

Moderne Analysemethoden zur Charakterisierung komplexer
Kohlenhydrate:
Hyaluronsäurefragmente und Alkylpolyglykoside



Dissertation

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

vorgelegt der

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

von Frau Apothekerin Andrea Kühn
geboren am 02.11.1975 in Würzburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Neubert, Halle
2. PD Dr. H.-H. Rüttinger, Halle
3. Prof. Dr. H. Wätzig, Braunschweig

Halle (Saale), den 29.10.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007429

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007429>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Kohlenhydrate	3
2.2	Hyaluronsäure	3
2.2.1	Historische Aspekte.....	4
2.2.2	Vorkommen, Struktur und Funktionen	5
2.2.3	Enzymatischer Abbau	9
2.2.4	Funktionen der Hyaluronsäurefragmente.....	11
2.3	Alkylpolyglykoside	12
2.4	Analytik.....	14
2.4.1	Probleme der Kohlenhydratanalytik.....	14
2.4.2	Methoden.....	15
2.4.2.1	Rheologie	15
2.4.2.2	Gelpermeationschromatographie	16
2.4.2.3	Kapillarelektrophorese	19
2.4.2.4	Massenspektrometrie.....	23
2.4.2.5	Kopplungsmethoden (LC/MS, CE/MS).....	30
3	Ergebnisse und Diskussion	33
3.1	Charakterisierung von Hyaluronsäurefragmentmischungen.....	33
3.1.1	Bestimmung der Molekülmassenverteilung.....	33
3.1.2	Quantitative Bestimmung mittels LC/ESI-MS	39
3.1.3	Identifizierung von Hyaluronsäureoligosacchariden mittels CE/ESI-MS Kopplung.....	42
3.1.4	Untersuchungen zum Mechanismus des enzymatischen Abbaus von Hyaluronsäure mittels GBS Hyaluronat Lyase	48
3.2	Massenspektrometrische Charakterisierung von Alkylpolyglykosiden.....	52
4	Zusammenfassung.....	54
5	Literatur.....	57
6	Anlagen (veröffentlichte Originalarbeiten)	68
6.1	Kühn, A.V.; Raith, K.; Sauerland, V.; Neubert, R.H.H.: Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 30:1531-1537 (2003)	
6.2	Kühn, A.V.; Rüttinger, H.H.; Neubert, R.H.H.; Raith, K.: Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis with electrospray ion trap mass spectrometry. <i>Rapid Commun. Mass Spectrom.</i> 17:576-582 (2003)	

- 6.3 Kühn, A.V.; Ozegowski, J.H.; Neubert, R.H.H.: Behaviour of 4,5-unsaturated hyaluronic acid oligosaccharides under electrospray ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18:733-734 (2004)
- 6.4 Kühn, A.V.; Ozegowski, J.H.; Peschel, G.; Neubert, R.H.H.: Complementary exploration of the action pattern of hyaluronate lyase from streptococcus agalactiae using capillary electrophoresis, gel-permeation chromatography and viscosimetric measurements. *Carbohydr. Res.* 339:2541-2547 (2004)
- 6.5 Kühn, A.V.; Neubert, R.H.H.: Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (Plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharm. Res.* 21:2348-2354 (2004)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
APG	Alkylpolyglykosid
API	Ionisation unter Atmosphärendruck (<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>)
CAPB	Cocamidopropylbetain
CE	Kapillarelektrophorese (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CID	kollisionsinduzierte Fragmentierung (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
DP	durchschnittlicher Polymerisationsgrad (<i>Degree of Polymerization</i>)
DO	durchschnittlicher Oligomerisationsgrad (<i>Degree of Oligomerization</i>)
EI	Elektronenstoßionisation (<i>Electron Impact Ionization</i>)
EOF	Elektroosmotischer Fluss (<i>Electroosmotic Flow</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	Ionisation durch Beschuss mit Atomen/Ionen (<i>Fast Atom Bombardment</i>)
GAG	Glykosaminoglykan
GBS	Streptokokken der serologischen Gruppe B (<i>Group B Streptococci</i>)
GC	Gaschromatographie
GlcA	D-Glucuronsäure
GlcNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose (N-Acetyl-D-glucosamin)
GPC	Gelpermeationschromatographie
HA	Hyaluronsäure (<i>Hyaluronic Acid</i>)
HAF	Hyaluronsäurefragmente (<i>Hyaluronic Acid Fragment</i>)
HA Lyase	Hyaluronat Lyase
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LALLS	Laser-Kleinwinkel-Lichtstreuung (<i>low angle laser light scattering</i>)
LC	Flüssigchromatographie (<i>Liquid Chromatography</i>)
LCQ	ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MALLS	Laser-Lichtstreuung bei mehreren Winkeln gleichzeitig (<i>Multi Angle Laser Light Scattering</i>)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie, -spektrometer

MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS ⁿ	Mehrfach-Massenspektrometrie (<i>Multiple Mass Spectrometry</i>)
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PD	Polydispersität
PEG	Polyethylenglykol
Q-TOF	Hybrid-Massenspektrometer aus Quadrupol- und TOF-Massenanalysator mit ESI-Quelle
RP	Umkehrphasen- (<i>Reversed Phase</i>)
RI	Brechungsindex (<i>refractive index</i>)
SIM	Abtasten einzelner/ausgewählter Massenspuren (<i>Single/Selected Ion Monitoring</i>)
TEA	Triethylamin
TIC	Totalionenstrom (<i>Total Ion Current</i>)
TOF	Flugzeit (<i>Time of Flight</i>)
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett

SYMBOLVERZEICHNIS

η	Viskosität	[Pas]
$[\eta]$	intrinsische Viskosität	[cm ³ /g]
λ	Wellenlänge	[nm]
d	Durchmesser	[nm]
Da	Dalton	[1,6606 10 ⁻²⁴ g]
e	Elementarladung	[1,60219 10 ⁻¹⁹ C]
E	elektrische Feldstärke	[V/cm]
I	Intensität	
	Ionenstärke	[M]
	Stromstärke	[μ A]
M	Molekülmasse, \sim_{AV} mittlere, \sim_r relative	
	molare Masse	[g/mol]
	Molarität	[mol/L]
\bar{M}_n	zahlenmittlere Molekülmasse	
\bar{M}_w	gewichtsmittlere Molekülmasse	
\bar{M}_η	viskositätsmittlere Molekülmasse	

m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis	
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration	
T	Temperatur	[°C]
U	Spannung	[V]
V	Volumen	[L]
z	Ladungszahl	

1 Einleitung und Zielstellung

Obwohl Poly- bzw. Oligosaccharide wie Hyaluronsäure (HA), Hyaluronsäurefragmente (HAF) und Alkylpolyglykoside (APGs) eine ziemlich einfache Molekülstruktur aufweisen, ist der Versuch einer Charakterisierung dieser Stoffgemische auf molekularer Ebene mit einer Vielzahl an Schwierigkeiten verbunden. Der Einsatz, sei es als Wirk- oder Hilfsstoff, in pharmazeutischen Produkten setzt hochentwickelte Analysemethoden voraus, die eine umfangreiche Charakterisierung erlauben. Dies ist besonders dann erforderlich, wenn durch enzymatischen Abbau von Biopolymeren wie HA gewonnene Produkte in pharmazeutischen Formulierungen zur Anwendung kommen sollen.

Den durch enzymatischen Abbau von HA gewonnenen HAF werden zurzeit unterschiedliche Wirkungen zugesprochen, z.B. Aktivierung dendritischer Zellen (Termeer et al. 2000), Hemmung des Tumorwachstums (Ghatak et al. 2002) und Protektion von Granulationsgewebe vor dem Angriff durch freie Sauerstoffradikale (Trabucchi et al. 2002). Der Aufklärung der genauen Zusammensetzung dieser Fragmentmischungen mit geeigneten analytischen Methoden kommt daher große Bedeutung zu. Einerseits, um anhand der entstandenen Oligosaccharide den Spaltungsmechanismus (endolytisch/exolytisch) der entsprechenden Enzyme zu charakterisieren (Pritchard et al. 1994, Park et al. 1997, Rodig et al. 1999), andererseits, um einheitliche Kettenlängenverteilungen für pharmazeutische Anwendungen z.B. in halbfesten Zubereitungen zu gewährleisten (Plätzer et al. 1999, Alkrad et al. 2002, Kühn et al. 2003). Für die quantitative Bestimmung der Hyaluronsäure und ihrer Fragmente in biologischen Systemen ist eine hochempfindliche und selektive Analytik erforderlich (Roboz et al. 1989, Akiyama et al. 1991, Goessler et al. 1993, Karamanos et al. 1995, Karamanos und Hjerpe 1997), die für Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der in pharmazeutischen Formulierungen inkorporierten Wirkstoffe genutzt werden kann (Alkrad et al. 2003).

Auch die APGs stellen ein Substanzgemisch an Molekülen dar, die sich sowohl in ihrer Alkylkette als auch der Anzahl hieran verknüpfter Monosaccharideinheiten unterscheiden können. Die physiko-chemischen Eigenschaften der APGs korrelieren direkt mit ihrer molekularen Zusammensetzung (Förster et al. 1996, Schulte et al. 1999). Eine Voraussetzung für den technologischen Einsatz der APGs in pharmazeutischen Produkten stellt daher die vorherige umfassende Charakterisierung der Mischungen auf molekularer Ebene dar.

Als analytische Methoden werden in dieser Arbeit die Kapillarelektrophorese, die Flüssigchromatographie und die Gelpermeationschromatographie zur Trennung der Analyten

eingesetzt, sowie die Massenspektrometrie und die Lichtstreuung (MALLS) zur Identifikation und Strukturaufklärung. Durch die Kopplung der Flüssigchromatographie und der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie (LC/MS und CE/MS) kann eine hochspezifische Untersuchung der Kohlenhydrate erfolgen, die, aufgrund fehlender geeigneter Standardsubstanzen, sowie charakteristischer UV-Absorption, mit anderen Methoden kaum erzielt werden kann.

Es soll gezeigt werden, ob eine umfassende Charakterisierung im Hinblick auf mittlere Molekülmasse, Molekülmassenverteilung und Polydispersität der HAF und APGs mit Hilfe der entwickelten Analytik möglich ist. Als eine Voraussetzung für den Einsatz in pharmazeutischen Formulierungen ist die Quantifizierung der zuvor charakterisierten HAF ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Der Mechanismus des enzymatischen Abbaus von HA mit der verwendeten GBS Hyaluronat Lyase soll erstmals vollständig mittels der Methoden, einschließlich Viskositätsmessungen, aufgeklärt und die Veränderung der Produktzusammensetzung in Abhängigkeit von Parametern des enzymatischen Abbaus (Abbauzeit, Enzymkonzentration usw.) erfasst werden.

2 Grundlagen

2.1 Kohlenhydrate

Als eine der vier großen Naturstoffklassen sind Kohlenhydrate neben Nucleinsäuren, Proteinen und Lipiden ein essentieller Bestandteil lebender Organismen. Auch Viren, denen man lange Zeit eine Existenz ausschließlich auf der molekularen Basis von Proteinen und Nucleinsäuren zuschrieb, enthalten Kohlenhydrate (Lehmann, J. 1996).

Die Definition „Hydrat der Kohle“ mit den Summenformeln $C_n(H_2O)_n$ bei Monosacchariden oder $C_n(H_2O)_m$ bei Oligo- und Polysacchariden trifft für viele Kohlenhydrate nicht zu, während andere Verbindungen, die der Definition entsprechen, z.B. Milchsäure oder Acrylsäure, keine Kohlenhydrate sind. Oligo- und Polysaccharide stellen Kondensationsprodukte von Monosacchariden dar. Kondensationsprodukte von Monosacchariden mit Verbindungen anderer Klassen werden als Glykoside bezeichnet. Kohlenhydrate weisen eine Häufung von funktionellen Gruppen im Verhältnis zur Molekülgröße auf, wie sie von keiner anderen Substanzklasse gezeigt wird. Schon bei relativ kleinen Molekülen kommt es daher zu einer großen Anzahl an möglichen Stereo- und Konstitutions-Isomeren. Die meisten in der Natur auftretenden Kohlenhydrate besitzen mehr als 4 asymmetrische C-Atome. Während sich aus zwei gleichen Aminosäuren nur ein Dipeptid bilden lässt, können aus zwei Glucosemolekülen, unter Bildung einer Acetal-Bindung, bereits elf verschiedene Glucosedisaccharide entstehen (anomere Verknüpfungsmöglichkeiten eingeschlossen).

Im Zuge der schnellen Entwicklung der Molekularbiologie standen Peptide, Proteine sowie Nucleinsäuren im Vordergrund des biologischen und analytischen Interesses, während Kohlenhydrate eher am Rande behandelt wurden. Allmählich wird auch die Biochemie der Kohlenhydrate intensiver untersucht, vor allem die der Glykoproteine. Kohlenhydratstrukturen spielen z.B. in vielen Bereichen der Immunologie, der Zell-Zell-Adhäsion, der Zell-Invasion oder des intrazellulären Protein-Transports eine wichtige Rolle (Lehmann, W.D. 1996).

2.2 Hyaluronsäure

Von den Glykosaminoglykanen (GAGs) ist die HA in fast jeder Beziehung ein Fall für sich. Über die Biosynthese, vor allem die Initialschritte ist am wenigsten bekannt. Allein die Molekülgröße ist außergewöhnlich und erschwert die Untersuchungen. Es fehlt das Protein (alle anderen GAGs sind gleichzeitig auch Proteoglykane), es fehlen die Sulfatreste, und eine

Kernregion wurde nie gefunden. Ein recht ungewöhnlicher Mechanismus der Biosynthese, der sich auf zahlreiche, sorgfältige Untersuchungen stützt, wurde 1983 von Prehm beschrieben (Prehm 1983a,b). Besonderheiten sind ein alternierender Einschub von UDPGlcNAc und UDPGlcA vom reduzierenden Ende der wachsenden Kette, ein an Bakterienpolysaccharide erinnernder Aufbaumechanismus, wobei immer der letzte eingeführte UDP-Rest das Ende der Kette bildet. Erst wurde angenommen, dass die Synthese im Golgi-Apparat stattfindet, bis von Prehm 1984 gezeigt werden konnte, dass die Synthese von HA an der inneren Seite von Plasmamembranen erfolgt. Während ihrer Bildung ist sie nichtkovalent an ein Protein gebunden (Toole 2000). Die Kette soll aus der Membran herauswachsen, was ohne Verankerung schwer vorstellbar ist. Für den Einsatz von polaren UDP-Hexosen außerhalb der Zellmembran wären zusätzlich Transportsysteme notwendig (Lehmann, J. 1996).

Die wissenschaftliche Untersuchung der HA war und ist beschwerlich, und oft mit Rückschlägen verknüpft, da viele etablierte Methoden aus anderen Forschungsbereichen nicht geeignet sind, und daher neue Methoden entwickelt werden müssen.

2.2.1 Historische Aspekte

HA wurde erstmals 1934 von Meyer und Palmer beschrieben. Sie isolierten ein neues GAG aus dem Glaskörper von Rinderaugen und nannten die durchsichtige viskose Flüssigkeit aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften (hyalos; griechisch-lateinisch für durchscheinend, glasartig) „Hyaluronsäure“. Sie zeigten, dass die Substanz eine Uronsäure und einen Aminozucker enthielt und keinerlei Sulfatierung aufwies (Meyer und Palmer 1934). Ihre Untersuchungen stützen sich auf die analytischen Arbeiten von Carl Mörner, der sich bereits 1894 intensiv mit den Flüssigkeiten des Auges befasst und Elementarbestimmungen von Stickstoff und Schwefel durchgeführt hat. Sein Hauptaugenmerk galt hierbei wiederum den Proteinen der Augenflüssigkeit (Mörner 1894).

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Makromolekül in seiner vollständig dissoziierten Form vor, und wird als Polyanion Hyaluronat genannt. Im allgemeinen spricht man von Hyaluronan unabhängig davon, ob HA selbst oder die Salze gemeint sind, damit wird auch der Polysaccharidcharakter hervorgehoben.

HA wurde später auch aus vielen anderen Geweben wie Nabelschnur, Haut, Synovialflüssigkeit, Hahnenkämmen (Meyer 1947) und Streptokokken (Kendall et al. 1937) isoliert.

2.2.2 Vorkommen, Struktur und Funktionen

HA wird von der Zellmembran aller Körperzellen, vor allem der mesenchymalen Zellen, synthetisiert und kommt ubiquitär im Körper vor, mit einer besonders hohen Konzentration in den Bindegeweben, der extrazellulären Matrix, der Nabelschnur, der Gelenkflüssigkeit, dem Knorpelgewebe, der Haut und dem Glaskörper des Auges (Prehm 2002).

Mikroorganismen wie Streptokokken der serologischen Gruppen A und C (zur Gruppeneinteilung s. Abschnitt 2.2.3) synthetisieren HA an der Protoplastenmembran (Markovitz und Dorfman 1962). Die Gewinnung von HA mit Hilfe dieser Mikroorganismen, z.B. *Streptococcus zooepidemicus*, nach einem zyklischen *batch*-Hochleistungsverfahren und nachfolgender Reinigung wird heute gegenüber der Extraktion aus natürlichen Geweben (Hahnenkämme, Rinderaugen), welche ein hohes Kontaminationsrisiko und Allergisierungspotential birgt, bevorzugt.

HA (Abb. 1) ist ein lineares saures Polysaccharid, das aus alternierenden (1,3)-verknüpften N-Acetyl- β -D-Glucosamin- (GlcNAc) und (1,4)-verknüpften β -D-Glucuronsäure-Einheiten (GlcA) besteht (Brimacombe und Webber 1964). Die Anzahl der sich wiederholenden Disaccharideinheiten in einem kompletten HA-Molekül kann 10^4 und mehr erreichen, was einer Molekülmasse von $\sim 4 \times 10^6$ Da entspricht.

Die Aufklärung der Sekundär- und Tertiärstruktur der HA erforderte viele Jahre der Forschung und kann auch heute als noch nicht vollständig abgeschlossen angesehen werden. Die Vereinigung von zwei Polysaccharidketten zu einem Doppelstrang, bei der die beiden Stränge antiparallel verlaufen und in einer linkshändigen Schraube umeinander gewunden sind (Doppelhelix), wurde mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen gefunden (Guss et al. 1975, Winter et al. 1975). NMR spektroskopische Untersuchungen an HA-Oligosacchariden ergaben eine Sekundärstruktur, die vier verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen pro Trisaccharideinheit (GlcA-GlcNAc-GlcA) aufwies (Scott et al. 1984, Scott 1989). Blatt- und rohrförmige Tertiärstrukturen zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von gefriergetrockneten wässrigen HA-Lösungen bei physiologischen Konzentrationen (Mikelsaar und Scott 1994). Laurent beschrieb die Überstruktur in wässriger Lösung als ein expandiertes Zufallsknäuel, welches ein bestimmtes Maß an Steifheit aufweist (Laurent et al. 1996).

Unter physiologischen Bedingungen weisen HA-Moleküle, bedingt durch die chemische Struktur der Disaccharideinheit, intramolekulare Wasserstoffbrücken und Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, eine sehr kettensteife Struktur auf, welche die hohen Viskositäten der HA bedingt (Wik und Wik 1998). In Wasser führen alternierende hydrophobe Bereiche zu

einer klebebandartigen Sekundärstruktur, die HA-Moleküle befähigt Aggregate auszubilden und selbst bei geringer Konzentration dichte Netzwerke zu formen (Scott et al. 1991, Scott 1998).

Die biologischen Funktionen des Makromoleküls sind bis heute noch nicht vollends aufgeklärt. Die Spekulationen reichen von einem als molekulares Sieb wirkenden Diffusionsmodulator (Prehm 2002) bis zum Schutzstoff vor entzündlichen Erkrankungen (Adams et al. 2000). Wesentliche Funktionen des Polysaccharids sind die Vergrößerung des extrazellulären Raums durch Bindung von Wasser und Salzen, die Organisation der extrazellulären Matrix und die Förderung der Wundheilung (Presti und Scott 1994).

Außerdem wird HA von vielen Oberflächenrezeptoren (Hyaladherine) erkannt und aktiviert durch Interaktion mit diesen Rezeptoren intrazelluläre Signalwege oder wird selbst internalisiert (Camenisch und McDonald 2000). So ist beispielsweise der CD44-Rezeptor, ein plasmamembran-assoziiertes Glykoprotein, an Zell-Migrationsprozessen sowie an der Aufnahme von HA in die Zelle beteiligt (Lesley 1998).

Dank ihres hohen Wasserbindungsvermögens wirkt das GAG als „natural moisturizer“ in der menschlichen Haut und wird daher, wie auch Harnstoff, Elastin und Kollagen, bevorzugt in kosmetischen Formulierungen als Feuchthaltesubstanz eingesetzt (Raab und Kindl 1997). Es gibt Hinweise, dass HA radikalfangende Eigenschaften besitzt (Gerlach 2002, Trommer 2002, Trommer et al. 2003a). Hierbei konnte eine Degradation des Polysaccharids nachgewiesen werden, welche sich u.a. in einer Viskositätserniedrigung äußerte (Phillips 1998). Nachdem Lapčák und Mitarbeiter 1991 mit Hilfe der elektronenparamagnetischen Resonanzspektroskopie (EPR) und der Spin-Trapping-Technik Photodegradationsprodukte von HA detektierten (Lapčák et al. 1991), konnten Hawkins und Davies 1996 mit ihren EPR-Untersuchungen - unter Einbeziehung von Experimenten mit den Monomeren GlcA und GlcNAc - HA-Radikale als Intermediate der Hydroxylradikal-induzierten Degradation direkt nachweisen (Hawkins und Davies 1996). Durch Nachweis der Endprodukte der Oxidation nach Schädigung mit dem Fenton-System mittels Massenspektrometrie (MS) stellte sich heraus, dass die Spaltung von glykosidischen Bindungen der HA vor allem an den GlcA-Einheiten ansetzt (Jahn et al. 1999). Trommer und Mitarbeiter stellten in den zur Bestimmung des Lipidperoxidationsgrades verwendeten Modellsystemen mittels der (unspezifischen) Thiobarbitursäure-Reaktion eine protektive Wirkung sowohl der Hyaluronsäure als auch ihrer Fragmente auf die untersuchten Hautlipide nach Schädigung mit UV-Licht fest. Bei Untersuchungen mit der elektronenparamagnetischen Resonanzspektroskopie, unter Verwendung des Fenton-Systems und der Spin-Trapping-Technik, zeigten sich prooxidative

Effekte anhand steigender Hydroxylradikalkonzentrationen (indirekt gemessen als Spinaddukt). Dies konnte mit einer Chelierung der (in beiden Versuchen anwesenden) Eisenionen durch das Glycosaminoglycan und einem gegenüber dem freien $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Redoxpaar veränderten Redoxpotential des Chelats erklärt werden (Trommer et al. 2003a, Rüttinger und Trommer 2004). Nach Untersuchungen von Sipos und Mitarbeitern handelt es sich um Komplexe der Form $\text{L}[\text{Fe}(\text{OH})_3]_n$, wobei L die sich wiederholende Disaccharideinheit des Moleküls ist (Sipos et al. 1995). Eine Bestrahlung in diesem Bereich führt zu einer Elektronenübertragung von HA auf das Fe(III)-Zentralatom und damit zur erneuten Generierung von OH-Radikalen, welche in direkter Nachbarschaft zum komplexgebundenen Eisen an der HA abreagieren, während sie in Anwesenheit von Spintraps von diesen abgefangen und die vermehrte Radikalbildung tatsächlich detektiert wird.

Folgt man der Einteilung der antioxidativen Verbindungen in Radikalfänger, Elektronendonatoren, antioxidative Enzyme und Übergangsmetallionen-Chelatoren, so sind HA (und auch HAF) der zuletzt genannten Gruppe zuzuordnen.

Durch chemische Modifizierung der HA, unter Aufrechterhaltung der viskoelastischen Eigenschaften des Polysaccharids, versucht man Materialien für neue Anwendungsgebiete (z.B. für die kontrollierte Freigabe von Arzneistoffen) zu entwickeln (Prestwich et al. 1998).

Eine kritische Übersicht über alle bewiesenen und unbewiesenen Funktionen der HA, eingeteilt in unspezifische Interaktionen mit Lösungsmitteln und Makromolekülen, Wechselwirkungen mit Hyaladherinen und Wirkungen im Gelenk (Tab. 1), findet man bei Laurent und Mitarbeitern (Laurent et al. 1996).

Tab. 1: Einige wichtige physiologische Funktionen von HA (modifiziert nach Trommer et al. 2003b)

Einteilung der Funktionen	Spezielle Aufgaben
Unspezifische Interaktionen mit Lösungsmitteln und Makromolekülen	Regulation des Wasserhaushalts Strukturstabilisator
Wechselwirkung mit Hyaluronsäurebindenproteinen (Hyaladherine)	Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren, zum Beispiel CD 44, RHAMM Modulation der Membranpermeabilität
Funktionen im Gelenk	Grundsubstanz Schmier- und Gleitmittel Zellaktivitätsregulator Radikalfänger (?)
Funktionen in der Haut	»Natural Moisturizer« Förderer der Wundheilung Wichtigste Matrixkomponente des Bindegewebes Radikalfänger (?)

2.2.3 Enzymatischer Abbau

Durch Einsatz entsprechender Enzyme (Hyaluronidasen) entstehen aus dem nativen Makromolekül Hyaluronsäurefragmente (HAF). Die Hyaluronidasen werden nach ihrem katalytischen Mechanismus in Hydrolasen und Lyasen unterteilt (Linhardt et al. 1986, Kreil 1995). Beim enzymatischen Abbau von Hyaluronsäure (HA) mit bakteriellen Lyasen (z.B. aus *Streptomyces hyalurolyticus*, EC 4.2.2.1) entsteht in einer β -Eliminierungsreaktion ein komplexes Gemisch an terminal 4,5-ungesättigten Oligosacchariden unterschiedlicher Kettenlänge, wobei die Endprodukte je nach Enzym Tetra- und Hexasaccharide (HA Lyase aus *Streptomyces hyalurolyticus*) oder Disaccharide (GCS HA Lyase aus *Streptococcus equisimilis*) sein können (Shimada und Matsumara 1980, Rodig et al. 1999). Die Verwendung von Hydrolasen (Hyaluronat 4-Glykanohydrolase, EC 3.2.1.35, z.B. testikuläre Hyaluronidase; Hyaluronat 3-Glykanohydrolase, EC 3.2.1.36, z.B. Blutegelhyaluronidase) führt zu gesättigten Produkten (Abb.1). Die Enzyme (speziell die Lyasen) können das Substrat (HA) in *endo*- oder *exolytischer* Weise abbauen, wodurch die Zusammensetzung des Endprodukts bestimmt wird.

