BEITRÄGE ZUR ANWENDUNG DER MASSENSPEKTROMETRIE IN DER LIPIDANALYTIK

Dissertation

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Herrn Klaus Raith
geb. am 09.03.1971 in Sömmerda

Gutachter:
1. Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. rer. nat. Peter Nuhn
3. Prof. Dr. rer. nat. Michael W. Linscheid

Halle (Saale), den 5. Mai 1999

Dank

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Reinhard Neubert, danke ich für die interessante Aufgabenstellung, sein großes Engagement zur Schaffung guter Arbeitsbedingungen, die ständige Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für das in mich gesetzte Vertrauen.

Frau Manuela Woigk bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Durch ihre tatkräftige und versierte Mithilfe hat sie wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herr Bui Duc Hanh war stets hilfsbereit bei Computerproblemen aller Art.

Dr. Jörg Darius (Institut für Klinische Pharmakologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) danke ich für die Möglichkeit, GC/MS-Untersuchungen durchzuführen.

Dr. Sebastian Zellmer (Institut für Physiologische Chemie) spreche ich meinen Dank aus für die Durchführung der Lipidextraktfraktionierung mit Hilfe der AMD-HPTLC.

Raik Wolf (Probiodrug, Halle) danke ich für drei Jahre gute Zusammenarbeit sowie für Messungen am Triple-Quadrupol-MS.

Dr. Heiko Schinke (Institut für Pharmazeutische Chemie) hat die im Grundlagenteil gezeigten Molekülmodelle berechnet.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biopharmazie gilt mein Dank für das angenehme Arbeitsklima.

Der Landesgraduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt danke ich für ein 2 ½ jähriges Stipendium.

Inhaltsübersicht

1 Einleitung und Zielstellung 7

2 Grundlagen 10

2.1 Lipide 10

2.1.1 Überblick und Einteilung 10

2.1.2 Lipide im Stratum corneum 14

2.1.3 Lipidextraktion 19

2.2 Methoden zur analytischen Trennung 19

2.2.1 Gaschromatographie (GC) 20

2.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) 21

2.2.3 Kapillarelektrophorese (CE) 22

2.3 Massenspektrometrie (MS) 24

2.3.1 Ionisationstechniken 25

2.3.2 Massenanalysatoren 29

2.3.2.1 Einfacher Quadrupol 29

2.3.2.2 Triple Quadrupol 31

2.3.2.3 Ionenfalle 32

2.3.2.4 Andere Massenanalysatoren 33

2.4 Kopplungsmethoden 34

2.4.1 GC/MS 34

2.4.2 LC/MS 34

2.4.3 CE/MS 36

3 Materialien und Methoden 38

3.1 Chemikalien 38

3.2 Gewinnung humaner Stratum-corneum-Ceramide 39

3.3 CE/MS 40

3.4 LC/MS 43

3.5 GC/MS 46

3.6 MS/MS und MS^n 47

4 Ergebnisse und Diskussion 49

4.1 Phospholipide 49

4.1.1 Analytische Trennung durch Nichtwäßrige Kapillarelektrophorese mit massenspektrometrischer Detektion 49

4.1.2 Trennung und Quantifizierung mittels LC/MS 52
4.1.3 Strukturuntersuchungen mittels Elektrospray-Massenspektrometrie 56
4.2 Ceramide 61
4.2.1 Analytische Trennung 61
4.2.1.1 LC/MS 62
4.2.1.2 GC/MS 68
4.2.2 Strukturuntersuchungen mittels Elektrospray-Massenspektrometrie 73
4.2.3 Untersuchung von Ceramiden des menschlichen Stratum corneum 84
4.3 Cholesterolsulfat 89
5 Zusammenfassung und Ausblick 98
6 Literaturverzeichnis 103

Abkürzungsverzeichnis

AMD	Automated Multiple Development (Automatische Mehrfachentwicklung)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
CEC	Capillary Electrochromatography (Kapillarelektrochromatographie)
CI	Chemical Ionisation (Chemische Ionisation)
CID	Collision-Induced Dissociation (Kollisionsinduzierte Fragmentierung)
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (Kapillarzonenelektrophorese)
EI	Electron Impact (Elektronenstoß)
ESI	Electrospray Ionization (Elektrospray-Ionisation)
GC	Gas Chromatography (Gaschromatographie)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchr.)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography (Hochleistungsdünnschichtchr.)
ID	Innendurchmesser
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
Δm	Massendifferenz
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (Matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisation)
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography (Mizellare Elektrokinetische Chromat.)
MS	Mass Spectrometry (Massenspektrometrie)
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry (Tandem-Massenspektrometrie)
MS^n	Multiple Mass Spectrometry (Mehrfach-Massenspektrometrie)
RP	Reversed Phase (Umkehrphasen-)
RSD	Relative Standard Deviation (Relative Standardabweichung)
SC	Stratum corneum
SIM	Selected Ion Monitoring (Scannen einzelner Massenspuren)
S/N	Signal-to-Noise (Signal/Rausch-Verhältnis)
SRM	Selected Reaction Monitoring (Scannen bestimmter Fragmentierungsprodukte)
TEWL	Transepidermal Water Loss (Transepidermaler Wasserverlust)
TLC	Thin Layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie, DC)
TOF	Time of Flight (Flugzeit)

1 Einleitung und Zielstellung

Lipide sind neben Kohlenhydraten, Proteinen und Nukleinsäuren eine der großen Naturstoffklassen, die in jeder lebenden Zelle vorkommen. Sie erfüllen mannigfaltige Funktionen.

Von besonderem Interesse für die Forschung sind die Lipide in der Haut, insbesondere in der Epidermis. Während das Lipidmuster in tiefer gelegenen Hautschichten dem anderer Gewebe ähnelt, ist es im Stratum corneum, der obersten Hornschicht, einzigartig in seiner Zusammensetzung. Die dort befindlichen interzellulären Lipiddomänen sichern die Barrierefunktion des Stratum corneum gegen den transepidermalen Wasserverlust einerseits und die Einwirkung von schädigenden Einflüssen aus der Umwelt andererseits. Dadurch wird die Existenz von höheren Lebensformen auf dem Festland erst ermöglicht. Den Ceramiden kommt dabei eine Schlüsselrolle zu. Die Lipidzusammensetzung unterscheidet sich bei verschiedenen Spezies, aber auch bezüglich des jeweiligen Körperareals, des Differenzierungsgrades usw. Weiterhin weist mittlerweile eine Vielzahl von Befunden darauf hin, daß bei verschiedenen Erkrankungen der Haut, von denen hier nur die Psoriasis und die atopische Dermatitis exemplarisch genannt seien, ein verändertes Lipidmuster auftritt. Dies begründet das enorme dermatologische Interesse an der Erforschung der Hautlipide. Eng damit verzahnt ist ein pharmazeutischer Aspekt, der einerseits darin besteht, das Lipidmuster therapeutisch positiv zu beeinflussen und andererseits den Einfluß der Lipide auf die Penetration und Permeation topisch applizierter Arzneistoffe aufzuklären hat. Aber auch die kosmetische Industrie hat die Bedeutung der Hautlipide erkannt und treibt die Forschung zur Optimierung ihrer Produkte voran.

Grundlage und Voraussetzung für die Erforschung der Lipide ist eine leistungsfähige Analytik. Betrachtet man die wichtigsten Lipidklassen unter pragmatischen analytischen Gesichtspunkten, so fallen bei aller strukturellen Vielfalt drei Punkte auf:

- die Vielzahl ähnlicher oder homologer Verbindungen,
- die geringe Anzahl funktioneller Gruppen, verbunden mit einem relativ inerten chemischen Verhalten,
- das weitgehende Fehlen von Chromophoren, Fluorophoren und UV-absorbierenden Strukturelementen.

Daher verwundert es nicht, daß zahlreiche analytische Methoden nicht oder nur sehr begrenzt für Lipide geeignet sind.

Im ersten Schritt müssen die Lipide aus biologischem Material extrahiert werden. Wenn sie in Gewebe vorliegen, wird meist die Flüssigphasenextraktion angewandt, während sich zur Gewinnung aus wäßrigen biologischen Flüssigkeiten die Festphasenextraktion anbietet.
Zur Trennung von Lipidgemischen sollen als inzwischen klassische Methoden die Dünnschichtchromatographie und die Gaschromatographie genannt werden. Auch die Hochleistungsflüssigchromatographie, die zur wichtigsten chromatographischen Methode geworden ist, findet eine immer breitere Anwendung.
Die Massenspektrometrie hat in den letzten Jahren eine außerordentlich dynamische Entwicklung durchlaufen. Während die klassische Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation seit vielen Jahren neben der Schwingungs- und der Kernmagnetischen Resonanzspektroskopie eine zentrale Rolle bei der Identifizierung und Strukturaufklärung organischer Substanzen sowie als spezifischer Detektor in der Gaschromatographie spielt, ist die Elektrospray-Massenspektrometrie erst in den letzten Jahren immer stärker ins Blickfeld gerückt. Unter den verschiedenen Techniken zur Ionisation einer Analytsubstanz aus flüssiger Phase hat sich die Elektrospray-Ionisation eine dominierende Stellung erobert, v.a. beim Einsatz der Massenspektrometrie als Detektor in der Hochleistungsflüssigchromatographie und in der Kapillarelektrophorese.
Da die Energieeinwirkung auf die Moleküle bei der Elektrospray-Ionisation vergleichsweise sehr moderat ist, spricht man von einer sanften Ionisation, die in der Regel nur Molekülionen sowie Addukte, häufig mit ubiquitär vorkommenden Ionen, hervorbringt. Dies ist bezüglich der Strukturinformation gegenüber der Elektronenstoß-MS ein Nachteil, der jedoch durch die Tandem-Massenspektrometrie, die eine gezielte Fragmentierung ausgewählter Ionen ermöglicht, ausgeglichen wird. Allerdings ist die Standardisierung dieser v.a. an Ionenfallen- bzw. Triple-Quadrupol-Massenspektrometern durchgeführten MS/MS-Studien schwieriger und daher längst nicht so weit fortgeschritten wie im Falle der Elektronenstoß-MS.

In [67] werden drei wesentliche Trends in der modernen Lipidanalytik genannt:

- Vereinfachung und Perfektionierung bereits verfügbarer Methoden,
- Miniaturisierung und Empfindlichkeitssteigerung,
- verstärkter Einsatz von Online-Kopplungsmethoden.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand daher darin,

- die Möglichkeiten der Anwendung neuer instrumenteller Methoden in der Lipidanalytik auszuloten,
- spezifische, empfindliche und reproduzierbare Methoden für die Analytik von Hautlipiden, v.a. Ceramiden, zu entwickeln sowie
- die Anwendbarkeit der Methoden auf natürliche Lipidgemische, insbesondere Lipidextrakte aus humanem Stratum corneum, zu demonstrieren.

Im Mittelpunkt des Interesses standen jene Lipidklassen, bei denen die zur Verfügung stehenden klassischen Analysenmethoden nicht voll befriedigen können und somit ein Entwicklungsbedarf besteht.
A priori war dabei keine Beschränkung auf die Massenspektrometrie und ihre Kopplungstechniken vorgesehen, jedoch erwies sie sich als besonders geeignet, einerseits wegen ihrer Spezifität und Empfindlichkeit, andererseits wegen ihrer Koppelbarkeit mit chromatographischen und elektrophoretischen Trennverfahren. Angesichts des Umfangs dieses Gebietes kann die vorliegende Arbeit nur Beiträge liefern und ist dementsprechend überschrieben. Auch der Begriff Anwendung ist bewußt gewählt, denn an einem pharmazeutischen Institut bestand das Ziel nicht vorrangig in gerätetechnischen Verbesserungen. Wenngleich die Elektrospray-Ionisation im Rahmen der Arbeit eine dominierende Rolle spielt, wurde z.T. auch die GC/MS mit Elektronenstoß-Ionisation benutzt, so daß der allgemeine Oberbegriff Massenspektrometrie gewählt wurde.

2 Grundlagen

Im folgenden Teil soll zunächst ein kurzer Überblick über die Lipide gegeben werden. Die untersuchten Substanzklassen der Phospholipide und Ceramide werden dabei kurz vorgestellt. Zusätzlich ist jeweils ein kurzer Verweis auf die gebräuchliche Analytik gegeben. Weiterhin werden das Lipidmuster des Stratum corneum und die Lipidextraktion beschrieben. Im Anschluß folgt eine Einführung zu den benutzten analytischen Methoden, wobei angrenzende Methoden mit erwähnt werden, um die Systematisierung zu erleichtern. Da mehrere Methoden benutzt wurden, die zwar zunehmend Verbreitung finden, aber noch nicht als allgemein bekannt vorausgesetzt werden können, geriet dieser Abschnitt etwas länger als üblich.

2.1 Lipide

2.1.1 Überblick und Einteilung

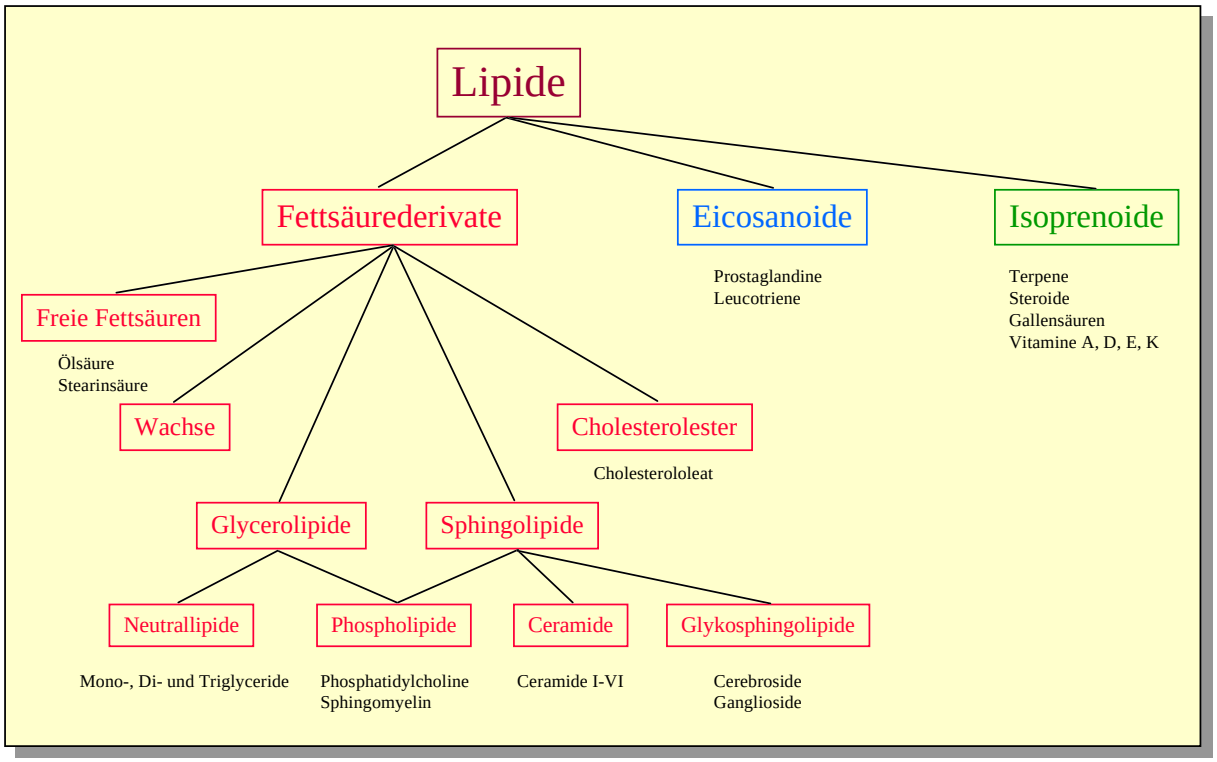


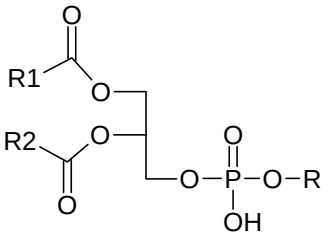
Abb. 1: Übersicht über die Stoffklassen der Lipide mit Beispielen. Fettsäurederivate als Lipide im engeren Sinne sind rot dargestellt.

Zur Definition der Lipide sind zwei unterschiedliche Herangehensweisen möglich. Im weitesten Sinne werden als Lipide alle (biologischen) Substanzen bezeichnet, die sich durch eine gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln auszeichnen [67]. Im engeren Sinne werden dazu all jene Substanzklassen gerechnet, die Derivate langkettiger aliphatischer Carbonsäuren, der Fettsäuren, darstellen [91]. Damit sind auch hydrophilere Substanzen (wie etwa die Ganglioside) mit eingeschlossen, nicht jedoch die strukturell andersartigen Eicosanoide und Isoprenoide. Bei den Eicosanoiden läßt sich freilich darüber diskutieren, ob sie als Fettsäurederivate anzusehen sind, da sie biosynthetisch aus Arachidonsäure gebildet werden und auch noch über eine Carbonsäurefunktion verfügen, jedoch ist die Strukturabwandlung relativ weit gediehen. Die Cholesterolester wiederum können sowohl bei den Isoprenoiden als auch bei den Fettsäurederivaten eingeordnet werden. Abb. 1 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten natürlich vorkommenden Substanzklassen der Lipide.

Für die Analytik von freien oder durch Hydrolyse von komplexen Lipiden gewonnenen **Fettsäuren** steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Die größte Bedeutung hat die Gaschromatographie nach Überführung in die Methylester. Auch mittels HPLC [43,90] und Kapillarelektrophorese (meist mit indirekter UV-Detektion [29,39,97,105]) lassen sich bestimmte Problemstellungen lösen. Kerwin et al. führten Untersuchungen zu ESI-MS und MS/MS von Fettsäuren durch [62].

Die **Phospholipide** sind zweifache Ester der Phosphorsäure einerseits mit einer lipophilen Alkoholkomponente (Diacylglycerole → Glycerophospholipide, N-Acylsphingoide → Sphingomyeline) und andererseits mit einer polaren Kopfgruppe. Sie sind Grundbausteine biologischer Membranen und somit für jede lebende Zelle von essentieller Bedeutung [91]. Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften sind sie befähigt, in wäßrigem Milieu Lipiddoppelschichten, Mizellen und Liposomen auszubilden. Phosphatidylcholine sind bei Tieren und Pflanzen, nicht jedoch bei Bakteri-

Tab. 1: Struktur verschiedener Glycerophospholipide.



Polare Kopfgruppe (R)	Substanzklasse
-H	Phosphatidsäuren
$-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$	Phosphatidylcholine
$-CH_2-CH_2-NH_2$	Phophatidylethanolamine
$-CH_2-CH(COOH)-NH_2$	Phosphatidylserine
$-CH_2-CHOH-CH_2OH$	Phosphatidylglycerole
myo-Inositol	Phosphatidylinositole
Phosphatidylglycerol	Cardiolipine

en, die häufigsten Phospholipide. Sie werden auch als Lecithine bezeichnet. Sie kommen besonders in Nervengewebe und inneren Organen angereichert vor; die Gewinnung erfolgt meist aus Eigelb oder Sojabohnen. Phosphatidylcholine weisen wegen ihrer quarternären Ammoniumstruktur die höchste Polarität auf und lösen sich daher in Alkohol. Für die übrigen Glycerophospholipide ist Chloroform ein geeigneteres Lösungsmittel. Das C-2 des Glycerolrests ist chiral. Per definitionem befindet sich der Phosphorsäureester am C-3. Natürliche Glycerophospholipide sind Derivate des sn-Glycerol-3-phosphats (= L-Glycerol-3-phosphat). Aus Gründen der Vereinfachung wird die stereochemische Bezeichnung im folgenden weggelassen. Tab. 1 faßt die Strukturen der wichtigsten Phosphatidylglycerole zusammen, Abb. 2 zeigt ein Molekülmodell eines typischen Phosphatidylcholins.

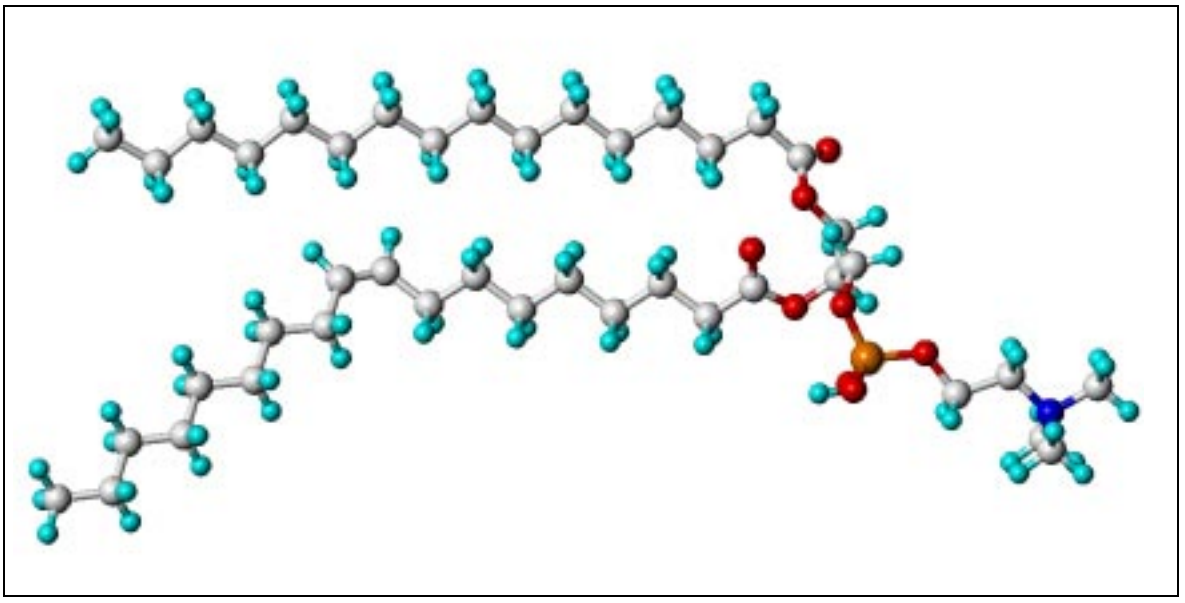


Abb. 2: Molekülmodell von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin. Kohlenstoffatome sind grau, Wasserstoff hellblau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau und Phosphor orange dargestellt.

Zur analytischen Trennung verschiedener Phospholipidklassen stehen eine Reihe dünnschichtchromatographischer Verfahren zur Verfügung (z.B. für die Phospholipide der Epidermis [122]). Zur HPLC siehe 4.1.2, zur Tandem-Massenspektrometrie siehe 4.1.3. Eine Übersicht über die speziesspezifische Analytik der Phospholipide findet sich in [93].

Sphingomyeline besitzen einen N-acylierten Sphingosinrest anstelle des Diacylglycerols und zählen daher zu den **Sphingolipiden**. Sie kommen in den Myelinscheiden der Nerven sowie v.a. im Blutplasma vor. Abb. 3 zeigt ein Molekülmodell von Sphingomyelin.

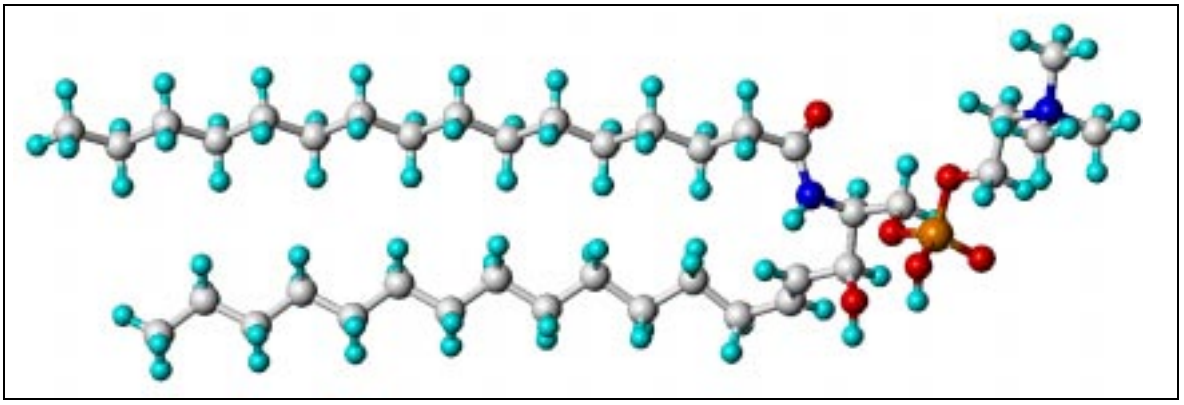


Abb. 3: Molekülmodell von Sphingomyelin.

