; Esrey, E.G.; Croes, R.A.; Maxwell, C.A. *N*-Acetylglutamate and *N*-Acetylaspartate in Soybeans (*Glycine max* L.), Maize (*Zea maize* L.), and Other Food-stuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56, 9121-9126, **2008**.
- Hille, R. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical Reviews*. 96, 2757-2816, **1996**.
- Howlett, A.C.; Barth, F.; Bonner, T.I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.A.; Felder, C.C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B.R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R.G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews*. 54, 161-202, **2002**.
- Howlett, A.C. Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* (Pertwee R. G. ed), Springer-Verlag, Berlin. 53-79, **2005**.
- Huang, S.M.; Bisogono, T.; Trevisani, M.; Al-Hayani, A.; De Petrocellis, L.; Fezza, F.; Tognetto, M.; Petros, T. J.; Krey, J. F.; Chu, C. J.; Miller, J. D.; Davies, S. N.; Geppetti, P.; Walker, J. M.; Di Marzo, V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99, 8400-8405, **2002**.
- Hudson, B.D.; Hébert, T.E.; Kelly, M.E.M. Ligand- and Heterodimer-Directed Signaling of the CB₁ Cannabinoid Receptor. *Molecular Pharmacology*. 77, 1-9, **2010**.
- Hübscher, H.D.; Dils, R.R.; Pover, W.F.R. Studies on the biosynthesis of Phosphatidylserin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 36, 518-525. **1959**.
- Hübschmann, H.J. *Handbook of GC-MS-Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA. **2009**.
- Ichida, K.; Amaya, Y.; Kamatani, N.; Nishino, T.; Hosoya, T.; Sakai, O. Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *The Journal of Clinical Investigation*. 99, 2391-2397, **1997**.
- Johns, D.G.; Behm, D.J.; Walker, D.J.; Ao, Z.; Shapland, E.M.; Daniels, D.A.; Riddick, M.; Dowell, S.; Staton, P.C.; Green, P.; Shabon, U.; Bao, W.; Aiyar, N.; Yue, T.L.; Brown, A.J.; Morrison, A.D.; Douglas, S.A. The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *British Journal of Pharmacology*. 152, 825-831, **2007**.

- Jonczyk, A. und Wiostowska, J.A. A Simple Method for Generation of Diazocompounds in an Aqueous Two-Phase System. *Synthetic Communications*. 8, 569-572, **1978**.
- Juntunen, J.; Huuskonen, J.; Laine, K.; Niemi, R.; Taipale, H.; Nevalainen, T.; Pate, D.W.; Järiven, T. Anandamide prodrugs 1. water-soluble phosphate esters of arachidonylethanolamide and R-methanandamide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 19, 37-43, **2003**.
- Kano-Sueoka, T.; Cohen, D.M.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Mori M., Fujiki, H. Phosphoethanolamine as a growth factor of a mammary carcinoma cell line of rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 76. 5741-5744. **1979**.
- Kano-Sueoka, T.; Errick, J.E.; King, D.; Walsh, L.A. Phosphatidylethanolamine synthesis in ethanolamine-responsive and nonresponsive cells in culture. *Journal of Cellular Physiology*. 117, 109-115, **1983**.
- Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, Doeneck, D.; Koolman, J.; Fuchs, G.; Gerok, W. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. **2005**.
- Karlsson, M.; Contreras, J.A.; Hellman, U.; Tornqvist, H.; Holm, C. cDNA Cloning, Tissue Distribution, and Identification of the Catalytic Triad of Monoglyceride Lipase Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *The Journal of Biological Chemistry*. 272, 27218-27223, **1997**.
- Kataoka, H.; Sakiyama, N.; Maeda, M.; Makita, M. Determination of phosphoethanolamine in animal tissues by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography*. 494, 283-288, **1989**.
- Kataoka, H.; Sakiyama, N.; Maqta, M. Gas Chromatographic analysis of aminoalkylphosphonic acids and aminoalkylphosphates. *Journal of Chromatography*. 436, 67-72, **1988**.
- Kato, M.; Kato, H.; Eyama, S.; Takatsu, A. Application of amino acid analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with isotope dilution mass spectrometry for peptide and protein quantification. *Journal of Chromatography B*. 877, 3059-3064. **2009**.
- Kato, M.; Onda, Y.; Sekimoto, M.; Degawa, M.; Toyo'oka, T. A capillary electrochromatography-electron spray ionization-mass spectrometry method for simultaneous analysis of charged and neutral constituents of a hepatocarcinoma cell metabolome. *Journal of Chromatography A*. 1216, 8277-8282, **2009**.
- Kennedy, E.P. und Weiss, S.B. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *Journal of Biological Chemistry*. 222, 193-214, **1956**.
- Kent, C. Eucariotic Phospholipid Biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*. 64, 313-343, **1995**.
- Kingsley, P.J. und Marnett, L.J. Analysis of endocannabinoids, their congeners and COX-2 metabolites. *Journal of Chromatography B*. 577, 2746-2754, **2009**.

Kingsley, P.J.; Rouzer, C.A.; Saleh, S.; Marnett, L.J. Simultaneous analysis of Prostaglandin glyceryl esters and prostaglandins by electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 343, 203-211, **2005**.

Kirkham, T.C.; Williams, C.M.; Fezza, F.; Di Marzo, V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoylglycerol. *British Journal of Pharmacology*. 136, 550-557, **2002**.

Koga, D., Santa, T; Fukushima, T; Homma, H.; Imai, K. Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*. 690, 7-13, **1997**.

Kolter, T. und Sandhoff, K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758, 2057-2079, **2006**.

Kolter, T. und Sandhoff, K. Sphingolipids - Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angewandte Chemie*. 38, 1532-1568, **1999**.

Kozak, K.R.; Rowlinson, S.W.; Marnett, L.J. Oxygenation of the Endocannabinoid, 2-Arachidonoylglycerol, to Glyceryl Prostaglandins by Cyclooxygenase-2. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 33744-33749, **2000**.

Krämer, J. *Lebensmittel Mikrobiologie*. 4. Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. **2002**.

Kuppusamy, P. und Zweier, J.L. Characterization of Free Radical Generation by Xanthine Oxidase – Evidence for hydroxyl radical generation. *The Journal of Biological Chemistry*. 264, 9880-9884, **1989**.