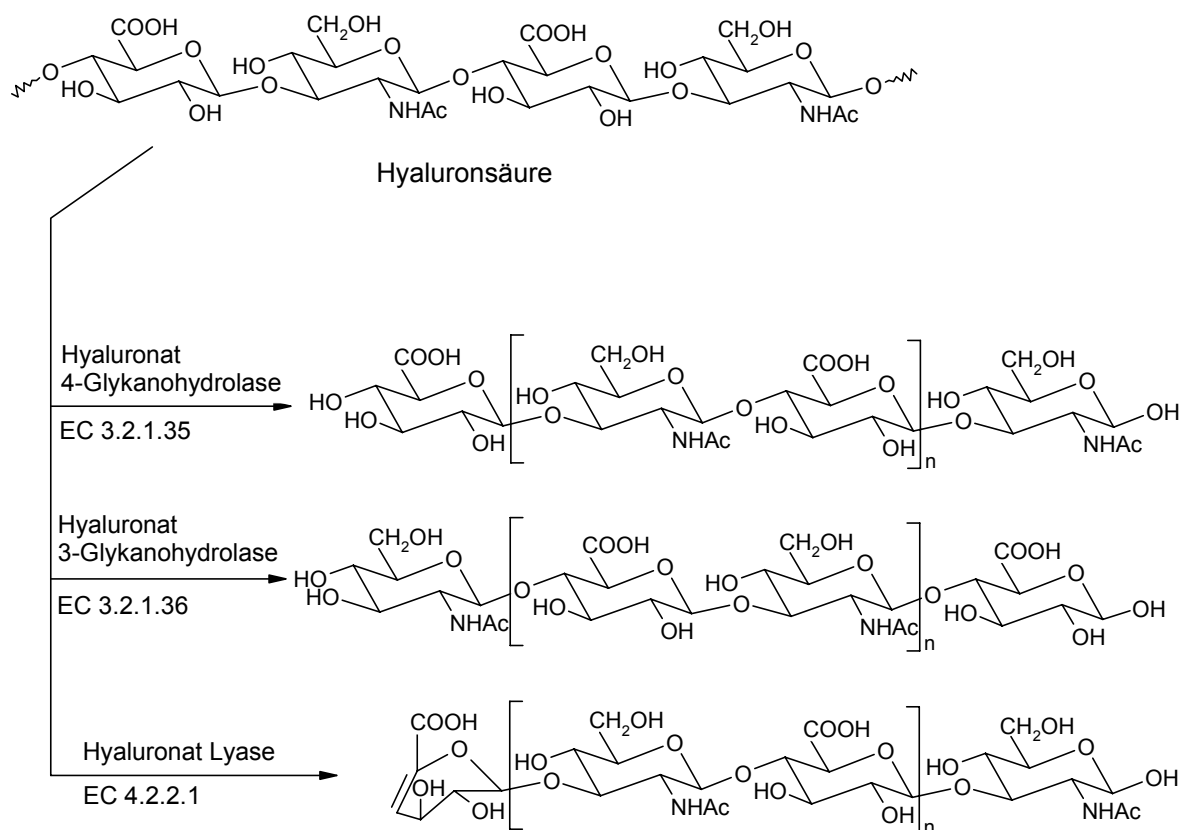


Abb. 1: Strukturen von HA und der Hauptprodukte der drei HA abbauenden Enzymklassen

Die in dieser Arbeit untersuchten HAF sind durch Abbau von HA mit Hyaluronat Lyase aus *Streptococcus agalactiae* entstandene Produkte. *Streptococcus agalactiae* gehört zu den pyogenen hämolytischen Streptokokken und hier zur Gruppe B (Group B Streptococci, GBS). Diese Gruppeneinteilung nach *Lancefield* basiert auf dem Vorhandensein unterschiedlicher gruppenspezifischer Polysaccharidantigene, die in der Zellwand vorkommen (Werner et al. 1991).

Nachdem Pritchard und Lin 1993 zeigten, dass es sich bei dem zuvor als Neuraminidase charakterisierten Enzym aus *Streptococcus agalactiae* um eine Hyaluronidase handelt (Pritchard und Lin 1993), erfolgten genauere strukturelle Untersuchungen u.a. anhand von Röntgenbeugungsexperimenten (Jedrzejewski und Chantalat 2000).

Im Zuge des mit der aus Rinderhoden extrahierten Hyaluronidase verbundenem BSE- und Allergierisikos wurde nach Austauschmöglichkeiten gesucht. Die HA Lyase aus *S. agalactiae* könnte eine mögliche Alternative sein, da sie u.a. biotechnologisch hergestellt werden kann und daher eine höhere Reinheit verglichen mit den testikulären Extrakten aufweist (Oetl et al. 2003). Eine Aufklärung der Aktionsweise des Enzyms und der entstehenden Degradationsprodukte ist daher notwendig.

So zeigten Baker und Mitarbeiter, dass die GBS HA Lyase beim Abbau von Chondroitinsulfat in spezifischer Weise nur unsulfatierte Regionen spaltet (Baker et al. 1997).

Für HA Lyase aus *S. agalactiae*, Stamm 3502, wurde für den HA-Abbau eine exolytische Aktionsweise mit einem initial endolytischen Schritt beschrieben, wonach als Endprodukt einzig das 4,5-ungesättigte Disaccharid (L-4dthrHex4enA-(1 → 3)-D-GlcNAc) vorliegen soll (Pritchard et al. 1994, Baker und Pritchard 2000, Pritchard et al. 2000, Li und Jedrzejewski 2001). Gelchromatographische Untersuchungen von HA-Abbauprodukten, die mit der von uns verwendeten HA Lyase aus *S. agalactiae*, Stamm 4755, gewonnen wurden, deuteten auf einen endolytischen Mechanismus hin (Rodig et al. 1999), obwohl beide Enzyme umfassende Sequenzübereinstimmungen zeigen (Lin et al. 1994, Gase et al. 1998). Bei der endolytischen Aktionsweise entstehen Produktmischungen, die aus HAF unterschiedlicher Kettenlänge bestehen, deren Verteilung durch die jeweiligen Abbaubedingungen bestimmt wird. Dies soll in dieser Arbeit durch die entwickelten Methoden genauer untersucht werden.

2.2.4 Funktionen der Hyaluronsäurefragmente

HA-Oligosacchariden werden zurzeit unterschiedliche physiologische Wirkungen zugesprochen, wie die Induktion der Angiogenese (West et al. 1985, Montesano et al. 1996), Aktivierung von Lymphozyten (McKee et al. 1997, Termeer et al. 2000) und Makrophagen (McKee et al. 1996, Noble et al. 1998), Hemmung des Tumorwachstums (Ghatak et al. 2002), und Protektion von Granulationsgewebe vor dem Angriff durch freie Sauerstoffradikale (Trabucchi et al. 2002).

Die oben beschriebenen Hinweise auf antioxidative Eigenschaften der HA zeigten sich auch in Experimenten mit HAF (Gerlach 2002, Trommer 2002). Diese UV-protaktiven Effekte der HAF lassen die Anwendung in Dermatika sinnvoll erscheinen, um vorzeitige Hautalterung zu verhindern. Für die mit HA Lyase gewonnenen HAF wird diese Wirkung auch im Zusammenhang mit der Existenz der Doppelbindungen diskutiert (Wohlrab 2000, Gerlach 2002). Aus biopharmazeutischer Sicht ist gegenüber nativer HA eine bessere Penetration in die Haut zu erwarten.

Eine Reihe an Patenten verdeutlicht die Einsatzmöglichkeiten von Hyaluronat Lyase und HAF in pharmazeutischen Produkten (Tab. 2).

Tab. 2: Patente in Bezug auf HA und HA Lyase

Patent Nr.	Anmelder	Erfinder, Jahr	Titel
EP 1 140 006 B1	Esparma	Wohlrab et al., 2000	Mittel zum Schutz der Haut enthaltend hydrolysierte Hyaluronsäure
DE 199 63 538 A1	HKI	Ozegowski et al., 2001	Verwendung eines Enzyms zur Verbesserung der Geweberesorption von Arzneimitteln
DE 101 03 271 A1	HKI	Ozegowski et al., 2002	Pharmazeutische Formulierungen zur Erweichung von Bindegewebe, insbesondere zur Formkorrektur von Bindegewebe und Bindegewebestrukturen
DE 100 53 053 A1	HKI	Venbrocks et al., 2002	Pharmazeutische Formulierungen zur Hemmung von entzündlichen Arthritiden

Voraussetzung für den Einsatz dieser Fragmentmischungen in halbfesten Zubereitungen für pharmazeutische Anwendungen ist eine umfassende Charakterisierung auf molekularer Ebene mit geeigneten analytischen Methoden, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt.

2.3 Alkylpolyglykoside

Alkylpolyglykoside (APGs) gehören zur Gruppe der nichtionischen Tenside. Sie zeigen neben guten funktionellen Eigenschaften, wie Schaumstabilität und Synergismen mit anderen Tensiden (Rosen und Sulthana 2001), auch hervorragende toxikologische und ökologische Eigenschaften (Steber et al. 1995), und werden daher in zahlreichen Kosmetik- und Körperpflegeprodukten eingesetzt (Förster et al. 2000). Eine Auswahl der derzeitigen Patente gibt Tabelle 3.

Die Herstellung erfolgt nach der zum erstenmal 1893 von Emil Fischer in der chemischen Literatur beschriebenen Synthese (Fischer 1893, Fischer 1895). Die APGs unterscheiden sich in den Ausgangsrohstoffen und ihren physiko-chemischen Eigenschaften von den klassischen nichtionischen Tensiden, den Fettalkoholethoxylaten. Im Gegensatz zu diesen sind APGs sowohl im hydrophoben als auch im hydrophilen Tensidteil auf Basis nachwachsender Rohstoffe herstellbar. Die Ausgangsstoffe können aus Mais, Kartoffeln, Weizen einerseits und Fetten, wie z.B. Kokosöl, andererseits gewonnen werden. Die Rohstoffe werden durch Umesterungs-, Hydrierungs- bzw. Hydrolyseschritte zu den eigentlichen Ausgangsstoffen Glucose und Fettalkohol umgewandelt und anschließend in einer sauer katalysierten Reaktion zu den APGs umgesetzt (Busch et al. 1993, von Rybinski und Hill 1998). Im Gegensatz zur stereospezifischen Umsetzung mit Hilfe von Schutzgruppen, die zu eindeutig definierten Produkten führt, entsteht beim industriellen Prozess ein komplexes Gemisch an Alkyloligoglykosiden. Technische Produkte sind daher aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Molekülen (bezogen auf die Alkylkette und die Anzahl hieran verknüpfter Hexose-Einheiten), Konstitutions- und Konfigurationsisomeren zusammengesetzt und werden daher Alkyl**poly**glykoside genannt (von Rybinski und Hill 1998). Abbildung 2 zeigt eine der vielen möglichen Strukturformeln der APGs.

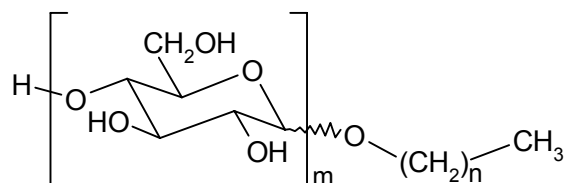


Abb. 2: Chemische Struktur eines Alkylpolyglykosids ohne Berücksichtigung von möglichen Konstitutions- und Konfigurationsisomeren. $m = 1-10$; $n = 5-15$

Eine Charakterisierung der Produkte erfolgt über die Verteilung der Alkylkettenlängen und die mittlere Anzahl hieran verknüpfter Monosaccharideinheiten, dem Polymerisationsgrad (DP).

Die physiko-chemischen Eigenschaften, wie Hydrophilie, Viskosität oder Schaumvermögen, hängen direkt von der molekularen Zusammensetzung der APGs ab (Schmidt 1999). So spielt die Verteilung der Alkylketten für die kritische Mizellkonzentration eine entscheidende Rolle (Balzer 1991, Balzer 1996). In Bezug auf rheologische Eigenschaften wirkt sich eine Änderung der Alkylkettenlänge deutlicher aus als Änderungen im DP (Schulte et al. 1999).

Auf der Basis von APGs in Verbindung mit hydrophoben Co-Tensiden können temperaturstabile Mikroemulsionen gebildet werden (Förster et al. 1996, von Rybinski et al. 1998), deren Mikrostruktur wiederum von der molekularen Zusammensetzung der eingesetzten APGs abhängig ist (Ryan und Kaler 1999).

Für die Charakterisierung der APGs auf molekularer Ebene und Korrelation der Daten mit physiko-chemischen Eigenschaften bedarf es hochentwickelter analytischer Methoden, wie der NMR Spektroskopie (Spilker et al. 1996, Billian et al. 2000a), der Massenspektrometrie (Buschmann et al. 1996, Berchter et al. 1997, Billian et al. 2000b) und der online LC/MS-Kopplung (Schulte et al. 1999, Eichhorn und Knepper 1999, Klaffke et al. 1999), welche in dieser Arbeit zu Charakterisierung von kommerziellen APG-Produkten (Plantacare[®]) eingesetzt wurde.

Tab. 3: Auswahl an Patenten zur Anwendbarkeit der APGs

Patent Nr.	Anmelder	Erfinder, Jahr	Titel
EP 0 511 466 A1	Hüls	Balzer, 1992	Wässrige Tensidzubereitungen mit erhöhter Viskosität
EP 0 681 832 A2	Hüls	Balzer, 1995	Wässrige viskoelastische Tensidlösungen zur Haar- und Hautreinigung
DE 199 45 577 A1	Cognis	Schmid et al., 2001	Kosmetische und/oder pharmazeutische Zubereitungen enthaltend Dicarbonsäuremonoester und Alkyl/Alkenyloligoglykoside
DE 101 22 257 A1	Cognis	Behler et al., 2002	Tensidgemische mit verbesserten Schaumeigenschaften und verminderter Klebrigkeit auf der Basis von Alkyl/Alkenyloligoglykosiden
DE 101 29 517 A1	Henkel	Bastigkeit et al., 2003	Mikroemulsionen auf APG-Basis als Fleckenvorbehandlungsmittel

2.4 Analytik

2.4.1 Probleme der Kohlenhydratanalytik

Kohlenhydrate besitzen im Allgemeinen kein Chromophor und weisen daher kein charakteristisches UV-Spektrum auf. Oft fehlen geeignete Standardsubstanzen, wie im Falle der HAF, welche eine eindeutige Zuordnung von Kettenlängen zu Retentionszeiten ermöglichen könnten. Die Analyse mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC/MS), welcher die Strukturzuordnung enorm erleichtert, erfordert zuvor eine aufwendige Derivatisierung der Analyten (Lottspeich und Zorbas 1998). Als hydrophile Substanzen zeigen sie meist eine schlechte Retention auf den gängigen RP Säulen. Daher wird oft die Anionenaustausch-Chromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (*high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection*, HPAEC-PAD) zur Analysierung von Kohlenhydraten verwendet. Die Trennung erfolgt hierbei an pelliculären Matrices mit Aminopropylgruppen (Carbo-Pac HPLC-Säulen) unter alkalischen Bedingungen, bei denen die Zuckerstrukturen als negativ geladene Alkoolate vorliegen und daher mit der Anionenaustauschermatrix interagieren. Die Detektion erfolgt elektrochemisch an einer Goldelektrode. Die HPAEC-PAD erfordert keine Derivatisierung der Zucker. Als amperometrische Methode, welche auf Oberflächenreaktionen beruht, ist ihre Anwendung durch die ab einer bestimmten Molekülgröße geringen Diffusionskoeffizienten limitiert. Die strukturelle Zuordnung einzelner Peaks bedarf geeigneter Standardsubstanzen oder, falls diese nicht verfügbar sind, den Vergleich der gemessenen und über zwei interne Standards korrigierten Retentionszeiten mit den validierten Retentionszeiten einer Datenbank bekannter Glykane oder die Korrelation mit *offline* erhaltenen Daten der Massenspektrometrie (Price et al. 1997, Mahoney et al. 2001). Auch die *online* Kopplung von HPAEC mit der Massenspektrometrie (HPAEC-MS) wurde beschrieben (Conboy und Henion 1992, van der Hoeven et al. 1992, Niessen et al. 1992). Da die in der HPAEC verwendeten Eluenten aufgrund ihres hohen Salzgehaltes (0,1 M NaOH, 0,5 M NaAc) nicht MS kompatibel sind, ist hierbei die Zwischenschaltung eines Mikromembransuppressors erforderlich, welcher die Kationen und Anionen vor dem Einlass ins MS effizient durch Protonen und Hydroxidionen ersetzt. Bei der Kopplung mit einem ESI-MS führt erst ein dem Suppressor-Schritt nachfolgender Zusatz von organischen Lösungsmitteln (z.B. ACN) zu einer ausreichenden Ionisation.

Die Analysemethoden zur Untersuchung von HAF und APGs der vorliegenden Arbeit werden nachfolgend beschrieben.

2.4.2 Methoden

2.4.2.1 Rheologie

Ein Charakteristikum gelöster kettenförmiger Makromoleküle besteht darin, dass sie ein, im Vergleich zu kleinen Molekülen, großes Volumen einnehmen. Lösungseigenschaften wie die Viskosität, die vom Volumen (welches wiederum durch Faktoren wie Oberfläche und Gestalt des Moleküls bestimmt wird) der gelösten Substanz abhängen, reagieren daher stark auf Änderungen der Molekülgröße (Arndt und Müller 1996).

Die Bestimmung der Molekülmasse monodisperser Proben ist über die Ermittlung der Grenzviskosität oder intrinsischen Viskosität $[\eta]$ möglich. Der Zusammenhang zwischen Grenzviskosität und relativer Molekülmasse M_r wird durch die Kuhn-Mark-Houwink-Gleichung (KMH) beschrieben:

$$[\eta] = kM_r^\alpha \quad [\text{cm}^3/\text{g}] \quad \text{Gl. 1}$$

worin k und α Konstanten sind, die von der Natur des Polymers, der Temperatur und dem Lösungsmittel abhängig sind. Umfangreiche Tabellen hierzu findet man bei Kurata und Tsunashima (Kurata und Tsunashima 1989). Für Polymer-Lösungsmittel-Temperatur-Systeme sind in der Literatur oft unterschiedliche Werte für k und α angegeben, resultierend aus dem durch die Messung begrenzten Molmassenintervall. Das bedeutet, dass man k und α nur für den Molmassenbereich benutzen sollte, in dem sie auch bestimmt wurden (Arndt und Müller 1996).

Um die Parameter der KMH-Gleichung bestimmen zu können, müssen monodisperse Referenzproben, z.B. Fraktionen der GPC, benutzt werden. Diese stehen aber für HAF zurzeit nicht zur Verfügung.

Für polydisperse Proben gilt:

$$[\bar{\eta}]_w = k\bar{M}_w^\alpha \quad [\text{cm}^3/\text{g}] \quad \text{Gl. 2}$$

worin $[\bar{\eta}]_w$ die gewichtsmittlere Grenzviskosität ist. In den meisten Fällen kann mit vertretbarem Fehler zur Ermittlung der Konstanten die gewichtsmittlere Molekülmasse \bar{M}_w anstelle der viskositätsmittleren Molekülmasse \bar{M}_η verwendet werden. Nutzt man eine in der Literatur angegebene KMH-Gleichung, sollte darauf geachtet werden, wie die Molekülmassen der Polymerproben bestimmt wurden, mit deren Hilfe man k und α ermittelt hat. Vorzuziehen

sind fraktionierte und durch Bestimmung der gewichtsmittleren Molekülmasse charakterisierte Proben. Konstanten, die durch Verwendung neutraler Standardsubstanzen, wie z.B. Pullulan und Dextran, ermittelt wurden, sind auf Polyelektrolyte wie HA nicht ohne weiteres übertragbar (s. unter 2.4.2.2).

Eine genaue Ermittlung der mittleren Molekülmasse von HA und HAF-Proben gestaltet sich ohne die Verfügbarkeit geeigneter Referenzproben demnach als sehr schwierig. Die Bestimmung der Viskositätsänderung von HA-Lösungen unter definierten Bedingungen während eines enzymatischen Abbaus gibt jedoch die Geschwindigkeit der Änderung der Kettenlängen im Polysaccharidgemisch wieder, woraus Schlüsse auf den Abbaumechanismus gezogen werden können (Jandik et al. 1994).

2.4.2.2 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen (HV) der Probenmoleküle verantwortlich, weniger die Molekülmasse. Das hydrodynamische Volumen eines Polymers ergibt sich aus dem Produkt seiner intrinsischer Viskosität $[\eta]$, welche selbst wiederum vom HV abhängig ist, und seiner relativen Molekülmasse M_r . Diese Größen sind über die Kuhn-Mark-Houwink-Gleichung miteinander verbunden:

$$HV = [\eta]M_r = kM_r^{\alpha+1} \quad [\text{cm}^3/\text{g}] \quad \text{Gl. 3}$$

Ab einer bestimmten Größe können die Moleküle nicht mehr in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen V_0 . Kleinere Moleküle können in die Poren der einzelnen Teilchen der stationären Phase eindringen und erfahren dadurch eine Verzögerung. Ihr Elutionsvolumen V_m entspricht der Summe des internen Porenvolumens und des Partikelzwischenraums. Die kleinsten Komponenten haben somit die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden zuletzt eluiert.

Zur Kalibrierung werden meist Pullulan-, Dextran- (für Polysaccharide) und Polyethylenglykolstandards verwendet. Diese Polymere sind neutral und ihre Mark-Houwink Konstanten daher unabhängig von eventuellen Ionenzusätzen im Laufmittel. Ganz anders verhält sich dies bei Polyelektrolyten (Polymere, die seiten- oder kettenständig ionische Gruppen enthalten, z.B. Hyaluronsäure), deren hydrodynamisches Volumen stark vom

Salzgehalt des Eluenten abhängig ist. Zusätzlich zu den Wechselwirkungen zwischen Polymermolekül und Lösungsmittel, den Polymersegmenten und den sterischen Einflüssen bestimmen die abstoßenden elektrostatischen Kräfte die Form und Gestalt der Moleküle. Sie werden steifer und einem Stäbchen ähnlicher (Arndt und Müller 1996). Die Viskosität hängt von der Zahl der Ladungen der Kette, d.h. dem Dissoziationsgrad ab. Je größer dieser ist, desto „steifer“ wird die Polymerkette und um so größer ihre reduzierte Viskosität. Verändert man bei einer verdünnten Polyelektrolytlösung den Dissoziationsgrad, z.B. durch Salzzugabe oder durch Erhöhung der Konzentration des Polyelektrolyten, kann die Viskositätsänderung mehrere Größenordnungen betragen. Die Salzzugabe verringert die Ionenwolke um die Polyelektrolytkette und erniedrigt den Dissoziationsgrad und damit auch die „Steifigkeit“ der Kette. Deshalb können Molekülmassen von Polyelektrolyten, die auf Kalibrierungsdaten mit den zuvor genannten ungeladenen Standardsubstanzen beruhen, stark von der tatsächlichen Molekülmasse abweichen (Yeung und Marecak 1999, Heinzmann 2003). HA-Referenzstandards (im Handel kaum erhältlich) sind daher für die Kalibrierung zu bevorzugen (Armstrong und Johns 1995).

Die on-line Kopplung der GPC mit einem multi angle laser light scattering (**MALLS**) Detektor ermöglicht eine absolute Bestimmung der Molekülmasse innerhalb eines großen Massenbereichs (Al-Assaf et al. 2002). Innerhalb dieses Bereiches ist die Intensität des an den Molekülen gestreuten Lichts (*Rayleighstreuung*) direkt proportional zum Produkt aus gewichtsmittlerer Molekülmasse und Konzentration des Polymers.

Die Anwendung der statischen (kohärenten elastischen) Lichtstreuung zur Charakterisierung von Polymeren setzt voraus, dass die Moleküle als Einzelmoleküle vorliegen, welches in einer verdünnten Lösung gegeben ist. Hierbei wird die in einem Zeitintervall, das größer als die charakteristische Zeitskala der Molekülbewegungen ist, über alle Frequenzen gemittelte Strahlung gemessen. In Abhängigkeit vom Polarisationszustand des eingestrahnten Primärlichts ergibt sich eine Winkelabhängigkeit der Streustrahlung. Das vom Beobachtungswinkel abhängige Streuvolumen ist eine weitere Ursache der Abhängigkeit der Streustrahlung vom Streuwinkel. Moderne Lichtstreugeräte arbeiten mit vertikal polarisiertem Laserlicht, bei welchem keine Winkelabhängigkeit des Streulichtes eintritt. Für kleine streuende Moleküle ist die (um die Winkelabhängigkeit des vom Detektor erfassten Streuvolumens korrigierte) Streuintensität dann winkelunabhängig. Bei asymmetrischen (großen) Molekülen variiert die Intensität des gestreuten Lichtes mit dem Beobachtungswinkel. Ab einem Durchmesser $d > \lambda/20$ (ca. 10^5 Da) besitzt ein Makromolekül mehrere Streuzentren. Das bedeutet, dass von verschiedenen Punkten des Moleküls gestreutes

Licht ausgeht. Interferenzen im Streulicht führen zur Abnahme des beobachteten Streulichts bei höheren Messwinkeln im Vergleich zum Streulicht bei einem theoretischen Messwinkel von Null Grad, der aufgrund des Laserstrahls messtechnisch aber nicht zugänglich ist (Heinzmann 2003). Mathematisch wird dies durch den Formfaktor $P(\theta)$ ausgedrückt (Gl. 4).

$$P(\theta) = \frac{I_{\theta}}{I_0} \quad \text{Gl. 4}$$

I_{θ} ist die Streuintensität beim Streuwinkel θ (Interferenz) und I_0 die Streuintensität beim Streuwinkel $\theta = 0$ (interferenzfrei).

Die Messung des Streulichts (*Debyestreuung*) erfolgt daher bei mehreren Winkeln gleichzeitig mit anschließender Extrapolation auf den Winkel Null Grad. Durch die Verbindung der GPC mit einem MALLS-Detektor (absolute Massenbestimmung) und einem konzentrationssensitiven Detektor (Refraktometer, Photometer) können die Intensität der Lichtstreuung und die Analytkonzentration an jedem Punkt des fraktionierten Peaks bestimmt werden. Dadurch können Informationen über die gewichtsmittlere Molekülmasse (\bar{M}_w), die zahlenmittlere Molekülmasse (\bar{M}_n), die Molekülmassenverteilung und die Polydispersität (\bar{M}_w/\bar{M}_n) der Probe erhalten werden.

Die Verwendung eines Laser-Kleinwinkel-Lichtstreuendetektors (low angle laser light scattering, **LALLS**) hat den Vorteil, dass die Intensität des gestreuten Lichtes praktisch gleich der des Nullwinkels ist. Die aufwendigeren winkelabhängigen Messungen sowie die notwendigen Extrapolationen können deshalb entfallen (Martin et al. 1987). Die direkte Messung des Streulichtes bei einem möglichst kleinen Winkel, über den die MALLS-Geräte aus optisch-physikalischen Gründen nicht verfügen können, verringert daher die Unsicherheit und Fehlerrate die mit der auf einem mathematischen Fit der Messdaten beruhenden Extrapolation verbunden sind.