Die **Ceramide** sind Amide von Fettsäuren mit langkettigen hydroxylierten Aminbasen, den Sphingoiden. Sie spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Gebieten der Biochemie. Zum einen kommen sie in vielen tierischen und pflanzlichen Geweben sowie im Blut zusammen mit ihren Derivaten, den Glykosphingolipiden, vor. In den letzten Jahren wurde ihre Bedeutung als intrazellulärer Botenstoff intensiv untersucht [40,76]. Vor allem aber sind sie integraler Bestandteil der interzellulären Lipiddomänen des Stratum corneum und damit unerläßlich für die Ausbildung der Barrierefunktion, die die Existenz von höheren Lebensformen auf dem Festland erst ermöglicht [36,37,73,110,146] (siehe 2.1.2). Abb. 4 zeigt ein Molekülmodell von N-(2-Hydroxystearoyl)-sphingosin.

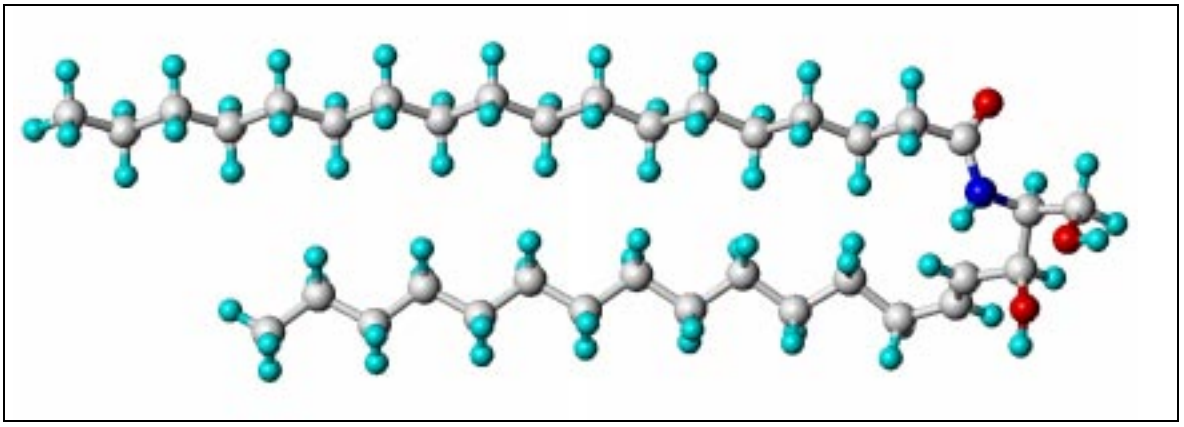


Abb. 4: Molekülmodell von N-Stearoyl-sphingosin.

Ceramide unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Acylkomponenten als auch in ihren langkettigen Basen. Letztere besitzen vier wesentliche Grundstrukturen (siehe Abb. 5).

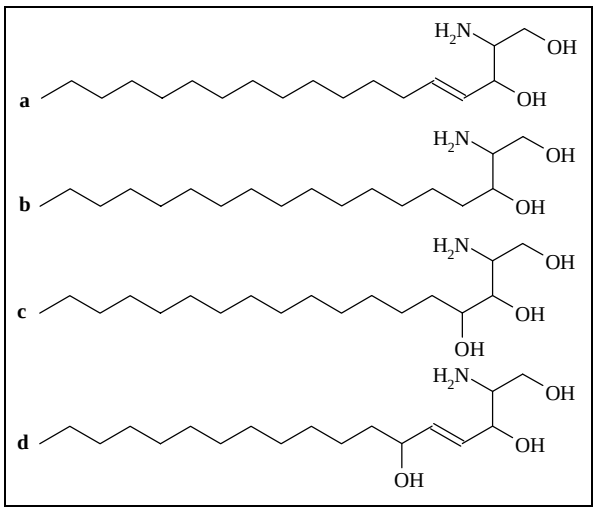


Abb. 5: Strukturen der Sphingoidbasen.
a: Sphingosin (Sphingenin)
b: Sphinganin (Dihydrosphingosin)
c: Phytosphingosin
d: 6-Hydroxysphingosin

In Ceramiden aus Blut und tierischen Geweben kommt vor allem Sphingosin und daneben in geringeren Mengen Sphinganin vor, in pflanzlichem Gewebe zusätzlich Phytosphingosin. Die Doppelbindung im Sphingosin ist stets trans-konfiguriert [56]. C-2, C-3 sowie bei Phytosphingosin auch C-4 sind chiral. Die Kettenlänge beträgt praktisch ausschließlich C-18, lediglich C-20-Homologe kommen in Spuren vor. Dagegen haben die Sphingoidbasen der Ceramide des Stratum corneum eine sehr heterogene Zusammensetzung [132] (siehe 2.1.2).
Zur analytischen Bestimmung der Ceramide wird häufig die HPTLC herangezogen [78,132,95,35], die in der AMD-Technik (Automated Multiple Development) ihren vorläufigen apparativen Höhepunkt gefunden hat. Zur HPLC siehe 4.2.1.1, zur GC siehe 4.2.1.2.

2.1.2 Lipide im Stratum corneum

Die menschliche Haut besteht aus mehreren differenzierten Schichten mit unterschiedlicher Morphologie und Funktion. Von besonderem Interesse ist die lebende Epidermis sowie vor allem das Stratum corneum (SC), dessen Lipidmuster einzigartig ist [68,110]. Folgt man dem Ziegelstein-Mörtel-Modell des Stratum corneum [26], so bilden die Keratinozyten die Ziegelsteine und die Lipide den Mörtel. Obwohl letztere nur etwa 10 % der Trockenmasse des SC ausmachen, sind sie entscheidend für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. Als allgemein akzeptiertes Maß für die Barrierefunktion hat sich die Messung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) etabliert [54].
Die Angaben über die Lipidzusammensetzung schwanken z.T. erheblich. Die Gründe dafür sind vielschichtig. Sehr unterschiedlich ist z.B. die Probengewinnung. Häufig wird in vivo am Probanden eine Extraktion von der Oberfläche her vorgenommen (mit verschiedensten Lösungsmitteln), wobei naturgemäß die äußeren Schichten bevorzugt extrahiert und Oberflächenlipide (Exsudat der Talgdrüsen etc.) mit erfaßt werden. Weiterhin spielen das Körperareal [68] und die Auswahl des Probandenkollektivs eine Rolle.

Auch Abrißtechniken (Klebeband oder Cyanoacrylatharz) oder Ex-vivo-Techniken werden eingesetzt (Verwendung von Operationsresten, Hornhaut von der Fußsohle).

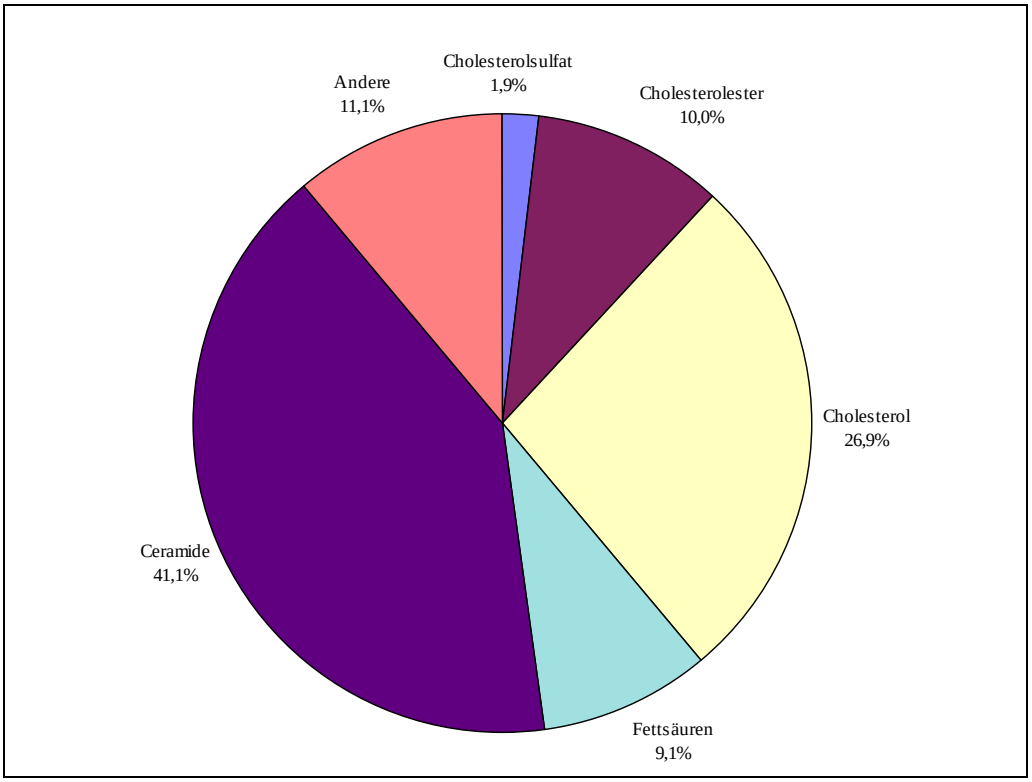


Abb. 6: Lipidzusammensetzung des menschlichen Stratum corneum [133].

Vergleicht man das Lipidmuster des Stratum corneum (siehe Abb. 6) mit dem der anderen, lebenden Gewebe, fällt auf, daß die Menge an Ceramiden, Cholesterol (einschließlich Ester) und freien Fettsäuren deutlich erhöht ist. Diese drei Komponenten sind es, die die Barrierefunktion des Stratum corneum einerseits gegen den transepidermalen Wasserverlust, andererseits gegen äußere Einflüsse, in erster Linie aufrechterhalten. Dagegen sind die polareren Phospho- und Glykolipide zumindest in den äußeren Schichten völlig verschwunden. Es wurde auch innerhalb des SC ein Lipidgradient gefunden, was andeutet, daß durchaus noch eine gewisse metabolische Aktivität vorhanden ist.

Zur Bedeutung der freien Fettsäuren für die Barrierefunktion des SC vgl. [3,110,11].

Besonders interessant sind die Ceramide. Sie wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie in Fraktionen aufgetrennt, denen Strukturen zugeordnet werden konnten [131] (Abb. 7). Daraus wurde eine Einteilungsnomenklatur abgeleitet. Ansteigende römische oder auch arabische Zahlen von 1-6 (bzw. 7) kennzeichnen Fraktionen in der Reihenfolge steigender Polarität. Eine informativere Nomenklatur, die Aussagen zum Fettsäure- und zum Basentyp macht, wurde vorgeschlagen [81,103], hat sich jedoch bisher nicht durchgesetzt.

Bei den Fettsäuren kommen praktisch ausschließlich langkettige, gesättigte Spezies vor, die teilweise an C-2 hydroxyliert sind.

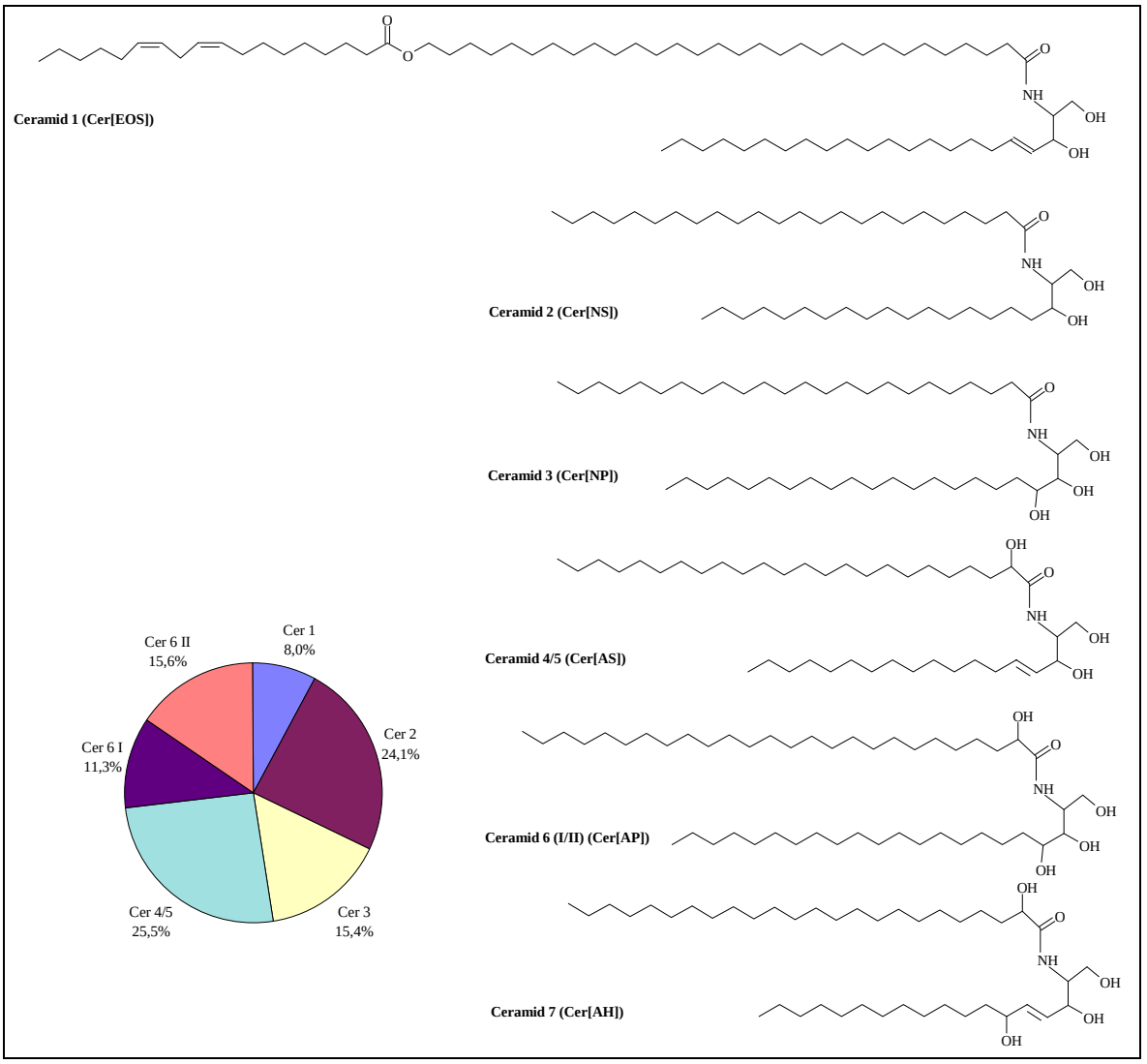


Abb. 7: Ceramide des Stratum Corneum: Strukturen und Häufigkeit. Nomenklatur nach [131] (bzw. [71,103]).

Ceramid 1 stellt eine Besonderheit hinsichtlich der Struktur dar. Die amidartig gebundene Fettsäure weist eine ω-Hydroxygruppe auf, an die eine weitere, meist ungesättigte Fettsäure esterartig angeknüpft ist. Bei den langkettigen Basen kommen meist Sphingosin-, aber auch Sphinganin-Homologe vor.

Ceramid 2 ist eine Fraktion, die aus nichthydroxylierten Fettsäuren und Sphinganin- oder Sphingosinbasen gebildet wird.

Ceramid 3 enthält ebenfalls nichthydroxylierte Fettsäuren, jedoch Phytosphingosinbasen, die keine Doppelbindung enthalten.

Ceramid 4 und 5 enthalten 2-Hydroxyfettsäuren und vornehmlich Sphingosin-Homologe, aber auch Sphinganine wurden gefunden. Die Aufteilung in zwei Fraktionen resultierte vermutlich daraus, daß größere Unterschiede in der Kettenlänge zu einer Doppelbande bei der HPTLC führten. Da die Grundstruktur identisch ist, können Ceramid 4 und 5 zusammengefaßt betrachtet werden.

Ceramid 6 erbrachte ebenfalls eine Doppelbande. Es erfolgte eine nomenklatorische Aufteilung in 6I und 6II (oder 6a und 6b). Während für Ceramid 6II korrekt 2-Hydroxyfettsäuren und Phytosphingosinbasen zugeordnet wurden, gab es für Ceramid 6I verschiedene Strukturvorschläge. Häufig wurde eine Struktur postuliert, bei der die Hydroxygruppe an C-4 des Phytosphingosins eine weitere 2-Hydroxyfettsäure trägt [73]. Vermutlich resultierte die Aufspaltung ähnlich wie bei Ceramid 4 und 5 lediglich aus größeren Kettenlängendifferenzen. Hingegen erbrachten spätere Arbeiten den Nachweis für die Existenz von **Ceramid 7**, welches ebenfalls 2-Hydroxyfettsäuren enthält, jedoch 6-Hydroxysphingosin-Homologe als langkettige Basen [103].

Zur Strukturaufklärung wurden die Ceramide hydrolysiert und die Fettsäuren und langkettigen Basen einzeln gaschromatographisch analysiert. In [132] finden sich Angaben zur Häufigkeit des Vorkommens dieser Komponenten in 6 Ceramidfraktionen. Abb. 8 a und b vermitteln am Beispiel von Ceramid 2 einen Eindruck von der außerordentlichen Variabilität der Ketten. Nach der getrennten Analytik von Fettsäuren und langkettigen Sphingoidbasen konnte keine Aussage gemacht werden über die Kombination der Komponenten. Wenn diese statistisch erfolgt, ergäbe sich allein bei Berücksichtigung der in [132] eindeutig identifizierten Komponenten die riesige Zahl von 2377 möglichen Ceramiden.

Eine Reihe von Arbeiten gibt Hinweise auf Veränderungen der Ceramide bei verschiedenen Krankheitsbildern. So wurde bei Psoriasis ein geringerer Anteil phytosphingosinhaltiger Ceramide gezeigt [81], der auf einen geringeren Wassergehalt zurückzuführen sein könnte. Dies könnte auch erklären, warum trotz ausreichenden Angebots des kritischen Synthesebausteins Linolsäure der Gehalt an Ceramid 1 zu gering ausfällt: das wasserarme Milieu behindert die Funktion der entsprechenden Transferase. Verschiedene Arbeiten beschreiben eine Reduktion der Gesamtceramide und insbesondere des Ceramid 1 bei atopischer Dermatitis [45,50,144]. Bei Ceramid 1, dem seit langem eine besondere Rolle bei der Verbindung verschiedener Lipiddoppelschichten zugeschrieben wird [135,10], spielt jedoch nicht nur die Gesamtmenge eine Rolle, sondern auch die korrekte Fettsäurezusammensetzung. Bei Mangel an essentiellen Fettsäuren wird anstelle der Linolsäure Ölsäure eingebaut, was bereits zu einem dramatischen Anstieg des transepidermalen Wasserverlusts führt [45 und Literatur dort]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer spezifischen Ceramidanalytik.

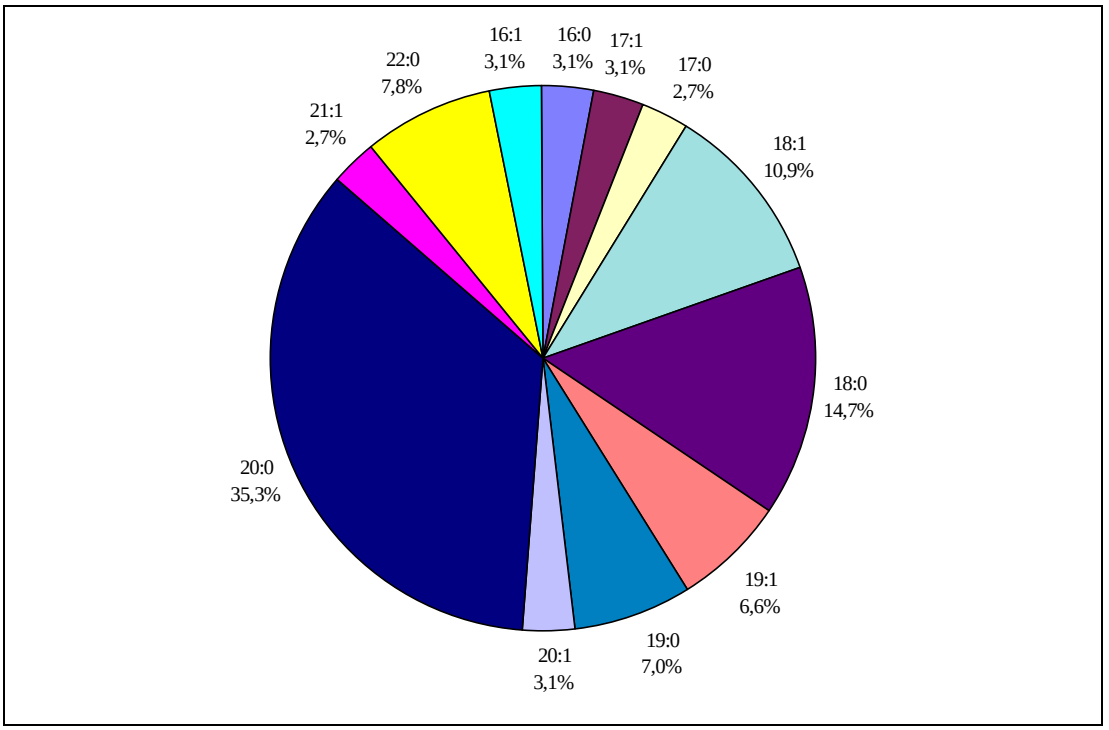


Abb. 8a: Zusammensetzung der langkettigen Basen in Ceramid 2 [132]. Die Basen sind durch Kettenlänge:Anzahl der Doppelbindungen symbolisiert und mit ihren prozentualen Häufigkeiten beschriftet.

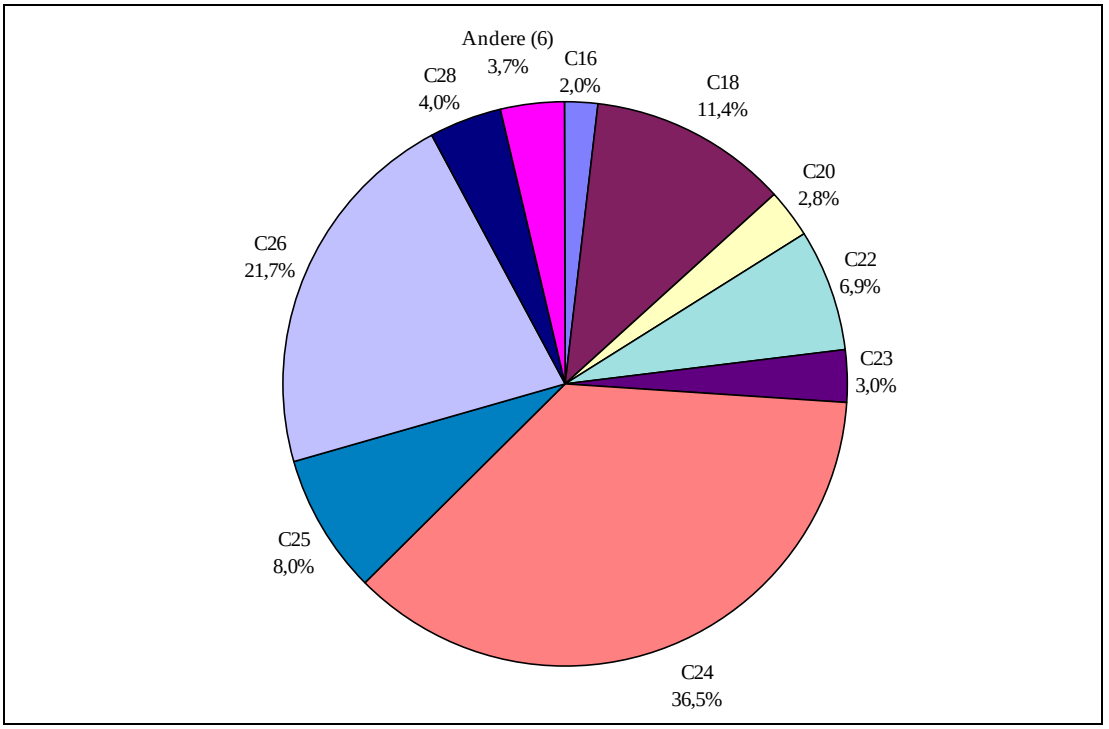


Abb. 8b: Zusammensetzung der amidartig gebundenen Fettsäuren in Ceramid 2 [132]. Alle Fettsäuren sind gesättigt, unverzweigt und besitzen keine Hydroxygruppen. Sie sind mit der Kettenlänge und ihrer prozentualen Häufigkeit beschriftet.