Kytzia, H.J. und Sandhoff, K. Evidence for two different active sites on human beta-hexosaminidase A. Interaction of GM2 activator protein with beta-hexosaminidase A. *The Journal of Biological Chemistry*. 260, 7568-7572, **1985**.

Kytzia, H.J.; Hinrichs, U.; Maire, I.; Sandhoff, K. Variant of GM2-gangliosidosis with hexosaminidase A having a severely changed substrate specificity. *EMBO Journal*. 2, 1201-1205, **1983**.

Lam, P.M.W.; Marczylo, T.H.; El-Talatini, M.; Finney, M.; Nallendran, V.; Taylor, A.H.; Konje, C.J. Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the measurement of anandamide in human plasma. *Analytical Biochemistry*. 380, 195-201, **2008**.

Lanzetta, P.A.; Alvarez, L.J.; Reinach, P.S.; Candia, O.A. Improved Assay for nanomole amounts of inorganic-phosphate. *Analytical Biochemistry*. 100, 95-97, **1979**.

Le Boucher, J.; Charret, C. ; Coudray-Lucas, C. ; Giboudeau, J. ; Cynober, L. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A. *Clinical Chemistry*. 43, 1421-1428, **1997**.

Lehninger Biochemie, Nelson, D. und Cox, M. 4. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer, Berlin. **2008**.

Leung, D.; Saghatelian, A.; Simon, G.M.; Cravatt, B.F. Inactivation of *N*-Acyl Phosphatidylethanolamine Phospholipase D Reveals Multiple Mechanisms for the Biosynthesis of Endocannabinoids. *Biochemistry*. 45, 4720-4726, **2006**.

Li, Y.T.; Li, S.C.; Hasegawa, A.; Ishida, H.; Kiso, M.; Bernardi, A.; Brocca, P.; Raimondi, L.; Sonnino, S. Structural Basis for the Resistance of Tay-Sachs Ganglioside GM2 to Enzymatic Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*. 274, 10014-10018, **1999**.

Lippard, S.J. und Berg, J.M. Bioanorganische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. **1995**.

Liu, J.; Wang, L.; Harvey-White, J.; Huang, B.X.; Kim, H.-Y.; Luquet, S.; Palmiter, R.D.; Krystal, G. Ravi Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology*. 54, 1-7, **2008**.

Locher, S. Dissertationsarbeit. Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg. In Vorbereitung. **2011**.

Liu, J.; Lei Wang, L.; Harvey-White, J.; Osei-Hyiaman, D.; Razdan, R.; Gong, Q.; Chan, A.C.; Zhou, Z.; Huang, B.X.; Kim, H.-Y.; Kunos, G. A biosynthetic pathway for Anandamide. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 103, 13345-13350, **2006**.

Löffler, G.; Petrides P.E.; Heinrich P.C. Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, **2007**.

LoVerme, J.; La Rana, G.; Russo, R.; Calignano, A.; Piomelli, D. The search for the palmitoylethanolamidereceptor. *Life Science*. 77, 1685-1698, **2005**.

Lynn, A.B. und Herkenham, M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 268, 1612-1623, **1994**.

Ma, D.; Zhang, J.; Sugahara, K.; Ageta, T.; Nakayama, K.; Kodama, H. Simultaneous Determination of *N*-Acetylaspartic Acid, *N*-Acetylglutamic Acid, and *N*-Acetyl-aspartylglutamic Acid in Whole Brain of 3-Mercaptopropionic Acid-Treated Rats Using Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 276, 124-128, **1999**.

Mahuran, D.J. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1455, 135-138, **1999**.

Markesbery, W.R. Oxidative Stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 23, 134-147, **1997**.

- Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of an cannabiod receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346, 561-564, **1990**.
- Mayatepek, E. und Hoffmann, G.F. Leukotrienes: Biosynthesis, Metabolism, and Pathophysiological Significance. *Pediatric Research*. 37, 1-9, **1995**.
- McCarty, D. J.; Hollander, J. L. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Annals of Internl Medicine*. 54, 452-460, **1961**.
- McGale, E.H.F.; Pye, I.F.; Stonier, C.; Hutchinson, E.C.; Aber, G.M. Studies of the inter-relationship between cerebrospinal fluid and plasma amino acid concentrations in normal individuals. *Journal of Neurochemistry*. 29, 291-297, **1977**.
- McNeil, S.D. ; Nuccio, M.L. ; Ziemak, M.J. ; Hanson, A.D. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine *N*-methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 98, 10001-10005, **2001**.
- McKinney, M.K. und Cravatt, B.F. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual Review of Biochemistry*. 74, 411-432, **2005**.
- Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N.E.; Schatz, A.R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B.R.; Compton, D.R.; Pertwee, R.G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, Z. Identification of an endogenous 2-Monoglyceride, present in the canine gut that binds to cannabiod receptors. *Biochemical Pharmacology*. 50, 83-90, **1995**.
- Mechoulam, R.; Frider, E. The unpaved road to the endogenous brain cannabinoid ligands, the anandamides. *Neuroscience Perspectives, Cannabinoid receptors*. 233-258. **1995**.
- Mechoulam, R.; Frider, E.; Di Marzo, V. Endocannabinoids. *European Journal of Pharmacology*. 359, 1-18, **1998**.
- Miyasaka Brewing Company, Ltd.
<http://www.masumi.co.jp/english/profile/process1.html>. (Zugriff am 16.3.2010).
- Mudd, S.H. und Datko, A.H. Synthesis of ethanolamine and its regulation in *Lemna paucicostata*. *Plant Physiology*. 91, 587-597, **1989**.
- Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-65, **1993**.
- Neumeister, B.; Besenthal, I.; Liebich, H.Gustav. *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. Fischer Verlag Stuttgart. **1998**.
- Nomura, M. ; Ishitani, M., Takabe, T.; Rai, A.K., Takabe, T. *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli* bet gens produces glycine betaine from cholin and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiology*. 107, 703-708, **1995**.