2.4.2.3 Kapillarelektrophorese

Das grundsätzliche Prinzip der Kapillarelektrophorese (CE) beruht auf der Migration in Lösung (Elektrolytpuffer) befindlicher geladener Moleküle unter Einwirkung eines elektrischen Feldes innerhalb einer Kapillare. Diese Ionenwanderungen wurden vor mehr als 100 Jahren von F. Kohlrausch untersucht, der auch die physikalischen Gesetzmäßigkeiten dafür beschrieb (Kohlrausch 1897). Der Aufbau einer CE-Apparatur ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit v eines Ions in einem Elektrolytpuffer ist eine Funktion der angelegten elektrischen Feldstärke E , seiner Eigenladung q sowie des Reibungswiderstands, den das betrachtete Ion in der Pufferlösung erfährt. Der Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Feldstärke ist die substanzspezifische Größe μ_{eff} , die effektive elektrophoretische Mobilität (beinhaltet den Dissoziationsgrad α). Für kleine kugelförmige Moleküle lässt sich das Stokessche Gesetz anwenden, um die Reibungskraft zu berechnen (Gl. 5), wobei r den Stokes-Radius des Moleküls, welcher auch die Solvatationshülle mit beinhaltet, und η die Viskosität des Puffers darstellt.

$$\mu_{eff} = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad [\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}] \quad \text{Gl. 5}$$

Bei konstanter Feldstärke und gleichbleibender Pufferzusammensetzung ist die Migrationsgeschwindigkeit eine Funktion der Ladung, Größe und Gestalt der Moleküle. Diese Größen (und die Viskosität) werden ihrerseits beeinflusst durch Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Puffers. In stromdurchflossenen Elektrolyten geht ein Teil der elektrischen Energie in Form der Jouleschen Wärme verloren. Der Abtransport der durch die elektrische Leistung verursachten Wärme erfolgt ausschließlich über die Kapillarwand, so dass ein radialer Temperatur und Viskositätsgradient im Puffer senkrecht zur elektrophoretischen Wanderung entsteht. Dadurch wandern die Substanzzonen in Bereichen mit hoher Viskosität (Kapillarwand) langsamer als in Bereichen mit geringerer Viskosität (Kapillarmitte). Die Ausbildung des Temperaturgradienten hängt stark von der Kapillardimension, der Pufferleitfähigkeit und der Kühlung der Kapillare ab. Viskositätsunterschiede zwischen Kapillarmitte und Wand führen zu Migrationsunterschieden und damit zu einer Peakverbreiterung und Verlust an Auflösung. Auch Unterschiede zwischen der Leitfähigkeit des Puffers und der Probenzonen und/oder der Mobilität der Probenionen und der Pufferionen

und hieraus resultierende lokale Störungen des elektrischen Feldes (*Elektrodispersion*) führen zu einer Peakverbreiterung.

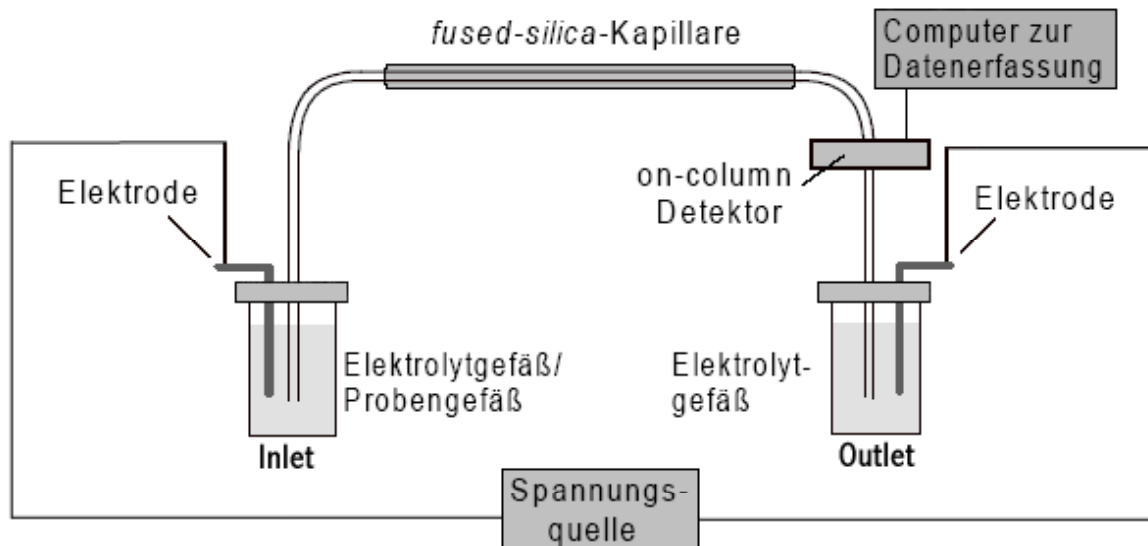


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese-Apparatur

Die Migrationsgeschwindigkeit schwacher Säuren und Basen hängt vom Dissoziationsgrad der Verbindung ab und damit vom pH-Wert des Elektrolyten. Die Abhängigkeit der Mobilität in der Nähe des pK-Wertes der Verbindung zeigt einen analogen Verlauf wie die Titrationskurve der Verbindung (Engelhardt et al. 1994). Um eine schnelle elektrophoretische Trennung zweier Komponenten zu erzielen, sollte der Puffer einen pH-Wert aufweisen, der zwischen den pK_A-Werten der Analyten liegt. Bei Verwendung unbeschichteter *fused-silica*-Kapillaren (amorphes SiO₂) steht ein pH-Wert-Bereich von 2-12 zur Verfügung. Bei sehr alkalischen pH-Werten können in der CE selbst Phenole und neutrale Kohlenhydrate deprotoniert werden. Erst bei pH-Werten unter 2 und über 12 erfolgt der Ladungstransport überwiegend durch Protonen oder Hydroxidionen. Da diese Ionen aber eine extrem hohe Mobilität besitzen (hohe Leitfähigkeit), kommt es zu einer raschen Erhitzung, welche die Trennung der Analyten behindert.

Elektrophoretische Trennungen sind nur dann möglich, wenn sich die Ionen in ihrer Mobilität unterscheiden. Die beobachtete Mobilität μ_{beob} eines Analyten unter gegebenen Bedingungen lässt sich aus der Migrationszeit t , der effektiven Länge der Trennstrecke (Länge vom Inlet bis zum Ort der Detektion) L_{eff} und der Feldstärke E nach folgender Gleichung berechnen:

$$\mu_{beob} = \frac{L_{eff}}{tE} = \frac{L_{eff} L_{ges}}{tU} \quad [\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}] \quad \text{Gl. 6}$$

Die Feldstärke resultiert aus $E = U/L_{ges}$, wobei L_{ges} die Gesamtlänge der Kapillare darstellt.

Die elektrophoretische Eigenwanderung geladener Analyten im elektrischen Feld wird durch ein zweites Transportphänomen überlagert, welches als **elektroosmotischer Fluss** (EOF, auch Endoosmotischer Fluss genannt) bezeichnet wird. Dieser beschreibt einen Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld als Folge von Grenzflächenphänomenen zwischen Kapillarwand und Elektrolytlösung. In den meisten Fällen ist in der CE die elektrophoretische Wanderung der Ionen durch den EOF überlagert. Dieser EOF hängt von der Verteilung der Ladungen in der Nähe der Kapillaroberfläche ab.

An einer Vielzahl von Materialien treten Oberflächenladungen auf. Im Falle der in der CE bevorzugt eingesetzten *bare-fused-silica*-Kapillaren (bestehen aus Kieselglas (Wätzig 2000); gebräuchlich, aber nicht ganz korrekt ist die Bezeichnung Quarzglas) sind das negative Ladungen durch Dissoziation der Silanolgruppen. Diesen Oberflächenladungen stehen entsprechend gegensinnig geladene Ionen in der Lösung gegenüber. In dieser Doppelschicht, schematisch in Abbildung 4a dargestellt, überwiegen in Kieselglaskapillaren die positiven Ionen, die sich in einer starren und unbeweglichen Schicht (kompakte Schicht) an der Oberfläche anordnen. Von dieser Schicht ausgehend folgt in Richtung Kapillarmitte eine zweite, diffuse Schicht, die den restlichen Ladungsüberschuss kompensiert. Beide Schichten zusammen werden als *Stern-Doppelschicht* bezeichnet (Dörfler 1994).

Das sich aufgrund der Ladungsverteilung aufbauende Potential wird in zwei Abschnitte eingeteilt (Abb. 4b): Eine lineare Abnahme des Potentials im Bereich der kompakten Schicht (*Helmholtz*) und eine exponentielle Abnahme in der diffusen Schicht (*Gouy-Chapman*).

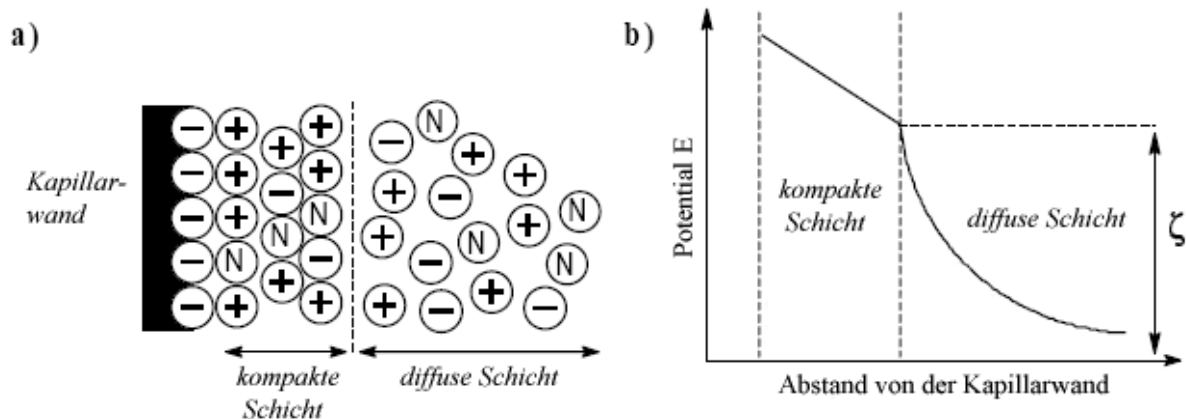


Abb. 4: Schematische Darstellung des Verlaufs des Zeta-Potentials (ζ) als Funktion des Abstandes von der Kapillarwand

Im Falle von Kieselglaskapillaren mit einer Anreicherung von positiven Ionen in der Grenzschicht wird der EOF beim Anlegen eines elektrischen Feldes daher zur Kathode hin induziert. Obwohl die Dicke der Doppelschicht nur etwa 10 nm beträgt, wird das gesamte Puffermedium, infolge zwischenmolekularer Wechselwirkungen der hydratisierten Kationen, gleichmäßig bewegt. Es bildet sich ein extrem flaches (fast stempelförmiges) Strömungsprofil aus. Das Verfahren der Elektrochromatographie (CEC) vereint die Selektivität der HPLC mit der Trennschärfe der CE, indem es sich durch Verwendung sehr kleiner Teilchen (Teilchendurchmesser um 1 μm oder kleiner) bzw. langer Säulen den EOF zunutze macht und damit deutlich effizientere Stofftrennungen als die konventionelle, druckgestützte HPLC mit ihrer parabolförmigen Flüssigkeitsströmung erzielt (Altria et al. 1997).

Die Mobilität des EOFs μ_{EOF} lässt sich vereinfacht mit Hilfe der Helmholtz-Gleichung beschreiben:

$$\mu_{EOF} = \frac{v}{E} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad [\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}] \quad \text{Gl. 7}$$

Die Geschwindigkeit v des EOFs ist umgekehrt proportional der Viskosität η des Elektrolyten, proportional seiner Dielektrizitätskonstante ε , der angelegten Feldstärke E und dem ζ -Potential. Bei unbeschichteten Kieselglaskapillaren sinkt der EOF mit zunehmender Ionenstärke des Puffers und wächst mit dem Dissoziationsgrad der Oberflächensilanolgruppen, d.h. er steigt mit dem pH-Wert an (ζ -Potentialänderung).

In Anlehnung an Gl. 6 lässt sich die Mobilität des EOF aus der Zeitspanne t_{EOF} bestimmen, in der eine ungeladene Markersubstanz, wie Aceton, Methanol oder DMSO, vom Einlass der Kapillare bis zum Ort der Detektion transportiert wird:

$$\mu_{EOF} = \frac{L_{eff}L_{ges}}{t_{EOF}U} \quad [\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}] \quad \text{Gl. 8}$$

Um die effektive elektrophoretische Mobilität μ_{eff} eines Ions zu ermitteln, muss der Beitrag des EOFs von der beobachteten Mobilität μ_{beob} subtrahiert werden:

$$\mu_{eff} = \mu_{beob} - \mu_{EOF} = \frac{L_{eff}L_{ges}}{U} \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad [\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}] \quad \text{Gl. 9}$$

Durch die Elektroosmose können auch Neutralkomplexe und, bei genügend hohem EOF, auch Anionen zur Kathode transportiert und kathodenseitig detektiert werden. Ungeladene Moleküle wandern unter diesen Bedingungen alle mit der gleichen Geschwindigkeit (der des EOFs) und können daher nicht voneinander getrennt werden.

Der EOF kann durch die Verwendung von Kapillaren mit chemisch modifizierten Oberflächen (*coated capillaries*), z.B. mit Polyacrylamid oder Polyvinylalkohol Beschichtung, kontrolliert oder sogar wirksam unterdrückt werden. Gleichzeitig wird dadurch die Adsorption von Probenbestandteilen an die Kapillaroberfläche vermindert. Nachteilig ist die oft begrenzte Stabilität der Kapillarbelegung im alkalischen pH-Bereich (Engelhardt et al. 1993).

Die Detektion erfolgt in der CE meist direkt durch ein Fenster in der Trennkapillare (*on-column*), welches durch die örtliche Entfernung der äußeren Polyimidbeschichtung entsteht, mittels Messung der UV-Absorption (z.B. UV-VIS-Dioden-Array-Detektor, DAD) oder der laserinduzierten Fluoreszenz (LIF). Außerhalb der Kapillare (*off-column*) ist die Detektion z.B. durch Kopplung mit einem Massenspektrometer (CE/MS) oder mit einem elektrochemischen oder Leitfähigkeitsdetektor möglich. In dieser Arbeit kamen die UV-Absorptionsmessung (DAD), die elektrochemische Detektion und die online CE/MS-Kopplung zum Einsatz.

2.4.2.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysetechnik zur Ermittlung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus einer Ionenquelle, in der aus Atomen oder Molekülen gasförmige Ionen erzeugt werden, einem Massenanalysator, der die Ionen im Hochvakuum nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) auftrennt und einem Detektor (Lottspeich und Zorbas 1998). Als Resultat erhält man ein Massenspektrum, in dem die m/z -Werte der Ionen gegen ihre relative Häufigkeit aufgetragen sind, wobei der intensivste Peak, der Basispeak, meist willkürlich auf 100 % gesetzt wird.

Als Ionenquellen eignen sich für die Untersuchung von Kohlenhydraten vor allem schonende Ionisationstechniken, bei denen intakte Molekülionen entstehen, wie die **FAB-Ionisation** (*Fast Atom Bombardment*), die **Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation** (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*, **MALDI**) und die **Elektrospray-Ionisation** (**ESI**).

Bei Verwendung der **chemischen Ionisation** (**CI**) werden in der Regel die permethylierten Derivate untersucht und Ammoniak als Reaktantgas verwendet (Lehmann, W.D. 1996). Aus

dem Reaktantgas werden durch Elektronenstoß-Ionisation mit ca. 150 eV relativ energiereiche Primärionen gebildet, die dann über eine Serie von Stößen zu stabileren Ionen abreagieren. Gegenüber der CI liegen die Vorteile der anderen oben genannten Methoden darin, dass Kohlenhydrate auch underivatisiert analysiert werden können und auch Polysaccharide mit höherer Molekülmasse zugänglich sind.

Die *FAB-Ionisation* eignet sich zur Bestimmung polarer, nichtflüchtiger und/oder thermolabiler Substanzen. Die Probe wird mit einer schwerflüchtigen Matrix (Glycerol u.ä.) vermischt und im Vakuum mit Atomen (Xe, Ar) oder Ionen (Cs^+) hoher kinetischer Energie bombardiert. Durch Absorption dieser Energie werden Ionen aus der Probe in die Gasphase abgegeben. Bei FAB-MS bilden Oligosaccharide im positiv-Ionen-Modus $[\text{M}+\text{H}]^+$ -, $[\text{M}+\text{Glycerol}+\text{H}]^+$ - und $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ionen (Dallinga und Heerma 1991a), im negativ-Ionen-Modus treten die entsprechenden $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen auf (Dallinga und Heerma 1991b). HA-Oligosaccharide zeigen im negativ-Ionen-Modus $[\text{M}-\text{H}_{x+1}+\text{Na}_x]^-$ -Ionen (Park et al. 1997).

Die ersten Arbeiten zum *Elektrospray-Verfahren* (Ionisation unter Atmosphärendruck, API) wurden Anfang der 70er Jahre von M. Dole und seinen Mitarbeitern durchgeführt (Dole et al. 1968). Hierbei wird eine Lösung der Probe in einem starken elektrostatischen Feld versprüht, das zwischen der Kapillarspitze, aus der die Lösung austritt, und einer wenige Millimeter davon entfernten Gegenelektrode angelegt wird. Die Sprayerzeugung wird oft durch koaxial zum Eluenten zugeführten Stickstoff unterstützt. Aus dem Nebel aus hochgeladenen Tröpfchen, die im elektrischen Feld zur Gegenelektrode wandern, werden Ionen durch Verdampfen des Lösungsmittels freigesetzt. Durch eine Öffnung im Zentrum der Gegenelektrode (*Interface*) gelangen die Ionen in den Analysatorteil (Hochvakuum) des Massenspektrometers. Restliches Lösungsmitteln wird durch geheizten Stickstoff oder in einer Metallkapillare verdampft. Eine Sonderform stellt die Z-Spray-Quelle der Firma Micromass dar, bei der die Ionen auf einer Z-förmigen Bahn in das MS gelenkt werden (Abb. 5).

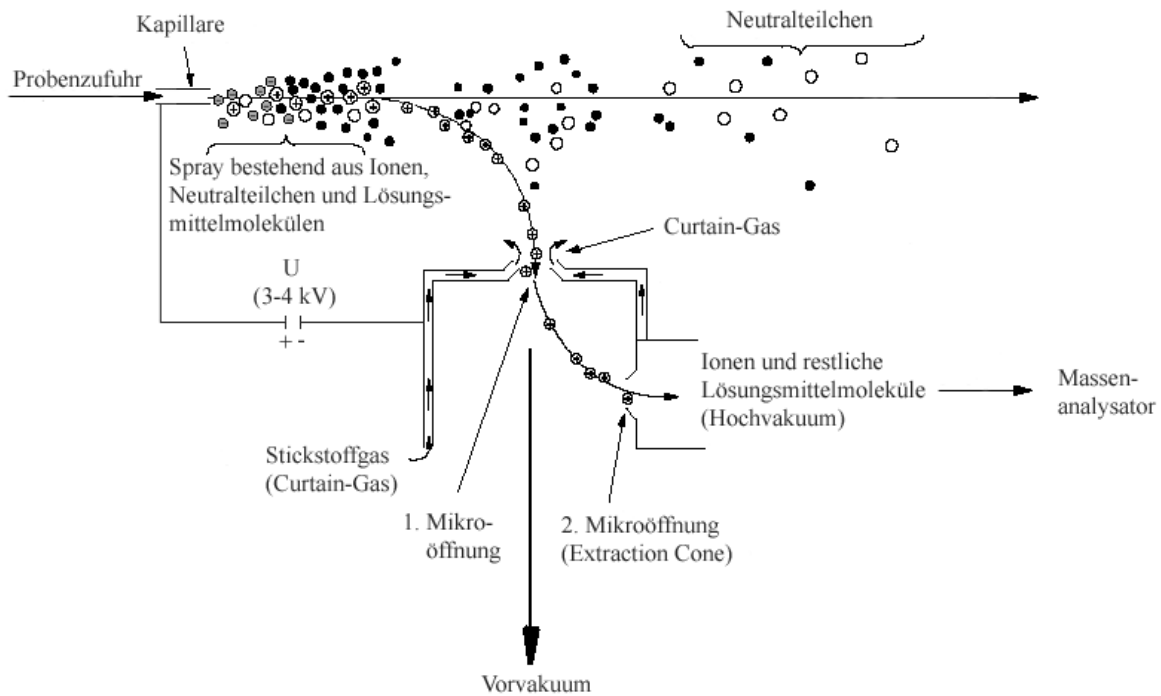


Abb. 5: Schematische Darstellung der Prozesse beim Z-Spray (positiv-Ionen-Modus). Die aus einer auf Potential liegende Metallkapillare austretende Probenlösung wird unter Atmosphärendruck in sehr viele kleine, geladene Tröpfchen dispergiert. Es kommt zu einem kontinuierlichen Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen durch Verdampfen von Lösungsmittelmolekülen. Unter dem Einfluss des elektrischen Feldgradienten (Potentialdifferenz von 20-80 V zwischen 1. und 2. Mikroöffnung) werden nur entsprechend geladene Moleküle in das Massenspektrometer gelenkt und dadurch Matrixeffekte vermindert. (modifiziert nach Micromass 2000)

Zur Zeit existieren zwei Modellvorstellungen für die Bildung der freien Gasphasen-Ionen:

- das Modell des geladenen Rückstands (*charged-residue model*, CRM)
- das Ionenemissionsmodell (*ion evaporation model*, IEM).

Grundlage des ersten Ansatzes nach Dole ist die stufenweise Verkleinerung der Tröpfchen durch Coulomb-Explosions-Serien, in deren Folge Tröpfchen mit einem Radius von ≈ 1 nm gebildet werden, die nur noch ein Analytmolekül enthalten und durch Desolvatisierung gasförmige Ionen freigeben (Dole et al. 1968). Das Ionenemissionsmodell nach Iribarne und Thomson geht von der direkten Freisetzung von Ionen aus noch viele Analytmoleküle enthaltenden hochgeladenen Tröpfchen aus (Iribarne und Thomson 1976).

Durch diese sanfte Ionisation unter geringer thermischer Belastung resultieren einfach und mehrfach geladene Quasi-Molekülionen über die Anlagerung oder Abstraktion von Protonen,

Dimer-Addukte, aber auch Addukte (z.B. Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Acetat $^-$, Cl^-) durch Bestandteile des Lösungsmittels sind möglich (Lehmann, W.D. 1996).

Generell werden neutrale Oligosaccharide bei FAB und ESI weniger effektiv ionisiert als ionische Oligosaccharide, wie z.B. HAF.

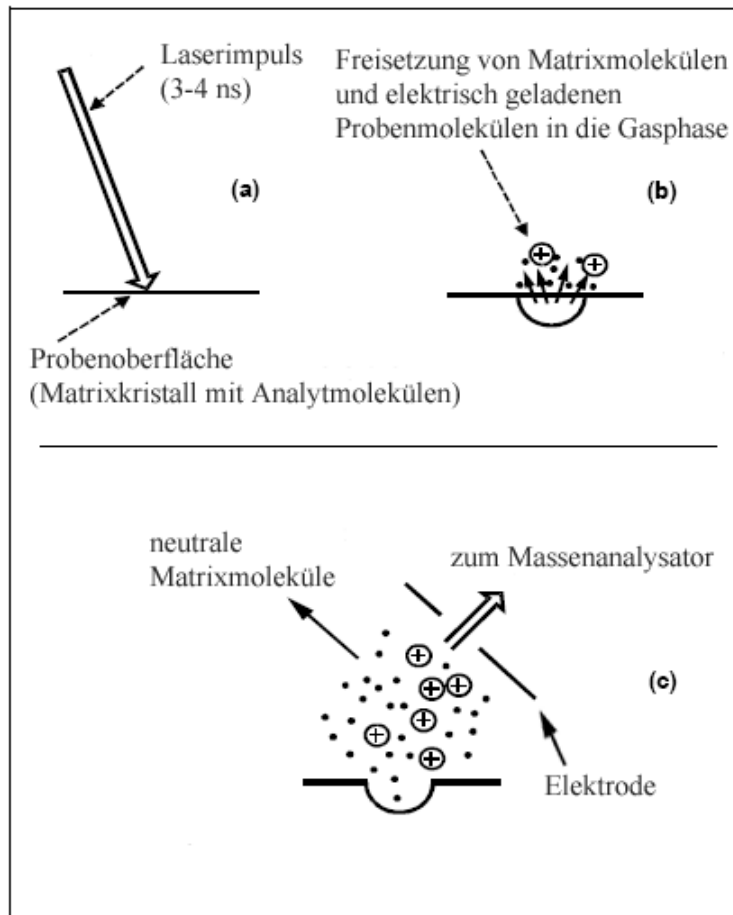


Abb. 6: Prinzip des MALDI-Prozesses im positiv-Ionen-Modus (modifiziert nach Micromass 2000)

Die *MALDI-Technik* nutzt die Energie eines gepulsten Lasers, um die Probe zu verdampfen und zu ionisieren, wobei meist einfach geladene Molekül-Ionen entstehen (Abb. 6). Die Probenpräparation erfolgt in der Regel durch das Vermischen von Lösungen der Probe und einer Matrixsubstanz (z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure, DHB). Nach Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einer Kokristallisation von Matrix und Analyt, wobei der Einbau der Probenmoleküle in das Kristallgitter der Matrix als Voraussetzung für eine erfolgreiche Energieüber-

tragung und Ionisation der Probe angesehen wurde. Eine kürzlich veröffentlichte Präparationstechnik, bei der die Matrix mit der Probe in einer Kugelmühle lösungsmittelfrei vermischt wird (Trimpin et al. 2001), deutet darauf hin, dass die Theorie der Probeneinbettung in eine übergeordnete Kristallgitterstruktur der Matrix nicht zutrifft. Demgegenüber soll ein hohes Maß an Homogenität der Analyt/Matrix-Mischung ein wichtiger Faktor für die Qualität der Spektren sein.

Durch den gepulsten Laser entsteht ein diskontinuierlicher Ionenstrom, der besonders für die Kopplung mit einem **Flugzeitmassenanalysator** (Time-of-Flight, **TOF**) günstig ist.

Die innerhalb des kurzen Laserimpulses gebildeten Ionen durchlaufen, nach ihrer Beschleunigung durch ein elektrostatisches Feld, auf einer geraden Flugbahn eine feldfreie Driftstrecke (Flugrohr) von der Quelle bis zum Detektor (lineare TOF-Instrumente).

Nach Durchlaufen der Beschleunigungsspannung U beträgt die kinetische Energie E_{kin} der Ionen:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zeU \quad [\text{Nm}] \quad \text{Gl. 10}$$

Die Geschwindigkeit v ergibt sich aus dem Weg-Zeit-Gesetz (L ist die Flugstrecke), e stellt die Elementarladung dar. Umgestellt ergibt sich:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2}t^2 \quad \text{Gl. 11}$$

In Flugzeitanalysatoren ist demnach das m/z -Verhältnis proportional zum Quadrat der Flugzeit t . Nach Gl. 11 erhält man kg als Einheit für den m/z -Quotienten. Bei Verwendung der gebräuchlicheren relativen Molekülmasse M_r zur Beschreibung der Masse von Molekülen wird das m/z -Verhältnis im Massenspektrum ohne Einheit angegeben.

Unschärfen der Anfangsenergie von Ionen gleicher Masse führen zu Signalverbreiterungen und damit zu einer Herabsetzung der Auflösung. Neuere Geräte verfügen über Reflektoren (Reflektor-TOF-Instrumente) und verzögerte Ionenextraktion (*delayed extraction*) und können dadurch in gewissen Grenzen Energieunschärfen der Ionen ausgleichen.

Als Analysatoren in Verbindung mit ESI-Quellen sind **Quadrupole**, **Ionenfallen** oder **Hybridsysteme** geeignet.