Angesichts des Zusammenhangs zwischen dem Lipidgehalt und bestimmten Hautveränderungen (z.B. Trockenheit) ist die topische Lipidsubstitution nicht nur dermatologisch, sondern auch kosmetisch von großem Interesse. Daher wurde die topische Applikation von Ceramiden mehrfach untersucht [20,31,72,75]. Häufig muß zwischen optimaler Wirkung (z.B. Reduzierung des TEWL) und marktstrategischen Aspekten (Vermeidung von wenig attraktiven W/O-Emulsionen o.ä.) ein Kompromiß gefunden werden, und bei vielen auf dem Markt befindlichen Präparaten hat das Ceramid lediglich hinsichtlich des Marketing einen Effekt. Da die Ceramide auch im Haar eine Rolle spielen [49], sind sie vielfach in Shampoos enthalten.

2.1.3 Lipidextraktion

Wenn Lipide aus biologischem Material analysiert werden sollen, müssen sie zunächst extrahiert werden. Dieser Schritt ist eine wesentliche Fehlerquelle und muß sorgfältig validiert sein. Daher wird meist auf bewährte Protokolle zurückgegriffen und oftmals ein Kontrollstandard zugesetzt [67].

Bei der Lipidextraktion aus Geweben verwendet man die traditionelle **Flüssigphasenextraktion**. Man unterscheidet die Folch-Extraktion [32], bei der 1 g Gewebe mit 20 ml Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert wird, und die Methode nach Bligh und Dyer [8], bei der 1 ml Gewebehomogenisat mit ca. 4 ml Methanol/Chloroform 2:1 extrahiert wird. Daneben wurden für spezielle Fragestellungen andere Protokolle beschrieben, etwa für die Extraktion der Stratum-corneum-Ceramide [69,95]. Die selektive und dennoch quantitative Extraktion einzelner Lipidklassen ist jedoch nicht möglich.

Für die Extraktion von Lipiden aus (wäßrigen) biologischen Flüssigkeiten bietet sich hingegen die **Festphasenextraktion** (SPE) an. Auch eine Vortrennung zwischen verschiedenen Lipidklassen ist dadurch möglich. Dieses Verfahren muß ebenfalls sorgfältig validiert werden. Apparaturen zur automatisierten SPE sind kommerziell erhältlich.

2.2 Methoden zur analytischen Trennung

Eine zuverlässige quantitative Bestimmung einer Substanz in einer mehr oder weniger komplexen Matrix, wie sie ein Gesamtlipidextrakt darstellt, erfordert den Einsatz einer Methode zur Stofftrennung. Dabei haben chromatographische und elektrophoretische Methoden in der Praxis die bei weitem größte Bedeutung erlangt, gerade auch wegen der Vielzahl der damit koppelbaren Detektoren. Im folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit angewandten

Trennmethoden Gaschromatographie, HPLC und Kapillarelektrophorese kurz dargestellt werden.

2.2.1 Gaschromatographie (GC)

Der Begriff Chromatographie steht heute für eine ganze Familie von Trennmethoden, bei denen ein gelöstes Substanzgemisch mit Hilfe einer mobilen Phase, die ein Gas, ein überkritisches Fluid oder eine Flüssigkeit sein kann, über eine stationäre Phase geleitet wird und sich dabei in seine Bestandteile auftrennt [59].

Bei der Gaschromatographie werden flüchtige Substanzen entweder in mit feinkörnigem Trägermaterial gefüllten Säulen oder in innen beschichteten Kapillaren aus amorphem Siliziumdioxid (Fused Silica) mit Hilfe eines inerten Trägergases (He, H_2 oder N_2) getrennt. Man unterscheidet die GSC (Gas Solid Chromatography), bei der ein poröser, polymerer Feststoff als stationäre Phase dient, und die GLC (Gas Liquid Chromatography), bei der eine viskose Flüssigkeit diese Aufgabe erfüllt.

Die **Detektion** im Gasstrom kann mit verschiedenen Detektoren erfolgen, u.a. mit einem Flammenionisationsdetektor (FID), einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) oder mit Hilfe der Massenspektrometrie (GC/MS). Die Gaschromatographie erreicht eine hohe Trennleistung, da sich die Verteilungsgleichgewichte zwischen Trägergas und stationärer Phase sehr schnell einstellen [116].

Nach Auswahl einer für das jeweilige Trennproblem geeigneten GC-Säule bzw. Kapillare ist die Variation der Temperatur der wichtigste Parameter zur Optimierung. Daher befindet sich die GC-Kapillare in einem Säulenofen, der eine entsprechende Steuerung des Temperaturprogramms erlaubt.

Kapillarsäulen benötigen keinen Träger, da bei ihnen die Innenwand mit der stationären Phase belegt wird (WCOT, Wall Coated Open Tubular, wandbelegte Trennsäule). Die Kapillaren sind den gepackten Säulen in der Regel hinsichtlich der Trennleistung überlegen. Bei einer Länge von 15-30 m und Innendurchmessern von 0,15-0,5 mm sind die GC-Kapillaren innen mit einem Trennphasenfilm beschichtet (0,1 - 5 µm dick). Eine größere Kapillarlänge verbessert die Trennleistung, verlängert jedoch die Analysenzeiten. Die Länge sollte also so gering wie möglich gehalten werden. Eine Verringerung des Innendurchmessers verbessert die Auflösung und verringert die Kapazität. Die Filmdicke ist wesentlich für die Steuerung der Retention. Bei hochsiedenden Verbindungen wie Lipidderivaten müssen geringe Filmdikken verwendet werden, um die Elution zu gewährleisten. Als stationäre Phase eignen sich für die Lipidanalytik vor allem wenig polare Polysiloxanderivate.

Die Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit der GC, das Vorliegen eines gasförmigen oder unzersetzt verdampfbaren Analyten, ist gleichzeitig die bedeutsamste Limitation der Methode. Oftmals ist eine **Derivatisierung** polarer funktioneller Gruppen erforderlich, z.B. durch Methylierungen oder Silylierungen von Hydroxygruppen. Hierfür sind eine Vielzahl von Verfahren entwickelt worden, so daß hier keine allgemeinen Angaben gemacht werden sollen und bezüglich der in dieser Arbeit angewandten Derivatisierungen auf den Experimentellen Teil verwiesen wird.

2.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Unter dem Begriff Flüssigkeitschromatographie faßt man die Methoden mit flüssiger mobiler Phase zusammen, wozu die Papier- und die Dünnschichtchromatographie (zusammengefaßt als Planarchromatographie) und die Säulenchromatographie zählen. Letztere wiederum unterteilt sich in Niederdruck- und Hochdruckflüssigchromatographie [59].

Für analytische, aber auch für präparative Zwecke hat die Hochdruckflüssigchromatographie, die wegen der hohen erzielbaren Trennleistung (bis ca. 10000 theoretische Böden) auch als Hochleistungsflüssigchromatographie bezeichnet wird (beides abgekürzt als **HPLC**), eine überragende Bedeutung erlangt. Hierbei befindet sich eine homogen gepackte feste, poröse stationäre Phase in einer Stahlsäule, während eine flüssige mobile Phase (Laufmittel) mit Hilfe einer Pumpe unter hohem Druck hindurch geleitet wird. Die Trennung der gelösten Analyten findet in der Grenzschicht zwischen dem Laufmittel in den Poren und der inneren Oberfläche der Teilchen der stationären Phase statt. Es kommt zu einer je nach der Affinität des Analyten zur stationären Phase unterschiedlichen Anreicherung an der Grenzfläche. Dieser Vorgang kann als Adsorptions- oder als Verteilungsprozeß beschrieben werden.

Die wichtigsten **Packungsmaterialien** sind das anorganische Kieselgel und seine Derivatisierungsprodukte. Daneben spielen auch synthetische Polymere, die sich u.a. durch eine höhere pH-Stabilität auszeichnen, eine Rolle. Heutzutage haben sich Packungsmaterialien mit gleichmäßigen, sphärischen Partikeln weitestgehend durchgesetzt. Wichtige Charakteristika sind die Partikelgröße (meist 3-10 µm) und der Porendurchmesser (typischerweise 10-100 nm).

Bei der **Normalphasen**-HPLC steht einer polaren stationären Phase (meist Kieselgel) eine weniger polare mobile Phase (Hexan, Chloroform o.ä.) gegenüber.

Bei der **Umkehrphasen**-HPLC (engl. Reversed Phase, RP) findet dagegen eine weniger polare stationäre und eine polarere mobile Phase Anwendung. Als stationäre Phase dominieren Derivate des Kieselgels, bei denen die freien Silanolgruppen mittels Silanisierung durch orga-

nische Reste ersetzt werden (u.a. Octadecyl-(RP-18). Octyl-(RP-8), Butyl-, Dimethyl-, Cyano-, Phenyl-, Amino- oder Diolphasen). Als **mobile Phase** werden Acetonitril, Methanol und Wasser am meisten angewandt. Man kann die Lösungsmittel nach ihrer Elutionskraft in einer eluotropen Reihe anordnen, die für das jeweilige Packungsmaterial empirisch ermittelt wird, jedoch im wesentlichen von der Polarität abhängt [125,66,28]. So nimmt die Elutionskraft bei einer RP-18-Phase in der Reihenfolge Wasser < Methanol < Isopropanol < Acetonitril < Tetrahydrofuran < Chloroform < Hexan zu.

Unterschieden wird zwischen **isokratischer** und **Gradientenelution**. Bei der isokratischen Elution bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse konstant. Wenn sich ein Trennproblem isokratisch befriedigend lösen läßt, wird dies in der Regel bevorzugt. Bei der Gradientenelution ändert sich die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse und zwar zweckmäßigerweise so, daß die Elutionsstärke des Fließmittelgemischs kontinuierlich zunimmt. Damit kann man erreichen, daß auch Analyten stark unterschiedlicher Polarität in einem Lauf chromatographiert werden können. Zu unterscheiden ist zwischen Niederdruckgradienten, die durch die Dosierung der einzelnen Laufmittelkomponenten über Ventile charakterisiert sind, und Hochdruckgradienten, bei denen jede Komponente durch eine eigene Pumpe gefördert wird. Die Umkehrphasen-HPLC hat die größte Verbreitung gefunden; man kann sie als das wichtigste chromatographische Verfahren überhaupt bezeichnen. Dies ist begründet in der vielseitigen Anwendbarkeit (bei ca. 80-90 % aller Trennprobleme in der Bioanalytik), der hohen Trennleistung und der guten Reproduzierbarkeit. Es steht eine Vielzahl von Detektoren zur Verfügung, die die erreichbare Empfindlichkeit und Spezifität determinieren.

2.2.3 Kapillarelektrophorese (CE)

Das Trennprinzip der Elektrophorese besteht in dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten elektrisch geladener Teilchen in Lösung beim Anlegen eines elektrischen Feldes.

Nachdem die Gelelektrophorese in der Biochemie bereits eine breite Anwendung gefunden hatte, konnte die Elektrophorese in offenen, mit Flüssigkeit gefüllten Röhren sich erst dann entscheidend weiterentwickeln, als es technologisch möglich war, Kapillaren mit sehr geringem, gleichmäßigem Innendurchmesser herzustellen. Nach wichtigen Vorarbeiten u.a. von Hjerten [44] gelang Jorgenson 1981 diesbezüglich der Durchbruch [55]. Der Vorteil der Kapillaren (Innendurchmesser 25-100 µm) besteht in dem günstigen Verhältnis Oberfläche/Volumen, was einen guten Abtransport der beim Stromfluß entstehenden Jouleschen Wärme ermöglicht. Dies wiederum erlaubt das Anlegen hoher Spannungen (üblicherweise bis

30 kV) und damit eine hohe Trennleistung und kurze Analysenzeiten. Derzeit werden nahezu ausschließlich Kapillaren aus amorphem Quarz (engl. Fused Silica) eingesetzt. Bei diesen Kapillaren tritt das Phänomen des elektroosmotischen Flusses (EOF) auf [27]. Neutrale Teilchen wandern mit der Geschwindigkeit des EOF, Kationen werden zusätzlich zur Kathode beschleunigt, Anionen verzögert. Eine prägnante Einführung in Theorie und Praxis der CE gibt Literatur [27], [117] oder auch [42]. Eine aktuelle Anwendungsübersicht gibt [7].

Der **apparative Aufbau** eines Kapillarelektrophoresegerätes ist sehr einfach. Unbedingt erforderlich sind nur die Kapillare, die zwei mit Elektrolytlösung gefüllte Gefäße verbindet, eine Hochspannungsquelle sowie ein Detektor. Moderne kommerziell erhältliche Geräte sind darüber hinaus mit einem automatischen Probensammler, einer Vorrichtung zum Anlegen von Druck, einer Thermostatisierung der Kapillare sowie einem Personalcomputer zur Steuerung und Auswertung ausgestattet.

Mit dieser relativ einfachen Anordnung sind verschiedene **Trennverfahren** durchführbar. Am weitesten verbreitet ist die Kapillarzonenelektrophorese (CZE), die sich zur Trennung und Quantifizierung einer großen Anzahl ionischer bzw. dissoziierbarer Substanzen eignet. Die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) eignet sich auch zur Trennung von Neutralstoffen. Dabei werden dem Elektrophoresepuffer Tenside zugesetzt, die elektrisch geladene Mizellen bilden; für jeden Analyten stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen Mizellen und freier Lösung ein. Daneben werden die Kapillargelelektrophorese (CGE), die Isoelektrische Fokussierung (CIEF) und die Kapillarisotachophorese (CITP) angewendet. Die erst jüngst entstandene **Kapillarelektrochromatographie** (CEC) [21,24] ist eine Hybridmethode aus HPLC und Kapillarelektrophorese. CE-Kapillaren werden dabei mit einer stationären Phase wie bei der HPLC gepackt. Das Laufmittel wird jedoch nicht mittels einer Pumpe, sondern nach Anlegen eines elektrischen Feldes durch den EOF fortbewegt. Die Trennung erfolgt somit sowohl durch chromatographische als auch durch elektrophoretische Effekte. Allerdings sind in praxi einige technische Probleme zu bewältigen, die daraus resultieren, daß die mit dem Stromfluß verbundene Wärmeentwicklung Inhomogenitäten der stationären Phase verursacht. Nach eigenen Versuchen genügen die bisher kommerziell erhältlichen CEC-Kapillaren nicht den Anforderungen, insbesondere bei Kopplung an die Massenspektrometrie. Eine Lösung dieses Problems könnte der Einsatz immobilisierter, monolithischer stationärer Phasen sein, die jedoch bislang nicht kommerziell angeboten werden [4].

Obwohl Wasser wegen seiner vorteilhaften physikochemischen Eigenschaften nach wie vor das wichtigste Lösungsmittel bei allen Kapillarelektrophoresetechniken ist, findet auch die Anwendung **nichtwäßriger** Systeme zunehmendes Interesse. Die Motivation dazu reicht von

einfacher Solubilisierung über Verbesserungen der Trennleistung bis hin zu semipräparativen Ansätzen [79,100,106,126].

Zur **Detektion** der in der Kapillarelektrophorese getrennten Analyten wurde eine Reihe von Verfahren erfolgreich angewandt. Hier sollen nur Online- bzw. On-Column-Verfahren genannt werden, wenngleich eine automatische Fraktionensammlung auch Offline-Untersuchungen ermöglicht, was jedoch wegen der geringen Mengen meist mit Schwierigkeiten verbunden ist. Mit Abstand die größte Verbreitung haben UV-VIS-Dioden-Array-Detektoren gefunden. Diese besitzen wegen der Möglichkeit, mehrere Wellenlängen gleichzeitig - und damit auch Spektren - zu akquirieren, große Vorzüge für die Methodenentwicklung und Peakidentifikation. Daneben sind auch Festwellenlängendetektoren möglich, die eine etwas bessere Empfindlichkeit bieten. Die Messung von spontaner oder auch Laser-induzierter Fluoreszenz (LIF) liefert eine sehr gute Empfindlichkeit, erfordert jedoch meist eine Derivatisierung. Elektrochemische, Leitfähigkeits-, Radioisotopen- und Brechungsindex-detektoren werden weniger häufig angetroffen und bleiben speziellen Applikationen vorbehalten. Für die Lipidanalytik eignen sich die genannten Detektoren nur in Ausnahmefällen (z.B. Bestimmung von Fettsäuren mittels indirekter photometrischer Detektion [97]) bzw. nach Derivatisierung der Analyten. Daher liegt es nahe, gerade für die Lipidanalytik die Kopplung der CE an einen vielseitig einsetzbaren, wenn auch nicht universellen Detektor, ein Massenspektrometer, in Erwägung zu ziehen. Die dabei auftretenden Probleme und Ansätze zur Lösung werden unter 2.4.3 diskutiert.

2.3 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum [25,70]. Jedes Massenspektrometer, unabhängig von der Vielzahl technischer Lösungen, besteht aus einer Ionenquelle, die einen Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) auftrennt, sowie einem Detektor. Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Massenspektrometern besteht der Detektor aus einer Konversionsdynode, einem Sekundärelektronenvervielfacher sowie einer Registriereinrichtung.

Hinsichtlich der Nomenklatur in der Massenspektrometrie ist zu bemerken, daß derzeit häufig verschiedene Synonyma für einen bestimmten Tatbestand benutzt werden. Ein Beispiel dafür ist die Bezeichnung der Masseneinheit. Ganz gleich, ob von µ (IUPAC), amu oder Dalton (Da) die Rede ist, gemeint ist stets 1/12 der Masse von ^{12}C. Bemühungen zur Standardisierung sind jedoch im Gange [128].

2.3.1 Ionisationstechniken

Das klassische Verfahren zur Ionisation von Analytmolekülen ist die **Elektronenstoß-Ionisation** (EI, Electron Impact). Hierzu wird die Probe über ein Einlaßsystem in gasförmigem Aggregatzustand zugeführt und mit Elektronen beschossen. Dabei entstehen zunächst Radikal-Kationen ($M^{\cdot +}$) und in geringerem Ausmaß Kationen (M^{2+}). Da in der Regel eine Energie von 70 eV verwendet wird, für die Bildung von Molekülionen jedoch nur etwa 10-15 eV benötigt werden, führt die überschüssige Energie zu Fragmentierungen des Moleküls. Damit ist es möglich, unter standardisierten Bedingungen reproduzierbare Fragmentspektren zu erhalten, die zur Identifizierung von Substanzen herangezogen werden können. Dies begründet den besonderen Wert der Elektronenstoßionisation, insbesondere durch die Möglichkeit des Vergleichs mit mittlerweile sehr umfangreichen Spektrenbibliotheken. Es ist allerdings mitunter schwierig, die Struktur einer unbekannten Verbindung aus dem EI-Spektrum abzuleiten. Verantwortlich dafür sind die Vielzahl der Fragmente und v.a. Umlagerungsreaktionen, von denen stellvertretend Retro-Diels-Alder-Reaktionen und die McLafferty-Umlagerung genannt seien.

Bei der **chemischen Ionisation** (CI) wird die gasförmige Substanz zusammen mit einem großen Überschuß an Hilfsgas einem Elektronenstrahl ausgesetzt, wobei zunächst das Hilfsgas ionisiert wird, bevor über Ionen-Molekül-Reaktionen in der Gasphase die Substanz selbst ionisiert wird.

Unter **Fast Atom Bombardment** (FAB) versteht man ein Verfahren, bei dem die Probensubstanz auf einem Kupferstab mit schnellen Argon- oder Xenonatomen (v ≈100 km/s) beschossen wird, wodurch im wesentlichen Quasi-Molekülionen und keine Fragmente entstehen. In der Modifikation als Continuos Flow Fast Atom Bombardment (CFFAB) ist das Verfahren auch an die HPLC koppelbar, jedoch inzwischen technisch überholt.

Bei der matrixunterstützten Laserdesorptionsionisation (**MALDI**) wird die Analytprobe auf einem metallischen Probenteller zusammen mit einem großen Überschuß einer geeigneten Matrixsubstanz (meist kleine organische Moleküle) auskristallisiert und anschließend im Hochvakuum einem kurzzeitigen, intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Die Matrixmoleküle, die die Energie zunächst absorbieren, geben diese schnell wieder an das Festkörpergitter ab, wodurch explosionsartig gasförmige Moleküle (sowohl Analyt als auch Matrix) freigesetzt werden. Auch die Ionisation erfolgt über die Matrix; der genaue Mechanismus der beschriebenen Vorgänge ist noch nicht abschließend geklärt. Der Vorzug der MALDI-MS besteht in der schonenden Ionisation auch thermisch labiler Makromoleküle. Daher hat diese Technik insbesondere in der Proteinanalytik eine große Bedeutung erlangt,

z.B. zur Bestimmung des Molekulargewichts. Nachteilig sind v.a. die Notwendigkeit der empirischen Testung verschiedener Matrices und Ionisationsbedingungen, Diskriminierungseffekte und die Tatsache, daß es sich um eine reine Offline-Methode handelt, die nicht mit chromatographischen oder elektrophoretischen Verfahren koppelbar ist. Die anfangs schlechte Auflösung wurde durch die Einführung von Reflektortechniken und der Delayed Extraction wesentlich verbessert.

Während zur Durchführung der vorgenannten Ionisationsmethoden ein Vakuum erforderlich ist, gibt es auch Verfahren, die unter **Atmosphärendruck** arbeiten und daher zusammenfassend als Atmospheric Pressure Ionisation (API) bezeichnet werden.

Die Beschreibung der **Elektrospray-Ionisation** (ESI) soll etwas ausführlicher erfolgen, da diese Technik in den letzten Jahren sprunghaft an Bedeutung gewonnen hat [16] und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit hauptsächlich angewandt wurde. Das Elektrospray-Phänomen wurde schon vor langer Zeit entdeckt [148], jedoch erst nach den Arbeiten von Fenn et al. in der Massenspektrometrie eingesetzt [145,138]. Bei der ESI-MS werden die Analytmoleküle, die in Lösung vorliegen, unter dem Einfluß einer Hochspannung (1-8 kV) sowie (im Falle des meist verwendeten pneumatisch unterstützten Elektrospray) eines Stickstoffstroms versprüht, wobei sich zunächst kleine geladene Tröpfchen bilden, die durch Verdampfung des Lösungsmittels kleiner werden. Erreicht der Radius das sogenannte Rayleigh-Limit, zerfallen die Tröpfchen wegen der Abstoßungskräfte zwischen gleichnamigen Ladungen in Coulomb-Explosionen zu kleineren Tröpfchen [58]. Die Rayleigh-Gleichung gibt einen Zusammenhang zwischen der Ladung der Tröpfchen (Q), der Oberflächenspannung (σ) und dem Radius (r):

$$Q^2 = 64\pi^2 \cdot \varepsilon_0 \cdot \sigma \cdot r^3$$

(ε_0 ist die Dielektrizitätskonstante im Vakuum.) Schließlich kommt es zur Bildung freier gasförmiger Ionen, ein Phänomen, für dessen Erklärung derzeit zwei Modellvorstellungen diskutiert werden. Erstens das Modell des geladenen Rückstands (Charged Residue Model, CRM), das davon ausgeht, daß letztlich winzige Tröpfchen von ca. 1 nm Radius entstehen, die nur noch ein Analytmolekülion enthalten, das durch den Stickstoffstrom vollständig desolvatisiert wird [111]. Zweitens das Ionenemissionsmodell (Ion Evaporation Model, IEM) [53], das davon ausgeht, daß bereits aus größeren, hoch geladenen Tröpfchen ($r \approx 8$ nm) freie Ionen in die Gasphase emittiert werden. Einige experimentelle Befunde lassen sich schlüssiger mit Hilfe der CRM-Theorie erklären, andere mit der IEM-Vorstellung [25,70]. Abb. 9a zeigt schematisch den makroskopischen und Abb. 9b den mikroskopischen ESI-Prozeß.