- Okada, S. und O'Brien, J.S. Tay-Sachs Disease: Generalized Absence of a Beta-D-N-Acetylhexosaminidase Component. *Science*. 165, 698-700, **1969**.
- Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 5298-5305, **2004**.
- Opitz, C.A.; Rimmerman, N.; Zhang, Y.; Mead, L.E.; Yoder, M.C.; Ingram, D.A.; Walker, J.M.; Rehmman, J. Production of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol by endothelial progenitor cells. *FEBS Letters*. 581, 4927-4931, **2007**.
- Organikum, 20. Auflage, J. A. Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig. 599-600. **1996**.
- Oz, M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. *Current Pharmaceutical Design*. 12, 227-239, **2006**.
- Panikashvili, D.; Simeonidou, C.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Breuer, A.; Mechoulam, R.; Shohami, E. An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature*. 413, 527-531, **2001**.
- Pauff, J. M.; Hemann, C.F.; Jünemann, N.; Leimkühler, S.; Hille, R. The Role of Arginine 310 in Catalysis and Substrate Specificity in Xanthine Dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 12785-12790, **2007**.
- Pertwee, R.G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International Journal of Obesity*. 30, 13-18, **2006**.
- Petersson, G. A McLafferty-type rearrangement of a trimethylsilyl group in silylated hydroxy carbonyl compounds. *Organic Mass Spectrometry*. 6, 577-592, **1972a**.
- Petersson, G. Mass spectrometry of hydroxy dicarboxylic acids as trimethylsilyl derivatives. Rearrangement fragmentations. *Organic Mass Spectrometry*. 6, 565-576, **1972b**.
- Pi-Sunyer, F.X.; Heshmati, H.M.; Devin, J.; Rosenstock, J. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 15, 761-765, **2006**.
- Platt, F.M.; Neises, G.; Reinkensmeier, G.; Townsend, M.J.; Perry, V.H.; Proia, R.L.; Winchester, B.; Dwek, R.A.; Butters, T.D. Prevention of Lysosomal Storage in Tay-Sachs Mice Treated with *N*-Butyldeoxynojirimycin. *Science*. 276, 428-431, **1997**.
- Proia, R.L. Gene encoding the human β -hexosaminidase β -chain: Extensive homology of intron placement in the α - and β -chain genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85, 1883-1887, **1988**.
- Pufahl, R.A.; Kasten, T.P.; Hills, R.; Gierse, J.K.; Reitzm B.A.; Weinberg, R.A.; Mafferr, J.L. Development of a fluorescence-based enzyme assay of human 5-lipoxygenase. *Analytical Biochemistry*. 364, 204-212, **2007**.

- Rapoport, S.M. und Schewe, T. The maturational breakdown in mitochondria in reticulocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 864, 471-495, **1985**.
- Ratner, S. Enzymes of Arginine and urea synthesis. *Advanced Enzymology*. 39, 1-90, **1973**.
- Razdan, R.K. Structure-Activity-Relationships in Cannabinoids. *Pharmacological Reviews* 38, 78-149, **1986**.
- Regio, P.H. Endocannabinoid structure–activity relationships for interaction at the cannabinoid receptors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 66, 143-160, **2002**.
- Riedel, E. *Anorganische Chemie*. 4. Auflage. Walter de Gruyter Verlag Berlin. 317, **1999**.
- Rehner, G. und Daniel, H. *Biochemie der Ernährung* 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin. **2002**.
- Rennes, H.; Winkel, C.; De Lemarriere, C.; Koenig, T.; Van Ommeren, E.; Tondeur, S. (Quest International Services B.V.). *PCT Int. Appl.* 26 pp, **2005**.
- Rhodes, D. und Hanson, A.D. Quarternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 44, 357-384, **1993**.
- Richard, D.; Guesdon, B.; Timofeeva, E. The brain endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *Best Practise and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 23, 17–32, **2009**.
- Richardson, D.; Ortorio, C.A.; Chapman, V.; Kendall, D.A.; Barrett, D.A. *Analytical Biochemistry*. Quantitative profiling of endocannabinoids and related compounds in rat brain using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 360, 216-226, **2007**.
- Richette, P. und Bardin, T. Gout. *Lancet*. 375, 318-328, **2010**.
- Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G.; Caput, D.; Ferrara, P.; Soubrié, P.; Brelière, J.C.; Le Fur, G. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters*. 350, 240–244, **1994**.
- Römpp Chemie Lexikon A-Cl, Falbe, J.; Regitz, M. Thieme Verlag Stuttgart. **1995**.
- Römpp, Chemie Lexikon Cm-G, Falbe, J.; Regitz, M. Thieme Verlag Stuttgart. **1995**.
- Römpp Chemie Lexikon M-Pk, Falbe, J.; Regitz, M. Thieme Verlag Stuttgart. **1995**.
- Römpp Chemie Lexikon T-Z, Falbe, J.; Regitz, M. Thieme Verlag Stuttgart. **1995**.
- Rontein, D.; Basset, G.; Hanson, A.D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering*. 4, 49-56, **2002**.

Rontein, D.; Nishida, I.; Tashiro, G.; Yoshioka, K.; Wo, W.I.; Voelker, D.R.; Basset, G.; Hanson, A.D. Plants synthesize ethanolamine by direct decarboxylation of serine using a pyridoxal phosphate enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 35523-35529, **2001**.

Rontein, D.; Rhodes D.; Hanson A.D. Evidence from engineering that decarboxylation of free serine is the major source of ethanolamine moieties in plants. *Plant Cell Physiology*. 44, 1185-1191, **2003b**.

Rontein, D.; Wu, W.I.; Voelker, D.R.; Hanson, A.D. Mitochondrial Phosphatidylserine Decarboxylase from Higher Plants. Functional Complementation in Yeast, Localization in Plants, and Overexpression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 132, 1678-1687, **2003a**.

Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjogren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P.J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*. 152, 1092-1101, **2007**.

Rychlik, M. und Asam, S. Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*. 21, 470-482, **2009**.

Sakamoto, A. und Murata, N. The use of bacterial choline oxidase, a glycine betaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiology*. 125, 180-188, **2001**.

Sandhoff, K. Variation of beta-N-acetylhexosaminidase-pattern in Tay-Sachs disease. *FEBS Letters*. 4, 351-354, **1969**.

Sanofi-Aventis: http://en.sanofi-aventis.com/investors/events/corporate/2008/081023_investor_update.asp. **2008**.

Sasaki, H.; Kume, H.; Nemoto, A.; Narisawa, S.; Takahasi, N. Ethanolamine modulates the rate of rat hepatocyte proliferation in vitro and in vivo. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. 94, 7320-7325, **1997**.