Die von Wolfgang Paul und Mitarbeitern (Paul 1990) berechneten Ionenfallen (**ion traps**) sind abgewandelte Quadrupole und bestehen aus einer Ringelektrode und zwei Endkappen, an die Wechselspannungen angelegt werden (Abb. 7). Zum Einlass sowie Auswurf der Ionen befinden sich kleine, zentrische „Öffnungen“ in der Mitte der Endkappen. In dem (ansonsten) in sich geschlossenen System beschreiben die Ionen Bahnen, wobei die Kollision mit in der Falle befindlichen Heliumatomen die Geschwindigkeit der Ionen nach Eintreten in die Falle verringert und das „Einfangen“ effizienter macht. Zur Detektion werden die Ionen über verschiedene Spannungsfelder (Multipolfelder) mit ansteigendem m/z -Wert nacheinander aus der Falle ejiziert und mit einem Sekundärelektronenvervielfacher nachgewiesen.

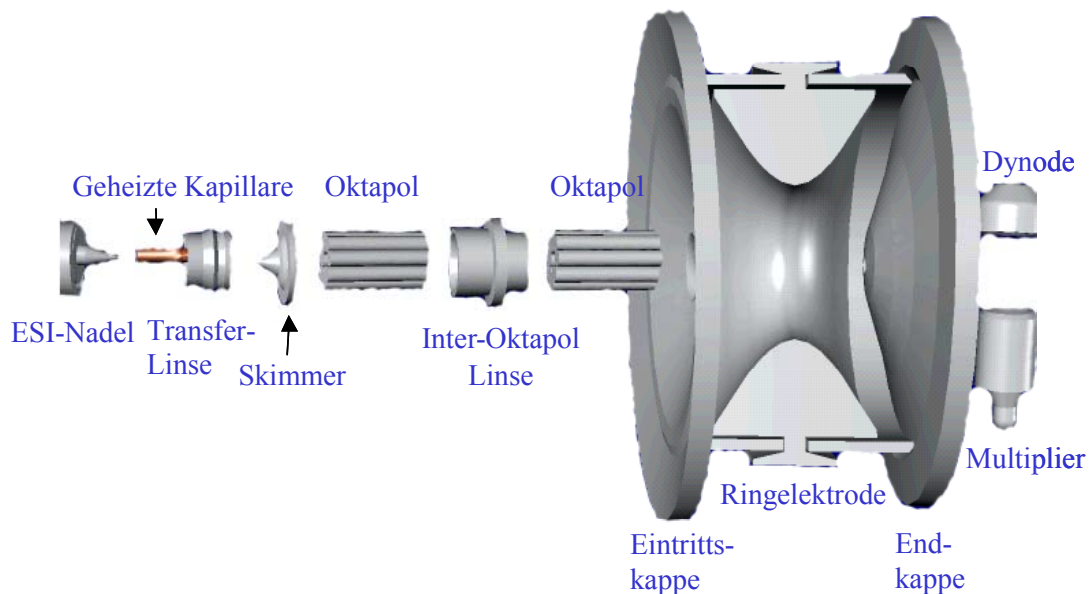


Abb. 7: Aufbau einer elektrischen Ionenfalle.

Durch die Möglichkeit der Isolierung von Ionen mit bestimmten m/z -Werten, nachfolgende resonante Anregung und Kollision mit Heliumatomen, kann eine gezielte Fragmentierung erreicht werden. Die Fragmente werden anschließend ejiziert und detektiert. Die zeitlich versetzte Auswahl und Fragmentierung wird als *Tandem-in-Time-MS* bezeichnet. Prinzipiell ist dieser Zyklus mehrfach möglich (MS^n), allerdings tritt ab einem bestimmten m/z -Verhältnis in vielen Fällen eine Hemmung des Fragmentierungsprozesses auf, weil die entstandenen Fragmente relativ stabil sind. Das Ausmaß der Fragmentierung ist abhängig von der angelegten Spannung und der Anzahl der zur Kollision verfügbaren Gasatome, d.h. dem Druck in der Ionenfalle.

Hybridsysteme stellen eine Kopplung von mehreren Massenanalysatoren dar. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten **Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Q-TOF-MS)** ist ein Quadrupol mit einem TOF-Analysator kombiniert (Abb. 8).

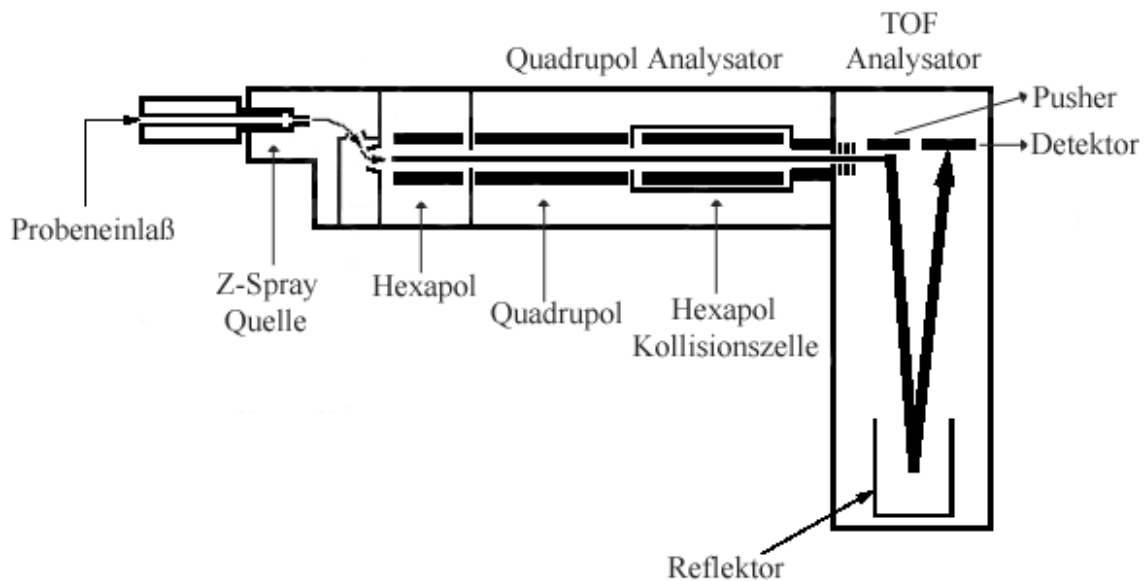


Abb. 8: Schematischer Aufbau des Q-TOF 2™ der Firma Micromass (Manchester, UK) (modifiziert nach Micromass 2000)

Der Quadrupol kann in zwei verschiedenen Modi betrieben werden. Durch Anlegung von Gleichspannung lässt er den gesamten Ionenstrom passieren (wide bandpass mode). Dieser erreicht das im rechten Winkel (orthogonal) angeordnete Flugrohr. Im zweiten Modus werden Gleich- und Wechselspannungen angelegt und dadurch nur Ionen bestimmter m/z -Werte durchgelassen (narrow bandpass mode). Der Gasdruck (Argon) im mittleren Hexapol (Kollisionszelle) wird erhöht, so dass die im Quadrupol selektierten Ionen nach Beschleunigung durch Anlegen von Spannung und Kollision mit den Gasatomen fragmentieren (*Tandem-in-Space-MS*).

In beiden Modi liefert der TOF-Analysator letztendlich das Massenspektrum. Geräte dieser Konfiguration erlauben eine spezifische Strukturaufklärung, welche die einzelnen Massenanalytoren nicht ermöglichen und besitzen eine hohe Massengenauigkeit im jeweiligen Kalibrierungsbereich. Die obere Grenze des Massenbereichs wird vom Hersteller mit 20 000 angegeben.

2.4.2.5 Kopplungsmethoden (LC/MS, CE/MS)

Bei der Kopplung der Flüssigchromatographie (LC) mit der Massenspektrometrie (MS) bestand zuerst die Schwierigkeit, die Analyten aus der Flüssigkeit in die Gasphase und vom Atmosphärendruck in das Hochvakuum des Massenspektrometers zu überführen. Die Einführung der Elektrospray-Ionisation und die Miniaturisierung von Chromatographiesäulen war ausschlaggebend für die Entwicklung der **LC/MS-Kopplung**. Der optimale Einsatz der Spraytechnik erfordert eine konstant niedrige Flussrate und wird idealerweise mit der HPLC im mikro- oder nano-Maßstab kombiniert. Über die LC/MS ist eine direkte Korrelation der Retentionszeit des Analyten und des entsprechenden m/z -Wertes über den Total-Ionenstrom (*total ion current*, TIC) möglich. Zusätzliche Strukturinformationen können durch LC/Tandem-MS erhalten werden. Dadurch kann eine Stoffidentifizierung in vielen Fällen auch ohne den Vergleich mit geeigneten Standardsubstanzen erfolgen (Willoghby et al. 1998). Zum Erreichen der vollen Effizienz der LC/MS-Kopplung ist eine optimale Gerätekonfiguration notwendig, die die Pumpe, das Injektionssystem und den Detektor einschließt.

Eine Möglichkeit, eine Identifizierung oder Charakterisierung der mit CE getrennten Komponenten zu erzielen, bietet die direkte Kopplung von Kapillarelektrophorese (hohe Trennleistung) und Massenspektrometrie (genaue Massenbestimmung), v.a. dann wenn keine geeigneten Standardsubstanzen zur Verfügung stehen und die Analyten kein charakteristisches UV-Absorptionsspektrum zeigen, wie es bei Kohlenhydraten oft der Fall ist. Das zurzeit am häufigsten verwendete **CE/MS-Kopplungsprinzip** stellt das 1988 von Smith und Mitarbeitern vorgestellte „*coaxial sheath flow interface*“ dar (Smith et al. 1988). Hierbei wird die CE-Kapillare direkt in den Probeneinlaß des ESI-Massenspektrometers eingeführt (Abb. 9). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Kopplung einer CE der Firma Agilent mit einem ESI-Iontrap MS (LCQ) der Firma ThermoFinnigan ist die Steuerung der Geräte im gekoppelten Zustand (noch) nicht über eine gemeinsame Software möglich. Während der Messung müssen daher Steuerungsbefehle, wie Start, Stop, Aufnahme usw., an beiden Geräten über die jeweilige Software manuell eingegeben werden.

Die sehr geringen Flussraten der CE machen eine Zuspeisung eines zusätzlichen Flüssigkeitsstroms, dem sogenannten „*sheath flow*“, von ca. 2-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ notwendig. Dieser liefert die Gegenionen für die CE-Trennung, hilft den elektrischen Kontakt herzustellen und

unterstützt das Verdampfen des Lösungsmittels und somit die Ionenemission durch den im *sheath liquid* enthaltenen organischen Lösungsmittelanteil.

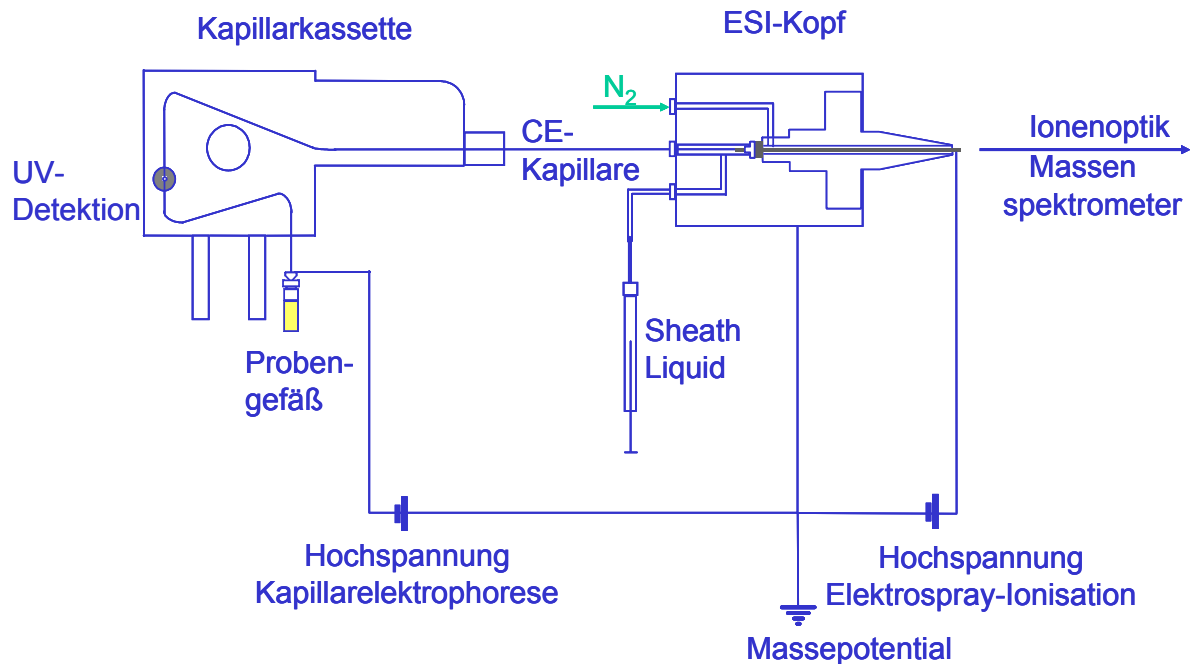


Abb. 9: Schematischer Aufbau einer online CE/ESI-MS-Kopplung

Aus der Verdünnung durch das *sheath liquid* resultiert nicht zwangsweise eine Abnahme der Empfindlichkeit, da das Lösungsmittel während des Sprayprozess vollständig verdampft (Raith 2003). Der CE-Puffer muß MS kompatibel sein, d.h. leicht flüchtig, z.B. Ammoniumacetat, Ammoniumformiat oder Citronensäure. In der CE üblicherweise verwendete Puffersysteme, wie Phosphat- und Boratpuffer, ergeben, neben ihrem negativen Einfluss auf den Elektrospray-Prozess durch die Behinderung der Bildung freier Analytionen, selbst starke Ionensignale, oftmals auch in Form von Ionenserien („*pattern*“), durch Cluster- oder Aggregatbildung.

Nachteilig sind die oft auftretenden Sprayinstabilitäten durch das Quellen der Kapillare (Aufweichen der Polyimidschicht), welche in direktem Kontakt mit dem *sheath liquid* steht, und die geringe Lebensdauer der Kieselglaskapillaren aufgrund des „*Elektrodrilling Effekts*“. Dieser Effekt beschreibt elektrochemische Prozesse an der Spitze der Kapillare, die durch Entwicklung von Gasblasen und damit verbundenem Verlust des Spannungsabfalls entlang der Kapillare zu hohen lokalen Feldstärken und letztendlich zum Bruch der CE-Kapillare

innerhalb der Stahlkapillare (ESI-Nadel) führen (Siethoff et al. 1998). Durch Auskleidung der Stahlkapillare mit einer Polypropylenschicht (Moseley et al. 1991) oder Austausch der Stahlkapillare gegen eine Aluminium-beschichtete fused-silica Kapillare (Siethoff et al. 1998) kann der „*Elektrodrilling Effekt*“ für eine gewisse Zeitspanne verhindert und die Lebensdauer der CE-Kapillare verlängert werden.

Migrationzeitschwankungen zwischen einzelnen CE-Läufen sind häufig durch Temperaturschwankungen verursacht, da auf der Kapillarstrecke von der CE bis zum MS meist keine Temperierung erfolgt.

Durch Modifikationen der CE/MS-Kopplung, wie das „*liquid-junction interface*“, bei dem die CE-Kapillare unterbrochen ist und die Potentialübertragung durch ein Pufferreservoir erfolgt (Lee et al. 1988) und das „*sheathless interface*“, welches über eine mit Gold überzogene Kapillarspitze verfügt (Olivares et al. 1987), können diese Probleme zum Teil vermieden werden, jedoch bestehen Schwierigkeiten in der Handhabung.

Eine Übersicht hierzu wird in mehreren Übersichtsartikeln gegeben (Cai und Henion 1995, Banks 1997, von Brocke et al. 2001).

Für die Charakterisierung von Glykopeptiden wurde kürzlich die Kopplung der CE mit dem ESI-QTOF-Massenspektrometer der Firma Micromass, ohne zusätzliche Flüssigkeitszufuhr, über ein selbstgebautes „*sheathless*“ CE/ESI-MS Interface, beschrieben (Zamfir et al. 2000, Zamfir und Peter-Katalinic 2001).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung von Hyaluronsäurefragmentmischungen

3.1.1 Bestimmung der Molekülmassenverteilung (Anlage 6.1: Kühn et al. 2003)

Biopolymere lassen sich mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie sehr gut identifizieren (Bahr et al. 1994, Harvey 1999), sofern sie folgende Grundvoraussetzungen erfüllen:

1. Die Polymere sollten nicht zu unpolar sein, aber auch nicht zu polar. Polyelektrolyte wie HA und v.a. Heparin sind schwer oder gar nicht ionisierbar. Aufgrund des extrem polaren Charakters der sulfatierten GAGs (Heparin) gehen sie starke (nichtkovalente) Bindungen mit polaren Gruppen der Matrix ein. Eine hohe Laserenergie ist daher für die Ionisation notwendig, welche eventuell zu einer exzessiven Fragmentierung bereits in der Ionisierungsquelle des MS führt. Die Analyse von Heparin-Oligosacchariden durch vorheriges Mischen mit basischen Peptiden oder Proteinen unter Ausbildung nichtkovalenter Komplexe und Detektion dieser Komplexe mit MALDI-TOF-MS wurde beschrieben (Juhász und Biemann 1995, Rhomberg und Biemann 1997).

2. Als obere Grenze für die Polydispersität (PD) werden im Allgemeinen Werte von 1,2 bis 1,3 angegeben (Montaudo et al. 2002), um noch aussagekräftige Spektren zu erhalten. Polymere mit höheren PD-Werten liefern Massenspektren, die Verteilungen zeigen, bei denen die Signalintensitäten zu kleineren m/z -Verhältnissen hin stetig ansteigen. Der Grund dafür liegt in der Unterdrückung der Signalintensitäten im höheren Massenbereich in Gegenwart von Ionen mit deutlich kleineren m/z -Werten. Für eine quantitative Auswertung der Massenspektren muss die Anzahl an Ionen, die vom Detektor registriert werden, die Anzahl an Kettenlängen in der Probe widerspiegeln. Voraussetzung hierfür ist eine von der Molekülgröße unabhängige Ionisation der Moleküle im Gemisch und ein auch mit steigender Molekülmasse konstanter "Response" des Detektors. Die zurzeit verwendeten Vielkanalplatten- (multi- oder microchannel plate, MCP) Detektoren können diese Voraussetzung nicht erfüllen und zeigen für unfraktionierte Proben Massendiskriminierungseffekte im höheren m/z -Bereich. Die MCPs stellen aufgrund ihrer schnellen Reaktion verbunden mit einer gleichzeitigen Verstärkung hoch-sensitive Detektoren

dar. Gerade deshalb sind sie aber sehr anfällig gegenüber Sättigungseffekten hervorgerufen durch niedermolekulare Komponenten in der Probe. Eine vorherige Fraktionierung von polydispersen Proben per GPC kann hierbei zu einer Verbesserung der Spektren führen (Montaudo und Montaudo 2002).

Auch im Fall der HAF handelt es sich um höherdisperse Systeme, bei denen neben Molekülen mittlerer Kettenlänge auch ein hoher Anteil Oligosaccharide anzutreffen ist. Die Verteilung wird durch Faktoren, wie die Art und die Menge des eingesetzten Enzyms (s. 3.1.4), die Abbauphase, die Temperatur und den pH-Wert des Puffers bestimmt.

Yeung und Marecak konnten durch ihre GPC/MALDI-TOF-MS Untersuchungen an durch Abbau von HA mit testikulärer Hyaluronidase gewonnenen Produkten zeigen, dass die so erhaltenen mittleren Molekülmassen deutlich von den mit externer Kalibrierung unter Verwendung von Pullulan- und Dextranstandards gefundenen abwichen (Yeung und Marecak 1999). Die Untersuchung von durch enzymatischen Abbau von Knorpel gewonnenen Endprodukte (Oligosaccharide) mit MALDI-TOF-MS im positiv- und negativ-Ionen-Modus wurde von Schiller und Mitarbeitern beschrieben (Schiller et al. 1999).

Unfraktionierte Proben können mittels MALDI-TOF-MS durch Ausblendung des niedrigen m/z -Bereichs analysiert werden. Hierbei erfolgt das Anlegen der Detektorspannung zeitlich verzögert, so dass Ionen mit m/z -Verhältnissen unterhalb des Ausblendungsbereichs zwar detektiert werden, jedoch mit einer aufgrund des Verstärkungsverlusts um den Faktor 100 bis 1000 erniedrigten Empfindlichkeit („low mass gate“). Die Detektion der Ionen mit hohem m/z -Verhältnis wird dadurch verbessert, und die so erhaltenen Spektren liefern Informationen über die Breite der Molekülmassenverteilung (MMB). Eine andere Möglichkeit stellt die Ablenkung von Ionen im unteren m/z -Bereich von ihrer Flugbahn mittels einer gepulsten Ablenkplatte dar, welche sich in der Nähe des Eingangs zum Flugrohr befindet (Montaudo et al. 2002).

In den Abbildungen 10-14 sind MALDI-TOF Massenspektren unfraktionierter HAF, die durch Abbau von HA mit Hyaluronat Lyase (*Streptococcus agalactiae*) gewonnen wurden, dargestellt.

Die Präparationen wurden im Linear- und Reflektormodus vermessen. Registriert wurden jeweils nur die Anionen, die sich aus dem Verlust eines Protons aus dem Molekülion ergeben ($[M-H]^-$, $[M-H_{x+1}+Na_x]^-$; negativ-Ionen-Modus). Der Linearmodus liefert Informationen zur Molekülmassenverteilung, besonders im Falle von großen Molekülen, während der

Reflektormodus durch sein hohes Auflösungsvermögen zur Bestimmung der exakten Molekülmasse der individuellen Moleküle eingesetzt wird.

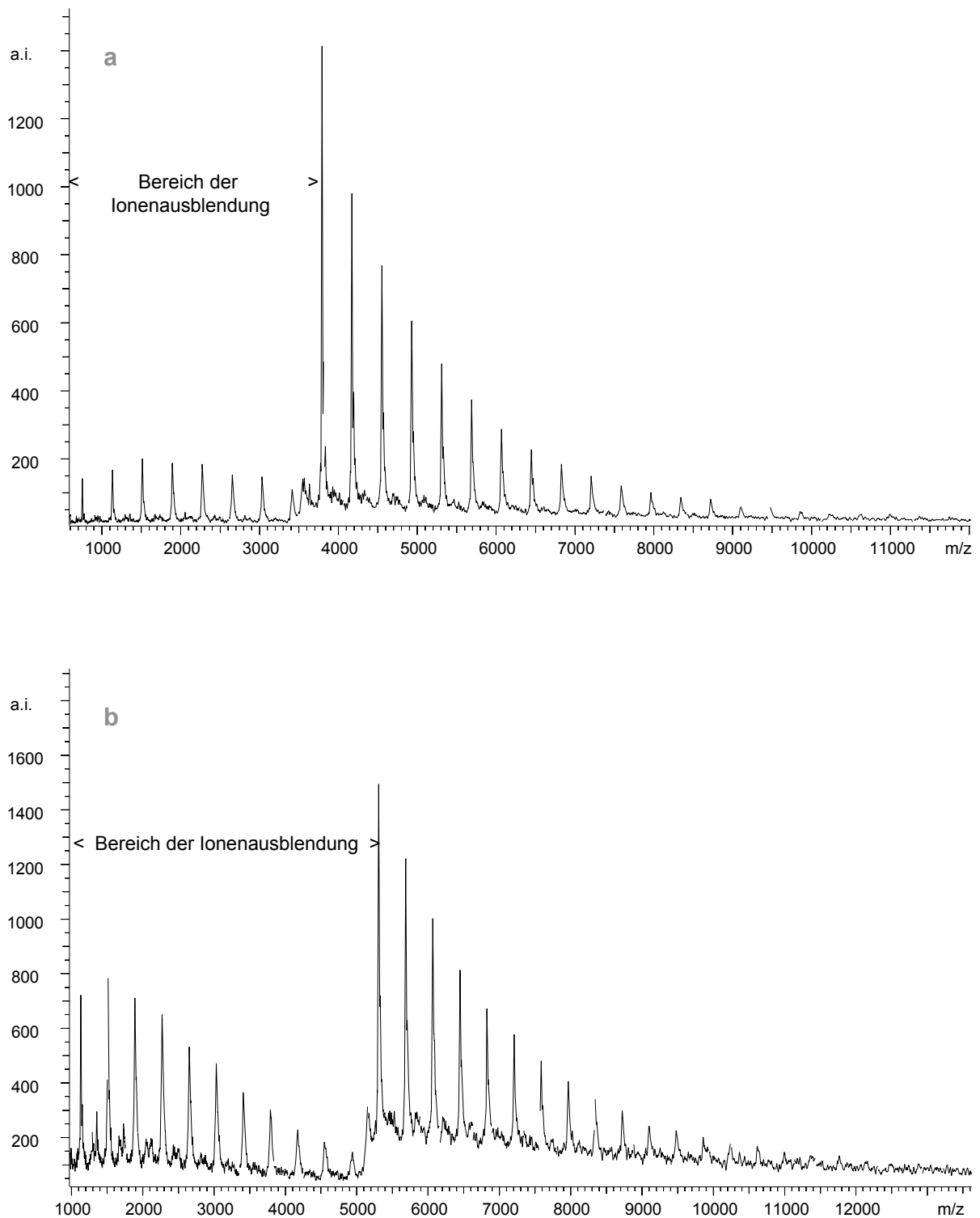


Abb. 10: MALDI-TOF Massenspektrum von HAF 22, Linearmodus. a) Ionenausblendung bis m/z 3500; b) Ionenausblendung bis m/z 5000.

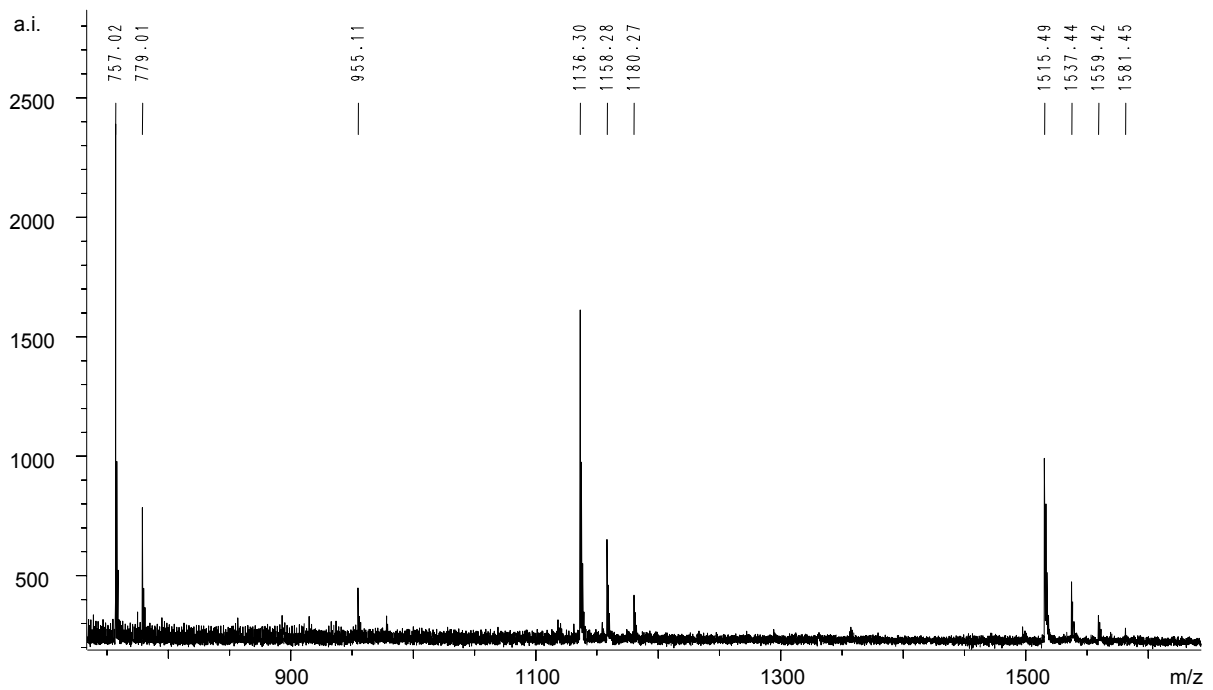


Abb. 11: MALDI-TOF Massenspektrum von HAF 22, Reflektormodus, $\Delta m/z$ 22: Na-Salze.