ESI ist auf Grund der relativ geringen auf die Moleküle wirkenden Energien eine „sanfte" Ionisierungstechnik, so daß selbst empfindliche Moleküle und teilweise sogar nichtkovalente

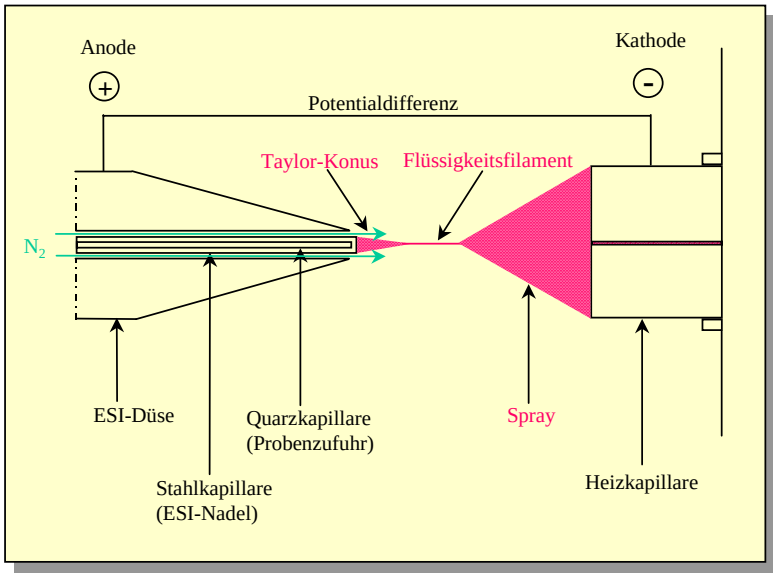


Abb. 9a: Der ESI-Prozeß, makroskopisch.

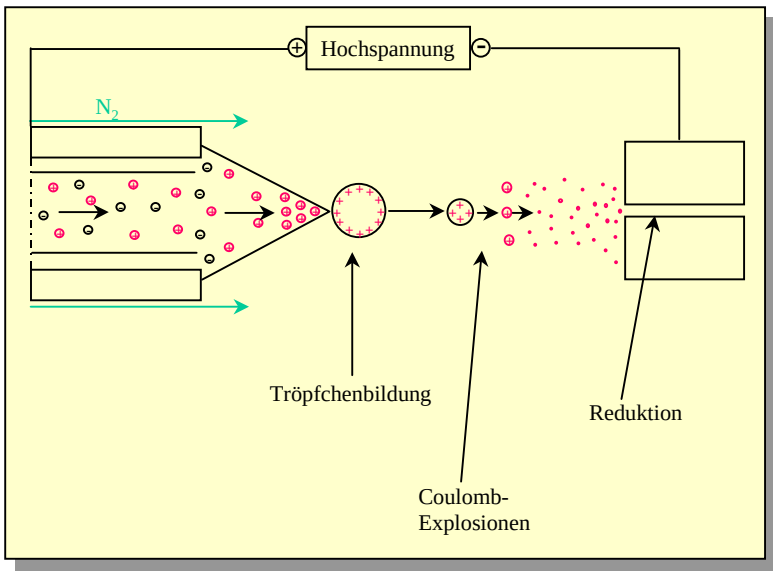


Abb. 9b: Der ESI-Prozeß, mikroskopisch.

Aggregate unzersetzt in den Massenanalysator gelangen. Typischerweise werden daher sogenannte Quasi-Molekülionen detektiert, die bei positiver ESI-Spannung durch Anlagerung und bei negativer ESI-Spannung durch Abstraktion eines Protons gebildet werden ($[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$). Ein weiteres charakteristisches Phänomen ist die Bildung von Anlagerungsprodukten (Addukten), meist mit ubiquitär vorkommenden Ionen; im Positivmodus sind Natriumaddukte sehr häufig und übersteigen in ihrer Intensität oftmals das $[M+H]^+$-Ion, daneben findet man in geringerem Ausmaße Kaliumaddukte; im Negativmodus treten Chloridaddukte am häufigsten auf, die anhand des Isotopenmusters i. d. R. schnell erkannt werden können. Auch mit anderen Matrixbestandteilen wie z.B. Tensiden oder auch Teilchen der gleichen Art können Adduktbildungen auftreten, wobei solche Erscheinungen mit der Konzentration der Probenlösung zunehmen. Generell gilt, daß das Adduktmuster von der Einstellung verschiedener Geräteparameter und der Zusammensetzung der Lösung abhängt und somit in gewissen Grenzen steuerbar ist. Diese Aspekte sind von großer Bedeutung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Quantifizierung.

Es soll nochmals hervorgehoben werden, daß bei der ESI primär keine Molekülfragmente entstehen, im Gegensatz zu einigen anderen Ionisationsarten wie z.B. Elektronenstoß.

Weil die Elektrospray-Ionisation unter Atmosphärendruck stattfindet, die Massenanalyse jedoch ein Hochvakuum erfordert, muß ein entsprechender Übergang (engl. Interface) geschaf-

fen werden. Die technischen Ausführungen der Elektrospray-Quelle samt Interface sind unterschiedlich. Stets ist eine Elektrospray-Kapillare (aus Edelstahl) vorhanden, durch die die Zufuhr der Probenlösung erfolgt. Auf diese ESI-Kapillare wird die Hochspannung aufgelegt, es besteht eine Potentialdifferenz zum Interface. Eine Möglichkeit besteht darin, den Spraykegel auf eine Interfaceplatte mit einer runden Öffnung zu richten, hinter der sich eine weitere Platte mit einer kleineren Öffnung (Orifice) befindet (PE Sciex, Thornhill, Ontario, Kanada). Zwischen den Platten strömt Stickstoff als eine Art Vorhang (engl. curtain) dem Elektrospray entgegen und desolvatisiert die Ionen. Wegen des geringen Durchmessers des Orifice (100 µm) kann dahinter ein Vakuum aufgebaut werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Spraykegel auf eine beheizte Stahlkapillare (Innendurchmesser 100 µm) zu richten, die die Desolvatisierung und den Übergang zum Vakuumsystem des Massenspektrometers bewerkstelligt (Finnigan, San Jose, CA, USA). Insbesondere bei höheren Flüssen ist es notwendig, den ESI-Prozeß durch Stickstoffzufuhr koaxial zur ESI-Kapillare zu unterstützen. Dies wird pneumatisch unterstützte ESI oder teilweise auch Ionspray genannt. Ebenfalls unterschiedlich bei verschiedenen Gerätemodellen ist die Anordnung der Elektrospray-Kapillare zur Flugachse der Ionen. Die neuere orthogonale Anordnung soll verhindern, daß Lösungsmittelmoleküle und andere ungeladene Matrixbestandteile in das Massenspektrometer gelangen, während die Ionen wegen der Potentialdifferenz eingesaugt werden.

Nachdem die Ionen das Orifice oder die Heizkapillare passiert haben, werden sie mit Hilfe der sogenannten Ionenoptik, zu der Skimmer, Linsen, Octapole u.ä. zählen, weiter fokussiert, bevor sie in den Massenanalysator gelangen. Die Elektrospray-Ionisation wird meist mit Quadrupol-, Ionenfallen- oder auch Flugzeit-Massenspektrometern (TOF) kombiniert (siehe 2.3.2).

Während ESI üblicherweise mit Flußraten im Bereich von 1-1000 µl/min arbeitet (sog. Mikrospray), wurde die Variante des **Nanospray** entwickelt, um mit Flußraten im nl/min-Bereich zu operieren [140]. Dies bietet nicht nur den Vorteil, daß mit kleinsten Substanzmengen ausführliche Messungen durchgeführt werden können, sondern auch eine effektivere, weniger diskriminierende Ionisation, da von vornherein kleinere Tröpfchen entstehen. Für die LC/MS-Kopplung ist die Methode weniger geeignet. Die Entwicklung im Bereich der ESI geht zu zwei Optionen: entweder Strukturuntersuchungen mittels Nanospray oder LC/MS mit Mikrospray-Interfaces.

Die **chemische Ionisation unter Atmosphärendruck** (APCI) stellt ein weiteres API-Verfahren dar. Die Ionisation erfolgt hierbei folgendermaßen: Die Probenlösung wird in einem 400-500 °C heißen Rohr verdampft, der austretende Dampf wird durch Anlegen einer Hochspannung (ca. 5 kV) über eine nadelartige Elektrode (sog. Coronanadel) in ein Plasma

überführt, in dem zunächst aus dem Lösungsmittel und zugesetztem Puffer (häufig Ammoniumacetat) Ionen gebildet werden, die ihrerseits wiederum den Analyten ionisieren. APCI bietet sich als Alternative und Ergänzung zu ESI insbesondere bei weniger polaren Substanzen an. Auch APCI ist eine sanfte Ionisationsmethode (Soft Ionization), jedoch etwas „härter" (energiereicher) als ESI, so daß auch noch etwas weniger polare Analyten ionisiert werden können. Allerdings erfordert die APCI höhere Flußraten (ca. 1 ml/min), was in der analytischen Praxis mitunter von Nachteil ist. APCI nimmt in der pharmazeutischen Routineanalytik inzwischen einen wichtigen Platz ein [139]. Häufig ist es möglich, ESI- und APCI-Quelle mit wenigen Handgriffen umzurüsten.
Zusammenfassend kann man sagen, daß je nach Analyt, Matrix, verfolgtem Ziel (Quantifizierung, Strukturaufklärung u.a.) und Verfügbarkeit eine geeignete Ionisation ausgewählt werden muß [139]. Keine Ionenquelle ist universell einsetzbar. Ein Trend dürfte in Zukunft zu solchen Geräten gehen, die mit geringem Umbauaufwand zwischen verschiedenen Ionisationstechniken umschalten können [107].

2.3.2 Massenanalysatoren

Nachdem die von der jeweiligen Ionenquelle gebildeten Ionen mit Hilfe der Ionenoptik fokussiert worden sind, gelangen sie in den Massenanalysator, der dazu dient, die Ionen nach ihren Masse/Ladungs-Verhältnissen (m/z) zu sortieren. Alle Massenanalysatoren arbeiten im Hochvakuum.

2.3.2.1 Einfacher Quadrupol

Ein Quadrupol stellt das einfachste Prinzip der Massenanalyse in der MS dar und wurde bereits 1953 von Paul und Steinwedel beschrieben. Er besteht lediglich aus vier gleichartigen, runden, parallel angeordneten Metallstäben, die auf einem Kreis mit dem Radius r um die z-Achse, die Flugachse der Ionen, angeordnet sind. An den Stäben wird eine Gleichspannung U und eine Wechselspannung ($V \cdot \cos 2\pi \cdot f \cdot t$) in der Weise angelegt, daß gegenüberliegende Stäbe jeweils die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung besitzen. Für Teilchen, die sich auf der z-Achse befinden, resultiert ein elektrisches Potential ϕ:

$$\phi(x,y,t) = (U + V \cdot \cos 2\pi \cdot f \cdot t) \cdot \frac{x^2 - y^2}{r^2}$$

(x,y,z: räumliche Koordinaten, f: Frequenz der Wechselspannung, t: Zeit).

Durch Anlegen einer geringen Beschleunigungsspannung (10-20 V) bewegen sich die Ionen in z-Richtung. Ihre Bewegung in der xy-Ebene wird durch folgende Gleichungen beschrieben:

$$m\frac{d^2y}{dt^2} = z \cdot e\frac{\partial\phi}{\partial y} = \frac{z \cdot e}{r^2}(U + V \cdot \cos 2\pi \cdot f \cdot t) \cdot y$$

(m: Masse des Ions, z: Anzahl der Ladungen, e: Elementarladung). Führt man die Parameter a und q ein,

$$a = \frac{2z \cdot e \cdot U}{m \cdot (\pi \cdot f \cdot r)^2} \quad \text{und} \quad q = \frac{z \cdot e \cdot V}{m \cdot (\pi \cdot f \cdot r)^2},$$

kann man diese zu den **Mathieuschen Gleichungen** umformen:

$$\frac{d^2x}{d \cdot (\pi \cdot f \cdot t)^2} + (a + 2q \cdot \cos 2\pi \cdot f \cdot t) \cdot x = 0$$

$$\frac{d^2y}{d \cdot (\pi \cdot f \cdot t)^2} + (a + 2q \cdot \cos 2\pi \cdot f \cdot t) \cdot y = 0$$

Die Lösungen der Mathieu-Gleichungen geben an, bei welchen Werten der Parameter a und q ein Ion mit einem bestimmten m/z-Verhältnis sich stabil in z-Richtung bewegen kann. Trägt man a und q gegeneinander auf, so steht, wenn r, U, V und f konstant sind, jeder Punkt für ein m/z-Verhältnis (Mathieu-Stabilitätsdiagramm, siehe [25]). Da a/q stets 2U/V entspricht, liegen bei gleichem z alle Massen auf einer Geraden, der Arbeitsgeraden. Soll ein Massenbereich abgetastet (gescannt) werden, werden U und V so erhöht, daß das Verhältnis konstant bleibt, ebenso wie die Frequenz (im Radiobereich, daher RF genannt). Nacheinander werden auf diese Weise verschiedene Massen in den Stabilitätsbereich des Quadrupolfeldes gebracht und zum Detektor hindurchgelassen. Der Quadrupol funktioniert somit als Massenfilter, der bestimmte Massen hindurchläßt und andere durch Kollision mit den Metallstäben stoppt [25].
Beim Quadrupol-MS werden zwei Arten der Massenanalyse unterschieden: **Full Scan** zum Abtasten größerer Massenbereiche und **Selected Ion Monitoring** (SIM) zum Aufnehmen einzelner m/z-Spuren. Der SIM-Modus liefert eine wesentlich höhere Empfindlichkeit (mind. Faktor 10).
Eine wichtige apparative Regelgröße ist die CID-Spannung (**Collision-Induced Dissociation**, Fragmentierung durch Kollision, auch Collision-Induced Decay oder Decomposition). Dabei wird im vorderen Teil der Ionenoptik, also z.B. am ersten Octapol, eine zusätzliche regelbare Beschleunigungsspannung angelegt, die die Ionen mit den Stickstoffmolekülen zusammenstoßen läßt. Auf diese Weise werden instabilere Ionen, z.B. Lösungsmitteladdukte, zerstört. Das Signal/Rausch-Verhältnis kann optimiert und dadurch häufig eine Verbesserung der Empfindlichkeit erreicht werden. Eine gezielte Fragmentierung von Molekülen zum Erhalt von Strukturinformationen ist jedoch nur sehr begrenzt möglich.

2.3.2.2 Triple Quadrupol

In einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer dient der erste Quadrupol zur Massenanalyse der Ionen, der zweite zum Hindurchleiten durch eine mit Gas (N_2, He oder Ar) gefüllte Kollisionskammer und der dritte wiederum zum Scannen der Ionen. Diese Anordnung erlaubt neben einfacher Massenspektrometrie eine gezielte Fragmentierung in der Kollisionszelle und die Massenanalyse der Fragmente (auch Tochterionen genannt), man spricht von **MS/MS** (bzw. MS-MS) oder Tandem-MS. Die Fragmentierung in der Kollisionszelle erfolgt wiederum durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung und dadurch ausgelöste Zusammenstöße der Ionen mit den Gasteilchen, daher spricht man auch in diesem Falle von CID. Um Verwechslungen zu vermeiden, bezeichnet man die unter 2.3.2.1 beschriebene (und natürlich auch bei Triple-Quadrupol-, Ionenfallen- oder TOF-Geräten (s.u.) verfügbare) CID-Spannung als Source CID, da sie unmittelbar nach der Ionenquelle angelegt wird, wohingegen anderenfalls von Mass Analyzer CID gesprochen wird. Der entscheidende Unterschied besteht darin, daß mit Hilfe von Mass Analyzer CID einzelne Ionen spezifisch fragmentiert werden können, da bereits eine Massenanalyse stattgefunden hat, während Source CID unspezifisch auf alle Ionen des jeweiligen Massenbereiches wirkt.

Mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer sind drei verschiedene Arten von MS/MS-Experimenten möglich. Bei der **Tochterionen- (bzw. Produktionen-)Analyse** wird der erste Quadrupol auf ein bestimmtes Masse/Ladungs-Verhältnis eingestellt, im zweiten Quadrupol findet die Fragmentierung durch CID statt, und im dritten Quadrupol werden die Massen der Fragmente analysiert. Die Produktionen-Analyse wird sehr häufig angewandt, gerade auch für die spezifische Quantifizierung beim Einsatz als Detektor in der HPLC. Die **Vorläuferionen-Analyse** (Precursor Ion Scan) arbeitet umgekehrt: der dritte Quadrupol wird auf eine bestimmte Masse fixiert, und der erste Quadrupol liefert ein Spektrum aller Massen, die ein derartiges Fragment ergeben. Damit ist es z.B. möglich, verschiedene Substanzen zu erfassen, die ein bestimmtes charakteristisches Strukturelement enthalten. Bei der **Neutralverlust-Analyse** scannt der dritte Quadrupol synchron mit dem ersten Quadrupol, allerdings um eine bestimmte Massendifferenz zurückversetzt. So lassen sich alle die Ionen nachweisen, die einen bestimmte Massenverlust bei der Fragmentierung zeigen, also z.B. Δ m= 18 im Falle einer Wasserabspaltung.

Triple-Quadrupol-Massenspektrometer haben insbesondere in der LC/MS und hierbei vor allem dann, wenn eine spezifische, sehr empfindliche Routinequantifizierung gefragt ist, trotz ihres im Vergleich zu Single Quadrupol, Ionenfallen- und Flugzeit-MS höheren Preises eine weite Verbreitung gefunden.

2.3.2.3 Ionenfalle

Hierunter soll in diesem Zusammenhang nur die elektrische Ionenfalle nach Paul verstanden werden. Die Ionenfalle (engl. Ion Trap) ist ein Massenanalysator, der im wesentlichen aus einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden mit zentrischen Öffnungen besteht. Die Ringelektrode kann als in sich gebogener, an den Enden verbundener Quadrupolstab verstanden werden. Auch für diesen Fall läßt sich ein Stabilitätsdiagramm mit Hilfe der Mathieu-Gleichung erstellen [25]. Will man einen größeren Massenbereich scannen, zeigt sich, daß es am günstigsten ist, die Gleichspannung U auf Null zu setzen und ausschließlich mit Wechselspannung zu arbeiten. Wenn die entsprechende Radiofrequenzwechselspannung an der Ringelektrode angelegt wird, entsteht ein dreidimensionales, rotationssymmetrisches Quadrupolfeld. Ionen der ausgewählten Masse/Ladungs-Verhältnisse werden in diesem Feld auf stabilen Umlaufbahnen gespeichert, wobei sie durch Heliumgas gedämpft bzw. fokussiert werden. Wenn die Amplitude der RF-Spannung erhöht wird, werden die Trajektorien der Ionen in Reihenfolge steigender m/z-Quotienten instabil und die Ionen werden in Richtung Detektor aus der Falle ausgeworfen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, durch eine zusätzliche dipolare Wechselspannung zwischen den beiden Endkappenelektroden Multipolfelder zu erzeugen, um die Ionen auszuwerfen. Die Ionenfalle arbeitet diskontinuierlich; es wird ein bestimmter Zyklus von Füllung und Massenanalyse durchlaufen. Wegen der hohen Geschwindigkeit kann sie dennoch bei der Online-Detektion verwandt werden. Wichtig ist, eine optimale Füllung der Falle sicherzustellen. Sind zu viele Ionen in der Falle, stören sie sich gegenseitig und die Auflösung wird verschlechtert; sind dagegen zu wenig Ionen eingefangen worden, ist die Empfindlichkeit schlecht. Um die optimale Füllung sicherzustellen, gibt es technisch mehrere Möglichkeiten; bei dem im Rahmen dieser Arbeit genutzten Ion-Trap-Gerät (siehe Experimenteller Teil) wird zuerst ein Vorscan durchgeführt und daraus die Injektionszeit für den analytischen Scan ermittelt (engl. Automatic Gain Control, AGC).

Die Massenanalyse in der Ionenfalle (Beispiel Finnigan LCQ, bei anderen Geräten z.T. leicht modifiziert) läuft in folgenden Schritten ab (zur Veranschaulichung siehe [151]):

1.) Einfangen der Ionen durch Anlegen einer Radiofrequenz-Wechselspannung an die Ringelektrode und Einstrom von Helium als Dämpfungsgas.
2.) Sequentielle Massenanalyse und Detektion.
    Für MS/MS:
3.) Auswahl der gewünschten Ionen:
    a) Erhöhung der Amplitude der RF-Wechselspannung→kleinere Massen werden instabil,
    b) zusätzliche Waveform-Spannung→größere Massen werden instabil,

c) Stabilisierung der gewünschten Masse.

4.) Anlegen einer zusätzlichen Gleichspannung, dadurch Beschleunigung der Ionen und Fragmentierung durch Kollision mit den Helium-Atomen.

5.) Sequentielle Massenanalyse und Detektion.

Für MS^n: n-fache Wiederholung der Schritte 3-5.

Die Ionenfalle erreicht im Full Scan ähnliche Empfindlichkeiten wie ein Quadrupol im SIM-Modus, der SIM allerdings bringt keine entscheidende Steigerung mehr. Das Gegenstück zum SIM bei einfacher MS ist das Selected Reaction Monitoring (SRM) bei MS/MS bzw. das Consecutive Reaction Monitoring (CRM) bei MS^n. Hierbei wird spezifisch ein bestimmtes Fragmention aufgezeichnet.

Die Ionenfallen-MS stellt hinsichtlich ihrer **MS/MS**-Fähigkeit eine preisgünstigere Alternative zum Triple Quadrupol dar. Dem Nachteil, keine Vorläuferionen- und Neutralverlust-Analyse durchführen zu können, steht als Vorteil die Fähigkeit zur **Mehrfach-MS** (MS^n, n= 3-10) gegenüber, was für die Strukturaufklärung sehr nützlich ist. In Bezug auf die Empfindlichkeit werden die Werte eines Triple-Quad-MS im SIM nicht ganz erreicht [130], sind jedoch im Full Scan wesentlich besser.

2.3.2.4 Andere Massenanalysatoren

Ein **Flugzeitmassenspektrometer** (TOF von engl. time of flight) hat ein gänzlich anderes Meßprinzip als die bisher beschriebenen Massenanalysatoren. Es wird eine bestimmte Beschleunigungsspannung angelegt, die den Ionen eine gleich große kinetische Energie verleiht. Nunmehr wird sehr genau die Zeit gemessen, die die jeweiligen Ionen benötigen, um eine bestimmte Driftstrecke durch das Flugrohr zurückzulegen, da bei gleicher kinetischer Energie die Geschwindigkeit der Ionen von ihrer Masse abhängt. Unschärfeeffekte beim Start der Ionen können durch Reflektoren ausgeglichen werden. TOF-Massenspektrometer haben eine höhere Scangeschwindigkeit als Quadrupol und Ionenfalle. Sie erreichen daher eine bessere Auflösung [12], besitzen allerdings keine MS/MS-Fähigkeit (außer in Hybrid-Konfigurationen). TOF-Analysatoren werden meist mit MALDI-Ionenquellen kombiniert, jedoch ist auch ein ESI-TOF auf dem Markt.

Sektorfeld-Massenspektrometer und magnetische Ionenfallen (Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz-MS) ermöglichen eine **Massenfeinbestimmung** (m/z-Werte bis 4 Nachkommastellen genau, exakte Ermittlung der Elementzusammensetzung möglich), gute bis sehr gute Empfindlichkeit sowie MS/MS- bzw. MS^n-Fähigkeit zu einem allerdings deut-

lich höheren Preis. Da solche Analysatoren im Rahmen dieser Arbeit nicht angewendet wurden, soll auf eine Beschreibung verzichtet werden.

2.4 Kopplungsmethoden

Unter Kopplungsmethoden (engl. hyphenated techniques) werden ganz allgemein Verfahren verstanden, bei denen zwei oder mehrere analytische Techniken kombiniert eingesetzt werden. Die größte Bedeutung haben Kopplungen von chromatographischen oder elektrophoretischen Trennverfahren mit einem Massenspektrometer. (Andere, weniger selbständige Detektoren wie z.B. UV-DAD werden nicht als eigene Technik gesehen, daher wird hier nicht von Kopplungsverfahren gesprochen.) Seltener werden mehrere Trenntechniken (z.B. HPLC und CE) oder mehrere Massenspektrometer gekoppelt (z.B. Sektorfeld und Ionenfalle). Dem Erfindungsreichtum sind hierbei kaum Grenzen gesetzt. An dieser Stelle sollen nur die im Rahmen dieser Arbeit angewandten Techniken GC/MS, LC/MS und CE/MS beschrieben werden.

