

# Phytoglykolipide aus den Samen von *Pistacia vera* L.

Phytoglycolipids in the Seeds of *Pistacia vera* L.

Zeliha Imre

Pharmazeutische Fakultät der Universität Istanbul, Türkei

(Z. Naturforsch. 29 c, 195–200 [1974]; eingegangen am 20. November 1973/5. Februar 1974)

*Pistacia vera*, Anacardiaceae, Phytoglycolipids, Seeds

Two phytoglycolipids (PGL<sub>1</sub>, PGL<sub>2</sub>), which in qualitative composition of their long-chain bases, sugar components and fatty acids show a close similarity with the phytoglycolipids of other plant seeds, were isolated from the pistachio seeds (*Pistacia vera* L.). The saccharid chain contain inositol, glucuronic acid, glucosamin, mannose, galactose and arabinose. The major fatty acids were the saturated 2-hydroxy C<sub>22</sub>, C<sub>23</sub> and C<sub>24</sub> acids; the major long-chain bases were dehydrophyto-sphingosine and phytosphingosine. PGL<sub>1</sub> should possess the typical groundstructure of the seed phytoglycolipids. PGL<sub>2</sub> seems to contain a saccharid chain formed slight differently.

Phytoglykolipide sind komplex gebaute pflanzliche Sphingolipide, die erstmals von Carter und Mitarb. aus Phosphatid-Extrakten verschiedener Ölsamen isoliert wurden<sup>1</sup>. Sie setzen sich aus äquimolaren Mengen von Sphingosinbasen, langkettigen Fettsäuren, Phosphat, Inosit, Glucuronsäure, Glucosamin und verschiedenen anderen Zuckern zusammen. Die Struktur von dieser Stoffklasse wurde auch von Carter und Mitarb. nach langjähriger Arbeit für Tetrasaccharid-Phytoglykolipide lückenlos bewiesen<sup>1–8</sup>. Es handelt sich dabei um ein Ceramid, das mit Phosphat-diesterbindung zu dem Tetrasaccharidanteil (2-Mannosido-6-[D-glucosamido-(1–4)-D-glucuronido]-inositol) gebunden ist. Phytoglykolipide aus verschiedenen Pflanzen unterscheiden sich voneinander, hauptsächlich in den Fettsäure- und Hexose- bzw. Pentose-Anteilen des Moleküls. Es wurden aber auch PGL-e isoliert, deren Konstitutionen von der aufgestellten allgemeinen Struktur abweichen müssen. Zum Beispiel enthält ein zweites aus Flachssamen isoliertes PGL kein Glucosamin und keine Glucuronsäure<sup>4</sup>. Auch aus dem Alge *Scenedesmus obliquus* isoliertem PGL fehlen Inosit und Glucuronsäure, zwei Bausteine des für PGL-e typisch angesehenen Trisaccharids, Glucosamido-glucuronido-inositol<sup>9</sup>.

Im Laufe der Untersuchungen der Glyko- und Phospholipoide aus Pistaziensamen haben wir durch PC auf Formaldehydpapier<sup>10</sup> festgestellt, daß die Samen Phytoglykolipid-ähnliche Substanzen enthal-

ten. Es erschienen auf Formaldehydpapier (Butanol-Eisessig-Wasser, 4 : 1 : 5) vier dicht aufeinander liegende Flecken, die mit Rhodamin B, Nilblau oder mit Ammoniummolybdat-Perchlorsäure anfärbbar waren und denselben  $R_F$ -Bereich wie das Erdnuß-PGL zeigten ( $R_F$ : 0,19–0,28). In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Isolierung und Charakterisierung der PGL-Komponenten aus dem Samen von *Pistacia vera*.