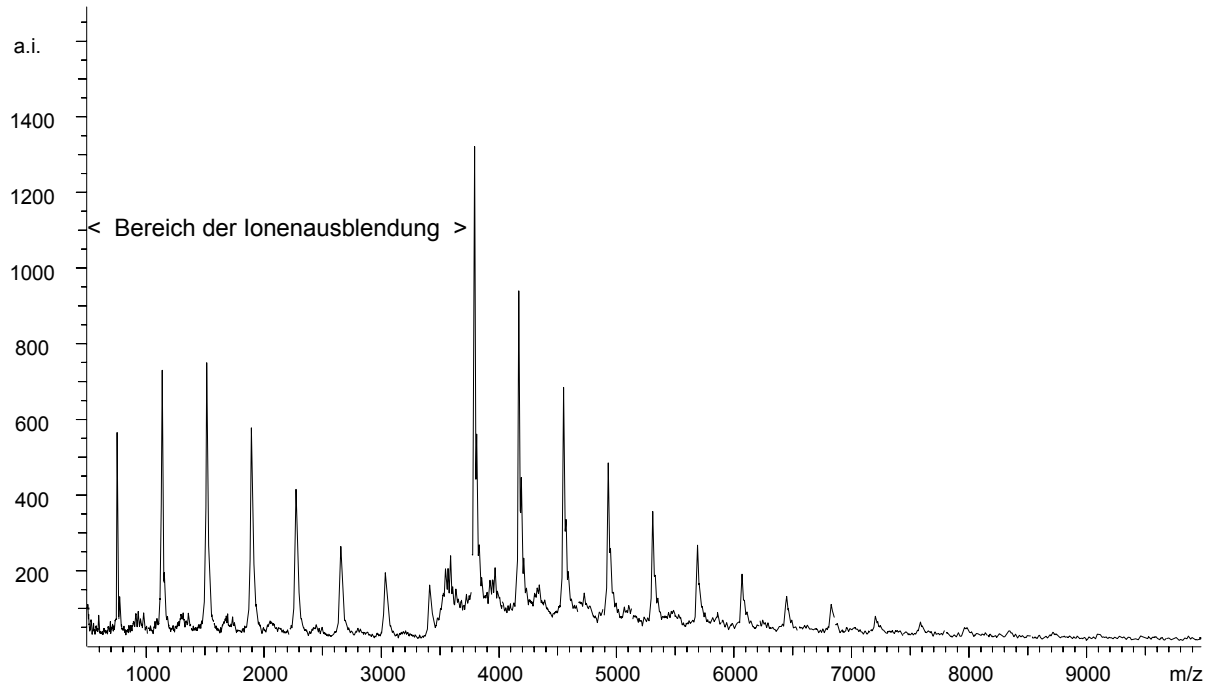


Abb. 12: MALDI-TOF Massenspektrum von HAF 31, Linearmodus, Ionenausblendung bis m/z 3500.

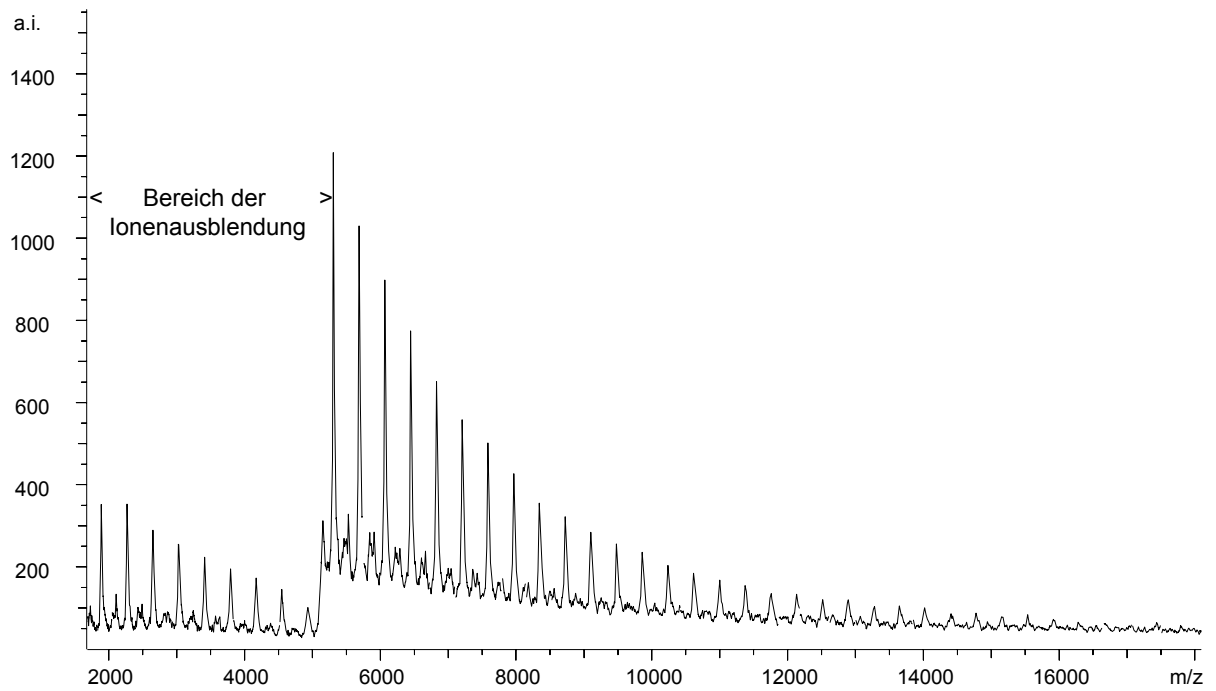


Abb. 13: MALDI-TOF Massenspektrum von HAF 2, Linearmodus, Ionenausblendung bis m/z 5000.

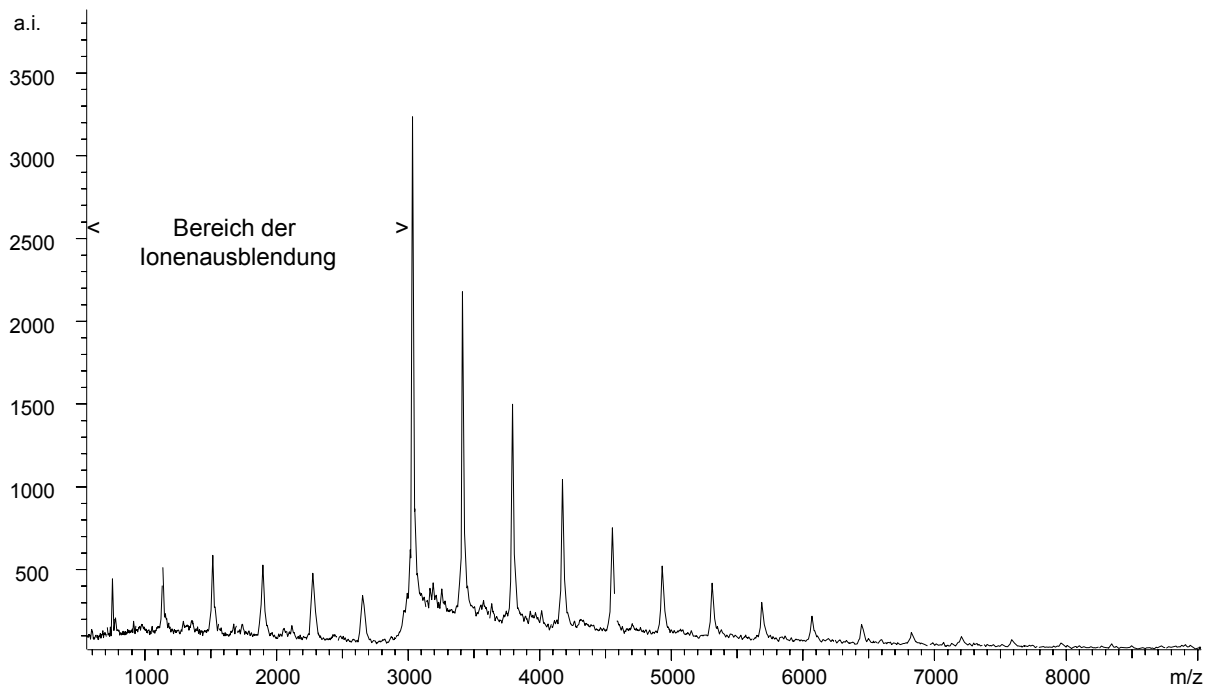


Abb. 14: MALDI-TOF Massenspektrum von HAF 6, Linearmodus, Ionenausblendung bis m/z 3000.

Die Spektren zeigen Serien von Signalen im Abstand von m/z 379 (Disaccharideinheit), gefolgt von Signalen im Abstand von m/z 176 (GlcA). Im Reflektormodus sind außerdem Natrium-Serien erkennbar ($\Delta m/z$ 22). Fragmentierungen der HA-Moleküle unter Bildung von Fragmenten mit einer ungeraden Anzahl an Monomeren ($\Delta m/z$ 176), die beim ESI-Verfahren unter bestimmten Bedingungen auftreten, sind beim MALDI-Prozess unwahrscheinlich (Prebyl et al. 2003). Daraus folgt, dass ungeradzahlige Oligomere (L-4dthrHex4enA-(1 → 3)-[D-GlcNAc-(1 → 4)-D-GlcA]_n), in sehr geringen Mengen, durch den Verdau von HA mit der eingesetzten HA Lyase entstehen und als solche in den Produkten vorliegen. Dies wurde auch für HA Lyase aus *Streptomyces hyalurolyticus* beschrieben (Price et al. 1997).

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS und GPC-MALLS Untersuchungen zusammengefasst.

Tab. 4: Ergebnisse der GPC-MALLS und MALDI-TOF Untersuchungen an HAF

HAF	Herstellungsparameter ^a	GPC-MALLS (\bar{M}_w) ^b	MALDI-TOF-MS (MMB) ^c
31	C _{HA} : 10g/L, pH 7,0 20 U/mL, 1h, 30°C	31 kDa	758 Da-7961 Da
22	C _{HA} : 5g/L, pH 6,0 4 U/mL, 2h, 30°C	22 kDa	758 Da-11753 Da
1	C _{HA} : 5g/L, pH 7,0 4 U/mL, ¼h, 30°C	45 kDa	nicht bestimmbar
2	C _{HA} : 5g/L, pH 7,0 4 U/mL, ½h, 30°C	30 kDa	758 Da-15923 Da
3	C _{HA} : 5g/L, pH 7,0 4 U/mL, ¾h, 30°C	30 kDa	758 Da-15165 Da
4	C _{HA} : 5g/L, pH 7,0 4 U/mL, 1h, 30°C	27 kDa	758 Da-14406 Da
5	C _{HA} : 5g/L, pH 7,0 4 U/mL, 1,5h, 30°C	40 kDa	758 Da-8341 Da
6	C _{HA} : 5g/L, pH 7,0 4 U/mL, 2h, 30°C	20 kDa	758 Da-7582 Da

^a Angaben: HA-Konzentration (C_{HA}), pH-Wert des Puffers, Hyaluronatlyaseeinheiten (U/mL), Abbaupzeit und Temperatur während des Abbaus.

^b Zur Ermittlung von \bar{M}_w wurde der Oligosaccharidpeak nicht berücksichtigt, da in diesem Bereich keine Proportionalität zwischen Molekülgröße und Intensität des an den Molekülen gestreuten Lichtes mehr gegeben ist (s. 3.1.4, Abb. 21). Die Werte stellen Mittelwerte aus drei Bestimmungen dar.

^c Das Dimer (m/z 378) konnte aufgrund störender Matrixsignale in diesem Bereich nicht detektiert werden

Die Ergebnisse lassen starke Unterschiede im Hinblick auf die verwendete Methode erkennen. Beide Verfahren weisen Einschränkungen für eine umfassende Analyse polydisperser HAF auf. Mit Hilfe der GPC-MALLS wird die gewichtsmittlere Molekülmasse \bar{M}_w bestimmt, größere (also auch schwerere) Moleküle werden dabei stärker gewichtet als kleinere. Die MALDI-TOF-MS liefert bei Produkten mit schmalen Molekülmassenverteilungen die zahlenmittlere Molekülmasse \bar{M}_n . Im Falle von polydispersen Proben sind die Molekülmassenverteilungen aufgrund der geschilderten Detektorprobleme zu den kleineren Molekülmassen verschoben. In Übereinstimmung mit den GPC-Ergebnissen zeigten CE/UV und CE/MS Untersuchungen der HAF 1-6 (s. 3.1.3, Abb. 18) ein weniger fortgeschrittenes Abbaustadium der Proben HAF 5 und HAF 3 im jeweiligen Vergleich zu HAF 4 und HAF 2, obwohl die Abbauzeiten der ersteren länger waren. Der Unterschied zu den Proben in Anlage 6.4 bei denen durch CE-Messungen ein linearer Anstieg an Oligosacchariden und somit ein kontinuierliches Fortschreiten des Abbauprozesses feststellbar war, liegt daran, dass dort einem Ansatz kontinuierlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen wurden, während hier Proben aus mehreren Ansätzen, die unterschiedlich lange inkubiert wurden, vorlagen. Hieran wird auch deutlich, mit welchen Schwierigkeiten eine Methodvalidierung dieses enzymatischen Abbaus verbunden ist, die die Herstellung von Produkten mit gleichen Kettenlängenverteilungen für den Einsatz in pharmazeutischen Formulierungen gewährleisten kann.

3.1.2 Quantitative Bestimmung mittels LC/ESI-MS (Anlage 6.1: Kühn et al. 2003)

Die alleinige Anwendung der ESI-MS zur Untersuchung der mit Hilfe bakterieller Lyasen produzierten Mischungen an ungesättigten HA Oligosacchariden ist wenig spezifisch. Aufgrund der Eigenschaft, dass Hyaluronsäuremoleküle unter diesen Bedingungen mehrfach negativ geladen sind und dadurch unterschiedliche Kettenlängen gleiche Masse/Ladungs-Quotienten aufweisen können, ist eine eindeutige Zuordnung von Kettenlängen zu m/z -Werten schwierig (Tabelle 5). Abbildung 15 zeigt ein ESI-Massenspektrum eines HAF-Produkts.

Dabei ist auch eine bei dieser Methode mögliche Bildung von Dimer-Addukten zu beachten, bei der z.B. das Disaccharid mit dem m/z -Wert des Tetrasaccharids im Massenspektrum erscheinen würde (Anlage 6.3).

Tab. 5: Theoretisch mögliche monoisotopische Massen der Hyaluronsäureoligosaccharide im Negativmodus (ESI-MS) ohne Berücksichtigung der Na-Salze.

Oligomer	M_r	$[M-H]^-$	$[M-2H]^{2-}$	$[M-3H]^{3-}$	$[M-4H]^{4-}$	$[M-5H]^{5-}$	$[M-6H]^{6-}$	$[M-7H]^{7-}$	$[M-8H]^{8-}$
2-mer	379.1	378.1							
3-mer	555.1	554.1	276.6						
4-mer	758.2	757.2	378.1						
5-mer	934.3	933.2	466.1	310.4					
6-mer	1137.3	1136.3	567.7	378.1					
7-mer	1313.4	1312.4	655.7	436.8	327.3				
8-mer	1516.4	1515.4	757.2	504.5	378.1				
9-mer	1692.5	1691.5	845.2	563.2	422.1	337.5			
10-mer	1895.6	1894.5	946.8	630.8	472.8	378.1			
11-mer	2071.6	2070.6	1034.8	689.5	516.9	413.3	344.3		
12-mer	2274.7	2273.7	1136.3	757.2	567.7	453.9	378.1		
13-mer	2450.7	2449.7	1224.3	815.9	611.7	489.1	407.4	349.1	
14-mer	2653.7	2652.8	1325.9	883.6	662.4	529.7	441.3	378.1	
15-mer	2829.8	2828.8	1413.9	942.3	706.4	565.0	470.6	403.3	352.7
16-mer	3032.9	3031.9	1515.4	1010.0	757.2	605.6	504.5	432.3	378.1

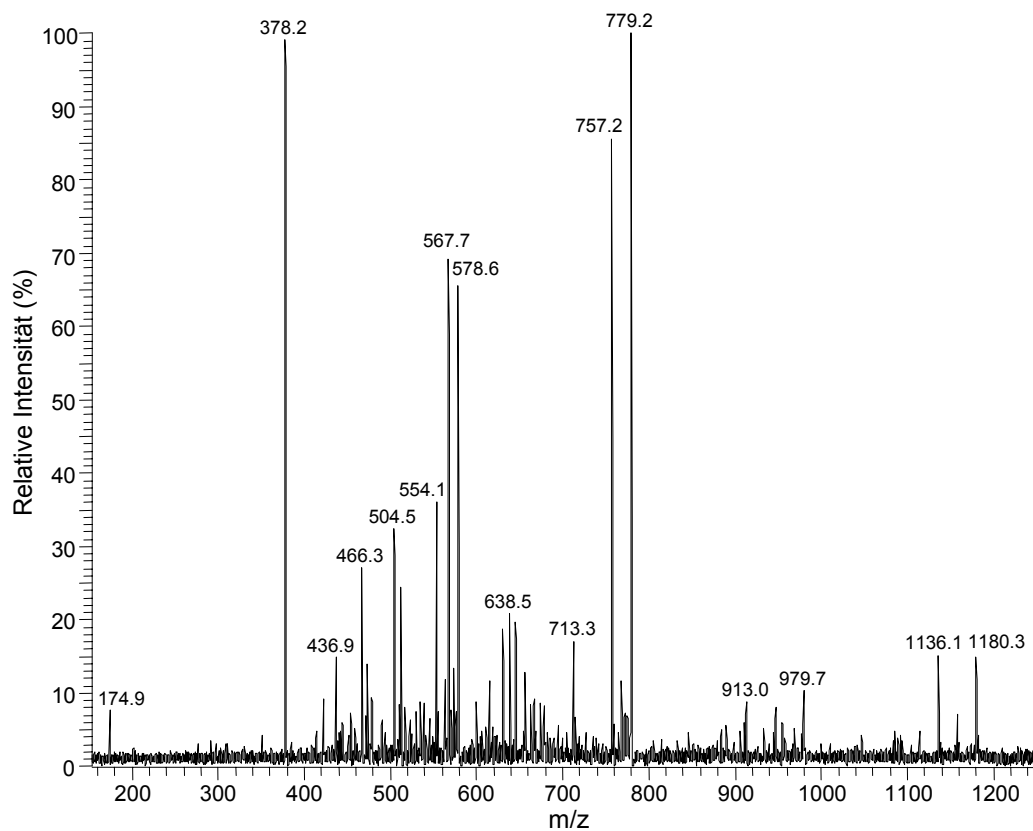


Abb. 15: ESI-MS von HAF 31, 50 $\mu\text{g/mL}$ in Methanol/Wasser (80/20, V/V), negativ-Ionen-Modus.

Deshalb ist eine vorherige Trennung der HAF notwendig (CE/MS-Kopplung s. 3.1.3). Wie bereits unter 2.4.1 dargestellt erfolgt die Trennung von Kohlenhydraten meist durch Anionenaustausch-Chromatographie, wobei die Kopplung mit der MS mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist. Monosaccharide (GlcA und GlcN) konnten nach saurer Hydrolyse von HA mittels HPAEC-PAD (Whitfield et al. 1991), HA-Disaccharide mittels HPAEC-UV identifiziert werden (Volpi 2000).

Der Einsatz der Dünnschichtchromatographie (TLC, *Thin Layer Chromatography*) zur Auftrennung von HA Oligosacchariden an Kieselgelplatten wurde beschrieben (Shimada und Matsumara 1984, Shimada und Matsumara 1985).

Die Untersuchung von geradzahligen und ungeradzahligen Hyaluronsäureoligomeren mit 1-8 Monomereinheiten mittels HPLC gelang durch Verwendung einer mit amino-modifiziertem Kieselgel gepackten Säule und 0,1 M KH_2PO_4 (pH 4,75) als mobiler Phase (Nebinger et al. 1983). Mit steigender Kettenlänge der durch Verdau von HA mit testikulärer (Hyaluronat 4-Glykanohydrolase) und Blutegel-Hyaluronidase (Hyaluronat 3-Glykanohydrolase) erhaltenen Oligosaccharide verlängerte sich die Retentionszeit. Geradzahlige Oligosaccharide gleicher Monomerenanzahl, die sich entsprechend dem jeweils verwendeten Enzym nur in der Sequenz unterschieden, konnten unter diesen Bedingungen aufgrund der identischen Ladung und Molekülgröße nicht voneinander getrennt werden. Durch Abbau von HA mit Hyaluronat Lyase aus *Streptomyces hyalurolyticus* gewonnene ungesättigte Tetra- und Hexasaccharide konnten mittels Ionenpaar-RP-HPLC (Ionenpaarreagenz: Tetrabutylammoniumphosphat) getrennt und quantifiziert werden (Chun et al. 1988, Payan et al. 1991). Diese Analytik ermöglichte die Bestimmung von HA in Geweben und Synovialflüssigkeit.

Die aufgeführten Methoden setzen die Verfügbarkeit geeigneter Referenzsubstanzen voraus, welche, abgesehen von GlcA, GlcNAc und HA-Disacchariden, zurzeit im Handel nicht erhältlich sind. Daher bietet sich die Kopplung einer Trennungsmethode mit der Massenspektrometrie an, welche zusätzliche strukturelle Informationen liefert.

Die Analytik ungesättigter HAF (*Streptomyces hyalurolyticus*, Price et al. 1997) und gesättigter HAF (testikuläre Hyaluronidase, Takagaki et al. 1992) gelang mittels Gelpermeationschromatographie und anschließende Analyse der erhaltenen Fraktionen an einem ESI-Triple-Quad-Massenspektrometer. Neben Oligosacchariden, die eine gerade Anzahl an Monomeren aufweisen, wurden kleine Mengen an Oligosacchariden mit ungerader Monomeren-Anzahl gefunden (Price et al. 1997). Solche Befunde müssen allerdings durch zusätzliche Methoden, z.B. MALDI-MS, verifiziert werden, da Oligosaccharide mit

ungerader Anzahl an Monomeren auch während des ESI-Prozesses durch Fragmentierung aus den geradzahligen entstehen können (Prebyl et al. 2003).

Für die Quantifizierung der HAF in pharmazeutischen Formulierungen wird eine hochselektive Analytik benötigt, die die Erfassung der komplexen HAF-Mischungen neben Matrixbestandteilen der halbfesten Zubereitungen erlaubt. Daher war es das Ziel, eine LC/MS-Methode zu entwickeln, die diese Anforderungen erfüllen kann. Mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung von C8- und C18-Säulen und MeOH/Wasser-Mischungen als Eluent konnte keine ausreichende Retention der Fragmente erzielt werden. Der Einsatz einer C2-Säule und THF als Zusatz im Eluent führte zu einer Retentionserhöhung. Dieser Effekt kann durch die im Säulenmaterial vorhandenen freien Silanolgruppen erklärt werden, die durch die kürzeren Alkylketten besser zugänglich sind und somit hydrophile Wechselwirkungen zulassen. Mit der in dieser Arbeit entwickelten LC/ESI-Iontrap-MS-Methode konnten die HAF nur angetrennt werden (Anlage 6.1). Da sich hinter einem bestimmten m/z-Wert mehrere Kettenlängen verbergen, wurde im MS/MS- und SIM-Modus detektiert, um die Selektivität der Methode zu erhöhen.

Unter der Annahme, dass die Kettenlängenverteilung in der Formulierung der im Ausgangsprodukt entspricht und durch die Grundlage nicht verändert wird, erfolgte die Quantifizierung nach Kalibrierung mit der jeweiligen HAF-Mischung anhand einzelner Kettenlängen (vgl. hierzu Kromidas 1999). Die Ergebnisse der Quantifizierung in Carboxymethylcellulose-Gel (CMC-Gel) und Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe sind in Anlage 6.1 zusammengestellt und diskutiert.

3.1.3 Identifizierung von Hyaluronsäureoligosacchariden mittels CE/ESI-MS Kopplung (Anlagen 6.2 und 6.3: Kühn et al. 2003, Kühn et al. 2004)

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese (CE) gelingt es, insbesondere kleinere HA-Oligosaccharide, HA-Disaccharide und deren Monomere zu trennen (Al-Hakim und Linhardt 1991, Grimshaw et al. 1994, Toida und Linhardt 1996, Grimshaw 1997, Zemmann et al. 1997, Payan et al. 1998, Suzuki und Honda 1998, Baker und Pritchard 2000), während intakte HA als ein einzelner breiter Peak im Elektropherogramm erscheint (Hayase et al. 1997, Karamanos und Hjerpe 1998, Plätzer et al. 1999). Durch den EOF werden die negativ geladenen Moleküle, in der Reihenfolge von kleinen zu großen Oligomeren, zur Kathode

transportiert. Wie für Heparin-Oligosaccharide beschrieben (Desai et al. 1993) sollte die Mobilität bei gleichem Ladungs/Masse-Verhältnis bei den kleinen Molekülen größer sein als bei den größeren und die Elution damit genau umgekehrt als beobachtet sein. Der Grund für diese unerwartete Elutionsreihenfolge könnte in der ungewöhnlichen Gestalt (s. 2.4.2.2) der Hyaluronsäuremoleküle im Puffermedium liegen, welche zu einem höheren Reibungswiderstand führt (Anlage 6.3).

Eine bessere Auflösung der Analytmoleküle kann durch die vorherige Umsetzung der Substanzen mit bestimmten „end-label“-Reagenzien erreicht werden, die entweder eine konstante Ladung (Park et al. 1997) oder einen erhöhten (konstanten) Reibungswiderstand (Sudor und Novotny 1997; für Heparindisaccharide) der Moleküle bewirken. Durch Konjugation der Moleküle mit dem Fluoreszenzmarker 7-Aminonaphtalin-1,3-disulfonsäure konnten Park und Mitarbeiter auch größere HAF (gewonnen mit HA Lyase aus *Streptomyces hyalurolyticus*) trennen. Die Einführung dieser Gruppe am reduzierenden Ende der HAF verbesserte einerseits die Empfindlichkeit (fluorimetrische Detektion) andererseits die Auflösung. Aufgrund der stärkeren Acidität der Sulfonsäuregruppen gegenüber den Carboxylatgruppen ist jedes Oligosaccharid beim verwendeten Elektrolytpuffer (pH 2,5) zweifach negativ geladen. Da die Nettoladung für jedes Molekül somit gleich ist, wird allein die Molekülgröße entscheidend für das Migrationsverhalten und die Trennung somit verbessert (umgekehrter CE-Mode). Tetra- und Hexasaccharide konnten als Hauptendprodukte identifiziert werden.