Scheen, A.J.; Finer, N.; Hollander, P.; Jensen, M. D.; Van Gaal, L. F. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *The Lancet*. 368, 1660-1672, **2006**.

Schmid, H-H. Pathways and mechanism of N-acyl ethanolamine biosynthesis: can anandamide be generated selectively? *Chemistry and Physics of Lipids*, 108, 71-87, **2000**.

Schmid, P.C.; Krebsbach, R.J.; Perry, S.R.; dettmer, T.M.; Maasson, J.L.; Schmid, H.H.O. Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain N-acyl ethanolamines in mammalian brain. *FEBS Letters*. 375, 117-120, **1995**.

Schmid, P.C.; Schwart, C.N.; Smith, C.N.; Krebsbach, R.J., Berdyshev, E.V.; Schmid, H.H. A sensitive endocannabinoid assay. The simultaneous analysis of N-

- acylethanolamines and 2-monoacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*. 104, 185-191, **2000**.
- Schmidt, A.; Brune, K.; Hinz, B. Determination of the endocannabinoid anandamide in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 20, 336-342, **2006**.
- Schreiber, D.; Harlfinger, S.; Nolden, B.M.; Gerth, C.W.; Jaehde, U.; Schomig, E.; Klosterkötter, J.; Giuffrida, A.; Astaria, G.; Piomelli, D.; Lewke, F.M. Determination of anandamide and other fatty acyl ethanolamides in human serum by electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 361, 162-168, **2007**.
- SDBS. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (Zugriff am 17.3.2010).
- SeQuantTM. A Practical Guide to HILIC. **2008**.
- Serhan, C.N. Lipoxins and Novel Aspirin-Triggered 15epi-Lipoxins (ATL): A Jungle of Cell-Cell Interactions or a Therapeutic Opportunity? *Prostaglandins*. 53, 107-137, **1997**.
- Sheskin, T.; Hanus, L.; Slager, J.; Vogel, Z.; Mechoulam, R. Structural Requirements for Binding of Anandamide-Type Compounds to the Brain Cannabinoid Receptor. *Journal of Medicinal Chromatography*. 40, 659-667, **1997**.
- Shimbo, K.; Oonuki, T.; Yahashi, A.; Hirayama, K.; Miyano, H. Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 23, 1483-1492, **2009**.
- Shin, S. H. und Moore, T. S. Phosphatidylethanolamine synthesis by castor bean endosperm - a base exchange reaction. *Plant Physiology*. 93, 148-153, **1990**.
- Simon, G.-M. und Cravatt, B.-F. 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 281, 26465-26472, **2006**.
- Skoog, D.A. and Leary, J.J. *Instrumentelle Analytik*. Springer Verlag, Berlin. **1996**.
- Squadrito, G.L.; Cueto, R.; Splenser, A.E.; Valavanidis, A.; Zhang, H.; Uppu, R.M.; Pryor, W.A. Reaction of Uric Acid with Peroxynitrite and Implications for the Mechanism of Neuroprotection by Uric Acid *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 376, 333-337, **2000**.
- Starowicz, K.; Nigam, S.; Di Marzo, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacological Therapy*. 114, 13-33, **2007**.
- Stryer Biochemie, Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. *Spektrum Akademischer Verlag*, Elsevier GmbH, München. **2007**.
- Sugiura, T.; Kodaka, T.; Kondo, S.; Tonegawa, T.; Nakane, S.; Kishimoto, S.; Yamashita, A.; Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol, a Putative Endogenous Cannabinoid Re-

ceptor Ligand, Induces Rapid, Transient Elevation of Intracellular Free Ca²⁺ in Neuroblastoma 1 Glioma Hybrid NG108-15 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 229, 58-64, **1996a**.

Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Tonegawa, T.; Nakane, S.; Yamashita, A.; Waku, K. Synthesis of Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor Ligand, through N-Acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca²⁺-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 218, 113–117, **1996b**.

Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Tonegawa, T.; Nakane, S.; Yamashita, A.; Ishima, Y. ; Waku, K. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of Nararachidonylethanolamine, an endogenous cannabionidreceptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *European Journal of Biochemistry*. 240, 53-62, **1996c**.

Sun, Y.X.; Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Murakami, M.; Kudo, I; Ueda, N. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochemical Journal*. 380, 749-756, **2004**.

Tavazzi, B.; Vagnozzi, R.; Di Pierro, D.; Amorini, A.; Fazzina, G.; Signoretti, S.; Marmarou, A.; Caruso, I.; Lazzarino, G. Ionpairing high-performance liquid chromatographic method for the detection of N-acetylaspartate and N-Acetylglutamate in cerebral tissue extracts. *Analytical Biochemistry*. 277, 104–108, **2000**.

Terkeltaub, R.; Bushinsky, D.A.; Becker, M.A. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics. *Arthritis Research & Therapy*. 8, (Suppl 1), S4, **2006**.

Thabuis, C.; Tissot-Favre, D. ; Bezelgues, L.B. ; Martin, J.C.; Cruz-Hernandez, C.; Dionisi, F.; Destailats, F. Biological functions and metabolism of oleoylethanolamide. *Lipids*. 43, 887-894, **2008**.

Thomas, L. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 5. Auflage. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main. **1998**.

Tropak, M.B. und Mauhran, D. Lending anhelping hand, screening chemical libraries for componuds that enhance β -hexosaminidase A activity in GM2 gangliosidosis cells. *FEBS Journal*. 274, 4951-4961, **2007**.

Tuchman, M. und Holzknrecht, R.S. N-Acetylglutamate Content in Liver and Gut of Normal and Fasted Mice, Normal Human Livers, and Livers of Individuals with Carbamyl Phosphate Synthetase or Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *Pediatric Research*. 27, 408-412, **1990**.

Tundo, P.; Selva, M.; Perosa, A.; Memoli, S. Selective Mono-C-methylation of Arylacetonitriles ans Arylacetates with Dimethylcarbonate: A Mechanistic Investigation. *Journal of Organic Chemistry*. 67, 1071-1077, **2002**.

- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J.; Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39, 44-84, **2007**.
- Vance, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related amoniphospholipids. *Journal of Lipid Research*. 49, 1377-1387, **2008**.
- Van Gaal, L.F.; Rissanen, A.M.; Scheen, A.J.; Ziegler, O.; Rössner, S. Effects of the cannabinoid-1-receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience in the RIO-Eurpoe study. *The Lancet*. 366, 1389-1397, **2005**.
- Van Veldhoven, P.; Gijssbers, S.; Mannaerts, G.P.; Vermeesh, J.R.; Brys, V. Human sphingosine-1-phosphatylase:cDNA cloning, functional expression studies ans mapping the chromosome 10q22(1). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1487, 128-134, **2000**.
- Visser, J.; Renes, H.; Winkel, C.; Noomen, S. (Quest International B.V. Netherlands). *PCT Int. Appl.* 24pp, **2006**.
- Vollhardt, K.P.C. und Schore, N.E. *Organische Chemie*. 2. Auflage. VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim. 871-872, **1995**.
- Waller, G.R. *Biomedical Applications of Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience. New York. **1972**.
- Walter, K. und Schütt, C. *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd Edition. Academic press, Inc. New York. 2, 860-864, **1974**.
- Wang, Y.; Liu, Y.; Hashiguchi, T.; Kitajima, I.; Yamakuchi, M.; Shimizu, H.; Matsuo, S.; Imaizumi, H.; Maruyama, I. Simultaneous Measurement of Anandamide and 2-Arachidonoylglycerol by Polymyxin B-Selective Adsorption and Subsequent High-Performance Liquid Chromatography Analysis: Increase in Endogenous Cannabinoids in the Sera of Patients with Endotoxic Shock. *Analytical Biochemistry*. 294, 73-82, **2001**.
- Wang, Y.; Liu, Y.; Sarker, K.P.; Nakashima, M.; Serizawa, T.; Kishida, A.; Akashi, M.; Nakata, M.; Kitajima, I.; Maruyama, I. Polymyxin B binds to anandamide and inhibits its cytotoxic effect. *FEBS Letters*. 470, 151-155, **2000**.
- Watson, M.S.; Watkins, S.D.; Tondeur, S. (Quest International Services B.V., Netherland ; Givaudan Nederland Services B.V.) *PCT Int. Appl.* 22pp, **2008**.
- Xie, B.; Rigat, B.; Smiljanic-Georgijev, N.; Deng, H.; Mahuran, D. Biochemical characterization of the Cys138Arg substitution associated with the AB variant form of GM2 gangliosidosis : evidence that Cys138 is required for the recognition of the GM2 activator/GM2 ganglioside complex by beta-hexosaminidase A. *Biochemistry*. 37, 814-821, **1998**.

Yadao, F.; Hechtman, P, Kaplan, F. Formation of a ternary complex between GM2 activator protein, GM2 ganglioside and hexosaminidase A. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1340, 45-52, **1997**.

Yagen, B. und Burstein, S., Novel and sensitive method for the detection of anandamide by the use of its dansyl derivative. *Journal of Chromatography B*. 740, 93-99, **2000**.

Yamaguchi, Y.; Matsumura, T.; Ichida, K.; Okamoto, K.; Nishino, T. Human Xanthine Oxidase Changes its Substrate Specificity to Aldehyde Oxidase Type upon Mutation of Amino Acid Residues in the Active Site: Roles of Active Site Residues in Binding and Activation of Purine Substrate. *Journal of Biochemistry*. 141, 513- 524, **2007**.

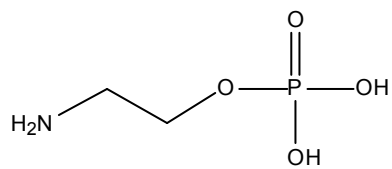
Zeisel, S.H. Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition*. 16, 669-671, **2000**.

Zhou, J. und Saba, J.D. Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 242, 502-507, **1998**.

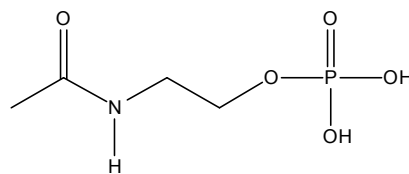
6 Strukturmatrix

In der folgenden Übersicht sind die wesentlichen in dieser Arbeit aufgeführten Verbindungen zusammengefasst.

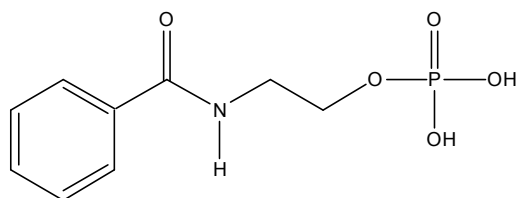
Nr.	Substanz
(1)	Ethanolaminphosphat
(2)	<i>N</i> -Acetyl-Ethanolaminphosphat
(3)	<i>N</i> -Benzoyl-Ethanolaminphosphat
(4)	<i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat
(5)	<i>N</i> -Lactoyl-Ethanolamin
(6)	Trimethyl-silyl- <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat
(7)	Di-methyl-Ethanolaminphosphat
(8)	<i>N</i> -Acetyl-Ethanolamin
(9)	Ethanolamin
(10)	p-Nitrophenylphosphat
(11)	p-Nitrophenol
(12)	Nordihydroguaretsäure
(13)	Xanthin
(14)	Harnsäure
(15)	Allopurinol
(16)	p-Nitrophenyl- <i>N</i> -acetyl-glucosamid
(17)	<i>N</i> -Acetyl-glucosamin
(18)	Methyl- <i>N</i> -lactoyl-Ethanolaminphosphat
(19)	Di-methyl- <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat
(20)	Benzyl- <i>N</i> -Lactoyl-Ethanolaminphosphat



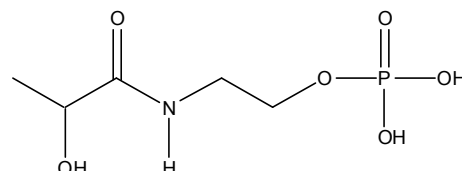
(1)



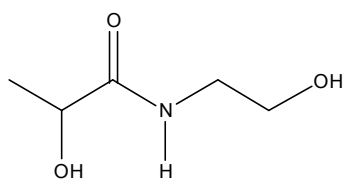
(2)