## Ergebnisse

Der Gehalt an PGL-ähnlichen Substanzen betrug bei den Pistazienkernen 0,08–0,09%. Die entfetteten handelsüblichen Phosphatidextrakte, die bisher zur Isolierung der Samen-PGL-e dienten, enthalten demnach das PGL in ca. hundertfachen Mengen als von uns als Ausgangsmaterial gebrauchten Samen. Dazu kommt noch, daß das PGL in der Droge ganz oder teilweise in Form der Ca-Salze vorliegt, die ziemlich schlechte Löslichkeits- bzw. Trennungseigenschaften zeigen. Unsere Isolierungsversuche mit den von Carter für Phosphatidextrakte angegebenen Methoden<sup>1,4</sup> waren erfolglos. Wir konnten durch übliche Reinigungsverfahren nur ein stark an PGL angereichertes Produkt erhalten, das noch auf dem Formaldehyd-PC am Start bleibende phosphorfreie und stickstoffhaltige hydrophylere Verunreinigungen und auch Sterine in geringen Mengen enthielt. Die Reinisolierung dieses mutmaßlichen PGL erfolgte aber dann, durch Anpassung der von Gla-

Sonderdruckanforderungen and Dr. Z. Imre, Pharmazeutische Fakultät der Universität Istanbul, *Beyazit-Istanbul*, Türkei.

Abkürzungen: PGL, Phytoglykolipid; MPI, Monophosphatidylinositol; DEAE, Diäthylaminoäthyl.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

dyshev<sup>11</sup> und kürzlich von Carter<sup>12</sup> beschriebenen Extraktions- und Trennungsvorgängen für unsere Zwecke.

Ausgehend von entfettetem und teilweise von Esterphosphatiden befreitem Samenpulver erhielten wir zuerst durch Extraktion mit saurem Alkohol ein rohes Extrakt. Reinigung von diesem durch Chromatographie an Formaldehydzellulose<sup>9</sup>, lieferte eine rohe PGL-Fraktion, die außer PGL noch das MPI enthielt und stark mit peptidähnlichen Substanzen verunreinigt war (hoher Stickstoffgehalt und starke Amidabsorption auf IR-Spektrum). Das Verfahren durch Lösungsmittelfraktionierung<sup>12</sup> liefert zwar auch eine rohe PGL-Fraktion, bei der das PGL etwa in derselben Größenordnung angereichert war. Wir bevorzugten aber die erste Methode, da sie eine verhältnismäßig bessere Trennung der restlichen Phosphatide gestattete. Zur weiteren Trennung wurde die Substanz, nachdem sie in die Form von Na-Salzen überführt wurde, an DEAE-Zellulose (Acetat-Form) adsorbiert. Die gradiente Elution mit Ammoniumacetat (0 bis 0,6 M) nach Hendrickson und Ballou<sup>13</sup> ermöglichte eine scharfe Trennung von MPI sowie von stickstoffhaltigen Verunreinigungen und ergab zwei PGL-Fractionen mit unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten. Aus diesen wurden dann nach sorgfältiger Entsalzung an Dextran-Gel die reinen Substanzen PGL<sub>1</sub> und PGL<sub>2</sub> gewonnen.

Die reinen PGL-Präparate stellen rein weiße, schwere, nicht hygroskopische Pulver dar und zeigen ähnliche Löslichkeitseigenschaften wie die bekannten Phytoglykolipide. Auch auf dem Formaldehyd-PC verhalten sie sich ähnlich zueinander und zu dem PGL aus der Erdnuß. Das molare Stickstoff-Phosphorverhältnis betrug bei PGL<sub>1</sub> wie bei den meisten Samen-PGL 2 : 1. Das PGL<sub>2</sub> hat hingegen einen zu niedrigen Stickstoffwert (s. Tab. I).

Die Bestimmung der einzelnen Komponenten von PGL<sub>1</sub> nach saurer Hydrolyse zeigte, daß sich der Saccharidanteil der Substanz aus äquimolaren Mengen von Inosit, Glucuronsäure, Glucosamin und Pentose bzw. Hexose (Arabinose, Mannose, Galaktose) zusammensetzt und gleicht damit dem von Erdnuß-<sup>14</sup> und Flachs-PGL<sup>12</sup>. Als Hauptbasenanteil enthält das PGL<sub>1</sub> das Phytosphingosin (D-ribo-1.3.4-trihydroxy-2-amino-octadecan) und/oder Dehydrophytosphingosin (D-ribo-1.3.4-trihydroxy-2-amino-8-trans-octadecen). Dünnschichtchromatographisch wurde noch ein schwacher Fleck im R<sub>F</sub>-Bereich der 1.4-Anhydroprodukte der beiden Hauptbasen festgestellt. Somit stimmt auch die Basenzusammensetzung des PGL<sub>1</sub> qualitativ gut mit der von Erdnuß-, Flachs-, Soja- und Mais-PGL überein.