Die Zuordnung der erhaltenen Peaks zu den jeweiligen Kettenlängen gestaltet sich aber aufgrund bis heute fehlender Standardsubstanzen und der unspezifischen UV- (bzw. Fluoreszenz-) Detektion als schwierig.

Das Ziel war daher die CE (hohe Trennleistung) mit der MS (genaue Massenbestimmung) zu koppeln und damit eine Identifizierung der Moleküle zu ermöglichen, wie sie für Heparin-Oligosaccharide (Duteil et al. 1999) und neutrale Oligosaccharide (Gennaro et al. 2002) beschrieben wurde.

Die Kopplung von CE und ESI-Iontrap-MS erfolgte über das „coaxial sheath flow interface“ (Anlage 6.2). Der hier verwendete Massenanalysator (Ionenfalle) bietet die Möglichkeit durch gezielte Fragmentierungen einzelner Ionen mit definiertem m/z -Verhältnis (*Tandem-in-Time*-MS) weitere Strukturaussagen zu erhalten. So spalten Oligosaccharide mit gerader Anzahl an Monomeren eine N-Acetylglucosamineinheit ab und es resultieren ungeradzahlige Fragmente (Anlage 6.2).

Mit unbeschichteten Kieselglaskapillaren konnten keine Probenmoleküle detektiert werden. Obwohl die Kapillarwand aufgrund der Dissoziation der Silanolgruppen beim pH-Wert des verwendeten Puffers negative Ladungen aufweist, muss von einer Adsorption der unter diesen Bedingungen ebenfalls negativ geladenen HA-Moleküle an der Kapillarwand ausgegangen werden. Darauf deutet auch eine während der CE/UV-Messungen auftretende kontinuierliche Migrationszeitverlängerung hin. Eine Verminderung der Adsorption von HAF an der Kapillarwand und damit Erhöhung der Empfindlichkeit ermöglichte der Einsatz von nach der Methode von Chiari und Mitarbeitern polyacrylamidbeschichteten Kieselglaskapillaren (Chiari et al. 1993). Trotz der Beschichtung war ein konstanter EOF feststellbar, welcher auf partielle Hydrolyse des Polyacrylamids zurückzuführen ist.

Um Schwierigkeiten aufgrund des Potentialabfalls im CE-MS-Interface zu umgehen, wurde der EOF mit einem CE Instrument mit elektrochemischer „end-column“ Detektion bestimmt. Der experimentelle Aufbau ist bei Rüttinger und Radschuweit beschrieben (Rüttinger und Radschuweit 2000). Um gelösten Sauerstoff zu entfernen, wurde in das Inlet-Puffer-Vial zuvor Argon eingeleitet. Die elektrochemische Detektionszelle enthielt eine Gold-Mikro-Elektrode, welche gegenüber einer Silber/Silberchlorid Bezugselektrode ein Potential von – 600 mV aufwies. Auf diese Weise erzeugt gelöster Sauerstoff ein starkes amperometrisches Signal. Im nachfolgenden Lauf ist die Kapillare mit sauerstofffreiem Puffer gefüllt und die Injektion eines Luft enthaltenden Puffers erzeugt einen scharfen Sauerstoff-Peak. Da Sauerstoff ungeladen vorliegt und somit als EOF-Marker dient, wurde die Migrationszeit dieses Peaks zur Berechnung der Mobilität des EOFs μ_{EOF} nach Gl. 8 verwendet (Tabelle 6).

Tab. 6: Ergebnisse der EOF-Bestimmungen mittels CE und elektrochemischer Detektion

Messung	Kieselglaskapillare (unbeschichtet) (μ_{EOF} in $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Polyacrylamidbeschichtete Kieselglaskapillare (μ_{EOF} in $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)
1	$4,316 \cdot 10^{-4}$	$5,107 \cdot 10^{-4}$
2	$4,579 \cdot 10^{-4}$	$5,087 \cdot 10^{-4}$
3	$4,921 \cdot 10^{-4}$	$5,083 \cdot 10^{-4}$

Die mit Polyacrylamid beschichtete Kieselglaskapillare wies einen konstanten EOF auf, während die unbeschichtete Kapillare eine Drift zu kürzeren Migrationszeiten und somit höheren EOF zeigte (Abb. 16), was mit einer langsamen Dissoziation der Silanolgruppen erklärt werden kann.

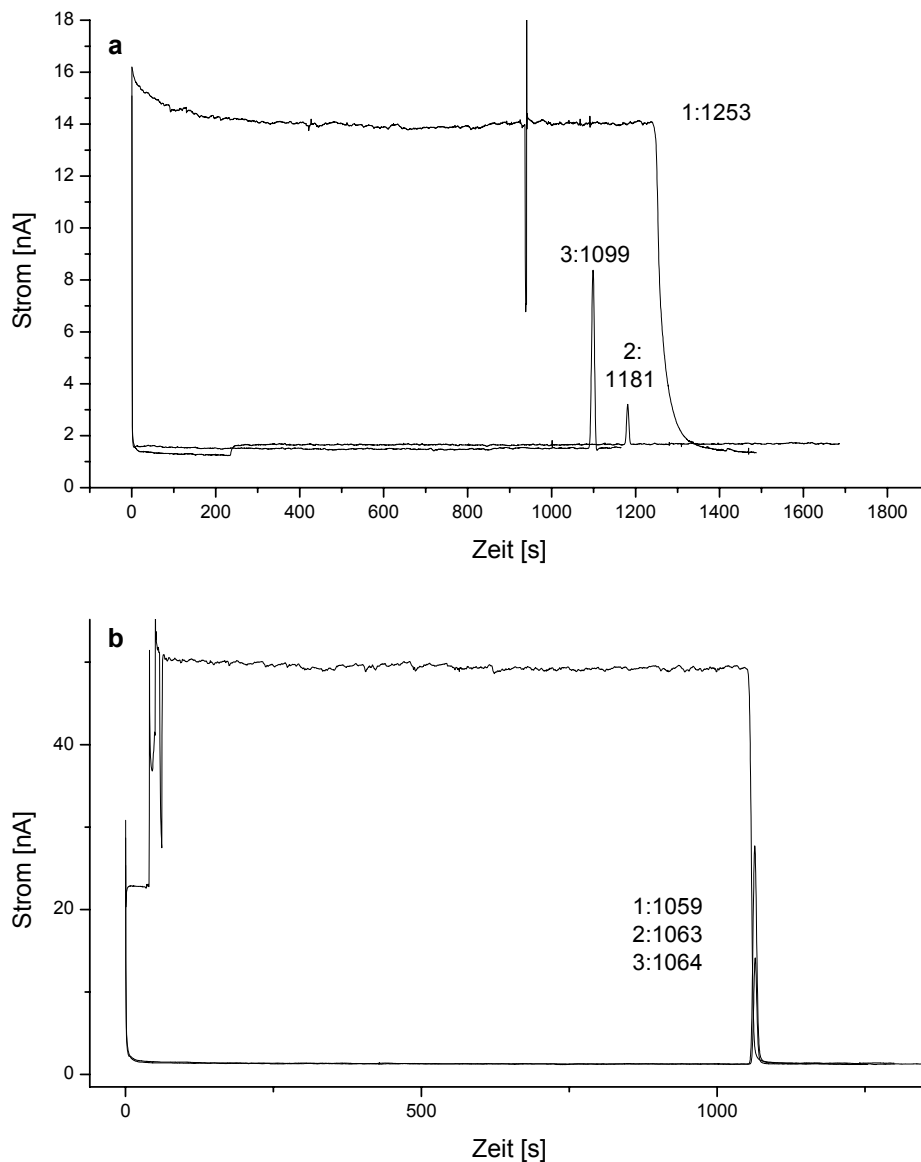


Abb. 16: Elektropherogramme mit kathodischer amperometrischer Detektion von Sauerstoff. a: unbeschichtete Kapillare; b: polyacrylamidbeschichtete Kapillare. Bedingungen: Spannung: 20 kV, Kapillarlänge: 104 cm, Elektrolyt: Natriumphosphatpuffer, pH 8. 1, 2, 3: Abfolge der Messungen.

Der Zusatz von TEA zum *sheath liquid* leistete einen weiteren Beitrag zur Erhöhung der Sensitivität (DeJohn und Loo 1999). In Abbildung 17 ist ein mit der in dieser Arbeit entwickelten CE/ESI-MS Methode (Anlage 6.2) erhaltenes Totalionenstrom (TIC) – Elektropherogramm von HAF 6 (s. 3.1.1) dargestellt, welches gute Übereinstimmungen im Peakprofil mit dem entsprechenden CE/UV-Elektropherogramm (Abb. 18f) zeigt.

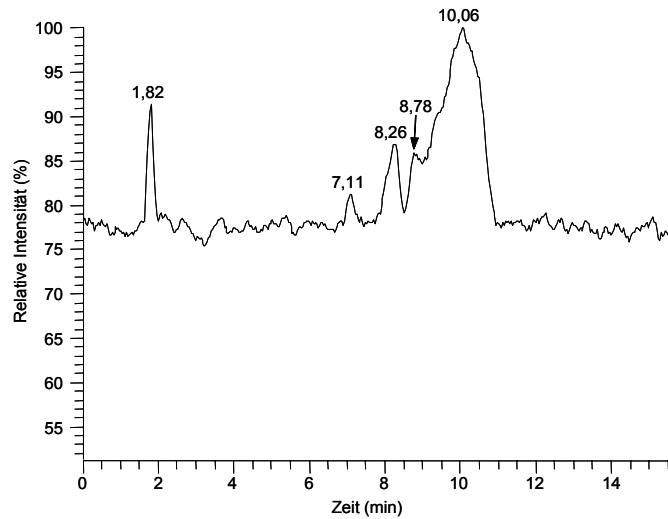


Abb. 17: CE/ESI-MS TIC-Elektropherogramm von HAF 6, 1% (m/V) in CE-Puffer.

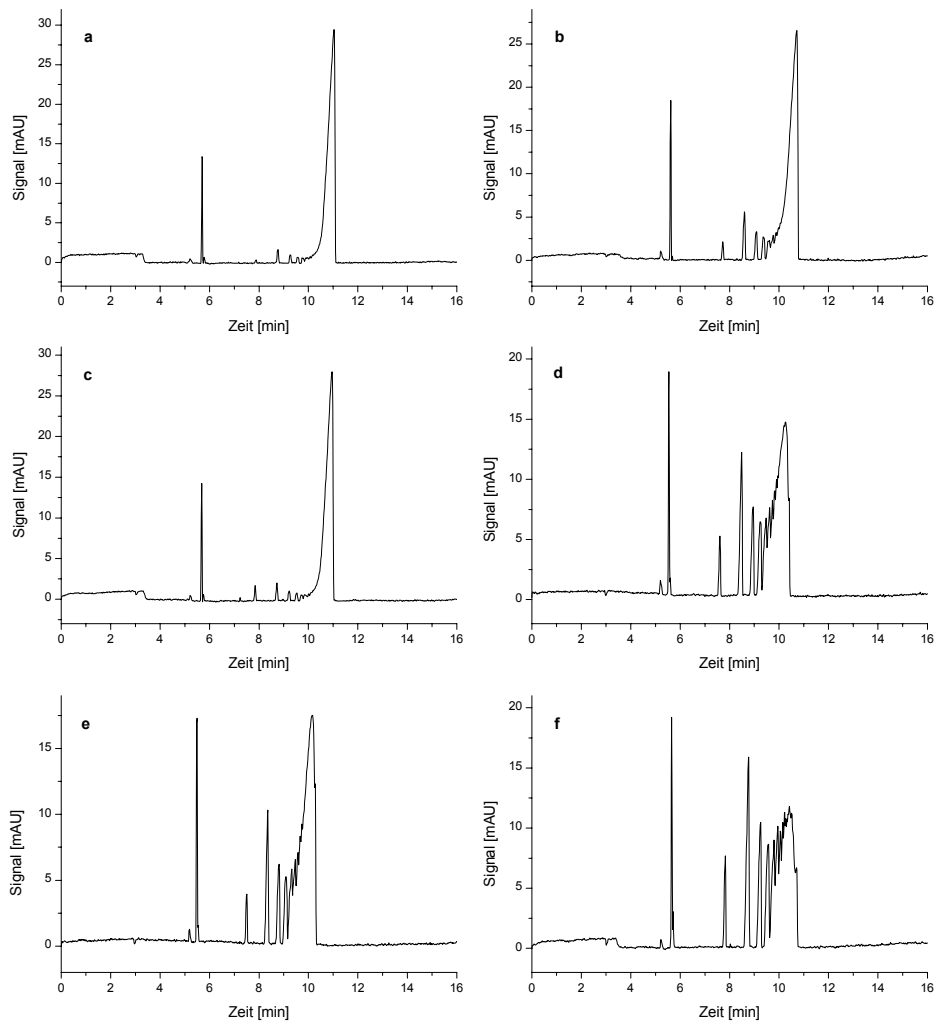


Abb. 18: CE/UV-Elektropherogramme von a: HAF 1, b: HAF 2, c: HAF 3, d: HAF 4, e: HAF 5 und f: HAF 6; jeweils 1% (m/V) in CE-Puffer. 1. Peak: EOF. (zu den Proben s. 3.1.1)

Durch die so erhaltenen CE/MS-Elektropherogramme (Abb. 19) und Spektren wurde die Zuordnung von Retentionszeiten zu Kettenlängen möglich, was momentan aufgrund fehlender Standards keine andere Methode leisten kann. Dennoch ist die eindeutige Identifikation, aufgrund der Eigenschaft der HA-Moleküle unter diesen Bedingungen Dimer-Addukte zu bilden, erschwert. Durch die in den Molekülen enthaltene Doppelbindung treten Dimeraddukte des Disaccharids im Spektrum mit dem entsprechenden m/z -Verhältnis des Tetrasaccharids auf (s. Anlage 6.3).

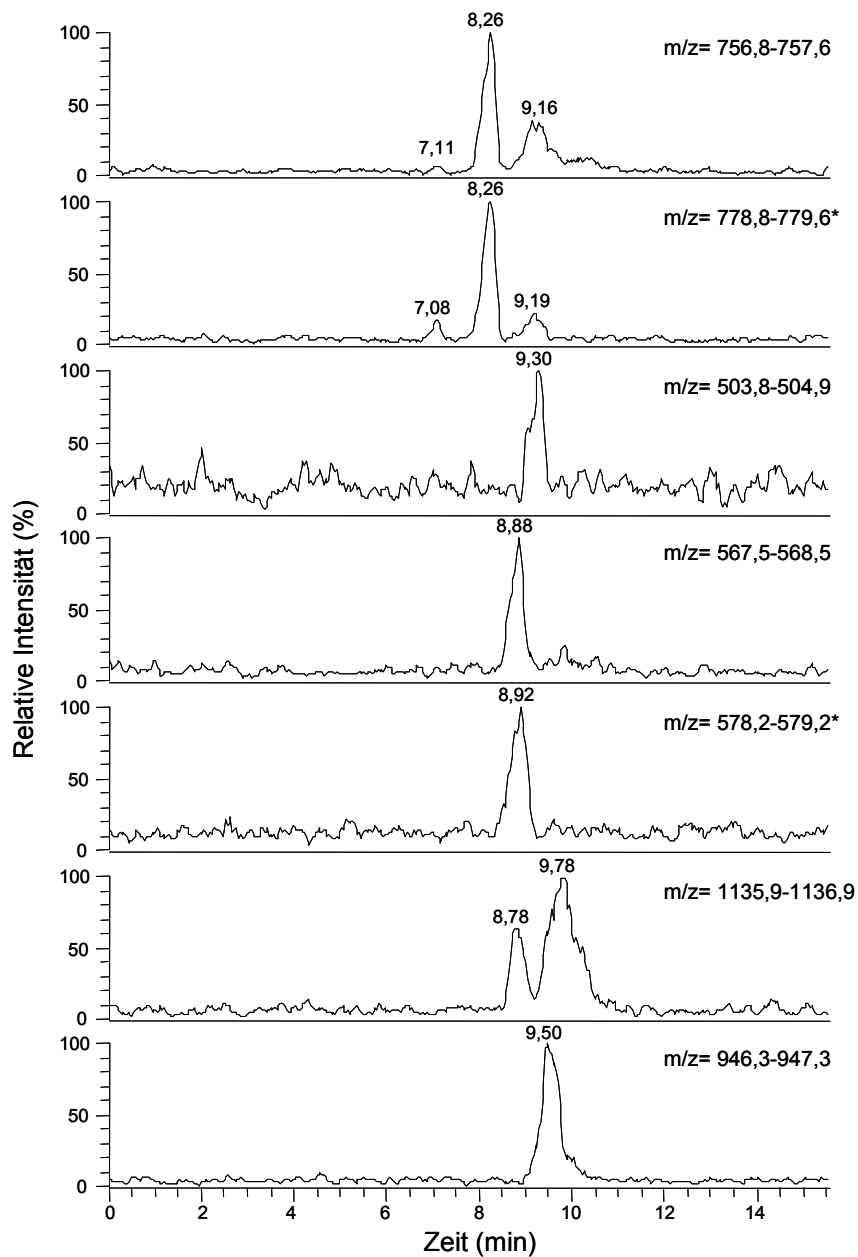


Abb. 19: CE/ESI-MS Massenelektropherogramme von HAF 6, 1% (m/V) in CE-Puffer. Elution: 2-mer (Dimeraddukt; 7,08-7,11 min), 4-mer (8,26 min), 6-mer (8,78-8,92 min), 8-mer (9,16-9,30 min), 10-mer (9,50 min) und 12-mer (9,78 min); *Natrium-Salze.

Dadurch ergab sich zunächst eine Zuordnung, die auf eine nichtlineare Elutionsreihenfolge deutete (Anlage 6.2). Mit Hilfe eines HA-Dimerstandards (δ -DiHA) konnte die Identifizierung des Disaccharids erfolgen (Anlage 6.3). Die bei diesen Trennbedingungen lineare Elution der HAF in der Reihenfolge von kleinen zu großen Molekülen wurde damit erstmals mittels CE/MS belegt.

3.1.4 Untersuchungen zum Mechanismus des enzymatischen Abbaus von Hyaluronsäure mittels GBS Hyaluronat Lyase (Anlage 6.4: Kühn et al. 2004)

Die Spaltung der Hyaluronsäure mit Hilfe bakterieller Enzyme zu ungesättigten HA-Fragmenten (HAF) kann u.a. durch Messung der Absorptionsänderung bei 232 nm verfolgt werden. Mit jeder enzym-katalysierten Spaltung einer glykosidischen Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure entsteht eine Doppelbindung am nichtreduzierenden Ende des Produktmoleküls und somit ein UV-Chromophor (Abb. 1). Daher ist die Absorptionsänderung proportional zur Anzahl gebildeter Moleküle und Anzahl Bindungen, die durch das Enzym gespalten wurden (Jandik et al. 1994).

Jandik und Mitarbeiter konnten anhand von Viskositätsmessungen mit einem Ubbelohde Kapillarviskosimeter verschiedene Glykosaminoglykan (GAG) abbauende Chondroitinasen und Heparinasen hinsichtlich ihres katalytischen Mechanismus charakterisieren. Im untersuchten Konzentrationsbereich verhalten sich GAG-Lösungen wie Newtonsche Lösungen (Abb. 20) und können daher sowohl mit Rotationsviskosimetern als auch mit Kapillarviskosimetern analysiert werden.

Anhand der Kurven, die sich aus der Auftragung von Viskosität (direkt proportional zur mittleren Molekülmasse) gegen die Zeit während der enzymatischen Spaltung ergeben, lässt sich der Abbaumechanismus des Enzyms erkennen (Anlage 6.4).

Hierbei können drei theoretisch mögliche Kinetikmodelle unterschieden werden (Jandik et al. 1994). Ein linearer Zusammenhang deutet darauf, dass das Enzym eine einzige Polysaccharidkette unter Abspaltung jeweils einer Disaccharideinheit vom Ende der Kette vollständig abbaut und dann mit einer neuen beginnt (non-random exolytic). Eine zufällige Auswahl einer Kette, Abspaltung einer Disaccharideinheit und Wechsel zu einem neuen Molekül, um den Prozess zu wiederholen, zeigt sich in einer hyperbolischen Kurve (random exolytic).

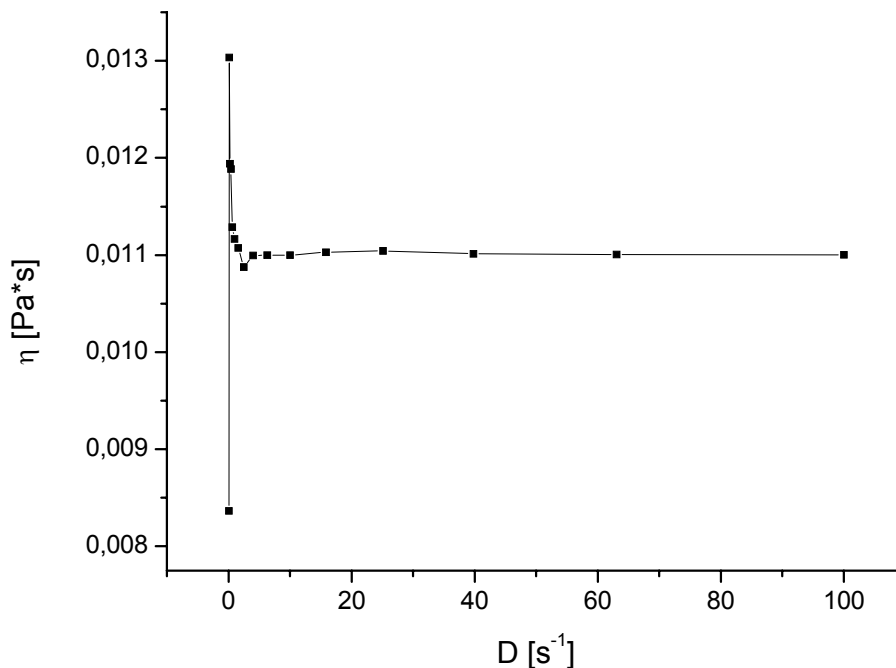


Abb. 20: Fließverhalten einer 2,5%igen Lösung (m/V) der Probe aus dem Vorverdau (0 min, 67 kDa; s. Tab. 7 und Anlage 6.4) in 0,01 M Na-Acetat-Puffer, pH 6, bei 25°C. Schwankungen im Bereich sehr kleiner Scherraten D sind aufgrund der geringen Viskosität η messtechnisch bedingt.

Der Angriff des Enzyms an einer glykosidischen Bindung innerhalb der Polysaccharidkette, Spaltung des Moleküls in ein Oligosaccharid und ein Restpolysaccharid und Auswahl einer neuen Kette, ergibt hyperbolische Kurven mit einem schnelleren Abfall (random endolytic). Allerdings ist es oft schwierig, aus den Kurven eindeutig auf den Reaktionsmechanismus schließen zu können. Daher ist es notwendig, zusätzliche Methoden anzuwenden, mit denen eine direkte Messung der gebildeten Produkte oder der jeweiligen Substrate möglich ist.

Die GPC mit refraktometrischer Detektion wurde von Vercruyse und Mitarbeitern zur Untersuchung der Kinetik des Hyaluronsäureabbaus mit testikulärer Hyaluronidase angewendet. Durch die Bestimmung der mittleren Molekülmassen während der enzymatischen Reaktion konnten die Konstanten der Michaelis-Menten-Gleichung (k_m , V_{max}) bestimmt werden. Es wurde eine in der Anfangsphase zufällige Angriffsweise dieser Hyaluronidase am Substrat gefunden (Vercruyse et al. 1994).

Die Untersuchung von Abbauprodukten von Hyaluronsäure durch Verwendung von Hyaluronat Lyase aus *Streptococcus agalactiae*, Stamm 4755, mit Hilfe der GPC lieferte Hinweise auf einen *endolytischen* Mechanismus (Rodig et al. 1999). Durch die in dieser Arbeit durchgeführten GPC-MALLS-Untersuchungen an Abbauprodukten von HA mit dem genannten Enzym konnte diese Annahme bestätigt werden (Tab. 7 und Abb. 21).

Tab. 7: Ergebnisse der GPC-MALLS Bestimmungen

	Abbau 1	Abbau 2
Abbauzeit	GPC-MALLS (\bar{M}_w)*	GPC-MALLS (\bar{M}_w)*
0 min	67 kDa	67 kDa
60 min	40,1 kDa	32 kDa
120 min	30,1 kDa	24 kDa
180 min	28 kDa	17 kDa
240 min	26,4 kDa	15 kDa
300 min	26 kDa	—

*Zur Ermittlung von \bar{M}_w wurde der Oligosaccharidpeak nicht berücksichtigt, da in diesem Bereich keine Proportionalität zwischen Molekülgröße und Intensität des an den Molekülen gestreuten Lichtes mehr gegeben ist (s. Abb. 21). Die Werte stellen Mittelwerte aus drei Bestimmungen dar.

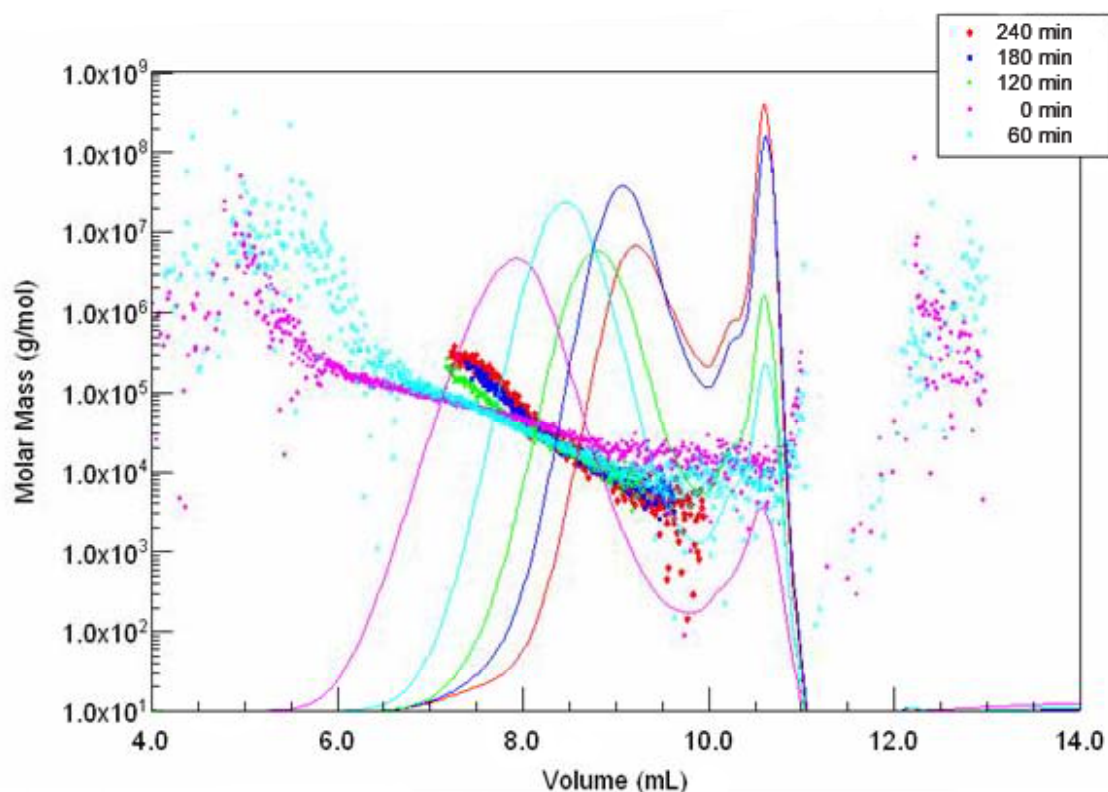


Abb. 21: GPC-RI-MALLS Chromatogramme der durch enzymatischen Abbau von HA mit HA Lyase aus *Streptococcus agalactiae*, Stamm 4755, gewonnenen Produkte (Abbau 2), jeweils 2,5% (m/V) in 0,01 M Na-Acetat-Puffer, pH 6 (zum Abbau und zur Methode s. Anlage 6.4). MALLS-Detektor: DAWN DSP laser light scattering photometer (Messzelle K5-651) mit 18 Detektoren (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA).