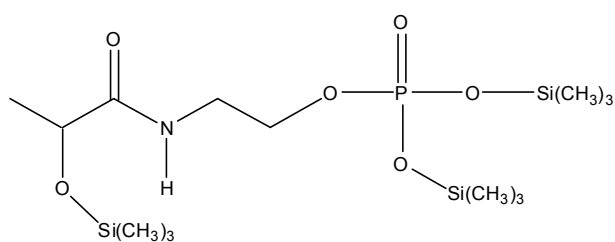
(3)



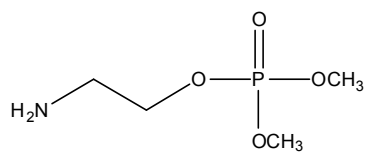
(4)



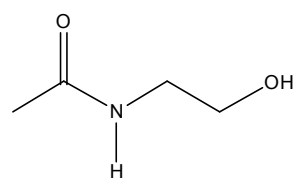
(5)



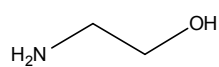
(6)



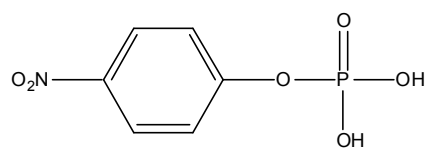
(7)



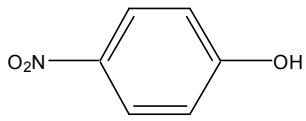
(8)



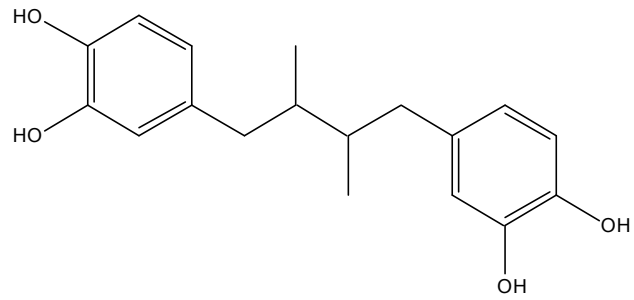
(9)



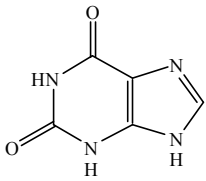
(10)



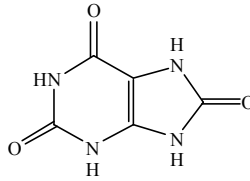
(11)



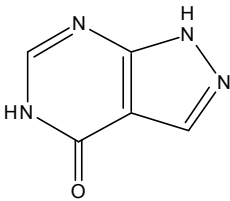
(12)



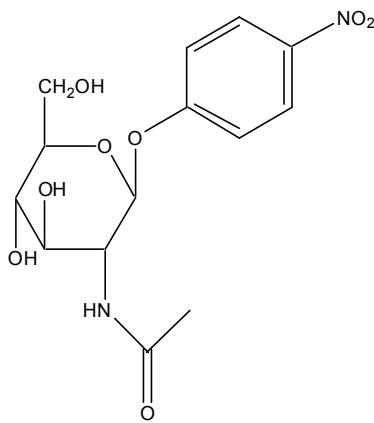
(13)



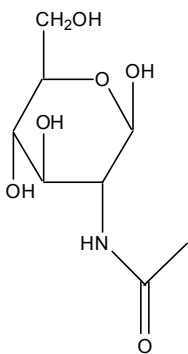
(14)



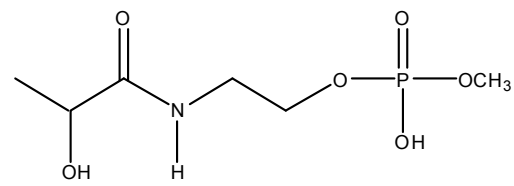
(15)



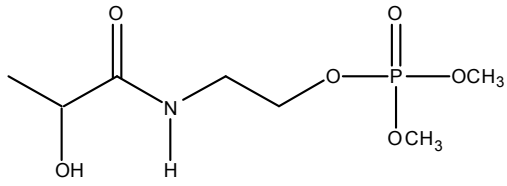
(16)



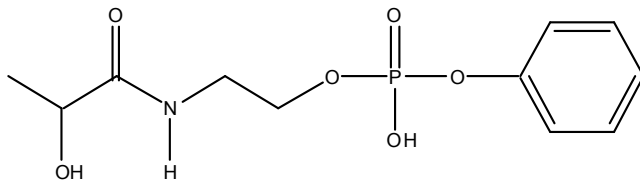
(17)



(18)



(19)



(20)

7 Anhang

Tab. 7.1 Ergebnisse der Leitfähigkeitsmessung der *N*-Acyl-Ethanolaminphosphatderivate (2 - 4) und Ethanolaminphosphat (1). Bestimmung der spezifischen Leitfähigkeit einer ca. $1 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung in Millipore-Wasser der jeweiligen Verbindung mittels Leitfähigkeitsmessgerät und Berechnung der molaren Leitfähigkeit über die molare Stoffmengenkonzentration

Substanz	c [mol/L]	spezifische Leitfähigkeit [μS/cm]	molare Leitfähigkeit [(S*cm ²)/mol]
EAP	$1.05 \cdot 10^{-3}$	3.77	3.59
NLEAP	$8.73 \cdot 10^{-4}$	52.0	59.32
NAEAP	$1.02 \cdot 10^{-3}$	70.0	68.87
NBEAP	$9.88 \cdot 10^{-4}$	78.7	79.68

Tab. 7.2 Ermittelte Stabilitätsraten von NAEAP (2), NBEAP (3) und NLEAP (4) mit EAP (1) als Standard und NAEA (8) und NLEA (5) mit EA (9) als Standard bei pH 3/25 °C. Angaben in g/L mit der jeweiligen Standardabweichung n=2.