Verschieden ist hingegen das Fettsäuremuster von PGL<sub>1</sub> von dem der anderen PGL. Es überwiegen die gesättigten C<sub>22</sub> bis C<sub>26</sub> 2-Hydroxyfettsäuren und die gesättigten C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub> Fettsäuren. Bemerkenswert ist das Vorkommen von ungeradzahligem C<sub>23</sub>,

Tab. II. Fettsäurezusammensetzung der Pistazien- und Erdnuß-PGL.

Fettsäure	Pistazien-PGL <sub>1</sub>	Erdnuß-PGL <sup>14</sup>
	[%]	[%]
Palmitinsäure	1,75	2,37
Öl- und Linolsäure	1,54	3,63
Arachinsäure	1,04	1
Hydroxyarachinsäure	2,76	—
Behensäure	2,93	3,0
Tricosansäure	1,75	—
Hydroxybehensäure	12,03	25,10
Lignocerinsäure	6,36	12,30
Hydroxytricosansäure	12,85	—
Pentacosansäure	3,74	—
Cerebronsäure	41,90	34,80
Hydroxypentacosansäure	5,21	—
Hydroxycerotinsäure	4,91	4,20
Arachidonsäure	—	1,89

Tab. I. Prozentuale Zusammensetzung der Pistazien-PGL.

	N	P	Sphingosinbasen (Basen-N)	Zucker (Pentose-Hexosen)	Inosit [%]	Glucosamin	Glucuronsäure	Fettsäuren
	[%]	[%]	[%]	[%]		[%]	[%]	[%]
PGL <sub>1</sub>	2,04	2,11	21,23 (0,94)	12,8	10,53	9,60	13,93	27,0
PGL <sub>2</sub>	1,48	1,98	19,90 (0,88)	14,02	11,10	4,06	15,40	27,75
Theoret. Werte für PGL (Tetrasaccharid)	1,97	2,17	22,29 (0,98)	12,64	12,64	12,58	13,63	27,0

C<sub>25</sub> Hydroxy- und unsubstituierten Fettsäuren (s. Tab. II).

Um etwas über die Struktur des Saccharid-Anteils zu erfahren, haben wir das PGL<sub>1</sub> und zur Kontrolle ein Erdnuß-PGL-Muster stufenweise hydrolysiert und die Spaltprodukte jeweils chromatographisch untersucht. Die nach barytalkalischer Hydrolyse erhaltenen Oligosaccharid-Lösungen der beiden Proben zeigten auf dem PC die gleichen Flecken. Es wurden ein mit Ninhydrin- und ammoniakalischer Silbernitratlösung anfärbbarer Fleck, der offenbar das Trisaccharid Glucosamido-glucuronido-inositol darstellt und ein langsamer laufender Fleck von einem längeren Oligosaccharid festgestellt. Weitere schwach saure Hydrolyse des Saccharidanteils lieferte ein Hydrolysat auf dessen PC der Trisaccharid-Fleck noch zu sehen war, längeres Oligosaccharid war verschwunden, hingegen waren die Flecken von Galaktose, Mannose und Arabinose aufgetaucht.

Die Analyse von PGL<sub>2</sub> ergab, daß die chemische Zusammensetzung der Substanz qualitativ völlig mit der von PGL<sub>1</sub> übereinstimmt. Auch die prozentualen Basen und Fettsäureanteile der beiden PGL stimmen miteinander überein. Der auffälligste Unterschied von PGL<sub>2</sub> zu PGL<sub>1</sub> besteht in dem zu niedrigen Glucosamingehalt. Demgemäß zeigt die Substanz keine äquimolaren Verhältnisse im Oligosid-anteil.