Die zeitabhängige Änderung der Elutionsposition des Hyaluronsäurepeaks während des partiellen Abbaus durch Bildung von Fragmenten mittlerer Molekülgröße deutet auf einen *endolytischen* Abbaumechanismus des Enzyms hin (Abb. 21 und Anlage 6.4). Eine *exolytische* Aktionsweise wäre durch einen zeitlich anwachsenden Disaccharidpeak, einen abnehmenden HA-Peak und das Fehlen von Intermediärprodukten im Chromatogramm gekennzeichnet (Reháková et al. 1994, Jandik et al. 1994, Rodig et al. 1999).

So zeigten u.a. Rodig und Mitarbeiter anhand ihrer GPC-Untersuchungen, dass die GCS HA Lyase aus *Streptococcus equisimilis* HA als *Exoglykosidase* spaltet.

Da durch die GPC-Untersuchungen die zeitliche Änderung der Oligosacchride nicht hinreichend verfolgt werden kann, wurden zusätzlich CE-Messungen durchgeführt. Die CE/UV erlaubt die direkte Verfolgung und „relative quantitative“ Erfassung (relativ, da eine absolute Quantifizierung ohne Standards nicht möglich ist und angenommen wurde, dass die HA Oligosaccharide ähnliche molare Absorptionskoeffizienten bei der gewählten Wellenlänge aufweisen) der Produkte über die Peakflächen während des Verdaus (Park et al. 1997). Die Peakidentifikation erfolgte mittels CE/ESI-MS (Anlage 6.4). Hierbei zeigte sich bei jeder Abbaustufe eine Mischung an HAF und HA-Oligosacchariden unterschiedlicher Kettenlänge (Anlage 6.4).

Für HA Lyase aus *S. agalactiae*, Stamm 3502 (serotype III GBS, isoliert aus dem Blut erkrankter Kleinkinder), wurde eine exolytische Spaltung der HA mit einem initial endolytischen Schritt und nachfolgender schnell fortschreitender Freisetzung des terminal 4,5-ungesättigten Disaccharids beschrieben (Pritchard et al. 1994, Baker und Pritchard 2000, Pritchard et al. 2000, Li und Jedrzejewski 2001, Oettl et al. 2003). Bei der in dieser Arbeit untersuchten HA Lyase aus *S. agalactiae*, Stamm 4755 (nontypable/R GBS, isoliert aus Pyelonephritiserkrankten; Ozegowski et al. 1994), wurde für die HA-Spaltung eine endolytische Aktionsweise gefunden. Obwohl beide Enzyme umfassende Sequenzübereinstimmungen zeigen (Lin et al. 1994, Gase et al. 1998) müssen Unterschiede aufgrund der Art der Isolierung oder Reinigung und/oder des Ursprungs angenommen werden. Möglicherweise stellt das früher untersuchte Enzym nicht die reine HA Lyase dar, sondern enthält noch Begleitfermente, welche die HA-Spaltung schnell zu den Disacchariden fortsetzen.

3.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von Alkylpolyglykosiden (Anlage 6.5: Kühn und Neubert 2004)

Mit Hilfe der RP-HPLC werden APGs in der Reihenfolge zunehmender Alkylkettenlänge getrennt (Lafosse et al. 1992, Spilker et al. 1996, Czichocki et al. 2002). Die begrenzte Zahl an Referenzsubstanzen und das Fehlen eines Chromophors in den Analytmolekülen macht die Kopplung der chromatographischen Trennung mit der Massenspektrometrie notwendig (Billian und Stan 1998, Schulte et al. 1999, Eichhorn und Knepper 1999, Klaffke et al. 1999). Gegenüber der GC/MS weist die LC/MS Vorteile auf, da die Moleküle vor der Analyse keiner Derivatisierung bedürfen und Fragmentierungen bei Verwendung von API-Quellen im Gegensatz zu den in der GC eingesetzten EI-Quellen eher selten sind, was die Zuordnung der Signale u.U. erleichtert.

Anhand der Einzelspektren (aufgenommen am LCQ) der technischen APG-Produkte (Plantacare[®]) lassen sich Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung der jeweiligen APG-Mischung erkennen (Anlage 6.5). Im positiv-Ionen-Modus wurden hauptsächlich die für Zucker typischen Alkalimetalladdukte, v.a. die $[M+Na]^+$ -Addukte, detektiert. Da keine mehrfach geladenen Adduktionen in den Spektren auftreten, wurde zuvor vermutet, dass das Na^+ -Ion mit dem Glykosid-Sauerstoff assoziiert ist, welcher den Zucker mit der Alkylkette verknüpft (Klaffke et al. 1999). Tandem MS Experimente zeigten jedoch, dass der nach Abspaltung des Alkylrestes verbliebene Zucker ebenfalls die Anlagerung eines Na^+ -Ions aufwies (Anlage 6.5). Da dem Zuckerfragment die oben genannte Assoziationsstelle fehlt, scheint vielmehr die Assoziation eines Na^+ -Ions mit mehreren der im Molekül vorhandenen Sauerstoffe (z.B. OH-Gruppen \rightarrow Komplexbildung) und die damit einhergehende Ladung das Herantreten eines weiteren Na^+ -Ions zu verhindern.

Anhand der relativen Peakintensität im Massenspektrum könnte, unter der Annahme, dass alle Einzelbestandteile ein ähnliches massenspektrometrisches Verhalten (Response) zeigen, eine Abschätzung des relativen Anteils der jeweiligen Komponente erfolgen (Plätzer 2002). Da es jedoch ohne vorherige (chromatographische) Trennung zu einer gegenseitigen Beeinflussung im Ionisationsverhalten kommen kann, liefert die LC/MS-Kopplung genauere Aussagen zur Produktzusammensetzung.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten LC/ESI-QTOF-MS Methode, unter Verwendung eines Elutionsgradienten, konnten die APGs hinsichtlich ihrer Alkylhomologen getrennt werden, während eine Trennung in Bezug auf den hydrophilen Saccharidteil der Moleküle nur ansatzweise erzielt wurde. Mit Hilfe des verwendeten Massenanalysators (QTOF) wurden

erstmals APGs mit bis zu 8 Monomereinheiten enthaltenden Oligosaccharidresten gefunden. Die Bestimmung der relativen Anteile der einzelnen APGs erfolgte anhand der Peakflächen, woraus sich die Verteilung der Oligosaccharide als Funktion der Alkylkettenlänge ergibt. Auch in einer Mischung mit Cocamidopropylbetain (CAPB), einem amphoterem Tensid, welches selbst wiederum eine Mischung an Alkylhomologen darstellt (McFadden et al. 2001), konnten die einzelnen APGs durch Modifikation des Gradienten bestimmt werden (Anlage 6.5).

Eine wirkliche Quantifizierung der einzelnen APGs mit Hilfe der Massenspektrometrie ist jedoch nur unter Zuhilfenahme geeigneter Standardsubstanzen möglich, da nicht sichergestellt werden kann, dass die Signalintensitäten für die einzelnen APGs gleicher Konzentration identisch sind.

4. Zusammenfassung

Der Einsatz komplexer Kohlenhydrate, wie Hyaluronsäure, Hyaluronsäurefragmente und Alkylpolyglykoside, in pharmazeutischen Formulierungen, sei es als Hilfs- oder Wirkstoff, erfordert zuvor eine umfassende Charakterisierung dieser Substanzgemische.

Ziel dieser Arbeit war es daher, moderne Analysenmethoden auf ihre Leistungsfähigkeit für diesen Einsatz zu prüfen und weiterzuentwickeln.

Hyaluronsäurefragmente

Durch die Komplexität der Hyaluronsäureabbauprodukte, die z.T. nicht kalkulierbaren physiko-chemischen Eigenschaften, v.a. aufgrund der ungewöhnlichen Struktur und Gestalt der Moleküle, die die Analytik erschweren und die zum jetzigen Zeitpunkt fehlenden geeigneten Standardsubstanzen, ist die Verwendung mehrerer Analysenmethoden für eine umfassende Charakterisierung notwendig. Die Ergebnisse der jeweiligen Methode sind kritisch zu betrachten und durch entsprechende Zusatzuntersuchungen abzusichern.

Dabei sind für die einzelnen Methoden folgende Aussagen zu treffen:

Rheologie

Mit Hilfe von Viskositätsmessungen lässt sich das Fortschreiten des enzymatischen Abbaus verfolgen. Die Viskositätsänderung in einem gegebenen System ist hierbei direkt proportional zur Änderung der mittleren Molekülmasse. Anhand der Auftragung der Viskosität gegen die Zeit während der enzymatischen Spaltung ergeben sich Rückschlüsse hinsichtlich der Aktionsweise des Enzyms.

Eine exakte Bestimmung der viskositätsmittleren Molekülmasse \bar{M}_η mit Hilfe der Kuhn-Mark-Houwink-Gleichung ist jedoch aufgrund fehlender Referenzsubstanzen zurzeit nicht möglich. Aufgrund der hohen intrinsischen Viskosität der HA-Moleküle, die wiederum stark von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung abhängig ist, können neutrale Referenzstandards, wie Dextrane, Pullulane oder PEGs, hier nicht eingesetzt werden.

Gelpermeationschromatographie

Die GPC gekoppelt mit einem MALLS Detektor ist gut geeignet für die Untersuchung von nativer Hyaluronsäure und größerer Hyaluronsäurefragmente und liefert Informationen über die gewichtsmittlere Molekülmasse \bar{M}_w . Kleinere Moleküle wie HA-Oligosaccharide sind mit

dieser Methode nicht mit ausreichender Präzision zu erfassen, da in diesem Bereich keine Proportionalität zwischen Molekülgröße und Intensität des an den Molekülen gestreuten Lichtes mehr gegeben ist.

Massenspektrometrie

Im Falle von Proben mit schmalen Molekülmassenverteilungen ($PD < 1,2$) weist die MALDI-MS drei wesentliche Vorteile gegenüber anderen etablierten Methoden auf, die in einer kurzen Analysendauer (nach vollendeter Probenvorbereitung), einem minimalen Substanzbedarf und einer hohen Massengenauigkeit, -auflösung und -reproduzierbarkeit begründet sind. Die Untersuchung polydisperser Mischungen macht die vorherige Fraktionierung der Proben z.B. mit der GPC erforderlich, da ansonsten Verteilungen erhalten werden, die zu kleineren m/z -Verhältnissen hin stetig ansteigen.

Aufgrund der Eigenschaft der Moleküle, unter ESI-Bedingungen Mehrfachladungen auszubilden, mit der Folge, dass unterschiedliche Kettenlängen bei gleichen m/z -Quotienten im Massenspektrum erscheinen, ist auch hier eine vorherige chromatographische Trennung notwendig. Des Weiteren können nur Hyaluronsäurefragmente bestehend aus bis zu ca. 16 Monomereinheiten detektiert werden, darüber hinaus erfolgt keine ausreichende Ionisation und Detektion der Moleküle mehr.

Vorteile der in dieser Arbeit verwendeten ESI-MS-Geräte liegen in der Möglichkeit der Tandem-MS, durch die unter bestimmten Bedingungen erkannt werden kann, wie viele Kettenlängen sich hinter einem speziellen m/z -Wert verbergen.

Kapillarelektrophorese

Ohne eine vorherige Derivatisierung der HAF lassen sich auch mit Hilfe der Kapillarelektrophorese hauptsächlich kleine HA-Moleküle trennen und analysieren. Aufgrund fehlender Referenzsubstanzen und der unspezifischen UV-Detektion ist eine eindeutige Zuordnung der Substanzen zu Signalen schwierig, was die Kopplung der CE mit der MS notwendig macht.

Kopplungsmethoden

Mit Hilfe der entwickelten LC/ESI-MS-Methode erfolgte die Quantifizierung der HAF in zwei pharmazeutischen Formulierungen (Carboxymethylcellulose-Gel und Wasserhaltige Hydrophile Salbe).

Die online CE/ESI-MS Kopplungsergebnisse belegten erstmalig das ungewöhnliche Elutionsverhalten der HA-Moleküle, welches bis dahin nur vermutet wurde, da eine eindeutige Peakidentifizierung nicht möglich war.

Durch die Kombination der verschiedenen Verfahren konnten die untersuchten Abbauprodukte als polydisperse Gemische charakterisiert werden, bei denen neben HAF mittlerer Kettenlänge ein großer Anteil an Oligosacchariden vorliegt, wobei die Verteilung durch die jeweiligen Abbaubedingungen bestimmt wird.

Im Gegensatz zu der Hyaluronat Lyase aus *S. agalactiae*, Stamm 3502, für die eine in Bezug auf den HA-Abbau exolytische Aktionsweise beschrieben wurde, konnte das in dieser Arbeit verwendete Enzym aus *S. agalactiae*, Stamm 4755, als *Endoglykosidase* charakterisiert werden. Im Zusammenhang mit den in der Literatur nachgewiesenen biologischen Funktionen der HAF ist die Kenntnis des Abbaumechanismus eine notwendige Voraussetzung, insbesondere beim Einsatz von Hyaluronidasen in pharmazeutischen Produkten. Die genaue Ursache für die unterschiedliche Aktionsweise der aus epidemiologisch und serologisch verschiedenen *S. agalactiae* Stämmen gewonnenen HA Lyasen muss noch aufgeklärt werden. Abschließend kann festgestellt werden, dass anhand der Kombination der gezeigten Methoden eine Charakterisierung der Hyaluronsäurefragmentmischungen, im Hinblick auf die Gewährleistung einheitlicher Produkte für pharmazeutische Einsatzgebiete, möglich ist.

Alkylpolyglykoside

Die entwickelte LC/ESI-QTOF-MS Methode erlaubt die Charakterisierung komplexer Mischungen industriell hergestellter Alkylpolyglykoside. Anhand der so gewonnenen Daten können die Alkylkettenlängenverteilung und der Oligomerisationsgrad des Oligosaccharidanteils ermittelt und mit physiko-chemischen Eigenschaften des Produkts korreliert werden. Die Bestimmung der APGs in Anwesenheit anderer Tenside, wie Cocamidopropylbetain, konnte gezeigt werden. Die eingesetzten massenspektrometrischen Methoden liefern jedoch keinerlei Information hinsichtlich der Stereochemie der APGs. Hierzu bedarf es weiterer, vor allem NMR-spektroskopischer, Untersuchungen.

5. Literatur

- Adams, M.E.; Lussier, A.J.; Peyron, J.G.: A risk-benefit assessment of injections of hyaluronan and its derivatives in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Drug safety* 23:115-130 (2000)
- Akiyama, H.; Toyoda, H.; Yamanashi, S.; Sagehashi, Y.; Toida, T.; Imanari, T.: Microdetermination of hyaluronic acid in human urine by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 5:189-92 (1991)
- Al-Assaf, S.; Williams, P.A.; Phillips, G.O.: Molecular characterization of hyaluronan and hylan using GPC-MALLS and asymmetrical flow FFF-MALLS. In: Kennedy, J.F., Phillips, G.O., Williams, P.A. (Hrsg.), *Hyaluronan (Proceedings of the International Cellucon Conference 2000)*, Volume 1. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK, S. 55-65 (2002)
- Al-Hakim, A.; Linhardt, R.J.: Capillary electrophoresis for the analysis of chondroitin sulfate- and dermatan sulfate-derived disaccharides. *Anal. Biochem.* 195: 68-73 (1991)
- Alkrad, J.A.; Mrestani, Y.; Neubert, R.H.H.: New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30:913-919 (2002)
- Alkrad, J.A.; Mrestani, Y.; Neubert, R.H.H.: The release profiles of intact and enzymatically digested hyaluronic acid from semisolid formulations using multi-layer membrane system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56:37-41 (2003)
- Altria, K.D.; Smith, N.W.; Turnbull, C.H.: A review of the current status of capillary electrochromatography technology and applications. *Chromatographia* 46:664-674 (1997)
- Armstrong, D.C.; Johns, M.R.: Improved molecular weight analysis of streptococcal hyaluronic acid by size exclusion chromatography. *Biotechnol. Tech.* 9:491-496 (1995)
- Arndt, K.F.; Müller, G.: *Polymercharakterisierung*. Carl Hanser Verlag, München (1996)
- Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F.: Analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 348:783-791 (1994)
- Baker, J.R.; Yu, H.; Morrison, K.; Averett, W.F.; Pritchard, D.G.: Specificity of the hyaluronate lyase of group-B streptococcus toward unsulphated regions of chondroitin sulphate. *Biochem. J.* 327:65-71 (1997)
- Baker, J.R.; Pritchard, D.G.: Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci. *Biochem. J.* 348:465-471 (2000)
- Balzer, D.: Alkylpolyglucosides, their physico-chemical properties and their uses. *Tenside Surf. Det.* 28: 419-427 (1991)
- Balzer, D.: Aqueous surfactant preparations with increased viscosity for cosmetics. *Eur. Pat. Appl.* EP 0 511 466 A1 (1992)
- Balzer, D.: Aqueous viscoelastic surfactant solutions for skin and hair cleaning. *Eur. Pat. Appl.* EP 0 681 832 A2 (1995)
- Balzer, D.: Zum Eigenschaftsbild der Alkylpolyglucoside. *Tenside Surf. Det.* 33: 102-104, 106-110 (1996)

- Banks, J.F.: Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray/mass spectrometry. *Electrophoresis* 18:2255-2266 (1997)
- Bastigkeit, T.; Wegener, M.; Rogge, B.; Pfennig-Dahmen, R.; Riebe, H.J.: Alkyl polyglycoside-based microemulsions for use as stain pretreatment agents. *Ger. Offen.* DE 101 29 517 A1 (2003)
- Behler, A.; Neuss, M.; Syldath, A.; Eggers, A.: Surfactant mixtures with improved foam properties and diminished stickiness based on alkyl and/or alkenyl oligoglycoside compounds. *Ger. Offen.* DE 101 22 257 A1 (2002)
- Berchter, M.; Meister, J.; Hammes, C.: MALDI-TOF-MS: Eine neue analytische Technik zur Charakterisierung von Produkten auf Basis nachwachsender Rohstoffe. *Fett/Lipid* 99:384-391 (1997)
- Billian, P.; Stan, H.-J.: Gas chromatography / Mass spectrometry of alkyl polyglucosides as their trimethylsilylethers. *Tenside Surf. Det.* 35: 181-184 (1998)
- Billian, P.; Hock, W.; Doetzer, R.; Stan, H.-J.; Dreher, W.: Isolation of *n*-Decyl- α (1 \rightarrow 6) isomaltoside from a technical APG mixture and its identification by the parallel use of LC-MS and NMR spectroscopy. *Anal. Chem.* 72:4973-4978 (2000a)
- Billian, P.; Erhard, M.; Stan, H.-J.: Investigation of alkyl polyglucosides by mass spectrometry. *Tenside Surf. Det.* 37:56 (2000b)
- Brimacombe, J.S.; Webber, J.M.: Mucopolysaccharides: Chemical structure, distribution and isolation. Vol. 6, Elsevier, Amsterdam (1964)
- Busch, P.; Hensen, H.; Tesmann, H.: Alkylpolyglycoside-eine neue Tensidgeneration für die Kosmetik. *Tenside Surf. Det.* 30:116-121 (1993)
- Buschmann, N.; Merschel, L.; Wodarczak, S.: Analytical methods for alkyl polyglucosides. *Tenside Surf. Det.* 33:16-20 (1996)
- Cai, J.; Henion, J.: Capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 703:667-692 (1995)
- Camenisch, T.D.; McDonald, J.A.: Hyaluronan: Is bigger better? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23:431-433 (2000)
- Chiari, M.; Nesi, M.; Righetti, P.G.: Movement of DNA fragments during capillary zone electrophoresis in liquid polyacrylamide. *J. Chromatogr. A* 652:31-39 (1993)
- Chun, L.E.; Koob, T.J.; Eyre, D.R.: Quantitation of hyaluronic acid in tissues by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography of oligosaccharide cleavage products. *Anal. Biochem.* 171:197-206 (1988)
- Conboy, J.J.; Henion, J.: High-performance anion-exchange chromatography coupled with mass spectrometry for the determination of carbohydrates. *Biol. Mass Spectrom.* 21:397-407 (1992)
- Czichocki, G.; Fiedler, H.; Haage, K.; Much, H.; Weidner, S.: Characterization of alkyl polyglycosides by both reversed-phase and normal-phase modes of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 943:241-250 (2002)
- Dallinga, J.W.; Heerma, W.: Positive ion fast atom bombardment mass spectrometry of some small oligosaccharides. *Biol. Mass. Spectrom.* 20:99-108 (1991a)
- Dallinga, J.W.; Heerma, W.: Reaction mechanism and fragment ion structure determination of deprotonated small oligosaccharides, studied by negative ion fast atom bombardment (tandem) mass spectrometry. *Biol. Mass. Spectrom.* 20:215-231 (1991b)

- DeJohn, D.E.; Loo, J.A.: Oligosaccharide analysis by electrospray ionization mass spectrometry using triethylamine additive. *Proc. of 47th ASMS Conf. on Mass Spectrometry and allied Topics* S. 286-287 (1999)
- Desai, U.R.; Wang, H.M.; Ampofo, S.A.; Linhardt, R.J.: Oligosaccharide composition of heparin and low-molecular heparins by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 213:120-127 (1993)
- Dole, M.; Mack, L.L.; Hines, R.L.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.D., Alice, M.B.: Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* 49:2240-2249 (1968)
- Dörfler, H.-D.: Grenzflächen und Kolloidchemie. Kap. 5: Aufbau und Eigenschaften elektrochemischer Doppelschichten an geladenen Grenzflächen. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, S. 112-122 (1994)
- Duteil, S.; Gareil, P.; Girault, S.; Mallet, A.; Feve, C.; Siret, L.: Identification of heparin oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis/ionspray-mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13:1889-1898 (1999)
- Eichhorn, P.; Knepper, T.P.: Investigations on the metabolism of alkyl polyglucosides and their determination in waste water by means of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 854:221-232 (1999)
- Engelhardt, H.; Beck, W.; Kohr, J.; Schmitt, T.: Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. *Angewandte Chemie* 105:659-804 (1993)
- Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.: Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden (1994)
- Fischer, E.: Über die Glucoside der Alkohole. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 26:2400-2412 (1893)
- Fischer, E.: Über die Verbindungen der Zucker mit den Alkoholen und Ketonen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 28:1145-1167 (1895)
- Förster, T.; Guckenbiehl, B.; Hensen, H.; von Rybinski, W.: Physico-chemical basics of microemulsions with alkyl polyglycosides. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 101:105-112 (1996)
- Förster, T.; Issberner, U.; Hensen, H.: Lipid/surfactant compounds as a new tool to optimize skin care properties of personal-cleansing products. *J. Surf. Det.* 3:345-352 (2000)
- Gase, K.; Ozegowski, J.; Malke, H.: The streptococcus agalactiae hylB gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1398:86-98 (1998)
- Gennaro, L.A.; Delaney, J.; Vouros, P.; Harvey, D.J.; Domon, B.: Capillary electrophoresis / electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of negatively charged derivatized and underivatized glycans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16:192-200 (2002)
- Gerlach, D.: Topische Anwendungskriterien von Hyaluronsäurefragmenten zur UV-Protektion. Dissertation, MLU Halle-Wittenberg (2002)
- Ghatak, S.; Misra, S.; Toole, B.P.: Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* 277:38013-38020 (2002)
- Goessler, N.; Reissner, C.; Janzen, N.; Kaehnert, H.; Kleesiek, K.: A high-performance liquid chromatography method for the determination of glycosaminoglycans in human blood. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 31:503-11 (1993)

- Grimshaw, J.; Kane, Á.; Trocha-Grimshaw, J.; Douglas, A.; Chakravarthy, U.; Archer, D.: Quantitative analysis of hyaluronan in vitreous humor using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 15:936-940 (1994)
- Grimshaw, J.: Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18:2408-2414 (1997)
- Guss, J.M.; Hukins, D.W.L.; Smith, P.J.C.; Winter, W.T.; Arnott, S.; Moorhouse, R.; Rees, D.A.: Hyaluronic acid: molecular conformations and interactions in two sodium salts. *J. Mol. Biol.* 95:359-384 (1975)
- Harvey, D.J.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom. Rev.* 18:349-450 (1999)
- Hawkins, C.L.; Davies, M.J.: Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials. *Free Radic. Biol. Med.* 21:275-290 (1996)
- Hayase, S.; Oda, Y.; Honda, S.; Kakehi, K.: High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass. *J. Chromatogr. A* 768:295-305 (1997)
- Heinzmann, G.: Hyaluronsäure: Charakterisierung eines eigenwilligen Moleküls. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 8:795-797 (2003)
- Iribarne, J.V.; Thomson, B.A.: On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.* 64:2287-2294 (1976)
- Jahn, M.; Baynes, J.W.; Spiteller, G.: The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and N-acetylglucosamine, with reactive oxygen species. *Carbohydr. Res.* 321:228-234 (1999)
- Jandik, K.A.; Gu, K.; Linhardt, R.J.: Action pattern of polysaccharide lyases on glycosaminoglycans. *Glycobiology* 4:289-296 (1994)
- Jedrzejas, M.J.; Chantalat, L.: Structural studies of streptococcus agalactiae hyaluronate lyase. *Acta Cryst. D* 56:460-463 (2000)
- Juhasz, P.; Biemann, K.: Utility of non-covalent complexes in the matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of heparin-derived oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 270:131-147 (1995)
- Karamanos, N.K.; Axelsson, S.; Vanky, P.; Tzanakakis, G.N.; Hjerpe, A.: Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans. *J. Chromatogr. A* 696:295-305 (1995)
- Karamanos, N.K.; Hjerpe, A.: High-performance capillary electrophoretic analysis of hyaluronan in effusions from human malignant mesothelioma. *J. Chromatogr. B* 697:277-281 (1997)
- Karamanos, N.K.; Hjerpe, A.: A survey of methodological challenges for glycosaminoglycan/proteoglycan analysis and structural characterization by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 19:2561-2571 (1998)
- Kendall, F.E.; Heidelberger, M.; Dawson, M.H.: A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococci. *J. Biol. Chem.* 118:61-69 (1937)