Zeit [d]	NAEAP [g/L]	NBEAP [g/L]	NLEAP [g/L]	NAEA [g/L]	NLEA [g/L]
0	14.8 ± 0.0	12.3 ± 0.0	10.7 ± 0.0	14.8 ± 0.0	20.0 ± 0.0
1		10.6 ± 0.9		12.6 ± 1.7	14.0 ± 0.8
2	11.7 ± 0.2		10.4 ± 0.1	13.3 ± 0.3	13.4 ± 0.6
3	13.0 ± 0.7	11.0 ± 1.9			
4	11.4 ± 2.0				
7	13.2 ± 0.6				
8	13.5 ± 1.4		9.0 ± 0.4		
9			10.1 ± 0.1		
10	13.3 ± 0.4	11.1 ± 0.5	8.5 ± 0.3		
11			9.1 ± 0.5		
13				10.5 ± 2.2	14.9 ± 3.6
15	11.6 ± 0.9	8.7 ± 1.9		12.3 ± 0.3	14.8 ± 1.2
16			10.1 ± 1.2	16.0 ± 1.4	12.3 ± 0.4
17		7.9 ± 0.6			
18		7.3 ± 0.3			
19				11.20 ± 0.1	10.7 ± 2.7
20		11.1 ± 2.1			

21			9.8 ± 1.6		
22					15.8 ± 1.6
23		10.8 ± 1.3		13.5 ± 0.9	12.4 ± 1.9
24	12.8 ± 0.7	12.2 ± 1.9	10.1 ± 0.1	10.9 ± 0.3	

Tab. 7.3 Ermittelte Stabilitätsraten von NAEAP (2), NBEAP (3) und NLEAP (4) mit EAP (1) als Standard und NAEA (8) und NLEA (5) mit EA (9) als Standard bei pH 7.4/37 °C. Angaben in g/L mit der jeweiligen Standardabweichung n=2.

Zeit [d]	NAEAP [g/L]	NBEAP [g/L]	NLEAP [g/L]	NAEA [g/L]	NLEA [g/L]
0	9.2 ± 0.0	12.3 ± 0.0	10.7 ± 0.0	14.8 ± 0.0	20 ± 0.0
1				13.4 ± 0.1	20.1 ± 3.9
2		10.6 ± 0.6		14.4 ± 1.8	14.6 ± 1.4
3	7.5 ± 0.9	10.7 ± 0.7			
7			8.8 ± 0.4		
9	8.2 ± 1.5	8.3 ± 1.0	9.2 ± 0.2		
10	7.4 ± 0.7	10.3 ± 0.4	8.6 ± 0.6		
11	7.2 ± 0.1		10.6 ± 0.7		
13				14.5 ± 1.6	21.5 ± 0.8
15				11.1 ± 1.7	18.4 ± 0.3
16	8.3 ± 0.4	10.5 ± 0.2	10.8 ± 0.4	17.0 ± 0.7	14.1 ± 5.2
17	9.4 ± 1.3	10.3 ± 0.1	11.1 ± 0.1		
18		10.9 ± 0.7			
19				12.3 ± 2.2	12.3 ± 2.1
21	9.8 ± 0.5	9.3 ± 0.5	11.2 ± 0.1		
22		7.6 ± 1.2	9.6 ± 0.2	14.2 ± 0.8	
23			11.7 ± 0.1		16.1 ± 3.1
24	8.3 ± 0.3		9.4 ± 0.6	14.1 ± 0.7	

Tab. 7.4 Ermittelte Stabilitätsraten von NAEAP (2), NBEAP (3) und NLEAP (4) mit EAP (1) als Standard und NAEA (8) und NLEA (5) mit EA (9) als Standard bei pH 10/25 °C. Angaben in g/L mit der jeweiligen Standardabweichung n=2.

Zeit [d]	NAEAP [g/L]	NBEAP [g/L]	NLEAP [g/L]	NAEA [g/L]	NLEA [g/L]
0	9.2 ± 0.0	12.3 ± 0.0	10.7 ± 0.0	14.8 ± 0.0	20.0 ± 0.0
1	6.6 ± 2.0	10.8 ± 0.2		11.4 ± 0.4	19.2 ± 1.7
2			10.2 ± 1.4	10.8 ± 1.3	
3			11.1 ± 1.3		
5	7.1 ± 2.4	13.4 ± 0.5			13.2 ± 2.9
6	8.4 ± 1.8	11.8 ± 1.1			
7			8.9 ± 0.2		
8			9.1 ± 0.4		
9	6.6 ± 2.2	12.2 ± 1.2	8.0 ± 0.5		
10	4.5 ± 1.5	11.9 ± 1.6	9.2 ± 0.9		15.9 ± 2.6
11			9.7 ± 1.2		
12	5.2 ± 1.3				18.5 ± 4.9
13				10.9 ± 0.3	
15		9.6 ± 0.8		11.7 ± 1.7	11.3 ± 1.2
16			8.7 ± 1.0	13.1 ± 3.3	
18	4.6 ± 0.1				21.5 ± 2.1
19				10.3 ± 0.9	
20		6.5 ± 2.1			21.0 ± 2.3
21					19.9 ± 0.5
22		8.6 ± 0.1	8.8 ± 1.4	12.6 ± 0.1	
23		7.0 ± 0.1			19.0 ± 2.1
24	2.9 ± 0.8		7.1 ± 0.3	14.2 ± 2.3	20.5 ± 0.1

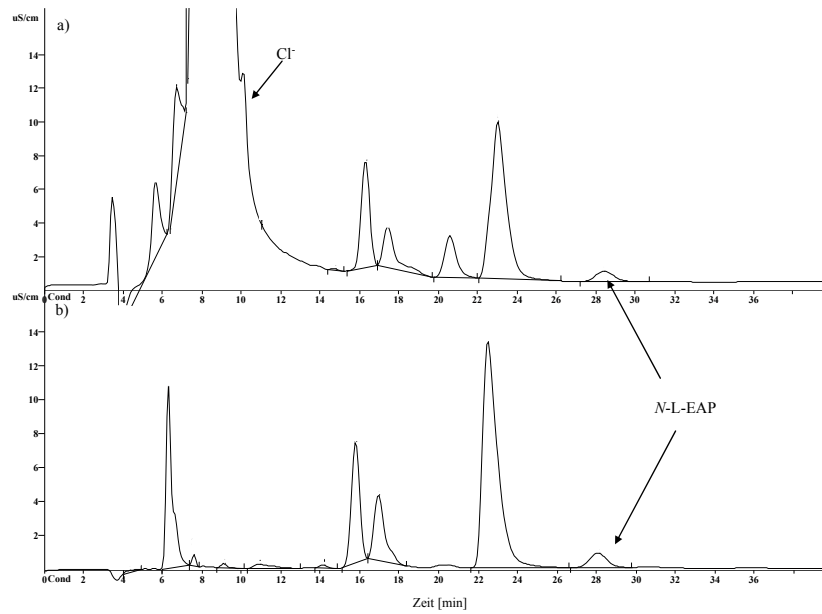


Abb. 7.1 oben: Ionenchromatogramm Isolierung von NLEAP (4) aus Nigorisake mit Dowex. Durchführung siehe 4.3.7.1
 Unten: Ionenchromatogramm Isolierung von NLEAP (4) aus Nigorisake mit SPE. Durchführung siehe 4.3.7.2. IC Bedingungen 4.2.5.