### Diskussion

Das Extraktionsverfahren von Gladyshev mit salzsaurem Alkohol, kombiniert mit der Chromatographie an DEAE-Zellulose, stellt für die Reinisolierung von komplex gebauten Phytoglykolipiden direkt aus der Droge die Methode der Wahl dar. Bei den von uns gebrauchten Säurekonzentrationen wurde keine Artefaktbildung festgestellt. Von den isolierten Verbindungen ergibt das PGL<sub>1</sub> bei der Hydrolyse äquimolare Mengen von Sphingosinbasen, Fettsäuren, Phosphat, Inosit, Glucosamin, Glucuronsäure und Pentose bzw. Hexose. Demnach zeigt diese Substanz die typische Zusammensetzung der Samen-PGL. Chromatographische Untersuchung des stufenweise hydrolysierten Produktes deutet weiterhin auf die Grundstruktur hin, die von Carter für die Samen-PGL allgemein postuliert wurde. Der Hauptunterschied im qualitativen sowie im quantitativen Sinne zwischen dem PGL<sub>1</sub> aus Pistazien und den PGL aus anderen Samen besteht in der Fettsäurezusammensetzung. Das PGL<sub>2</sub> unterscheidet sich von PGL<sub>1</sub>

durch zu niedrigen Glucosamin- und durch etwas höheren Zucker- und Glucuronsäuregehalt. Analytische Daten dieser Substanz, insbesondere die Sphingosinstickstoff- und Phosphorwerte sprechen gegen ein PGL-Muster mit etwas längerer Oligosaccharidkette als PGL<sub>1</sub>. Ob es sich nun bei PGL<sub>2</sub> um ein Phytoglykolipid mit anders gestaltetem Saccharidanteil handelt, muß noch geklärt werden. Auf Grund der chromatographischen Auftrennung der Pistazien-PGL in vier dicht übereinander liegende Zonen ist anzunehmen, daß es sich bei PGL<sub>1</sub> und PGL<sub>2</sub> um ein Gemisch von vier PGL ähnlichen Mol.-Gewichten handelt, die sich nur im Pentose- bzw. Hexose- oder im Fettsäureanteil unterscheiden.

### Experimenteller Teil

Das mit Formaldehyd imprägnierte Papier für PC der PGL und anderer Phospholipide und mit Formaldehyd imprägnierte Zellulose zur SC wurden aus dem Ederol Papier Nr. 208 (Fa. Binzer, Hatzfeld) bzw. aus Zellulose-Pulver MN 2100, nach Hörhammer, Wagner und Richter<sup>10</sup> hergestellt. Bestimmung des Gesamtstickstoffes erfolgte nach der Mikro-Kjeldahl-Methode. Phosphor wurde nach PC auf Formaldehydpapier oder direkt von der Probe nach Wagner und Mitarb.<sup>15</sup> bestimmt.

#### 1. Isolierung der Pistazien-PGL

Zur Isolierung wurden frische Pistazienfrüchte aus der Provinz Gaziantep (Südostanatolien/Türkei) verwendet. Nach Entfernung vom roten Fruchtfleisch sowie des Endokarps enthielten die gefriergetrockneten Samen 59–60% Fett, 0,8–1% Phosphatide und 0,08–0,09% PGL (beide ber. aus Phosphorgehalt nach Formaldehyd-PC).

#### Herstellung der rohen PGL-Fraktion

Aus 775 g Samenpulver durch erschöpfende Extraktion mit Petroläther (40–45 °C) gewonnenes fettfreies Pulver (312 g) wurde viermal mit je 1 l Chloroform-Methanol (3 : 1, 2 : 1) eine Stunde unter Rückfluß gekocht. Die Auszüge, die kein PGL enthielten, wurden verworfen. Das getrocknete Pulver (298 g) wurde dann mit 2 l 0,05 N HCl in 70-prozentigem Alkohol 40 min lang unter Rückfluß extrahiert, heiß filtriert und das Pulver noch dreimal mit je 1 l saurem Alkohol 10 min lang gekocht. Die vereinigten Filtrate wurden sofort abgekühlt und über Nacht bei –15 °C belassen. Die Niederschläge wurden in der Kälte (bei 5000 rpm und 1–2 °C) abzentrifugiert, mit kaltem, saurem Alkohol, dann mit Aceton und schließlich mit Äther gewaschen. 2 g dieses Rohextraktes (5,1 g) wurden