2.4.1 GC/MS

Die GC/MS-Kopplung ist technisch am einfachsten zu realisieren und wird daher seit Jahrzehnten erfolgreich angewandt [48]. Als Kopplungsglied (engl. Interface) muß lediglich eine Verlängerung des Säulenofens in die Ionenquelle hineingeführt werden. Die relativ geringen Gasströme bei der GC (typischerweise 2-10 ml/min He) stellen für das Vakuumsystem der MS kein Problem dar, so daß unmittelbar die Ionisation durch die Standardverfahren Elektronenstoß (EI) und chemische Ionisation (CI) erfolgen kann.

2.4.2 LC/MS

Im Gegensatz zur GC/MS sind bei der Kopplung der HPLC an die Massenspektrometrie (HPLC-MS oder LC/MS) zwei wesentliche Hindernisse zu überwinden. Zum einen liegen die Analyten in Lösung vor, was bedeutet, daß eine relativ große Flüssigkeitsmenge beseitigt werden muß, ehe die Probe ins Hochvakuum der MS überführt werden kann. Zum anderen sind viele Substanzen, die mit der HPLC erfolgreich getrennt werden können, nicht unzersetzt verdampfbar und damit den Standard-Ionisationsverfahren EI und CI nicht zugänglich.
Um diese Probleme zu lösen, wurden zunächst einige Interfaces entwickelt, die inzwischen lediglich noch historische Bedeutung haben und daher nur kurz genannt werden sollen. Beim Moving-Belt-Verfahren wurde die Eluentlösung der HPLC auf ein Förderband aus Polyimid

gesprüht, getrocknet und ins Vakuumsystem befördert. Das Thermospray-Verfahren erlangte bereits größere Verbreitung: Der Eluent wurde hierbei durch eine erhitzte Kapillare versprüht und durch Anlagerung flüchtiger Elektrolyt-Ionen ionisiert. Technisch aufwendig war dabei die Entfernung des Lösungsmittels über eine Kühlfalle. Beim Particle-Beam-Verfahren wird der Eluent mit Helium versprüht und getrocknet; das gebildete feine Aerosol wird über Blenden (Skimmer) in die MS gesaugt, verdampft und mit EI oder CI ionisiert. Problematisch ist die Fokussierung des neutralen Partikelstrahls, was zu einer relativ bescheidenen Empfindlichkeit führt. Beim Continuous Flow Fast Atom Bombardment werden dem Analyten ca. 2-5 % einer schwerflüchtigen Matrix (Glycerol o.ä.) zugesetzt und ein relativ kleiner Anteil der Lösung über eine Split-Schaltung in die MS geleitet; nach Trocknung bleibt der Matrixfilm zurück, wird auf eine Metallfritte geleitet und durch Beschuß mit schnellen Cäsium-Ionen ionisiert. Auch dieses Verfahren ist wegen seiner Kompliziertheit wenig praktikabel.

Der entscheidende Durchbruch hin zu einer breiten Anwendung der LC/MS-Technik wurde durch die Einführung des Elektrospray-Interface erreicht (siehe 2.3.1).

Der große Vorteil besteht darin, daß die Ionisation unter Atmosphärendruck erfolgt und das Lösungsmittel gar nicht erst in das Vakuumsystem des Massenspektrometers gelangt. Dabei können moderne ESI-Interfaces mit Flußraten von ca. 0,5 µl bis 1,5 ml/min zuverlässig arbeiten, wobei die erreichten Intensitäten konzentrationsabhängig und weitgehend unabhängig von der Flußrate sind. Damit können auch konventionelle 4 mm Säulen, die mit typischen Flußraten um 1 ml/min betrieben werden, für die LC/MS eingesetzt werden. (Dennoch zeichnet sich in der HPLC ein Trend zu kleineren Säulendurchmessern, z.B. 2 mm, ab, da neben geringerem Laufmittelverbrauch auch bessere Trennleistungen gezeigt wurden; diese Entwicklung ist sicherlich günstig für die LC/MS.) Die HPLC-ESI-MS hat sich zu einem Standardverfahren in Forschung und Qualitätskontrolle entwickelt [127,88,147]. Eine weitere API-Technik, die sich für die LC/MS-Kopplung eignet, ist APCI (siehe 2.3.1). Eine wichtige Einschränkung besteht bei ESI und APCI darin, daß der Eluentenstrom nur flüchtige Bestandteile enthalten sollte, also keine anorganischen Salze wie etwa Phosphatpuffer, da solche Bestandteile das Massenspektrometer durch Auskristallisation verunreinigen. Meist ist es möglich, anorganische Puffer durch flüchtige organische Salze wie z.B. Ammoniumacetat zu ersetzen oder sie durch eine entsprechende Probenvorbereitung oder über eine Ventilschaltung zu entfernen. Da jedoch insbesondere im Bereich der biologischen und medizinischen Wissenschaften vielfach nichtflüchtige Puffer verwendet werden, geht ein Trend zu solchen Interfaces, die diese Belastung verkraften können, z.B. dadurch, daß das Elektrospray auf eine Lochblende gerichtet wird, die ständig mit Lösungsmittel gespült wird, so daß sich keine Ablagerungen bilden können [11].

Die Signalintensität und damit die erreichbare Empfindlichkeit hängen einerseits von der Ionisierbarkeit des Analyten (Vorhandensein und Zugänglichkeit entsprechender polarer funktioneller Gruppen) und andererseits von den Elektrospray-Eigenschaften des Laufmittels ab.
Ein besonderer Vorzug der LC/MS besteht darin, daß häufig keine vollständige chromatographische Trennung der Analyten mehr erforderlich ist, da sie auf Grund ihrer unterschiedlichen m/z-Werte spezifisch detektiert werden können. Das ermöglicht eine Verkürzung der Analysenzeiten und damit die Einsparung von Zeit und Lösungsmittel. Eine weitere Erhöhung der Spezifität und Empfindlichkeit ist durch die Detektion im MS/MS bzw. MS^n-Modus möglich (siehe 2.3.2). Eine aktuelle Abhandlung zur LC/MS gibt die Literatur [139].

2.4.3 CE/MS

Die Kopplung der Kapillarelektrophorese mit einem Massenspektrometer als Detektor verspricht ein hohes Potential, denn man kombiniert dabei eine außerordentlich leistungsfähige Separationstechnik mit einem vielseitig einsetzbaren, hochspezifischen und empfindlichen Detektor. Zunächst einmal erscheint die Problematik ähnlich der LC/MS-Kopplung: die Analyten liegen in Lösung vor, sie müssen ionisiert und ins Vakuum überführt werden. Folgerichtig kommen prinzipiell die gleichen Interfaces in Frage, insbesondere das Elektrospray-Interface. Jedoch sind der CE/MS-Kopplung eine Reihe von Problemen inhärent. An erster Stelle steht der geringe Fluß des Lösungsmittels aus der CE-Kapillare. Bei Verwendung der üblichen 50 µm ID Kapillaren beträgt dieser weniger als 100 nl/min, was bei Benutzung kommerzieller ESI-Interfaces nicht ausreicht, um einen stabilen Elektrospray zu garantieren. Ein weiteres Problem ist die elektrische Kopplung. Üblicherweise wird die für die elektrophoretische Trennung erforderliche Hochspannung über eine Elektrode in das Elektrolytgefäß an der Einlaßseite der CE-Kapillare eingebracht, während das Auslaßende auf Massepotential liegt. Wird das Auslaßende in ein MS-Interface geführt, muß eine kontinuierliche elektrische Verbindung zum Massepotential bestehen, anderenfalls bricht die Stromstärke zusammen, und der CE-Lauf ist nicht auswertbar. Daher ist es nicht ohne weiteres möglich, das Auslaßende der CE-Kapillare in eine Düse zu führen, um trotz der geringen Flüsse eine Versprühung herbeizuführen. Ein drittes Problem besteht in einer starken Einschränkung der Auswahl an Pufferelektrolyten, da lediglich flüchtige Substanzen eingesetzt werden sollten [79] (siehe 2.4.2). Während diese Maßgabe für die HPLC i. d. R. durchaus zu verschmerzen ist, spielen die Elektrolyte in der CE eine überragende Rolle, und ihr Austausch erfordert, soweit überhaupt möglich, oft erhebliche Methodenumstellungen. Um diese Probleme zu lösen, wurden verschiedene Konstruktionen beschrieben [5,13,94,89]. Die einfachste Lösung besteht darin,

die CE-Kapillare durch die ESI-Nadel hindurchzuführen und konzentrisch um die Kapillare einen Strom von zusätzlicher Flüssigkeit (engl. **Sheath Liquid**, meist einige µl/min) hindurchzuleiten [92], um dadurch die Menge der beim Elektrospray zur Verfügung stehenden Flüssigkeit zu erhöhen und die elektrische Verbindung mit der ESI-Nadel zu bewerkstelligen. Diese Lösung bietet verschiedene Vorteile, so z.B. die Tatsache, daß das Sheath Liquid nach den Erfordernissen des ESI-Prozesses ausgewählt werden kann (z. T. jedoch Einfluß auf die CE-Trennung ! [124]), vor allem aber ist es die einzige Möglichkeit, ohne größere Modifikationen an der Kapillare und am Interface auszukommen. Der größte Nachteil liegt auf der Hand: das Sheath Liquid bewirkt eine Verdünnung der Lösung, weshalb eine relativ schlechte Konzentrationsempfindlichkeit resultiert [33]. Daraus ergibt sich, daß die Flußrate des Sheath Liquid so gering wie möglich gehalten werden sollte. Ob die hierbei erzielten Empfindlichkeiten brauchbar sind, hängt hauptsächlich von der Ionisierbarkeit des Analyten bei der ESI ab. Verschiedene Konstruktionen wurden beschrieben, um diese Nachteile zu umgehen.

Ein sogenanntes **Sheathless** Interface kommt ohne Hilfsflüssigkeit aus. Die CE-Kapillare wird dabei am vorderen, aus der ESI-Nadel herausragenden Ende sorgfältig angespitzt und die Spitze vergoldet. An diese Goldspitze wird eine elektrische Verbindung zur ESI-Hochspannungsquelle hergestellt. Wegen der starken auftretenden elektrischen Felder ist häufig der Einsatz eines Schutzgases (meist SF_6) erforderlich, um Entladungen zu vermeiden [129]. Eine weitere Lösung ist das **Liquid Junction** Interface. Hierbei wird die CE-Kapillare über ein spezielles T-Stück mit einer düsenartigen Spitze und einem Pufferreservoir verbunden, über das der elektrische Kontakt hergestellt wird. Die Justierung des möglichst totvolumenarmen T-Stücks ist dabei höchst problematisch. Eine weitere Variation stellt das Direktelektroden-Interface [30] dar, bei dem die ESI-Spannung über einen exakt zu positionierenden Golddraht in den Auslaßfluß der CE-Kapillare angelegt wird. Da die zuletzt beschriebenen Lösungen nicht kommerziell erhältlich sind, ein hohes Maß an handwerklichem Geschick erfordern und zudem nicht sehr zuverlässig arbeiten, ist die Anwendung des Sheath Liquid Interfaces noch immer am populärsten und wird weiter optimiert [119]. Die Nachteile haben jedoch bisher verhindert, daß aus der CE/MS eine Routinemethode vergleichbar der LC/MS wird. Eine befriedigende, auch kommerziell erhältliche Lösung steht noch aus.

3 Materialien und Methoden

Im folgenden Teil werden zunächst die Bezugsquellen der wichtigsten Chemikalien genannt. Es handelt sich, soweit nicht anders erwähnt, um Katalogware renommierter Laborchemikalienhersteller in der besten verfügbaren Reinheit. Teilweise wurden verschiedene Chargen benutzt, die jedoch gleichbleibende Qualität aufwiesen und daher nicht genannt sind. Auf die Angabe von Bestellnummern wurde wegen ihrer Veränderlichkeit ebenfalls verzichtet.
Im Anschluß wird die benutzte Methode zur Gewinnung von Stratum-corneum-Lipiden kurz beschrieben.
Darauf folgen die experimentellen Erläuterungen zu den benutzten analytischen Methoden CE/MS, LC/MS, GC/MS und MS/MS.

3.1 Chemikalien

1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamin (POPE), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylserin wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) gekauft. Alle anderen Phospholipid-Reinsubstanzen sowie L-α-Phosphatidylcholin (Lecithin aus Eigelb sowie aus Soja) wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen.
Ammoniumacetat wurde gleichfalls bei Sigma bestellt.
Ceramid III, eine Nicht-Hydroxyfettsäure-Ceramidmischung (nach Literatur [132,103] eigentlich als Ceramid 2 einzuordnen) und Ceramid IV, eine 2-Hydroxyfettsäure-Ceramidmischung, beide hergestellt aus Sphingomyelin (Rinderhirn), wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die darin enthaltenen Ceramide haben ausschließlich Sphingosin (C-18:1) als langkettige Base.
N-Stearoyl-phytosphingosin (Ceramid III), N-Oleoyl-phytosphingosin (Ceramid IIIb) und N-(2-Hydroxystearoyl)-phytosphingosin (Ceramid VI) waren Geschenke von Cosmoferm (Delft, Niederlande) [18]. Dabei wurde jeweils die Phytosphingosinbase (ausschließlich C-18) biotechnologisch hergestellt und anschließend die Fettsäure partialsynthetisch hinzugefügt. N-Stearoyl-sphinganin (Ceramid 2) war ein Geschenk von Sederma (Le Perray en Yvelines, Frankreich) und ist totalsynthetisch hergestellt [118]. Das Pseudoceramid N-(3-Hexadecyloxy-2-hydroxypropyl)-N-(2-hydroxyethyl)-palmitinsäureamid wurde von Dr. B. Rattay (Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle) nach Literatur [51] synthetisiert und zur Verfügung gestellt. N-Palmitoyl-sphingosin wurde ebenfalls am

Hause synthetisiert [6]. Sphingomyelin aus Eigelb kam wiederum von Avanti Polar Lipids. N-Hexanoyl-sphingosin und Cholesterol-3-sulfat kamen von Sigma.

Alle eingesetzten Lösungsmittel waren HPLC-rein bzw. Gradient Grade von verschiedenen Lieferanten (Merck, Darmstadt; Mallinckrodt Baker, Deventer, NL; Fisher Scientific, Kahla). Insbesondere beim häufig eingesetzten Methanol wurde auf MS-spezifische Qualitätsmerkmale, z.B. die Verunreinigung mit Weichmachersubstanzen, geachtet. Auch bei der Aufbewahrung von Lösungen wurden Kunststoffgefäße vermieden, um die Kontamination mit Weichmachern auszuschließen.

Die bei der Gaschromatographie angewandten Derivatisierungsreagenzien N,O-*bis*-(Trimethylsilyl)-acetamid (BSA), Trimethylchlorsilan (TMCS), N-Trimethylsilylimidazol (TSIM), Hexamethyldisilazan (HMDS) sowie Pyridin (99+%) wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.2 Gewinnung humaner Stratum-corneum-Ceramide

Es wurde eine modifizierte Bligh-Dyer-Extraktion angewandt. 1 g palmoplantares Stratum corneum wurde in 100 ml Chloroform/Methanol 1:1 (V/V) suspendiert und 24 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Der Extrakt wurde durch einen gewöhnlichen Papierfilter filtriert und mit 30 ml 145 mM PBS-Puffer (pH = 7,3) gewaschen, wobei das Cholesterolsulfat durch den Aussalzeffekt in die organische Phase gedrängt wird. Die organische Phase wurde gesammelt und unter Vakuum zur Trockne eingedampft. Die sorgfältig getrockneten Lipide wurden in so viel Chloroform/Methanol 1:1 (V/V) wieder aufgenommen, daß eine Stammlösung von 5 mg/ml resultierte. Bis zur Verwendung wurde diese bei - 18 °C gelagert.

Die HPTLC-Trennung des Lipidextrakts erfolgte mit Hilfe eines AMD-Gerätes der Fa. Camag (Muttenz, Schweiz) nach einer Prozedur, die in [149] beschrieben ist. Allerdings wurden 100 µl Lipidextrakt aufgetragen, was eine Kompromißlösung zwischen semipräparativer Ausbeute und Trennergebnis darstellte. Links und rechts des Extrakts wurden Standards aufgetragen. Diese Bereiche wurden abgetrennt und separat detektiert. Anhand der R_f-Werte erfolgte die Bandenzuordnung im nicht detektierten Bereich. Mehrere gut zuzuordnende Banden (Ceramid 2, 3, 4, 6, Cholesterol und Cholesterolsulfat wurden mittels Skalpell abgekratzt. Die jeweiligen Kieselgelfraktionen wurden mit Chloroform/Methanol 1:1 suspendiert und 10 min ins Ultraschallbad gegeben. Anschließend wurde das Kieselgel 10 min bei 3000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde ohne weitere Probenvorbereitung mittels HPLC-MS analysiert.

3.3 CE/MS

Sämtliche Kapillarelektrophoreseexperimente wurden mit dem HP^{3D}CE System von Hewlett-Packard (Waldbronn) durchgeführt (siehe Abb. 10). Zur CE/MS wurde das dazu gehörige kommerziell erhältliche CE/MS-Kit benutzt, welches insbesondere eine spezielle Kapillarkassette enthält, die das seitliche Herausführen der CE-Kapillare und eine Temperierung erlaubt. Zur Detektion wurde ein Ionenfallen-Massenspektrometer vom Typ LCQ (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA bzw. ThermoQuest, Egelsbach; siehe Abb. 11) eingesetzt, das mit einem Elektrospray-Interface ausgerüstet war.

Abb. 10: Das HP^{3D}CE-System. Links ist die UV/VIS-Meßzelle (Alignment Interface) vergrößert dargestellt.

Abb. 11: Das Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan LCQ.

Für die CE/MS-Kopplung mußte eine größere ESI-Düse und eine größere Elektrospraynadel als gewöhnlich eingebaut werden, um das Hindurchführen der CE-Kapillare (Außendurchmesser 360 µm) zu ermöglichen. Abb. 12 zeigt schematisch die verwendete CE/MS-Kopplung.

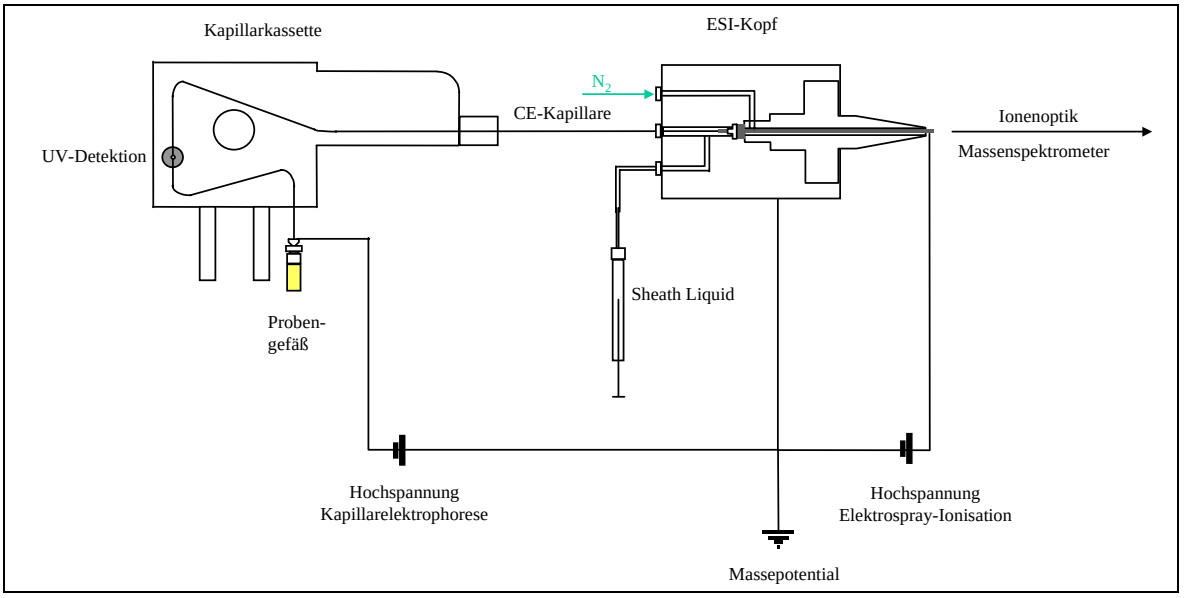


Abb. 12: Schema der CE/MS-Kopplung

Methyl-Sil desaktivierte CE-Kapillaren (75 µm ID) wurden als Meterware von CS (Langerwehe) bezogen. Es wurde eine Hilfsflüssigkeit (Sheath Liquid) zugesetzt, um stabile ESI-Bedingungen zu erreichen (Methanol/Wasser 80:20). Im Positivmodus waren mindestens 0,5 µl/min notwendig (z.T. 1 % Essigsäure zugesetzt), im Negativmodus 2-5 µl/min (1 % Tri ethylamin oder Ammoniumhydroxid zugesetzt).

CE-Elektrolytlösungen wurden durch einen 0,2 µm PTFE-Membranfilter filtriert und 10 min im Ultraschallbad entgast. Zur Zusammensetzung des CE-Elektrolyten als Ergebnis einer Optimierung siehe 4.1.1. Die Probenpräparation der Phospholipide war sehr einfach: 50 µl der handelsüblichen Chloroformlösungen (10 mg/ml) wurden mit 1 ml Acetonitril/Isopropanol/n-Hexan 57:38:5 verdünnt. Bei Injektion größerer Probenvolumina wurde häufig ein Zusammenbrechen der Stromstärke beobachtet, was mit der Ausbildung eines isolierenden Pfropfens zu erklären ist. Um diesen Effekt fortan zu vermeiden, wurden der Probenlösung jeweils 10 µl Eisessig zugesetzt. Selbstverständlich können die Proben auch durch Lösen der Phospholipide in CE-Elektrolyt hergestellt werden.

Auch bei gleicher Empfindlichkeit wurde der SIM-Modus gegenüber dem Full Scan häufig wegen des geringeren Speicherplatzbedarfs bevorzugt.

Da der EOF unter den gegebenen Bedingungen keine Rolle spielt, kann auf die Konditionierung der Kapillare mit NaOH verzichtet werden. Es wird lediglich vor jedem Lauf 4 min mit

CE-Elektrolyt gespült. Die Probeninjektion erfolgte durch Druck (normalerweise 50 mbar, 4 s; die Injektionszeit wurde z.T. bis auf 1 min verlängert). Die Kapillartemperatur wurde mittels Luftkühlung auf 25 °C eingestellt. Bei den Trennungen lag üblicherweise eine Spannung von + 30 kV an der Einlaßelektrode an, bei negativer Polarität kehrt sich die Migrationsreihenfolge um. Die effektive Trennspannung ergibt sich aus der Differenz zwischen der nominalen CE-Spannung und der ESI-Spannung, die anstelle des üblichen Massepotentials an der Auslaßelektrode anliegt. Voraussetzung für das Funktionieren der CE/MS-Kopplung ist das Vorhandensein eines ausreichenden kontinuierlichen Flüssigkeitsstromes zwischen dem Auslaßende der Kapillare und der ESI-Nadel, der die elektrische Verbindung herstellt. Da kein EOF vorhanden ist, wurde eine leichte Druckdifferenz (5 mbar) angelegt, um Stromzusammenbrüche bzw. Spannungsüberschläge zu vermeiden.

Das Kapillarelektrophoresegerät und das Massenspektrometer wurden getrennt über zwei Computer gesteuert. Auch wenn keine UV-Detektion erfolgte, mußte die UV-Zelle (sog. Alignment Interface) mit einem Kapillarstück als Atrappe versehen werden, da sonst die Kapillarkassette vom System nicht erkannt wurde. Das Massenspektrometer konnte jeweils erst nach dem Start eines CE-Laufs zugeschaltet werden, weil anderenfalls am CE-System eine Stromstärke gemessen wird, ohne daß das System Spannung angelegt hat, was eine Fehlermeldung verursacht. Anfangs wurde vom Hersteller des Kapillarelektophoresegerätes empfohlen, zwischen der ESI-Spannung des Massenspektrometers und dem Massepotential eine Kurzschlußverbindung über einen hochohmigen Widerstand (100 MΩ) zu legen, was zu einer zusätzlichen Spraystromstärke von ca. 40 µA führte (bei 100 µA wird die ESI-Spannung abgeregelt). Mit dieser Konfiguration wurden die beschriebenen Messungen durchgeführt. Späterhin teilte der Hersteller des Massenspektrometers mit, daß Tests ergeben haben, daß diese Vorsichtsmaßnahme nicht notwendig ist.