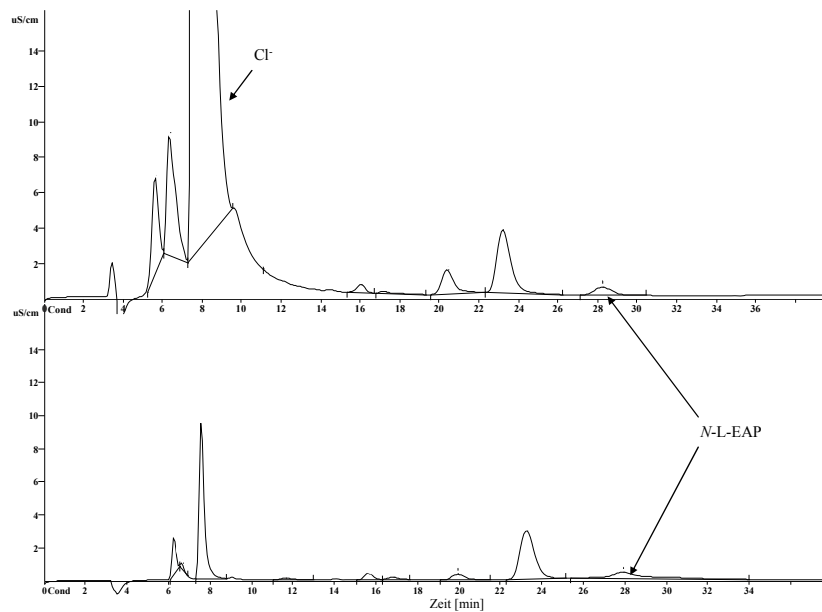


Abb. 7.2 oben: Ionenchromatogramm Isolierung von NLEAP (4) aus Amasake mit Dowex. Durchführung siehe 4.3.7.1
 unten: Ionenchromatogramm Isolierung von NLEAP (4) aus Amasake mit SPE. Durchführung siehe 4.3.7.2. IC Bedingungen 4.2.5.

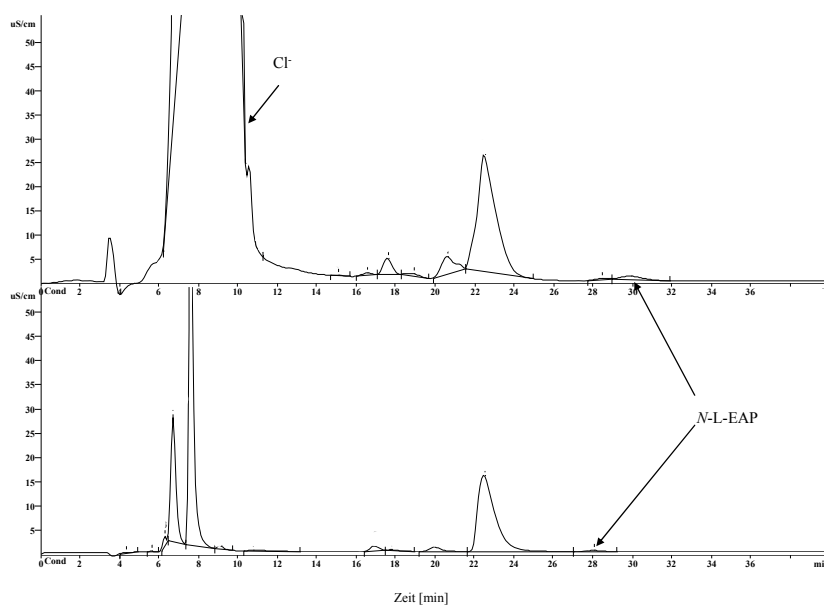


Abb. 7.3 oben: Ionenchromatogramm Isolierung von NLEAP (4) aus Rotkohl mit Dowex. Durchführung siehe 4.3.7.1
unten: Ionenchromatogramm Isolierung von NLEAP (4) aus Rotkohl mit SPE. Durchführung siehe 4.3.7.2. IC Bedingungen 4.2.5.

Tab. 7.5 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=2) aus der Isolierung von Lebensmitteln bzw. Kontrolle mit NLEAP (4) mit SC. Durchführung siehe 4.3.7.1. IC Bedingungen 4.2.5.

Lebensmittel	Wiederfindung [%]	SD [%]
NLEAP	101.8	7.4
Nigorisake	69.7	9.5
Sake	87.2	4.5
Amasake	100.7	12.7
Rotkohl	54.1	2.4

Tab. 7.6 Ermittelte Wiederfindungsraten und Standardabweichungen (n=2) aus der Isolierung von Lebensmitteln bzw. Kontrolle mit NLEAP (4) mit SPE. Durchführung siehe 4.3.7.1. IC Bedingungen 4.2.5.

Lebensmittel	Wiederfindung [%]	SD [%]
NLEAP	98.0	1.4
Nigorisake	80.9	1.3
Sake	91.1	26.3
Amasake	52.8	18.7
Rotkohl	62.1	4.2

Tab. 7.7 Ermittelte Werte des PhospholipaseA₂-Assays. Angegebene Werte: Mittelwerte und Standardabweichungen für *N*-Acetyl-Ethanolaminphosphat (**2**) und *N*-Benzoyl-Ethanolaminphosphat (**3**) (n=3).

[μM]	MW NAEAP [%]	MW NBEAP [%]
0.2	98.7 \pm 1.6	99.2 \pm 0.7
1	97.1 \pm 2.7	98.2 \pm 0.9
5	97.8 \pm 5.1	98.6 \pm 0.1
20	98.1 \pm 1.4	95.8 \pm 0.3
100	95.2 \pm 0.2	86.9 \pm 5.7
600	77.7 \pm 0.3	66.4 \pm 0.2
2376	78.2 \pm 2.2	64.4 \pm 2.9