an einer Formaldehyd-Zellulose-Säule ( $2,8 \times 50$  cm), mit der Oberphase des Lösungsmittels Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) getrennt. 100 Fraktionen à 5 ml wurden genommen und aus den PGL-haltigen Fraktionen 45–70 erhielt man 286 mg rohe PGL-Fraktion. Rosa-weiß gefärbtes, nicht hygroskopisches, schweres Pulver. Analytische Werte: P 1,10%, N 8,58%, Sphingosin-N 0,28%, MPI 7,8%.

#### Reinigung der PGL-Fraktion an DEAE-Zellulose durch Elution mit gradientem Salz

560 mg rohe PGL-Fraktion, gelöst in 30 ml wäßrigem Pyridin (26:4), ließen wir über eine Säule ( $1,7 \times 27$  cm) von chelatbildendem Ionenaustauscherharz laufen, Chelax 100, 50–100 mesh, Na<sup>+</sup>-Form<sup>16</sup> (Bio-Rad) und eluierten das Material quantitativ mit 300 ml Wasser. Ausbeute: 542 mg. Aus 40 g DEAE-Zellulose (Schleicher und Schüll, v. 0,64 meq/g Kapazität) wurde, wie von Rousser<sup>17</sup> beschrieben, eine Säule vorbereitet und in Acetat-form gebracht. Die PGL-Na<sup>+</sup>-Proben wurden in Portionen von 270 mg, suspendiert in 5 ml Chloroform, auf die Säule gegeben. Die lineare gradiente Salz-Elution erfolgte, in der wir 500 ml des Elutionsmittels (Chloroform-Methanol-Wasser, 20:9:1) zur Mischungskammer und das gleiche Volumen desselben, aber angereichert mit 0,6 M Ammoniumacetat, zum zweiten Reservoir gaben. Es wurden 165 Fraktionen à 6 ml gewonnen. Den Elutionsgang verfolgten wir durch Phosphorbestimmung bei einer 0,1 ml Probe von jeder dritten Tube und durch Formaldehyd-PC. Die einzelnen Fraktionen wurden nach einer, mit den Phosphorwerten aufgestellten Elutionskurve, in vier Fraktionen vereinigt (F<sub>1</sub>–F<sub>4</sub>). Davon enthielten F<sub>3</sub> (68–95) und F<sub>4</sub> (99–130) nur das PGL und das Salz, und F<sub>2</sub> (40–64) nur das MPI.

Die stark salzhaltigen Rückstände der Fraktionen F<sub>3</sub> und F<sub>4</sub> wurden durch Schütteln mit Alkohol und durch Gefriertrocknung teilweise vom Salz befreit. Die totale Entfernung des Salzes geschah dann mit Hilfe der Chromatographie an einer Sephadex-Säule. Aus 100 g Sephadex G-25 (Medium, Pharmacia) wurde nach Siakatos und Rousser<sup>18</sup> eine Säule vorbereitet und mit den für die Eluierung gebrauchten Lösungsmitteln sorgfältig gewaschen. Die Chromatographie mit 4 verschiedenen Lösungsmitteln, Chloroform-Methanol (Lösungsmittel 1), Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser (Lösungsmittel 2 und 3) und Methanol-Wasser (Lösungsmittel 4) erfolgte auch genau in der von Siakatos und Rousser beschriebenen Weise, und für die Trennung von 0,3 g F<sub>3</sub>- und 0,6 g F<sub>4</sub>-Rückständen wurden jeweils dort angegebene Mengen von 4 Elutionsmitteln ge-