Bei den Versuchen zur Kapillarelektrochromatographie (CEC) wurden mit RP-18-Material gepackte Kapillaren von zwei verschiedenen Herstellern getestet. Nach dem Slurry-Verfahren hergestellte CEC-Kapillaren (CEC-C18, 3 µm Partikelgröße, 490 mm x 100 µm ID) wurden von Hewlett-Packard (Waldbronn) bezogen [21]. Elektrokinetisch gepackte Kapillaren vom Typ EP-100-35-C18 (450 mm x 100 µm) wurden von Unimicro Technologies (Pleasanton, CA, USA) gekauft [24]. Zur Druckstabilisierung wurde eine Gasflasche (Stickstoff 4.0, 200 bar) über einen Druckminderer (Fa. Kayser, 10 bar) an das HP^{3D}CE-System angeschlossen. Die geräteeigene Druckregelung erlaubt eine Einstellung von 0-10 bar sowohl am Einlaß- als auch am Auslaßende.

3.4 LC/MS

Für die Analytik von Phospholipiden wurde eine Umkehrphasen-HPLC-Säule Nucleosil® 120 $3C_8$ (125 x 2 mm ID, 3 µm Teilchengröße; Macherey-Nagel, Düren) benutzt. Als mobile Phase kam Methanol/10 mM Ammoniumacetat 90:10 (V/V) mit einer Flußrate von 0,4 ml/min zum Einsatz. In der Ceramidanalytik wurden alle beschriebenen Trennungen auf einer Umkehrphasen-HPLC-Säule Nucleosil® 120 $3C_{18}$ (125 x 2 mm ID, 3 µm Teilchengröße; Macherey-Nagel, Düren) ohne Vorsäule durchgeführt. Die Optimierung führte zu einem Laufmittelgemisch Methanol/Tetrahydrofuran 97:3 (Flußrate 0,4 ml/min).
Für die Quantifizierung von Cholesterolsulfat wurde die o.a. RP-8-Säule benutzt. Das Laufmittel war Methanol/Wasser 80:20 (Flußrate 0,4 ml/min).

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden neben den o.g. weitere HPLC-Säulen verwendet, insbesondere:

- eine Diol-Säule (Kieselgel modifiziert mit $-(CH_2)_3-O-CHOH-CH_2OH$) LiChrospher® 100 (125 x 4 mm ID) (Knauer, Berlin),
- eine Diol-Säule Nucleosil® 100 (125 x 2 mm ID, 7 µm Partikelgröße) von Macherey-Nagel (Düren) und
- eine Cyano-Säule (Kieselgel modifiziert mit $-(CH_2)_3-CN$) 100 x 2 mm ID (YMC Europe, Weselerwald)

Für LC/MS-Untersuchungen standen **zwei Gerätekonfigurationen** zur Verfügung:

1.) Eine HPLC-Pumpe Waters 600 E mit einem automatischen Probensammler WISP 712 (Waters, Eschborn) gekoppelt über ein ESI-Interface an ein Quadrupol-Massenspektrometer Finnigan SSQ 710C (Finnigan MAT, Bremen, jetzt ThermoQuest, Egelsbach);

2.) Eine HPLC-Pumpe Spectra System P 4000, ausgestattet mit einem Vakuummembranentgaser SCM 1000, einem automatischen Probensammler AS 3000 und einem 8-Kanal-Steuermodul SN 4000 (Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA bzw. ThermoQuest, Egelsbach), über ein ESI-Interface gekoppelt an ein Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan LCQ (Finnigan, San Jose, CA, USA bzw. ThermoQuest, Egelsbach) (Abb. 13).

Abb. 13: LC/MS-System (2.), siehe Text.

Da das SSQ 710C über ein lokales Netzwerk mit dem LCQ verbunden war, konnten Rohdateien, die an ersterem aufgenommen wurden, mit Hilfe des File Converters in LCQ-Dateien überführt werden. Bei der Quantifizierung wurde die Peakintegration im Programmteil Explore (LCQ-Software, Version 1.1 bzw. 1.2) durchgeführt.

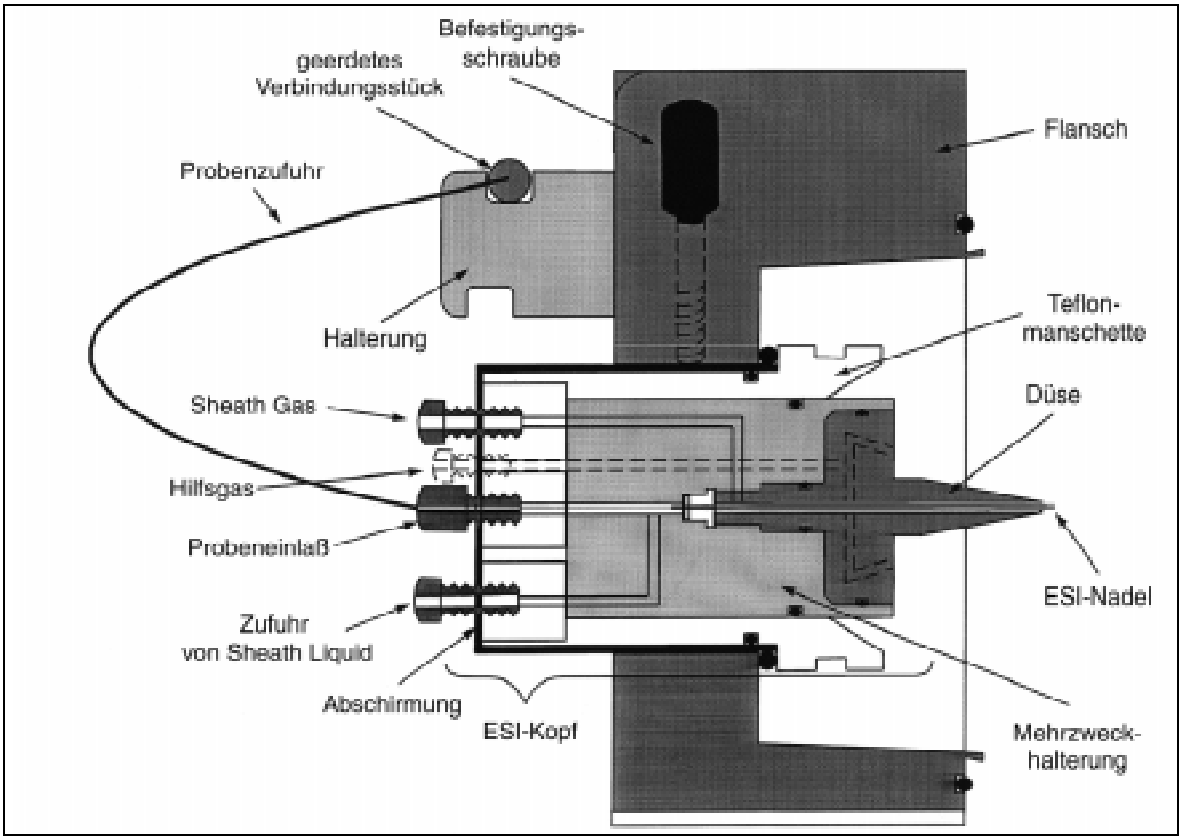


Abb. 14: Elektrospray-Interface (SSQ 710C und LCQ).

Wenn eine Peakglättung (Smoothing) durchgeführt wurde, wurde darauf geachtet, daß bei Kalibrier- und Meßproben die gleiche Glättung (i.d.R. 5-7 Punkt Gaussian) verwendet wurde.
Die Berechnung von **Kalibrierkurven** und Probenkonzentrationen mit Hilfe der ermittelten Peakflächen erfolgte in Excel® (Microsoft). Die Kalibrierfunktionen wurden als Trendlinien (Typ: linear, exponentiell oder polynomisch) berechnet. Ebenda wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt als Maß für die Güte der Anpassung einer Kalibrierfunktion an die Kalibrier werte.

Konzentrationsangaben erfolgen aus pragmatischen Gründen in µg/ml bzw. ng/ml. Eine Umrechnung in molare Konzentrationen ist über die Molmasse problemlos möglich. Auf Doppelangaben wurde daher verzichtet. Quantitative Angaben erfolgen zweckmäßig auf der Basis der Konzentrationen anstelle von Absolutmengen. Zu deren Ermittlung müßte die entsprechende Konzentration mit dem Injektionsvolumen (bei der LC/MS 10 µl) multipliziert werden. Das mindestens erforderliche Volumen Probenflüssigkeit lag bei Verwendung entsprechender handelsüblicher Gefäße bei ca. 50 µl.

Zur **Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen** wurden zunächst der Mittelwert des Signal-Grundrauschens (Blindwert) und das Ausmaß (Amplitude) des Grundrauschens (Noise) ermittelt. Diejenige Probenkonzentration, welche einen Peak verursacht, dessen Höhe (Differenz aus den Intensitäten von Peakmaximum und Basislinie) in der Intensität der Summe aus Blindwert und dem dreifachen Rauschpegel entspricht, wird als Nachweisgrenze definiert. Die Probenkonzentration, die einen Peak ergibt, dessen Höhe der Summe aus Blindwert und sechsfachem Rauschen entspricht, heißt Bestimmungsgrenze. Abb. 15 zeigt dies noch einmal im Diagramm. Vereinfacht ausgedrückt, ist das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) bei der Nachweisgrenze 3:1, bei der Bestimmungsgrenze 6:1. Wegen der festen Beziehung zwischen diesen beiden Parametern wird häufig nur einer davon, meist die Nachweisgrenze, angegeben.
Darüber hinaus wird zur Beurteilung der Verläßlichkeit und Reproduzierbarkeit einer analytischen Methode die **Relative Standardabweichung** (RSD) in % angegeben, zu deren Ermittlung eine Probe mehrfach analysiert wird (n = Anzahl der Wiederholungsmessungen) und die Standardabweichung durch den Mittelwert dividiert sowie mit 100 % multipliziert wird. Dabei handelt es sich um Durchschnittswerte. Ist die RSD in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen deutlich verschieden, wird ein Bereich angegeben.

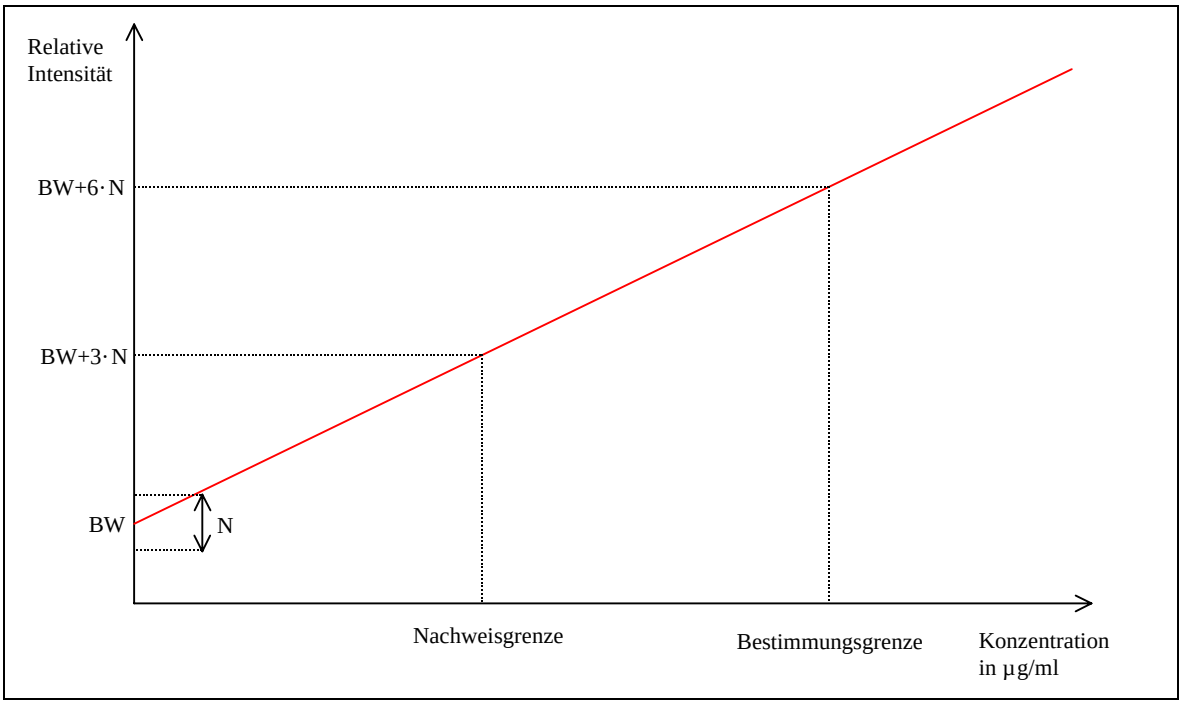


Abb. 15: Zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. BW: Blindwert (Mittelwert des Grundrauschens), N: Ausmaß (Amplitude) des Grundrauschens (engl. Noise). Modifiziert nach [116].

3.5 GC/MS

Bei den beschriebenen Messungen wurde folgendes Derivatisierungsschema angewandt:

1 mg Ceramid
+ 0,5 ml BSA/TMCS/TSIM 3:2:3
3 h im Thermoblock bei 75 °C.

Die beschriebenen GC/MS-Experimente wurden am Institut für Klinische Pharmakologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg an einem Gaschromatographen HP 5890 Series II ausgeführt, der mit einem Quadrupol-Massenspektrometer HP 5989 A MS Engine gekoppelt war (Hewlett-Packard, Waldbronn). Es wurde eine Optima® 5 Säule (30 m x 0,32 mm ID) mit einer Filmdicke von 0,1 µm benutzt (Macherey-Nagel, Düren). Als Gas wurde Helium eingesetzt (0,6 bar, bei 260 °C Fluß ca. 1,2 ml/min). Zur Probenaufgabe wurden jeweils 0,5 µl im Splitless-Modus injiziert. Das Temperaturprogramm startete bei 260 °C und steigerte sich um 3 K/min bis auf 360 °C.

3.6 MS/MS und MS^n

Elektrospray-Tandem-MS (MS/MS) und Mehrfach-MS (MS^n)-Untersuchungen wurden, falls nicht anders vermerkt, am Finnigan LCQ (siehe 3.4 und Abb. 11) vorgenommen.

Source CID bedeutet das unspezifische Anlegen einer Beschleunigungsspannung in der Octapolregion. Der Parameter ist von 0-100 % wählbar, was einer Octapol-Offset-Gleichspannung von ± 0-100 V entspricht. Dadurch erhalten die Ionen kinetische Energie, die bei Zusammenstößen mit Gasteilchen zur Fragmentierung führen kann (Collision-Induced Dissociation).

Um **MS/MS** bzw. **MS^n**-Experimente an der Ionenfalle durchzuführen, werden spezifisch die gewünschten Ionen mit einer bestimmten Bandbreite (meist 1,5-3 amu) isoliert und in der Ionenfalle (siehe Abb. 13) fragmentiert. Zur Unterscheidung spricht man von Massenanalysator-CID. 0-100 % relative Kollisionsenergie entsprechen hierbei 0-5 V (Peak zu Peak) der Resonanz-Anregungs-Radiofrequenzspannung.

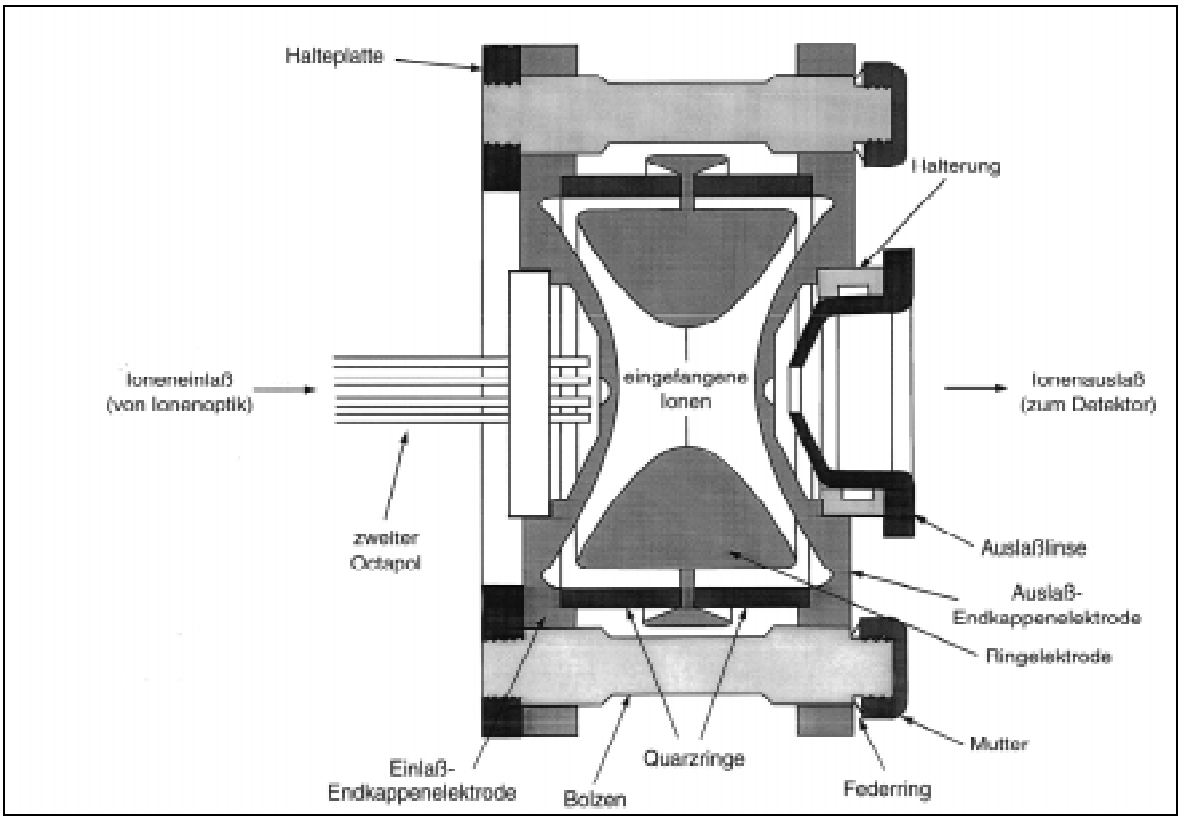


Abb. 16: Die Ionenfalle (Ion Trap), Massenanalysator des LCQ.

Einige vergleichende MS/MS-Studien sowie Vorläuferionen-Analysen (Precursor Ion Scan) wurden an einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 365 (PE Sciex, Thornhill, Ontario, Kanada) ausgeführt, das ebenfalls mit pneumatisch unterstützter Elektrospray-Ionisierung arbeitet (Firmenbezeichnung Turbo Ionspray).

Als pragmatische Vorgehensweise zur Standardisierung von MS/MS-Experimenten wurde die Kollisionsenergie i. d. R. soweit erhöht, bis die Intensität des Ausgangsions auf 10 % abgesunken ist. Wenngleich am selben Gerätetyp auch die für ein bestimmtes Fragmentierungsergebnis benötigte relative Kollisionsenergie sehr gut reproduzierbar war, sind somit auch Spektrenvergleiche zwischen verschiedenen Geräten erleichtert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Teil werden die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Analysenmethoden dargestellt und diskutiert. Dabei werden die untersuchten Lipide (Phospholipide, Ceramide und Cholesterolsulfat) in drei Unterpunkten abgehandelt. Für alle diese Lipide wurden chromatographische und/oder elektrophoretische Trennmethoden mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt, die i. d. R. eine Quantifizierung auch in komplexer Matrix erlauben. Weiterhin nehmen qualitative massenspektrometrische Untersuchungen (Tandem- und Mehrfach-MS) einen breiten Raum ein, da hierdurch Strukturinformationen zugänglich sind, die Elektrospray als sanfte Ionisationsmethode per se nicht liefert. Primär wurden diese Elektrospray-MS/MS- bzw. MS^n-Studien an Lösungen von Reinstoffen oder Stoffgemischen ohne vorherige Stofftrennung durchgeführt. Jedoch können diese Techniken ebenso zur Detektion in der HPLC angewendet werden, wie z.B. die LC/MS/MS-Untersuchungen an Ceramiden gezeigt haben.

4.1 Phospholipide

Entsprechend der großen Bedeutung der Phospholipide wurde bereits eine Vielzahl von Analysenmethoden für diese Substanzklasse oder einzelne Vertreter beschrieben. Dennoch besteht auch hier weiterhin ein großer Entwicklungsbedarf, insbesondere hinsichtlich Vereinfachung, erforderlicher Analysenzeit, Spezifität, Empfindlichkeit und notwendiger Substanzmenge.
Die zuerst dargestellte CE/MS-Trennung ist vorwiegend methodisch von Interesse. Dagegen zeichnet sich die danach beschriebene LC/MS-Methode durch Robustheit und Leistungsfähigkeit für die Quantifizierung aus. MS/MS- und MS^n-Studien runden das Spektrum der Untersuchungen an Phospholipiden ab. Darüber hinaus wird eine LC/MS-Methode zur Quantifizierung des synthetischen bolaamphiphilen Stoffs 22-Hydroxydocosylphosphatidylcholin aufgeführt.

4.1.1 Analytische Trennung durch Nichtwäßrige Kapillarelektrophorese mit massenspektrometrischer Detektion

Die **Kapillarelektrophorese** (CE) hat im zurückliegenden Jahrzehnt eine rasante Entwicklung genommen und wird für die Analytik einer großen Vielzahl von Substanzen erfolgreich eingesetzt. Im Bereich der Lipidanalytik erscheint ihre Anwendung jedoch begrenzt. Dazu tragen natürlich in erster Linie die mangelnde Wasserlöslichkeit der Lipide und ihre zu gerin-

ge UV-Absorption bei. Bei genauerer Betrachtung ergibt sich, daß die Anwendung der CE nur bei solchen Lipiden sinnvoll ist, die ganz oder teilweise in ionisierter Form vorliegen. Dabei bieten sich natürlich zunächst die Fettsäuren an. Mittlerweile wurden eine Reihe von Arbeiten hierzu publiziert, in denen meist die indirekte UV-photometrische Detektion angewandt wurde [29,39,97,105].

Eine weitere Klasse von Lipiden, die sich wegen ihrer vergleichsweise hohen Polarität und Ionisierbarkeit für die Kapillarelektrophorese anbietet, sind die Phospholipide. Zwei Hauptprobleme sind zu lösen: die Solubilisation und die Detektion. Ingvardsen et al. beschrieben eine MEKC-Trennung mit UV-Detektion [52]. Die bei eigener Anwendung dieser Methode erzielten Ergebnisse waren jedoch unbefriedigend. Zudem erlaubt die völlig unspezifische UV-Detektion keine exakte Zuordnung der Peaks. Daher lag es nahe, in einer **CE/MS**-Kopplung die Elektrospray-Massenspektrometrie zur Detektion einzusetzen.

Die **MEKC** weist wegen der in größeren Mengen verwendeten Tenside hinsichtlich ihrer Kompatibilität mit der ESI-MS erhebliche Nachteile auf. Von den verschiedenartigen Versuchen, diese Klippe zu umschiffen, sei hier nur die sog. *Partial Filling* Technik erwähnt [64], bei der verhindert wird, daß die tensidischen Mizellbildner in das Massenspektrometer gelangen, womit jedoch eine Reihe von Nachteilen erkauft werden. In der Arbeitsgruppe wurden Phospholipide als Mizellbestandteile eingesetzt [113-115], wobei zum Teil kurzzeitig MEKC-MS durchgeführt wurde, um die Bestandteile von Mischmizellen zu identifizieren. Dabei wurden häufig Addukte von Gallensalzen und Phospholipiden angetroffen. Diese Erscheinung ist typisch für das Verhalten amphiphiler Stoffe bei der ESI-MS, insbesondere in höheren Konzentrationen. Möglich ist aber auch, daß bereits in der CE-Elektrolytlösung Aggregate bestanden haben, die stabil genug sind, um beim Elektrospray intakt zu bleiben.