- Klaffke, S.; Neubert, T.; Kroh, L.W.: Determination of nonionic surfactants by LC/MS technique using alkyl polyglycosides as model substance. *Tenside Surf. Det.* 36:178-184 (1999)
- Kohlrausch, F.: Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Innern von Lösungen und Lösungsgemischen. *Ann. Phys. (Leipzig)* 62:209-239 (1897)
- Kreil, G.: Hyaluronidasen – A group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 4:1666-1669 (1995)
- Kromidas, S.: Validierung in der Analytik. In: Gruber, U., Klein, W. (Hrsg.), Die Praxis der instrumentellen Analytik, WILEY-VCH, Weinheim (1999)
- Kühn, A.V.; Raith, K.; Sauerland, V.; Neubert, R.H.H.: Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30:1531-1537 (2003)
- Kurata, M.; Tsunashima, Y.: Viscosity-molecular weight relationships and unperturbed dimensions of linear chain molecules. In: Brandrup, J., Immergut, E.H. (Hrsg.), Polymer Handbook, 3rd ed., J. Wiley & Sons New York, S. VII/1-VII/32 (1998)
- Lafosse, M.; Marinier, P.; Joseph, B.; Dreux, M.: Study of amphiphilic behaviour of alkylglycoside surfactants using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 623:277-287 (1992)
- Lapčik, L., Jr.; Chabreček, P.; Staško, A.: Photodegradation of hyaluronic acid: EPR and size exclusion chromatography study. *Biopolymers* 31:1429-1435 (1991)
- Laurent, T.C.; Laurent, U.B.; Fraser, J.R.: The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol. Cell. Biol.* 74:A1-A7 (1996)
- Lee, E.D.; Mück, W.; Henion, J.D.; Covey, T.R.: On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins. *J. Chromatogr. A* 458:313-321 (1988)
- Lehmann, J.: Kohlenhydrate. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1996)
- Lehmann, W.D.: Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1996)
- Lesley, J.: Hyaluronan binding function of CD44. In: Laurent, T.C. (Hrsg.), The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives, Portland Press Ltd, London, UK, S. 123-134 (1998)
- Li, S.; Jedrzejak, M.J.: Hyaluronan binding and degradation by streptococcus agalactiae. *J. Biol. Chem.* 276:41407-41416 (2001)
- Lin, B.; Hollingshead, S.K.; Coligan, J.E.; Egan, M.L.; Baker, J.R.; Pritchard, D.G.: Cloning and expression of the gene for group B Streptococcal hyaluronate lyase. *J. Biol. Chem.* 269:30113-30116 (1994)
- Linhardt, R.J.; Galliher, P.M.; Cooney, C.L.: Polysaccharide Lyases. *Appl. Biochem. Biotech.* 12:135-176 (1986)
- Lottspeich, F.; Zorbach, H. (Hrsg.) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg (1998)
- Mahoney, D.J.; Aplin, R.T.; Calabro, A.; Hascall V.C.; Day, A.J.: Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length. *Glycobiology* 11:1025-1033 (2001)

- Markovitz, A.; Dorfman, A.: Synthesis of capsular polysaccharide hyaluronic acid by protoplast membrane preparations of group A streptococci. *J. Biol. Chem.* 237:273-279 (1962)
- Martin, A.N.; Swarbrick, J.; Cammarata, A.; Stricker, H. (Bearb.): *Physikalische Pharmazie: Pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1987)
- McFadden, J.P.; Ross, J.S.; White, I.R.; Basketter, D.A.: Clinical allergy to cocamidopropyl betaine: reactivity to cocamidopropylamine and lack of reactivity to 3-dimethylaminopropylamine. *Contact Dermatitis* 45:72-74 (2001)
- McKee, C.M.; Penno, M.B.; Cowman, M.; Burdieck, M.D.; Strieter, R.M.; Bao, C.; Noble, P.W.: Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages – The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.* 98:2403-2413 (1996)
- McKee, C.M.; Lowenstein, C.J.; Horton, M.R.; Wu, J.; Bao, C.; Chin, B.Y.; Choi, A.M.K.; Noble, P.W.: Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 272:8013-8018 (1997)
- Meyer, K.; Palmer, J.W.: The polysaccharide of the vitreous humour. *J. Biol. Chem.* 107:629-634 (1934)
- Meyer, K.: The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* 27:335-359 (1947)
- Micromass: Back to Basics. CD-ROM, Version 3, Manchester, UK (2000)
- Mikelsaar, R.H.; Scott, J.E.: Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconjugate J.* 11:65-71 (1994)
- Montaudo, G.; Montaudo, M.S.: Polymer characterization methods. In: Montaudo, G., Lattimer, R.P. (Hrsg.), *Mass spectrometry of Polymers*, CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 41-111 (2002)
- Montaudo, G.; Montaudo, M.S.; Samperi F.: Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of Polymers (MALDI-MS). In: Montaudo, G., Lattimer, R.P. (Hrsg.), *Mass spectrometry of Polymers*, CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 419-521 (2002)
- Montesano, R.; Kumar, S.; Orci, L.; Pepper, M.S.: Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro. *Lab. Invest.* 75:249-262 (1996)
- Mörner, C.T.: Untersuchung der Proteinstoffen in den lichtbrechenden Medien des Auges. *Z. Physiol. Chem.* 18:233-256 (1894)
- Moseley, M.A.; Deterding, L.J.; Tomer, K.B.; Jorgenson, J.W.: Determination of bioactive peptides using capillary zone electrophoresis/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 63:109-114 (1991)
- Nebinger, P.; Koel, M.; Franz, A.; Werries, E.: High-performance liquid chromatographic analysis of even- and odd-numbered hyaluronate oligosaccharides. *J. Chromatogr.* 265:19-25 (1983)
- Niessen, W.M.A.; van der Hoeven, R.A.M.; van der Greef, J.; Schols, H.A.; Lucas-Lokhorst, G.; Voragen, A.G.J.; Bruggink, C.: High-performance anion-exchange chromatography/thermospray mass spectrometry in the analysis of oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6:474-478 (1992)

- Noble, P.W.; McKee, C.M.; Horton, M.R.: Induction of inflammatory gene expression by low-molecular-weight hyaluronan fragments in macrophages. In: Laurent, T.C. (Hrsg.), *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*, Portland Press Ltd, London, UK, S. 219-225 (1998)
- Oettl, M.; Hoechstetter, J.; Asen, I.; Bernhardt, G.; Buschauer, A.: Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from streptococcus agalactiae in pharmaceutical preparations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 18:267-277 (2003)
- Olivares, J.A.; Nguyen, N.T.; Yonker, C.R.; Smith, R.D.: On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 59:1230-1232 (1987)
- Ozegowski, J.H.; Günther, E.; Reichardt, W.: Purification and characterization of hyaluronidase from streptococcus agalactiae. *Zbl. Bakt.* 280:497-506 (1994)
- Ozegowski, J.H.; Müller, P.J.; Härtl, A.; Kietzmann, M.: Use of an enzyme for the improvement of the tissue absorption of drugs. *Ger. Offen.* DE 199 63 538 A1 (2001)
- Ozegowski, J.H.; Müller, P.J.; Härtl, A.; Hertel, W.: Pharmaceutical formulations containing hyaluronate lyase for softening connective tissues. *Ger. Offen.* DE 101 03 271 A1 (2002)
- Park, Y.; Cho, S.; Linhardt, R.J.: Exploration of the action pattern of streptomyces hyaluronate lyase using high-resolution capillary electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 1337:217-226 (1997)
- Paul, W.: Elektromagnetische Käfige für geladene und neutrale Teilchen (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* 102:780-789 (1990)
- Payan, E.; Jouzeau, J.Y.; Lapicque, F.; Muller, N.; Payan, J.P.; Gegout, P.; Bertin, P.; Netter, P.: Assay of synovial fluid hyaluronic acid using high-performance liquid chromatography of hyaluronidase digests. *J. Chromatogr.* 566:9-18 (1991)
- Payan, E.; Presle, N.; Lapicque, F.; Jouzeau, J.Y.; Bordji, K.; Oerther S.; Miralles G.; Mainard, D.; Netter, P.: Separation and quantification by ion-association capillary zone electrophoresis of unsaturated disaccharide units of chondroitin sulfates and oligosaccharides derived from hyaluronan. *Anal. Chem.* 70:4780-4786 (1998)
- Phillips, G.O.: Degradation of hyaluronan systems by free radicals. In: Laurent, T.C. (Hrsg.), *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*, Portland Press Ltd, London, UK, S. 93-111 (1998)
- Plätzer, M.; Ozegowski, J.H.; Neubert, R.H.H.: Quantification of hyaluronan in pharmaceutical formulations using high performance capillary electrophoresis and the modified uronic acid carbazole reaction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21:491-496 (1999)
- Plätzer, M.: Einsatz moderner Analysenmethoden in der Biopharmazie-Kapillarelektrophoretische Untersuchungen und Kopplung zwischen Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie. *Berichte aus der Pharmazie*, Shaker Verlag, Aachen (2002)
- Prebyl, B.S.; Kaczmarek, C.; Tuinman, A.A.; Baker, D.C.: Characterizing the electrospray-ionization mass spectral fragmentation pattern of enzymatically derived hyaluronic acid oligomers. *Carbohydr. Res.* 338:1381-1387 (2003)
- Prehm, P.: Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase. *Biochem. J.* 211:181-189 (1983a)
- Prehm, P.: Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanism of chain growth. *Biochem. J.* 211:191-198 (1983b)

- Prehm, P.: Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.* 220:597-600 (1984)
- Prehm, P.: Hyaluronan. In: Vandamme, E.J., De Baets, S., Steinbüchel, A. (Hrsg.), *Biopolymers*, vol. 5, Polysaccharides 1, Polysaccharides from Prokaryotes. WILEY-VCH, Weinheim, S. 379-406 (2002)
- Presti, D.; Scott, J.E.: Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH \cdot) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass. *Cell Biochem. Funct.* 12:281-288 (1994)
- Prestwich, G.D.; Marecak, D.M.; Marecek, J.F.; Vercruyse, K.P.; Ziebell, M.R.: Chemical modification of hyaluronic acid for drug delivery, biomaterials and biochemical probes. In: Laurent, T.C. (Hrsg.), *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*, Portland Press Ltd, London, UK, S. 43-65 (1998)
- Price, K.N., Tuinman, A.; Baker, D.C.; Chisena, C.; Cysyk, R.L.: Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: Observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units. *Carbohydr. Res.* 303:303-311 (1997)
- Pritchard, D.G.; Lin, B.: Group B streptococcal neuraminidase is actually a hyaluronidase. *Infect. Immun.* 61:3234-3239 (1993)
- Pritchard, D.G.; Lin, B.; Willingham, T.R.; Baker, J.R.: Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* 315:431-437 (1994)
- Pritchard, D.G.; Trent, J.O.; Zhang, P.; Egan, M.L.; Baker, J.R.: Characterization of the active site of group B streptococcal hyaluronan lyase. *Proteins* 40:126-134 (2000)
- Raab, W.; Kindl, U.: *Pflegekosmetik. Ein Leitfaden. 2., überarb. u. erw. Aufl.*, G. Fischer Stuttgart, Govi-Verlag, Frankfurt/Main (1997)
- Raith, K.: Hyphenation of ACE with mass spectrometry. In: Neubert, R.H.H., Rüttinger, H.H. (Hrsg.), *Affinity capillary electrophoresis in pharmaceutics and biopharmaceutics, Drugs and the pharmaceutical sciences*, vol. 128, Marcel Dekker, Inc., New York, S. 329-349 (2003)
- Reháková, M.; Bakoš, D.; Soldán, M.; Vizárová, K.: Depolymerization reactions of hyaluronic acid in solution. *Int. J. Macromol.* 16:121-124 (1994)
- Rhomberg, A.J.; Biemann, K.: Mass spectrometric analysis of highly acidic polysaccharides. In: Jackson, P. (Hrsg.), *A laboratory guide to glycoconjugate analysis*, BioMethods, vol. 9, Birkhäuser Verlag, Basel, S. 77-89 (1997)
- Roboz, J.; Chahinian, A.P.; Holland J.F.; Silides, D.; Szrajer, L.: Early diagnosis and monitoring of transplanted human malignant mesothelioma by serum hyaluronic acid. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:924-928 (1989)
- Rodig, H.; Ozegowski, J.H.; Peschel, G.; Müller, P.J.: Complementary characterization of a hyaluronic acid splitting enzyme from streptococcus agalactiae. *Zbl. Bakt.* 289:835-843 (1999)
- Rosen, M.J.; Sulthana, S.B.: The interaction of alkylglycosides with other surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* 239:528-534 (2001)
- Rüttinger, H.H.; Radschuweit, A.: Determination of peroxides by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *J. Chromatogr. A* 868:127-134 (2000)

- Rüttinger, H.H.; Trommer, H.: Hyaluronsäure als Radikalfänger. In: Wohlrab, W., Neubert, R.H.H., Wohlrab, J. (Hrsg.), Hyaluronsäure und Haut, Trends in clinical and experimental dermatology, vol. 3, Shaker Verlag, Aachen, S. 266-286 (2004)
- Ryan, L.D.; Kaler, E.W.: Microstructure properties of alkyl polyglucoside microemulsions. *Langmuir* 15:92-101 (1999)
- Schiller, J.; Arnhold, J.; Benard, S.; Reichl, S.; Arnold, K.: Cartilage degradation by hyaluronate lyase and chondroitin ABC lyase: a MALDI-TOF mass spectrometric study. *Carbohydr. Res.* 318:116-122 (1999)
- Schmid, K.H.; Fabry, B.; Westfechtel, A.; Koester, J.; Behler, A.: Cosmetic and/or pharmaceutical preparations containing dicarboxylic acid monoesters and alkyl/alkenyl oligoglycosides. *Ger. Offen.* DE 199 45 577 A1 (2001)
- Schmidt, C.: Synthese von Tensiden auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen-Neue einheitliche Alkylglucosid-Leitstrukturen mit optimierter Struktur-Wirkungs-Beziehung. *Konstanzer Dissertationen*, Bd. 568, Hartung-Gorre Verlag, Konstanz (1999)
- Schulte, J.; Enders, S.; Quitzsch, K.: Rheological studies of aqueous alkylpolyglucoside surfactant solutions. *Colloid Polym. Sci.* 277:827-836 (1999)
- Scott, J.E.; Heatley, F.; Hull, W.E.: Secondary structure of hyaluronate in solution. *Biochem. J.* 220:197-205 (1984)
- Scott, J.E.: Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. In: Evered, D. (Hrsg.), The biology of hyaluronan, Ciba Foundation Symposium 143, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, S. 6-20 (1989)
- Scott, J.E.; Cummings, C.; Brass, A.; Chen, Y.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. *Biochem. J.* 274:699-705 (1991)
- Scott, J.E.: Chemical morphology of hyaluronan. In: Laurent, T.C. (Hrsg.), The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives, Portland Press Ltd, London, UK, S. 7-15 (1998)
- Siethoff, C.; Nigge, W.; Linscheid, M.: Characterization of a capillary zone electrophoresis/electrospray-mass spectrometry interface. *Anal. Chem.* 70:1357-1361 (1998)
- Sipos, P.; St. Pierre, T.G.; Tombacz, E.; Webb, J.: Rod-like iron(III) oxyhydroxide particles in iron(III)-polysaccharide solutions. *J. Inorg. Biochem.* 58:129-138 (1995)
- Shimada, E.; Matsumara, G.: Degradation Process of hyaluronic acid by streptomyces hyaluronidase. *J. Biochem.* 88:1015-1023 (1980)
- Shimada, E.; Matsumara, G.: Thin-layer chromatography of hyaluronate oligosaccharides. *J. Biochem.* 96:721-725 (1984)
- Shimada, E.; Matsumara, G.: Comparison of relationships between the chemical structures and mobilities of hyaluronate oligosaccharides in thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 328:73-80 (1985)
- Smith, R.D.; Barinaga, C.J.; Udseth, H.R.: Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 60:1948-1952 (1988)
- Spilker, R.; Menzebach, B.; Schneider, U.; Venn, I.: Analytik von Alkylpolyglucosiden. *Tenside Surf. Det.* 33:21-25 (1996)

- Steber, J.; Guhl, W.; Stelter, N.; Schröder, F.R.: Alkyl polyglycosides-ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. *Tenside Surf. Det.* 32:515-521 (1995)
- Sudor, J.; Novotny, M.V.: End label free-solution electrophoresis of the low molecular weight heparins. *Anal. Chem.* 69:3199-3204 (1997)
- Suzuki, S.; Honda, S.: A tabulated review of capillary electrophoresis of carbohydrates. *Electrophoresis* 19:2539-2560 (1998)
- Takagaki, K.; Kojima, K.; Majima, M.; Nakamura, T.; Kato, I.; Endo, M.: Ion-spray mass spectrometric analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Glycoconjugate J.* 9:174-179 (1992)
- Termeer, C.C.; Hennies, J.; Voith, U.; Ahrens, T.; Weiss, J.M.; Prehm, P.; Simon, J.C.: Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J. Immunol.* 165:1863-1870 (2000)
- Toida, T.; Linhardt, R.J.: Detection of glycosaminoglycans as a copper (II) complex in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 17:341-346 (1996)
- Toole, B.P.: Hyaluronan is not just a goo! *J. Clin. Invest.* 106:335-336 (2000)
- Trabucchi, E.; Pallotta, S.; Morini, M.; Corsi, F.; Franceschini, R.; Casiraghi, A.; Pravettoni, A.; Foschi, D.; Minghetti, P.: Low molecular weight hyaluronic acid prevents oxygen free radical damage to granulation tissue during wound healing. *Int. J. Tissue React.* 24:65-71 (2002)
- Trimpin, S.; Rouhanipour, A.; Az, R.; Räder, H.J.; Müllen, K.: New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15:1364-1373 (2001)
- Trommer, H.: Untersuchungen zum Mechanismus des oxidativen Stresses an verschiedenen Lipid-Modellsystemen. *Edition Wissenschaft, Reihe Pharmazie*, Bd. 33, Tactum Verlag, Marburg (2002)
- Trommer, H.; Wartewig, S.; Böttcher, R.; Pöppel, A.; Hoentsch, J.; Ozegowski, J.H.; Neubert, R.H.H.: The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation. *Int. J. Pharm.* 254:223-234 (2003a)
- Trommer, H.; Kühn, A.V.; Mrestani, Y.; Neubert, R.H.H.: Hyaluronsäure-Viel mehr als nur Gelenkschmiere. *Pharm. Ztg.* 36:16-25 (2003b)
- van der Hoeven, R.A.M.; Niessen, W.M.A.; Schols, H.A.; Bruggink, C.; Voragen, A.G.J.; van der Greef, J.: Characterization of sugar oligomers by on-line high-performance anion-exchange chromatography-thermospray mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 627:63-73 (1992)
- Venbrocks, R.; Roth, A.; Müller, P.J.; Moeller, S.; Ozegowski, J.H.; Peschel, G.: Use of hyaluronic acid derivatives for the prevention of inflammatory arthritis. *Ger. Offen.* DE 100 53 053 A1 (2002)
- Vercruyse, K.P.; Lauwers, A.R.; Demeester, J.M.: Kinetic investigation of the degradation of hyaluronan by hyaluronidase using gel permeation chromatography. *J. Chromatogr. B* 656:179-190 (1994)
- Volpi, N.: Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by high performance liquid chromatography and fluorimetric detection with dansylhydrazine. *Anal. Biochem.* 277:19-24 (2000)

- von Brocke, A.; Graeme N.; Bayer, E.: Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* 22:1251-1266 (2001)
- von Rybinski, W.; Hill, K.: Alkyl polyglycosides-properties and applications of a new class of surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:1328-1345 (1998)
- von Rybinski, W.; Guckenbiehl, B.; Tesmann, H.: Influence of co-surfactants on microemulsions with alkyl polyglycosides. *Colloids Surf. A* 142:333-342 (1998)
- Wätzig, H.: Die Kapillarelektrophorese-eine leistungsfähige analytische Trenntechnik. In: Günzler, H., u.a. (Hrsg.), *Analytiker Taschenbuch*, Bd. 21, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S.117-147 (2000)
- Werner, H.; Heizmann, W.R.; Döller, P.C.: *Medizinische Mikrobiologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart, S. 100-112 (1991)
- West, D.C.; Hampson, I.N.; Arnold, F.; Kumar, S.: Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 228:1324-1326 (1985)
- Whitfield, D.M.; Stojkovski, S.; Pang, H.; Baptista, J.; Sarkar, B.: Diagnostic methods for the determination of iduronic acid in oligosaccharides. *Anal. Biochem.* 194:259-267 (1991)
- Wik, H.B.; Wik, O.: Rheology of hyaluronan. In: Laurent, T.C. (Hrsg.), *The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*, Portland Press Ltd, London, UK, S. 25-32 (1998)
- Willoghby, R.; Sheehan, E.; Mitrovich, S.: *A Global View of LC/MS*; Global View Publishing; Pittsburgh, Pennsylvania (1998)
- Winter, W.T.; Smith, P.J.C.; Arnott, S.: Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4-fold helical forms. *J. Mol. Biol.* 99:219-235 (1975)
- Wohlrab, W.; Neubert, R.; Huschka, C.; Müller, P.J.; Ozegowski J.H.; Koegst, D.; Fries, G.: Skin protection agents containing a fragment mixture produced from hyaluronic acid by hydrolysis. *PCT Int. Appl.* EP 1 140 006 B1 (2000)
- Yeung, B.; Marecak, D.: Molecular weight determination of hyaluronic acid by gel filtration chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J.Chromatogr. A* 852:573-581 (1999)
- Zamfir, A.; König, S.; Althoff, J.; Peter-Katalinic, J.: Capillary electrophoresis and off-line capillary electrophoresis-electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry of carbohydrates. *J. Chromatogr. A* 895:291-299 (2000)
- Zamfir, A.; Peter-Katalinic, J.: Glycoscreening by on-line sheathless capillary electrophoresis/electrospray ionization-quadrupole time of flight-tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 22:2448-2457 (2001)
- Zemann, A.; Nguyen, D.T.; Bonn, G.: Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18:1142-1147 (1997)

6. Anlagen (veröffentlichte Originalarbeiten)

- 6.1 Kühn, A.V.; Raith, K.; Sauerland, V.; Neubert, R.H.H.: Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30:1531-1537 (2003)
- 6.2 Kühn, A.V.; Rüttinger, H.H.; Neubert, R.H.H.; Raith, K.: Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis with electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17:576-582 (2003)
- 6.3 Kühn, A.V.; Ozegowski, J.H.; Neubert, R.H.H.: Behaviour of 4,5-unsaturated hyaluronic acid oligosaccharides under electrospray ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18:733-734 (2004)
- 6.4 Kühn, A.V.; Ozegowski, J.H.; Peschel, G.; Neubert, R.H.H.: Complementary exploration of the action pattern of hyaluronate lyase from streptococcus agalactiae using capillary electrophoresis, gel-permeation chromatography and viscosimetric measurements. *Carbohydr. Res.* 339:2541-2547 (2004)
- 6.5 Kühn, A.V.; Neubert, R.H.H.: Characterization of mixtures of alkyl polyglycosides (Plantacare) by liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Pharm. Res.* 21:2348-2354 (2004)

Weitere Veröffentlichungen:

Raith, K.; Kühn, A.V.; Rosche, F.; Wolf, R.; Neubert, R.H.H.: Characterization of povidone products by means of ^{13}C -NMR, MALDI-TOF, and electrospray mass spectrometry. *Pharm. Res.* 19:556-560 (2002)

Kühn, A.V.; Kiessig, S.; Thunecke, F.: Characterization of immunoreactions. In: Neubert, R.H.H., Rüttinger, H.H. (Hrsg.), *Affinity capillary electrophoresis in pharmaceuticals and biopharmaceuticals, Drugs and the pharmaceutical sciences*, vol. 128, Marcel Dekker, Inc., New York, S. 303-327 (2003)

Trommer, H.; Kühn, A.V.; Mrestani, Y.; Neubert, R.H.H.: Hyaluronsäure-Viel mehr als nur Gelenkschmiere. *Pharm. Ztg.* 36:16-25 (2003)

Kühn, A.V.; Mrestani, Y.; Neubert, R.H.H.: Analytik von Hyaluronsäure. In: Wohlrab, W., Neubert, R.H.H., Wohlrab, J. (Hrsg.), *Hyaluronsäure und Haut, Trends in clinical and experimental dermatology*, vol. 3, Shaker Verlag, Aachen, S. 105-128 (2004)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Personen bedanken, die wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen oder mich in den letzten Jahren unterstützt haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. R. Neubert für die Vergabe dieses interessanten Forschungsthemas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die großen Freiheiten bei der Bearbeitung des Themas bedanken.

Von besonderer Bedeutung war die Kooperation mit Herrn Dr. J. Ozegowski (Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena) und Frau Dr. G. Peschel (Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Jena), die durch die Durchführung des enzymatischen Abbaus von Hyaluronsäure, die GPC-MALLS Untersuchungen und die zahlreichen konstruktiven Diskussionen einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Mein Dank gilt auch Dr. K. Raith, der für Fragen zu theoretischen Aspekten der Arbeit immer ein offenes Ohr hatte.

PD Dr. H. Rüttinger (Institut für Pharmazeutische Chemie der MLU) danke ich für die Anregungen zu den kapillarelektrophoretischen Messungen, sowie Dr. V. Sauerland (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) für die Durchführung der MALDI-MS und Dr. K. Schröter (Fachgruppe experimentelle Polymerphysik des Fachbereichs Physik der MLU) für die Möglichkeit zur Durchführung der Viskositätsmessungen.

Herzlich gedankt sei an dieser Stelle Frau M. Woigk für ihre Hilfe bei der Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen sowie Frau S. Todte, die mich bei Viskositätsmessungen unterstützt hat.

Dank sagen möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biopharmazie, insbesondere Iris Hinneburg, Johanna Müller, Petra Fechner und Christian Schmelzer für ihre stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dem Land Sachsen-Anhalt danke ich für das mir gewährte Stipendium (Graduiertenförderung).

Meiner Familie und Ingo möchte ich danken für ihren Zuspruch, ihre Geduld und ihre stetige Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name Andrea Vera Kühn
Geburtsdatum 02.11.1975
Geburtsort Würzburg
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch
Eltern Margot Kühn, geb. Lehmann, Diplom-Chemikerin
Dr. Alfred Kühn, Chemiker

Schulbildung

1982-1986 Grundschule Edwin-Scharff-Ring, Hamburg
1986-1995 Gymnasium Grootmoor, Hamburg
1995 Abitur

Studium

1995-1999 Pharmaziestudium an der Universität Hamburg
20.03. 1998 1. Staatsexamen
Seit dem 5. Semester Leitung eines Tutoriums zur „Qualitativen Anorganischen Analyse“
12.10.1999 2. Staatsexamen
01.11.1999-30.04.2000 Pharmaziepraktikum in der Montfort-Apotheke, Langenargen, Bodensee
01.05.2000-31.10.2000 Pharmaziepraktikum am Arzneimitteluntersuchungs-institut AMI-Nord, Bremen
19.12.2000 3. Staatsexamen
04.01.2001 Approbation als Apothekerin

Promotion

01.02.2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der MLU Halle-Wittenberg
Stipendiatin der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt
Seit 02/01 Weiterbildung zur „Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik“

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Absatz 2b der Promotionsordnung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Bereiches der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Andrea Kühn

Halle (Saale), den 26.07.2004