nommen. Die Hauptmengen von PGL befanden sich bei dieser Prozedur in den Eluat von Lösungsmittel 2. Lösungsmittel 1 eluierte ein öliges Material, das wenig PGL enthielt. Größere Mengen von Ammoniumacetat wurden mit Lösungsmittel 3 und 4 eluiert. Zur vollkommenen Entsalzung mußten wir nur die Rückstände der Eluate von Lösungsmittel 2 mehrmals zur frisch regenerierten Säule geben. Wir erhielten aus der dritten Fraktion der DEAE-Zellulose-Säule 96 mg PGL<sub>1</sub>, aus der vierten Fraktion derselben 71 mg PGL<sub>2</sub>. Chromatographie auf Formaldehydpapier mit Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5, Oberphase), aufsteigend, Anfärbung mit Nilblau, Rhodamin B und Ammoniummolybdatperchlorsäure. R<sub>F</sub>-PGL<sub>1</sub> und PGL<sub>2</sub>: 0,20–0,31 bei Laufröhre 27 cm und ca. 100 µg Auftragsmenge.

#### 2. Hydrolyse der Pistazien-PGL und Nachweis von Spaltprodukten

Je 25 mg-Proben von PGL<sub>1</sub> und PGL<sub>2</sub> wurden mit 15 ml 2 N methanolischer HCl 6 Stunden lang unter Rückfluß gekocht. Aus dem Hydrolysat wurden die Fettsäuren mit Petroläther ausgezogen. Nach Abdampfen des Methanols halbierten wir das fettsäurefreie Hydrolysat. Eine Hälfte der Lösung wurde mit Dowex 2 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form) neutralisiert (pH: 5–6), zu einem kleinen Volumen eingengt und wurde absteigend auf Whatman Papier Nr. 1 mit Äthylacetat-Eisessig-Wasser (3:1:3) chromatographiert. Der Nachweis von Zucker erfolgte durch Besprühen mit butanolischer Anilinchthalat-, ammoniakalischer Silbernitrat-Lösungen und dem Elson-Morgan Reagens. Die andere Hälfte der Lösung wurde mit 10 N NaOH alkalisiert und die Sphingosinbasen mit Äther und Chloroform ausgeschüttelt. DC von Basen auf Kieselgel-G (Merck), Laufmittel-1: Chloroform-Methanol-Wasser (65:25:4)<sup>19</sup>, Laufmittel-2: Chloroform-Methanol-2 N NH<sub>4</sub>OH (40:10:1)<sup>20</sup>, Anfärbung mit Ninhydrinreagenz, Phytosphingosin und Dehydrophytosphingosin: R<sub>F</sub>-1: 0,24, R<sub>F</sub>-2: 0,22, 1,4-Anhydrophytosphingosine: R<sub>F</sub>-1: 0,72, R<sub>F</sub>-2: 0,65.

Der mit Petroläther ausgeschüttelte Fettsäureanteil wurde in ätherischer Lösung mit Diazomethan methyliert<sup>21</sup> und die Methylester wurden gaschromatographisch analysiert. Identifizierung erfolgte durch Überspritzen mit reinen Testsäureestern. Apparat Aerograph 204 mit FID, Fa. Varian; Säule  $1/8'' \times 3$  m, gepackt mit 3% SE-30 auf Chromosorb G 80–100 mesh; Säulentemperatur 240 °C, Einlaßtemperatur 260 °C, Dedektortemperatur 263 °C; Trägergas N<sub>2</sub>, 30 ml/min, H<sub>2</sub> 25 ml/min; Einspritzmenge 80–130 µg.



### 3. Quantitative Bestimmung der Spaltprodukte

Der Pentose- bzw. Hexoseanteil der PGL wurde nach der Anthron-Methode von Mallov<sup>22</sup> unter Zugrundelegung einer mit Galaktose aufgestellten Eichgerade, der Glucosamingehalt in Anlehnung an die Methode von Elson und Morgan<sup>23</sup>, in modifizierter Form von Rondle und Morgan<sup>24</sup> und Boas<sup>25</sup>, mit Glucosamin-HCl als Standard bestimmt. Die Bestimmung der Glucuronsäure erfolgte in den Aliquoten der Stammlösungen für obige zwei Bestimmungen, nach der Carbazol-Methode von Dische<sup>26</sup> in modifizierter Form nach Bitter und Ewins<sup>27</sup> und mit Glucuronsäurelacton als Standard. Der Inositgehalt wurde nach einer Methode von Böhm und Richarz<sup>28</sup>, in der Modifikation von Hübscher und Hawthorn<sup>29</sup> durch Perjodsäure-Oxydation bestimmt.