Als Alternative zur MEKC für die Analytik schlecht wasserlöslicher Substanzen wurde die **Nichtwäßrige Kapillarelektrophorese** gewählt.

Um den Löslichkeitsanforderungen der verschiedenen Substanzen gerecht zu werden, wurde ein für die Nichtwäßrige CE relativ ungewöhnliches Lösungsmittelgemisch entwickelt, das aus Acetonitril/Isopropanol/n-Hexan 57:38:5 (V/V/V) bestand.

Zur Herstellung der CE-Elektrolytlösung wurden 20 mM Ammoniumacetat in diesem Gemisch gelöst sowie 1 % Eisessig hinzugegeben, was zu einer ausreichend hohen Stromstärke bei der CE führte und die Trennung verbesserte. Alternativ kann auch Ammoniumhydroxid zugesetzt werden, wobei jedoch eine andere Migrationsreihenfolge resultiert. Da Phosphatidylcholine wegen ihrer quarternären Ammoniumfunktion eine außerordentlich starke Tendenz zur Wechselwirkung mit Silanolgruppen zeigen (vgl. Einsatz quarternärer Salze (z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid, CTAB) bei der dynamischen Wandmodifikation zur Umkehrung

des EOF), verbietet sich der Einsatz gewöhnlicher Fused-Silica-Kapillaren. Die Testung verschiedener inaktivierter bzw. belegter Kapillartypen ergab deren Gleichwertigkeit bezüglich des Analysenproblems, so daß der preiswerteste Kapillartyp gewählt wurde. Die Verwendung von unbelegten Kapillaren mit dynamischer Wandbelegung durch Zusatz von CTAB zum CE-Elektrolyten erwies sich als weniger zuverlässig, zudem führte dies zu einer Kontamination des Massenspektrometers mit diesem sehr gut ionisierbaren Stoff.

Ein Beispiel für die **Trennung** der 1-Palmitoyl-2-oleoyl-Derivate von vier verschiedenen Phospholipidklassen zeigt Abb. 17. Um alle vier untersuchten Phospholipidklassen (Phosphatidylcholine, -ethanolamine, -serine und -glycerole) detektieren zu können, wurde die Negativionisation angewandt. Liegen nur Choline und ggf. Ethanolamine vor, wie es häufig der Fall ist (z.B. in natürlichen Lecithingemischen), ist die Positivionisation vorteilhafter. Eine brauchbare Trennung wurde in einer relativ kurzen Zeit erreicht (<10 min). Die Trennung basiert auf der unterschiedlichen Polarität der Kopfgruppen. Phospholipide mit gleicher Kopfgruppe, die sich bezüglich ihrer Acylkomponenten unterscheiden, können mit dieser Methode nicht getrennt werden, da die Länge der Fettsäureketten praktisch keinen Einfluß auf das elektrophoretische Migrationsverhalten hat. Jedoch erlaubt die MS auch in diesem Falle eine

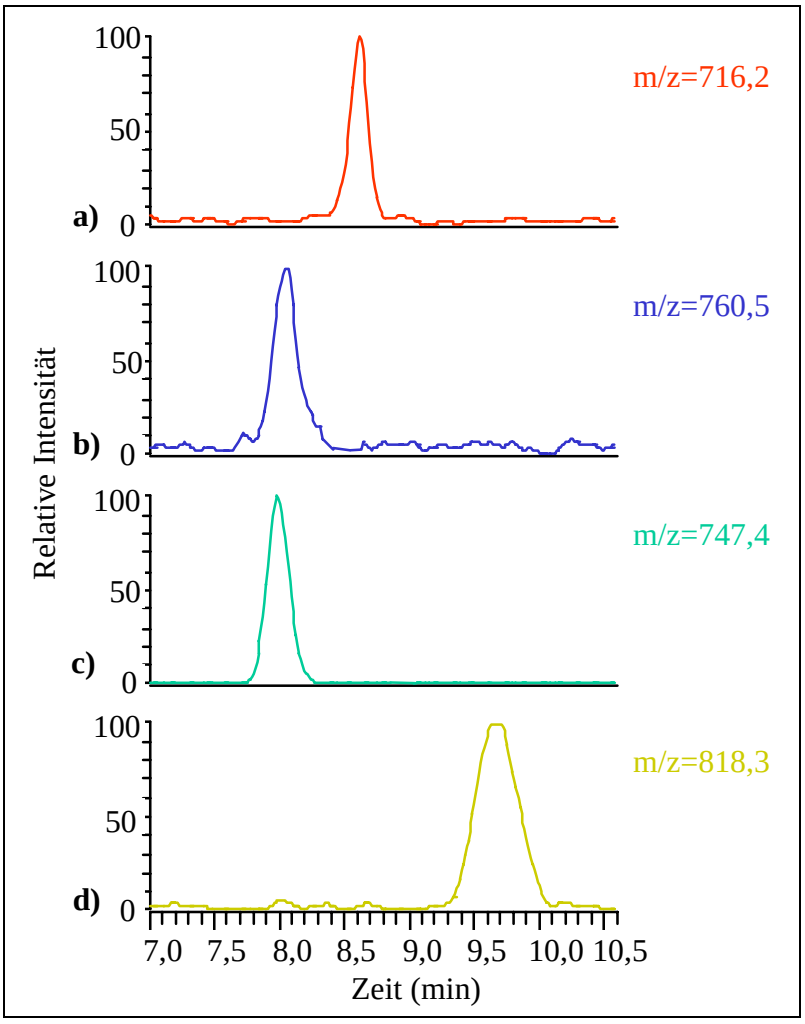


Abb. 17: CE/MS-Elektropherogramm. a) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamin (POPE), b) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylserin (POPS), c) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol, (POPG) d) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC).

getrennte Quantifizierung durch separate Auswertung verschiedener m/z-Spuren. Allerdings war die erreichte Nachweisempfindlichkeit infolge der Probenverdünnung durch die Hilfsflüssigkeit zu bescheiden und die Standardabweichung der ermittelten Peakflächen zu groß, so daß zunächst von einer Quantifizierung abgesehen wurde. Es ist zu erwarten, daß dieses fundamentale Problem der CE/MS mit den Fortschritten in der Interfaceentwicklung besser gelöst werden wird.

4.1.2 Trennung und Quantifizierung mittels LC/MS

Da die CE/MS (mit dem gegenwärtig verfügbaren Interface) in Bezug auf Empfindlichkeit, Robustheit und Automatisierbarkeit nicht überzeugen konnte, wurde alternativ eine LC/MS-Methode zur Quantifizierung entwickelt. Angesichts der großen Bedeutung der Phospholipide verwundert es nicht, daß bereits eine Reihe von Arbeiten zur HPLC-Analytik publiziert wurden. Häufig wurden Normalphasentrennungen durchgeführt, jedoch ist dies ungünstig hinsichtlich der Kompatibilität zur ESI-MS. Bei der Umkehrphasen-HPLC wurden verschiedene Detektionsmöglichkeiten beschrieben. Die schwache, völlig unspezifische UV-Absorption bei niedrigen Wellenlängen eignet sich entgegen anderslautender Behauptungen [77] wenig für eine empfindliche Quantifizierung. Daher wurde auf Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung zurückgegriffen [1]. Auch bei der mobilen Phase wurden verschiedene Versionen präsentiert. Dabei wurden Zusätze verwendet, die sich für die ESI-MS wiederum wenig eignen (Quats [1,2], p-Toluensulfonsäure bei pH 1 [71]). In [123] wurde Methanol/5 mM Ammoniumacetat 95:5 benutzt, was als Ausgangspunkt unserer Optimierung diente. Zwei Arbeiten zur ESI-LC/MS [63,14] zeigen verschiedene Vorgehensweisen, waren jedoch für die gestellte Problematik weniger geeignet.

Ziel der **Methodenentwicklung** war, eine MS-kompatible Umkehrphasen-HPLC-Methode zu entwickeln, die bezüglich Schnelligkeit, Robustheit und Empfindlichkeit befriedigende Ergebnisse liefert. Um möglichst eine Selektivität hinsichtlich der Fettsäurekettenlänge zu erhalten, wurde zunächst, wie in der Literatur beschrieben, eine RP-18-Säule eingesetzt. Damit konnten jedoch keine zufriedenstellenden Resultate erzielt werden, da die Substanzen, wenn überhaupt, sehr langsam eluierten und sehr breite Peaks verursachten. Daran ließ sich weder durch Veränderung des Ammoniumacetatpufferanteils noch durch Veränderung der Temperatur oder durch Zusatz organischer Lösungsmittel (Acetonitril, THF, n-Hexan) etwas ändern. Daher wurde auf eine RP-8-Säule umgestellt. Hier wurden mit einem Laufmittelgemisch Methanol/10 mM Ammoniumacetat 90:10 bei einer Temperatur von 60 °C gute Ergebnisse erzielt. Die **Trennung** erfolgte vornehmlich nach der Affinität zur stationären Phase (Länge

der Fettsäureketten), aber auch nach der Affinität zur mobilen Phase (Kopfgruppen). Die Detektion erfolgte im Full Scan, bei Phosphatidylcholinen und Phosphatidylethanolaminen im Positivmodus anhand der $[M+H]^+$oder $[M+Na]^+$-Ionen, bei Phosphatidylserinen im Negativmodus ($[M-H]^-$) und bei Phosphatidylglycerolen sowohl im Positiv- als auch im Negativmodus (zwei Scan-Events alternierend). Abb. 18 zeigt beispielhaft die Trennung von fünf Phospholipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen und Fettsäureresten.

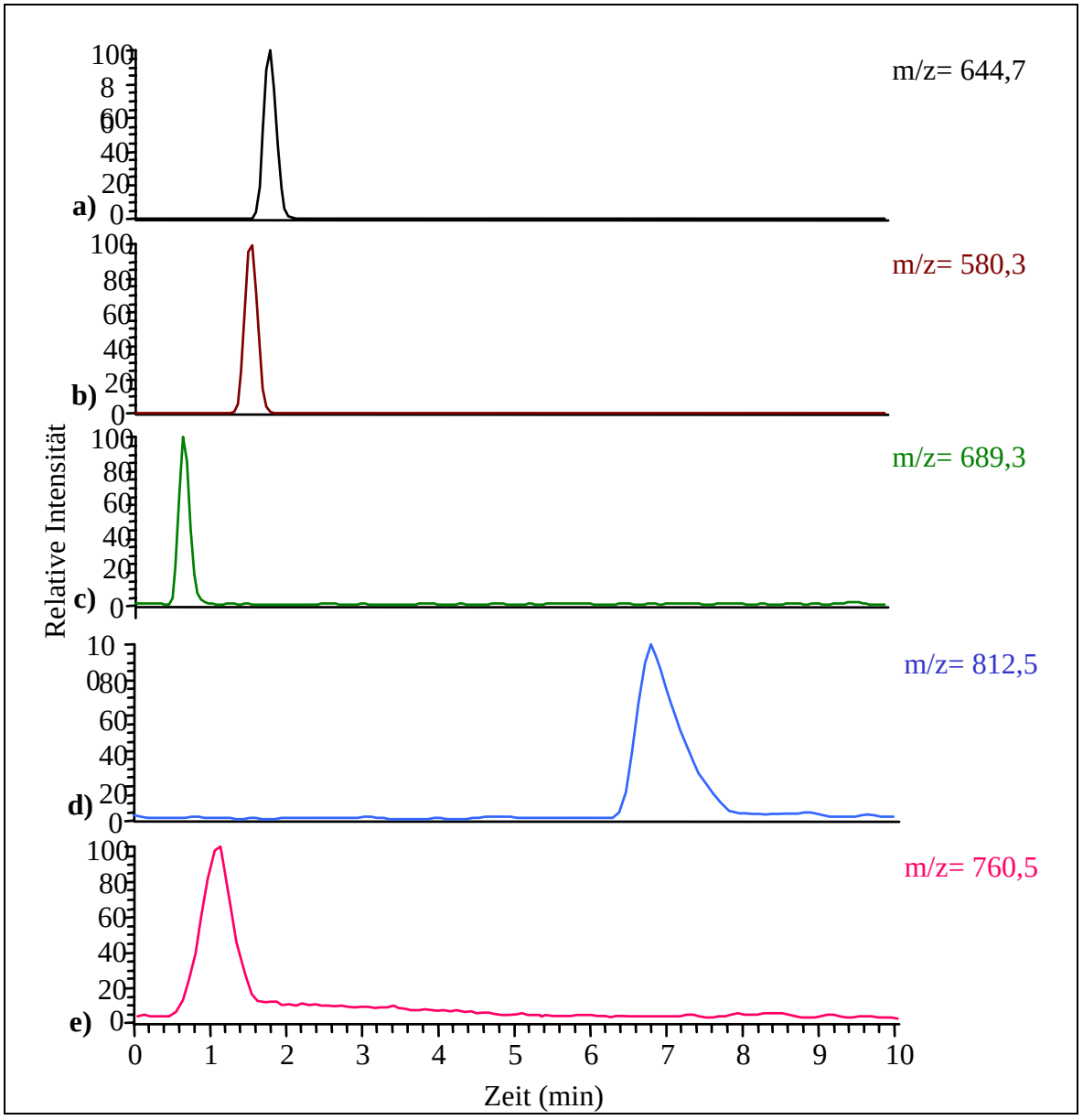


Abb. 18: LC/MS von Phospholipiden. a) Dilauroyl-phosphatidylcholin ($[M+Na]^+$), b) Dilauroyl-phosphatidylethanolamin ($[M+H]^+$), c) Dimyristoyl-phophatidylglycerol ($[M+H]^+$), d) Distearoyl-phosphatidylcholin ($[M+Na]^+$), e) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin ($[M+H]^+$).

Unter diesen Bedingungen zeigen Phospholipide mit längerkettigen Fettsäuren eine längere Retention und breitere Peaks. Dem kann durch Verringerung des Ammoniumacetatpufferanteils auf 5% erfolgreich entgegengewirkt werden, allerdings auf Kosten einer schlechteren Trennung der schneller eluierenden Substanzen.

Phosphatidylcholine haben bei gleichen Fettsäureresten größere Retentionszeiten als Phosphatidylethanolamine, und diese wiederum eluieren langsamer als Phosphatidylglycerole (und Phosphatidylserine, in Abb. 18 nicht gezeigt). 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin eluiert sehr schnell, wohl deshalb, weil die cis-Doppelbindung in der Ölsäure die Wechselwirkung mit dem Umkehrphasenmaterial behindert. Dennoch ist der Peak relativ breit, wie häufig bei Phosphatidylcholinen zu beobachten. (Die Transferkapillare am ESI-Interface bestand aus inaktiviertem Fused Silica, so daß Wandwechselwirkungen ausgeschlossen sein sollten; Verstopfungen traten auch tatsächlich nicht auf.)

Ein natürliches **Lecithingemisch**, das fast ausschließlich Phosphatidylcholine mit ähnlicher Fettsäurekettenlänge enthielt, konnte mit dieser einfachen HPLC-Methode nicht getrennt werden, da die Retentionszeiten sehr ähnlich waren; jedoch war die getrennte Quantifizierung durch separate Auswertung der m/z-Spuren möglich.

Für Phosphatidylcholine und -ethanolamine lag die **Nachweisgrenze** bei ca. 5 ng/ml, für Phosphatidylserine und -glycerole bei ca. 20 ng/ml (S/N 3:1). Die Kalibrierkurven zeigten gute Linearität über drei Größenordnungen ($R^2 > 0,99$; bei Polynom 2. Grades $R^2 > 0,999$). Die relative Standardabweichung (RSD, n=5) lag zwischen 3 und 5%.

Lysophospholipide eluieren unter den o.g. Bedingungen nahezu mit der Front.

Alternativ kann die HPLC auf einer Diol-Säule durchgeführt werden, wobei eine Trennung der verschiedenen Phospholipidklassen nach der Polarität der Kopfgruppen gelingt. Dagegen zeigt diese stationäre Phase erwartungsgemäß keinerlei Selektivität in Bezug auf die Kettenlängen der Fettsäurereste. Ähnliches gilt für Cyano-Phasen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die vorgestellte LC/MS-Methode im Vergleich mit anderen etablierten HPLC-Methoden verschiedene Vorteile aufzuweisen hat:

- vielseitige Anwendbarkeit (im Ggs. zu zahlreichen sehr spezialisierten Ansätzen),
- bei Vorliegen der Phospholipide in alkoholischer Lösung keine Probenvorbereitung (im Ggs. zu UV- und Fluoreszenzdetektion, die eine Derivatisierung erfordern),
- gute Empfindlichkeit (besser als bei UV, ähnlich wie Fluoreszenz),
- höhere Spezifität,
- Zeiteinsparung bei der Chromatographie (keine Basislinientrennung notwendig),
- sehr geringer Lösungsmittelverbrauch,

- Verfügbarkeit von Strukturinformationen durch ESI-MS/MS bzw. MS^n (siehe 4.1.3) sowie
- zuverlässige Quantifizierung anhand der Peakflächen im LC/MS-Chromatogramm (im Ggs. zur Auswertung von Peakhöhen im ESI-Massenspektrum).

22-Hydroxydocosylphosphatidylcholin weist strukturelle Verwandtschaft zu den Phosphatidylcholinen auf. Aufgrund ihrer interessanten physikochemischen Eigenschaften soll der Einfluß dieser bolaamphiphilen Substanz auf die Penetration und Permeation von Arzneistoffen untersucht werden [87]. Daher bestand der Bedarf, eine LC/MS-Methode zur Quantifizierung in einer komplexen Matrix zu entwickeln. Die Trennung ist von untergeordneter Bedeutung, da keine ähnlichen Verbindungen in biologischen Proben oder pharmazeutischen Formulierungen vorkommen. Mit einer CN-Säule (100 mm x 2 mm ID) und einem Laufmittel Methanol/Wasser 85:15 (Flußrate 0,2 ml/min) wurde bei einer Retentionszeit von 3 min ein gut quantifizierbarer Peak erhalten. Die MS-Detektion erfolgte an einem Quadrupol-Massenspektrometer im Positiv-ESI-Modus.

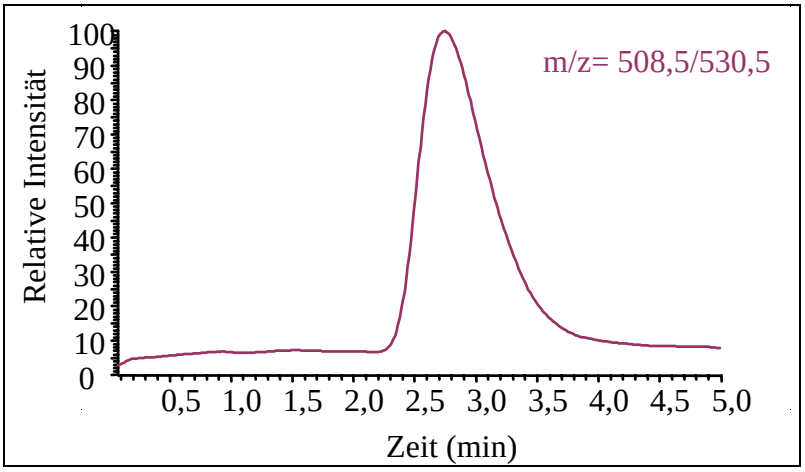


Abb. 19: LC/MS von 22-Hydroxydocosyl-phosphatidylcholin (Erläuterungen siehe Text).

Die Auswertung kann anhand der $[M+H]^+$ (m/z= 508,5), der $[M+Na]^+$ (m/z= 530,5) oder durch Zusammenfassung beider Ionen erfolgen (siehe Abb. 19). Die Konstanz des $[M+H]^+/[M+Na]^+$ Verhältnisses muß sichergestellt werden.

Die Nachweisgrenze lag bei 1,5 ng/ml, die Bestimmungsgrenze bei 3 ng/ml. Erste Ergebnisse zur Validierung ergaben eine relative Standardabweichung (RSD) von ca. 5 % (n=5).

4.1.3 Strukturuntersuchungen mittels Elektrospray-Massenspektrometrie

Es stellt in gewisser Weise eine Schwäche der Elektrospray-Ionisation dar, daß, wie bereits unter 2.3.1 ausgeführt, normalerweise nur Molekülionen und ggf. Addukte gebildet werden, nicht jedoch Fragmente, die über die Struktur eines Moleküls Auskunft geben könnten.
Eine Möglichkeit, in vielen Fällen Fragmente zu erzeugen, besteht darin, im Bereich der Ionenoptik eine zusätzliche Beschleunigungsspannung zu erzeugen, wobei durch Zusammenstöße der Ionen mit Gasteilchen Bruchstücke entstehen, die, soweit sie die entsprechende Ladung tragen, detektiert werden können. Dieses sogenannte **Source CID** ist jedoch unspezifisch, da bei einem Substanzgemisch nicht zugeordnet werden kann, welche Ausgangsmasse welches Fragment bildet.
Besser ist es daher, zunächst eine Massenanalyse durchzuführen, anschließend ein bestimmtes Ion gezielt zu fragmentieren und die Fragmente wiederum zu analysieren. Dies wird als **MS/MS** oder Tandem-Massenspektrometrie bezeichnet. Dazu benötigt man ein Triple-Quadrupol- bzw. Ionenfallen-Massenspektrometer. Letzteres erlaubt sogar **Mehrfach-MS**-Experimente (MS^n, n= 3-10), siehe 2.3.2.
Phospholipide sind sehr geeignete Objekte für MS/MS-Studien (vgl. auch [41,60,61]), da sie sich einerseits hinsichtlich ihrer Fettsäurereste und ihrer Kopfgruppen unterscheiden, andererseits aber als Naturstoffe gewissen Strukturgesetzmäßigkeiten unterliegen. Charakteristische Fragmentionen (Tochterionen) erlauben daher zusammen mit dem Wissen über ihre Struktur eine weitgehende Interpretation der MS/MS-Spektren. Es muß aber erwähnt werden, daß die Zuordnung bestimmter Strukturen zu Fragmentionen und die Ableitung von Fragmentierungsschemata letztlich hypothetisch bleibt, da eine echte Strukturaufklärung dieser unter MS-Bedingungen (Vakuum, elektrisches Feld) gebildeten Spezies nicht möglich ist. Dennoch ist eine Strukturzuordnung in vielen Fällen vertretbar und plausibel.
Positivionen-Elektrospray-Massenspektrometrie (kurz **Positiv-ESI-MS**) ergibt bei allen untersuchten Phospholipiden die $[M+H]^+$ und (häufig noch stärker) die $[M+Na]^+$ Adduktionen. Dabei steigt die Ionisationsintensität in der Reihenfolge Phosphatidylserine < Phosphatidylglycerole < Phosphatidylethanolamine << Phosphatidylcholine. Positiv **MS/MS** der Natriumaddukte führt zu Fragmentierungen, die spezifisch für die jeweilige **Kopfgruppe** sind. Während bei den Phosphatidylethanolaminen und Phosphatidylserinen die Kopfgruppe insgesamt (jedoch ohne Phosphat) abgespalten wird, zeigen die Choline eine charakteristische Abspaltung von Trimethylamin (Δ m = 59). Bei den Phosphatidylcholinen wurden darüber hinaus Fragmente detektiert, die auf die Abspaltung von Fettsäuren schließen lassen (z.B. Δ m = 256 im Falle von Palmitinsäure, Δ m = 282 bei Ölsäure). Bei den Phosphatidylserinen findet

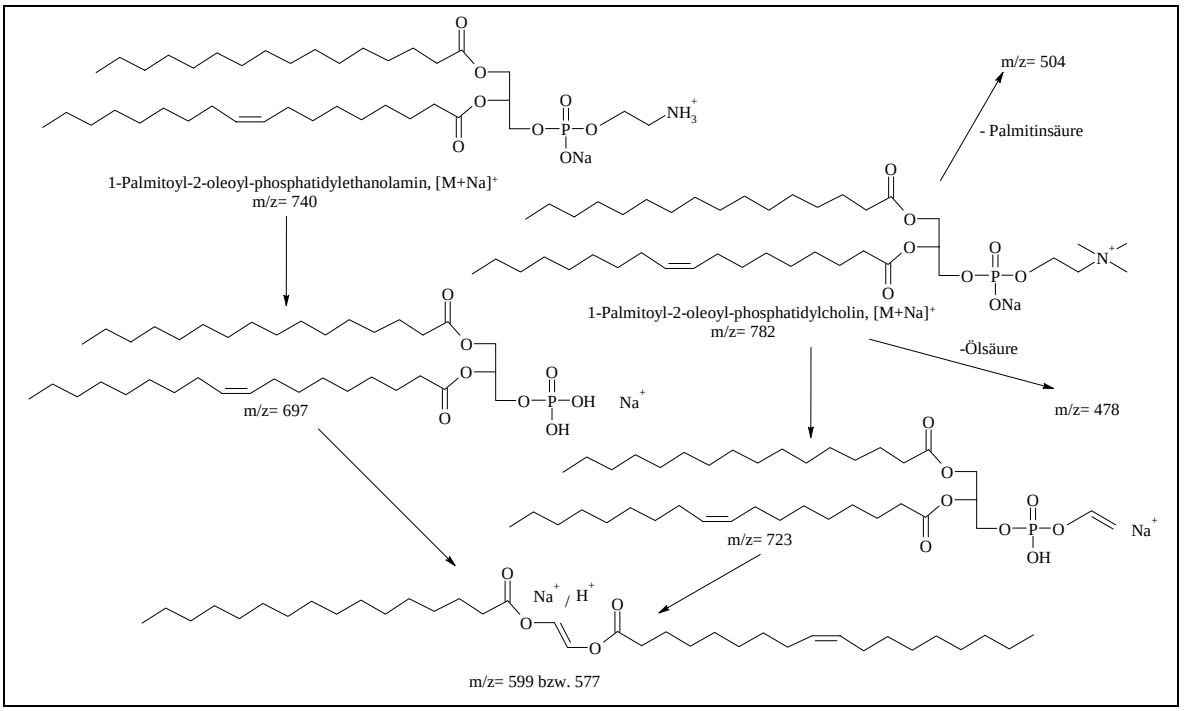


Abb. 20: Fragmentierungsschema von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamin und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin. Positiv-ESI-MS/MS bzw. MS^3. Erläuterungen im Text.

dagegen die Abspaltung von Fettsäuren und Kopfgruppe gleichzeitig statt. Phosphatidylcholine und Phosphatidylethanolamine spalten beim **MS^3**-Schritt schließlich Phosphat ab (siehe Abb. 20).