Zur Bestimmung des prozentualen Fettsäuregewichtes und der Sphingosinbasen wurden 16,3 mg PGL<sub>1</sub> und 14,7 mg PGL<sub>2</sub> mit 8 ml N methanolischer HCl in eine Glasampulle eingeschmolzen, 16 Stunden lang bei 75–80 °C hydrolysiert. Die Fettsäuren wurden mit Petroläther ausgezogen, zweimal mit Wasser gewaschen, nach Abfiltrieren über Hyflo-Supercel (Celite, Mansfield) und Entfernen des Lösungsmittels gefriergetrocknet. Ausbeute an Fettsäuren: PGL<sub>1</sub>: 4,43 mg, PGL<sub>2</sub>: 4,08 mg. Aus dem wäßrigen Hydrolysat ausgeschüttelte Basen wurden nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abdampfen des Äthers bis zum konstanten Gewicht getrocknet und zur Kontrolle abgewogen. 3,62 mg (22,2%) aus PGL<sub>1</sub> und 3,15 (21,4%) aus PGL<sub>2</sub>. Weißes, wachsartig aussehendes Basengemisch in 50 ml Chloroform gelöst. Kolorimetrische Bestimmung der Sphingosinbasen erfolgte dann in den Aliquoten dieser Lösung nach der Methode von Lauter und Trams<sup>30</sup>, unter Zu-

grundelegung einer mit C<sub>18</sub>-Phytosphingosin aufgestellten Eichkurve.

### 4. Stufenweise Hydrolyse des PGL<sub>1</sub>

Ca. 25 mg Proben von PGL<sub>1</sub> und von Erdnuß-PGL wurden nach Carter<sup>3</sup> barytalkalisch hydrolysiert. Aus dem filtrierten Hydrolysat wurden die Bariumionen mit einem Überschuß von N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entfernt. Die durch Hyflo-Supercel filtrierte und mit Dowex 2 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Form) neutralisierte Lösung wurde mit dem gebrauchten Harz zusammen auf eine kleine Säule (1,4 × 10 cm) von frischem Dowex 2 gegeben und mit 80 ml Wasser eluiert. Nach Gefriertrocknung wurde der Rückstand des Eluates in 0,3 ml Wasser gelöst und auf 2040 bgl Papier (Schleicher und Schüll) mit Äthylacetat-Eisessig-Wasser (3 : 1 : 1, Oberphase) absteigend chromatographiert. *R<sub>F</sub>*-Tetrasaccharid: 0,074; *R<sub>F</sub>*-Trisaccharid: 0,14; *R<sub>F</sub>*-unidentifizierter Fleck: 0,2. Die Lösung wurde dann mit 0,3 ml 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in einer Glasampulle 30 min lang bei 100 °C weiter hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit Dowex 2 auf pH 4–5 gebracht und wie oben beschrieben chromatographiert. *R<sub>F</sub>*-Trisaccharid: 0,13; *R<sub>F</sub>*-Galaktose: 0,42; *R<sub>F</sub>*-Arabinose und Mannose: 0,51.

Herkunft der Testsubstanzen: C<sub>18</sub>-Phytosphingosin wurde durch präparative DC aus dem Sphingosinmisch des Hefecerebrins dargestellt. Das Erdnuß-PGL-Muster, Cerebronsäure-Fraktion von Prof. Dr. Klenk; diverse Phosphatid- und Fettsäureproben, sowie einige Sphingosinbasen stammen aus dem Phosphatid-Labor des Institutes für Pharmazeutische Arzneimittellehre, München. Dafür danke ich Herrn Prof. Dr. H. Wagner herzlich.

<sup>1</sup> H. E. Carter, W. D. Celmer, D. S. Galanos, R. H. Gigg, W. E. M. Lands, J. H. Law, K. L. Mueller, T. Nakayama, H. H. Tomizawa u. E. Weber, J. Am. Oil Chem. Soc. **35**, 335 [1958].

<sup>2</sup> H. E. Carter u. H. S. Hendrickson, Biochemistry **2**, 389 [1963].

<sup>3</sup> H. E. Carter, R. H. Gigg, J. H. Law, T. Nakayama u. E. Weber, J. Biol. Chem. **233**, 1309 [1958]; *ibid.* 1312.

<sup>4</sup> H. E. Carter, D. S. Galanos, H. S. Hendrickson, B. Jann, T. Nakayama, Y. Nakazawa u. B. Nichols, J. Am. Oil Chem. Soc. **39**, 107 [1962].

<sup>5</sup> H. E. Carter, S. Brooks, R. H. Gigg, D. R. Strobach u. T. Suami, J. Biol. Chem. **239**, 743 [1964].

<sup>6</sup> H. E. Carter, B. E. Betts u. D. R. Strobach, Biochemistry **3**, 1103 [1964].

<sup>7</sup> H. E. Carter, D. R. Strobach u. J. N. Hawthorne, Biochemistry **8**, 383 [1969].

<sup>8</sup> H. E. Carter, A. Kisic, J. L. Koob u. J. A. Martin, Biochemistry **8**, 389 [1969].

<sup>9</sup> H. Wagner, P. Pohl u. A. Münzing, Z. Naturforsch. **24b**, 360 [1969].

<sup>10</sup> L. Hörhammer, H. Wagner u. G. Richter, Biochem. Z. **331**, 155 [1959].

<sup>11</sup> B. N. Gladyshev, Biokhimiya **28**, 210 [1963].

<sup>12</sup> H. E. Carter u. J. L. Koob, J. Lipid Res. **10**, 363 [1969].

<sup>13</sup> H. S. Hendrickson u. C. E. Ballou, J. Biol. Chem. **239**, 1369 [1964].

<sup>14</sup> H. Wagner, W. Zofcsik u. I. Heng, Z. Naturforsch. **24b**, 922 [1969].

<sup>15</sup> H. Wagner, J. Hölzl, Ä. Lissau u. L. Hörhammer, Biochem. Z. **339**, 34 [1963].

<sup>16</sup> H. E. Carter u. E. J. Weber, Lipids **1**, 16 [1966].

<sup>17</sup> G. Rousser, G. Kritchevsky, D. Heller u. E. Lieber, J. Am. Oil Chem. Soc. **40**, 425 [1963].

<sup>18</sup> A. N. Siakatos u. G. Rousser, J. Am. Oil-Chem. Soc. **42**, 913 [1965].

<sup>19</sup> H. Wagner u. W. Zofcsik, Biochem. Z. **346**, 333 [1966].

<sup>20</sup> K. Sambasivarao u. R. H. McCluer, J. Lipid Res. **4**, 106 [1963].

<sup>21</sup> P. Pohl, H. Glasl u. H. Wagner, J. Chromatogr. [Amsterdam] **42**, 75 [1969].

<sup>22</sup> S. Mallov, M. McKibbin u. J. S. Robb, J. Biol. Chem. **201**, 825 [1953].

<sup>23</sup> L. A. Elson u. W. T. J. Morgan, Biochem. J. **27**, 1824 [1933].

- <sup>24</sup> C. J. M. Rondle u. W. T. J. Morgan, *Biochem. J.* **61**, 586 [1955].
- <sup>25</sup> N. F. Boas, *J. Biol. Chem.* **204**, 553 [1953].
- <sup>26</sup> Z. Dische, *J. Biol. Chem.* **167**, 189 [1947].
- <sup>27</sup> T. Bitter u. R. Ewins, *Biochem. J.* **81**, 43 P [1961].
- <sup>28</sup> P. Böhm u. G. Richarz, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **298**, 110 [1954].
- <sup>29</sup> G. Hübscher u. J. E. Hawthorne, *Biochem. J.* **67**, 523 [1957].
- <sup>30</sup> C. J. Lauter u. E. G. Trams, *J. Lipid Res.* **3**, 136 [1962].