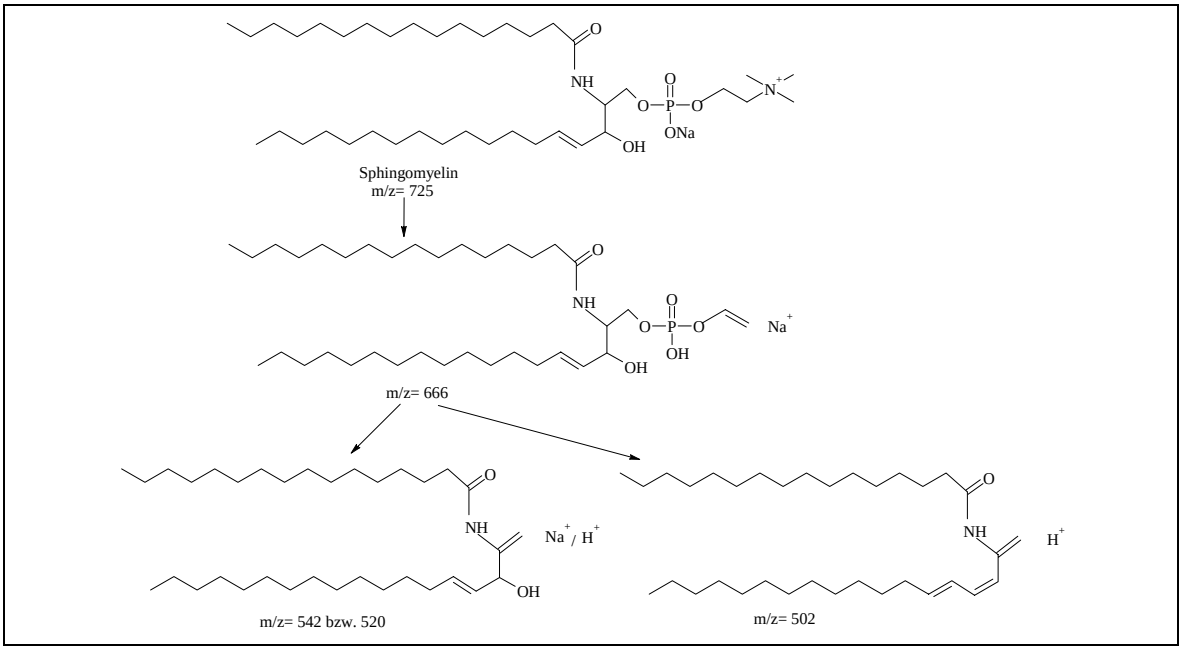


Abb. 21: Fragmentierungsschema von Sphingomyelin (aus Eigelb, Avanti Polar Lipids). Positiv-ESI-MS/MS bzw. MS^3. Erläuterungen im Text.

Sphingomyelin verhält sich analog zu Phosphatidylcholinen (siehe Abb. 21).

Negativ-ESI-MS ergibt im Falle der Phosphatidylethanolamine, der Phosphatidylglycerole und der Phosphatidylserine gewöhnliche $[M-H]^-$-Ionen. Bei den Phosphatidylcholinen ist dies jedoch wegen der quarternären Ammoniumgruppe des Cholinrestes nicht möglich. Im „Grundzustand", d.h. ohne Source CID, treten daher die Chloridaddukte in Erscheinung, wobei vermutlich das Chlorid die positive Ladung des quarternären Stickstoffs kompensiert, während die Phosphatgruppe die negative Ladung trägt. Die Chloridaddukte erkennt man an ihrem charakteristischen Isotopenmuster (^{35}Cl und ^{37}Cl). Zur Identifizierung wurde insbesondere der Zoom Scan Modus benutzt, der eine bessere Massenauflösung ermöglicht. Diese $[M+Cl]^-$ Ionen eignen sich nicht für **MS/MS**-Untersuchungen, da bei der Fragmentierung die negative Ladung am Chlor verbleibt und der restliche Molekülteil elektrisch neutral und somit nicht mehr detektiert wird. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß eine Erhöhung der Source-CID-Spannung (beginnend bei 5 %, Optimum bei 30 %) dazu führt, daß es anstelle der Anlagerung von Chlorid zu einer Methylabspaltung kommt, die aus dem quarternären Ammonium ein ungeladenes tertiäres Amin macht. Die resultierenden $[M-CH_3]^-$ Ionen tragen am Phosphat die negative Ladung.

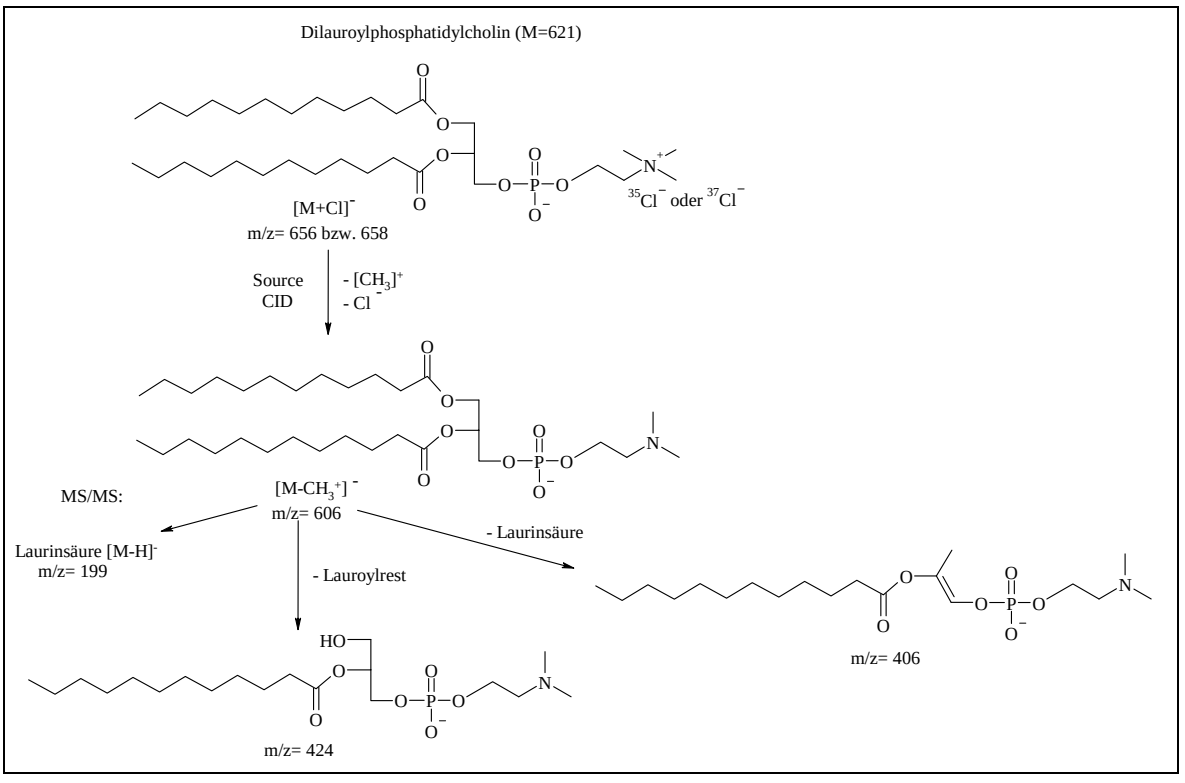


Abb. 22: Fragmentierungsschema von Dilauroyl-phosphatidylcholin bei Negativ-ESI-MS/MS.

Die $[M-H]^-$-Ionen von Phosphatidylethanolaminen und Phosphatidylglycerolen ergeben ebenso wie die $[M-CH_3]^-$-Ionen der Phosphatidylcholine im Tochterionenspektrum **Fettsäureabspaltungen** (z.B. Δ m = 256 im Falle von Palmitinsäure, Δ m = 282 bei Ölsäure). Daneben wurden bei allen untersuchten Phospholipiden auch die Fettsäuren selbst detektiert (m/z= 255 bei Palmitinsäure, m/z= 281 bei Ölsäure). Dieses wichtige Ergebnis zeigt, daß somit eine schnelle Identifizierung der Fettsäuren möglich ist. Selbstverständlich kann auf diese Weise keine Aussage getroffen werden, ob sich die jeweilige Acylgruppe in Position 1 oder 2 befindet, jedoch liegen eine Vielzahl von Befunden vor (z.B. mittels spezifischer Hydrolysen durch Phospholipasen), die bei natürlich vorkommenden Phospholipiden eine Zuordnung erleichtern (z.B. befindet sich ein Oleoylrest meist in 2-Position). Abb. 22 zeigt ein Fragmentierungsschema von Dilauroyl-phosphatidylcholin. Zusätzlich wurde hier ein Lauroylfragment gefunden.

Bei Phosphatidylethanolaminen, Phosphatidylserinen und Phosphatidylglycerolen zeigt das Tochterionenspektrum auch ein Phosphatidyl-Ion $[M\text{-Kopfgruppe}]^-$, das im MS^3-Schritt beide Acylreste einzeln oder auch gemeinsam abspaltet. Das doppelte Abspaltungsprodukt kann dabei jeweils auch durch MS^4 aus den einfachen Abspaltungsprodukten erzeugt werden. Tabelle 2 faßt die genannten Ergebnisse am Beispiel der Palmitoyl-oleoyl-Derivate zusammen.

Folgendes kann festgestellt werden:

- Tandem-Massenspektren erlauben bei allen vier untersuchten Phospholipidklassen die schnelle und einfache Identifizierung von Fettsäuren und Kopfgruppe;
- Mehrfach-MS-Experimente sind reproduzierbar durchzuführen und ergeben gut erklärbare Fragmente, sind jedoch zur Strukturaufklärung bei Phospholipiden nicht unbedingt notwendig;
- die Fettsäuren lassen sich im Negativ-MS/MS-Modus direkt identifizieren;
- die Massendifferenz zwischen Molekülion und positiv oder auch negativ geladenem Restion gibt eine zusätzliche Bestätigung für die Fettsäureerkennung;
- die Kopfgruppe läßt sich aus charakteristischen Massendifferenzen zwischen Molekülion und entsprechendem Restion ermitteln (Δm= 43 bei Phosphatidylethanolaminen, Δm= 74 bei -glycerolen, Δm= 87 bei -serinen);
- Phosphatidylcholine zeigen wegen ihres quarternären Stickstoffs ein abweichendes Verhalten; typisch ist die Trimethylaminabspaltung im Positiv-MS/MS-Modus und die Bildung von Chloridaddukten im Negativ-MS-Modus.

Tab. 2: Vergleich der Fragmentierungsmuster von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamin (POPE), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylserin (POPS). Alle Zahlen sind m/z-Werte, entsprechen jedoch der (monoisotopischen) Molmasse in amu, da z= 1. Weitere Erläuterungen im Text.

Modus	Ionen	POPC	POPE	POPG	POPS
pos. MS	$[M+H]^+/[M+Na]^+$	760/782	718/740	771/793	784/806
pos. MS/MS	$[M-Ölsäure]^+$	478			
	$[M-Palmitinsäure]^+$	504			
	$[M-N(CH_3)_3]^+$	723			
	$[M-Kopfgruppe]^+$		697		719
	$[M-Kopfgr.-Ölsre.]^+$				437
	$[M-Kopfgr.-Palmitinsre.]^+$				463
pos. MS^3	$[M-Kopfgr-Phosphat]^+$	577/599	577/599		
neg. MS	$[M-H]^-$		716	747	760
	$[M+^{35}Cl]^-/[M+^{37}Cl]^-$	794/796			
neg. MS (CID)	$[M-CH_3]^-$	744			
neg. MS/MS	$[M-Ölsäure]^-$	463	452	465	
	$[M-Palmitinsäure]^-$	489	478	491	
	Ölsäure	281	281	281	281
	Palmitinsäure	255	255	255	255
	$[M-Kopfgruppe]^-$		673	673	673
neg. MS^3	$[M-Kopfgr.-Ölsäure]^-$		391	391	391
	$[M-Kopfgr.-Palmitinsre.]^-$		417	417	417
neg. MS^4	$[M-Kopfgr.-Ölsäure-Palmitinsäure]^-$		153	153	153

4.2 Ceramide

Da die Ceramide eine sehr vielfältige Substanzfamilie der Sphingolipide darstellen, andererseits aber in ihrer Grundstruktur und ihren chemischen Eigenschaften enge Verwandtschaft aufweisen, ist es leicht einsehbar, daß der Quantifizierung einzelner Spezies zunächst eine analytische Trennung vorangestellt werden sollte.

Dennoch wurde am Beispiel des N-Stearoyl-phytosphingosins (Ceramid III, Cosmoferm) versucht, eine einfache **Grobquantifizierung durch Auswertung der Peakhöhen** im ESI-Massenspektrum vorzunehmen. Dazu wurden Lösungen der Reinsubstanz in Methanol (Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 10 µg/ml , zur Vermeidung von Memory-Effekten bei der geringsten Konzentration beginnend) über die integrierte Spritzenpumpe (bei konstanter Flußrate) dem Massenspektrometer zugeführt. Das Ergebnis war überraschend gut: Die nach Mittlung von je 50 Scans erhaltenen Peakintensitäten korrelierten gut mit der Konzentration (relative Standardabweichung ca. 5 %). Die Kalibrationskurve ließ sich an eine Exponentialfunktion anpassen ($R^2 \approx 0{,}99$). Das Bild änderte sich jedoch schlagartig, wenn der Lösung weitere Substanzen zugesetzt wurden. Die gleiche Menge Ceramid III, einem komplexen Lipidextrakt zugesetzt, ergab beispielsweise nur noch ca. 1/1000 der Peakintensität der reinen Lösung. Diese Erscheinung ist mit der Konkurrenz zwischen Analyt und Matrix einerseits bei der Elektrospray-Ionisation und andererseits bei der Erreichung der optimalen Füllung der Ionenfalle zu erklären. Daher kann man schlußfolgern, daß anhand der Peakhöhen im Massenspektrum allenfalls relative Aussagen, jedoch keine seriöse Quantifizierung möglich ist, wenngleich einige Publikationen anderes suggerieren (vgl. z. B. [61]).

4.2.1 Analytische Trennung

Bei der Auswahl geeigneter Analysenmethoden für die Trennung von Ceramidgemischen sind die physikochemischen Eigenschaften das wichtigste Leitkriterium. Da die Ceramide weder ionogen noch wasserlöslich sind, schieden kapillarelektrophoretische Techniken aus den Überlegungen aus. Gesucht wurde eine chromatographische Methode, die in der Lage ist, auch geringe strukturelle Unterschiede zur Trennung nutzbar zu machen und daneben eine spezifische Detektion ermöglicht.

Versuche, die **Kapillarelektrochromatographie** (CEC) einzusetzen, scheiterten. Wenn an beiden Kapillarenden ein hoher Druck (10 bar) angelegt wurde, konnten über einen kurzen Zeitraum stabile Meßbedingungen gehalten werden (Versuche mit UV-absorbierenden Testsubstanzen). Sowohl nach dem Slurry-Verfahren [21] als auch elektrokinetisch [24] gepackte

CEC-Kapillaren erwiesen sich als untauglich für die MS-Kopplung, da es hierbei nicht möglich ist, auch am Auslaßende der Kapillare Druck anzulegen. Das Ergebnis waren Inhomogenitäten der stationaren Phase, die zum Zusammenbruch der Stromstärke führten.
Die klassische Methode der Ceramidanalytik, die **Dünnschichtchromatographie** (TLC), liefert auch bei einem ausgefeilten, aufwendigen und zeitraubenden Regime nur Banden, die jeweils ein Stoffgemisch ähnlicher Retention repräsentieren. Dabei spielt die Anzahl und Stellung der Hydroxygruppen hinsichtlich der Wechselwirkung mit dem Kieselgel die wichtigste Rolle, während die unterschiedliche Kettenlänge der Fettsäuren und langkettigen Basen weniger bedeutend ist. Die auf diese Weise erzielte Auftrennung der Stratum-corneum-Ceramide zunächst in 6, später in 8 Fraktionen hat zu der wenig informativen, jedoch noch immer weitverbreiteten Klassifizierung mit römischen oder arabischen Zahlen geführt. Bei Versuchen in der eigenen Arbeitsgruppe konnten die guten Trennergebnisse der Literatur oft nicht reproduziert werden. Meist konnten nur drei Ceramidfraktionen sicher identifiziert werden. Ein prinzipieller Nachteil der TLC ist die unspezifische und destruktive Detektion.
Daher konzentrierte sich die Methodenentwicklung auf die LC/MS und die GC/MS.

4.2.1.1 LC/MS

Snada et al. berichteten über die Normalphasen-HPLC von perbenzoylierten Ceramiden [120]. Andernorts wurde ebenfalls mit NP-HPLC gearbeitet, jedoch wurde mittels Fluoreszenzdetektion nach Markierung eine Nachweisgrenze im Nanogramm-Bereich erreicht [96]. Couch u. Mitarb. identifizierten die drei wichtigsten Ceramide in menschlichen HL-60-Zellen mit einer LC/MS-Methode mit APCI und verglichen die Resultate mit einer konventionellen Methode mit UV-Detektion der perbenzoylierten Derivate [19]. Mano et al. [74] entwickelten eine Umkehrphasen-HPLC-Methode mit binärem Laufmittelgradienten. Die Detektion erfolgte im ESI-MS/MS an einem Triple-Quadrupol MS. Die Arbeit befaßt sich hauptsächlich mit intrazellulären Sphingolipid-Metaboliten und streift die Ceramide nur am Rande. Semiquantitative Positiv-ESI-MS/MS-Untersuchungen von Ceramiden (ohne HPLC-Trennung) an einem Triple-Quadrupol-MS beschreibt Literatur [38].
Eine **LC/MS-Methode zur quantitativen Analytik komplexer Ceramidgemische** stand also nicht zur Verfügung und mußte daher neu entwickelt werden. Die Optimierung der HPLC-Bedingungen war darauf ausgerichtet, schnelle und effektive Trennungen zu erhalten. Wenngleich die hohe Spezifität der MS-Detektion in den meisten Fällen eine vollständige Basislinientrennung überflüssig macht, sollte dennoch eine ausreichende Trennung zur Verringerung

von Matrixeffekten angestrebt werden, insbesondere mit Rücksicht auf die Anwendbarkeit der Methode auf komplexere Ceramidgemische.

Die Umkehrphasen- wurde der Normalphasen-HPLC vorgezogen, erstens wegen der besseren Kompatibilität polarer Laufmittel mit der ESI-MS, aber zweitens auch wegen der zu erwartenden höheren Selektivität der **stationären Phase** gegenüber Unterschieden in den unpolaren Ketten der Ceramide. Die Anwendung einer RP-18-Säule war vorteilhaft im Vergleich zu RP-8- und CN-Säulen. Wegen des geringeren Lösungsmittelverbrauchs, der besseren MS-Kompatibilität und der Robustheit wurden Säulen mit 2 mm ID eingesetzt. (Späterhin sollte die Umstellung auf 1 mm Säulen, evtl. mit Vorsäule, erwogen werden.)

Die **mobile Phase** mußte verschiedenen Anforderungen genügen:

- optimale Empfindlichkeit in der ESI-MS,
- kurze Retentionszeiten und
- effektive Trennung.

Wegen der hohen Affinität der Ceramide zur RP-18-Phase war es erforderlich, das starke Elutionsmittel Tetrahydrofuran (THF) zu Methanol hinzuzufügen, um schnelle Trennungen zu erreichen. Der THF-Gehalt wurde von 1-4 % (V/V) optimiert und schließlich auf 3 % eingestellt. Der Zusatz von Wasser erhöht die Retentionszeiten, ohne die Trennung zu verbessern. Ersetzt man Methanol ganz oder teilweise durch Acetonitril, verbessert sich wegen der geringeren Viskosität die Peakform, jedoch wird die Signalintensität und damit die Empfindlichkeit wegen der geringeren Polarität schlechter.

Wenn kein Säulenofen zur Verfügung stand (LC/MS-System 1.), siehe 3.4), wurde bei 20°C gearbeitet (Raumklimatisierung). An der Spectra System HPLC wurden mit Hilfe der am Autosampler eingebauten Peltier-Temperierung verschiedene Temperaturen getestet (20-40 °C). Obwohl höhere Temperaturen eine verbesserte Peakform erbrachten (reduziertes Tailing), verbesserte sich die Empfindlichkeit nicht. 25 °C wurden programmiert.

Eine isokratische Trennung wurde gegenüber einem Gradientenregime bevorzugt, da dies erfahrungsgemäß eine zuverlässige Quantifizierung bei der ESI-MS erleichtert, weil kein Driften der Basislinie auftritt.

Die Trennergebnisse der beschriebenen einfachen LC-Methode waren überraschend gut: sogar geringe Differenzen in der Kettenlänge der Fettsäurekomponenten führten zu unterschiedlichen Retentionszeiten. Ceramide, die aus Diastereomerenpaaren bestehen, zeigten Doppelpeaks (siehe Abb. 23). Dieses Phänomen wurde nur bei synthetischen oder halbsynthetischen Ceramiden beobachtet, nicht aber bei natürlichen. Ceramid 2 (Sederma) wird vollsynthetisch hergestellt, und die C-Atome 2 und 3 der Sphinganinkette sind optisch aktiv. Ceramid VI (Cosmoferm) wird dagegen offenbar durch Acylierung eines biotechnologisch

gewonnenen (isomerenreinen) Phytosphingosins mit einer racemischen 2-Hydroxyfettsäure hergestellt.

LC/MS-Quantifizierung auf einem Single-Quadrupol-MS. Die unter 3.4 beschriebene Gerätekonfiguration (1.) ermöglichte eine zuverlässige Quantifizierung. Im Positivionen-Modus (ESI-Spannung + 5 kV, Temperatur der Heizkapillare 230 °C, Sheath Gas und Hilfsgas optimiert) wurden die $[M+H]^+$ Peaks der Ceramide detektiert. Häufig auftretende Natriumaddukte sollten unterdrückt werden; wenn dies nicht möglich ist, kann alternativ auch (wenig, ca. 1 mM) Natrium hinzugegeben werden, um dann eine zuverlässige Quantifizierung der Natriumaddukte vornehmen zu können. Wegen der bei Quadrupol-Massenspektrometern im SIM-Modus wesentlich besseren Empfindlichkeit wurde ausschließlich im SIM quantifiziert.

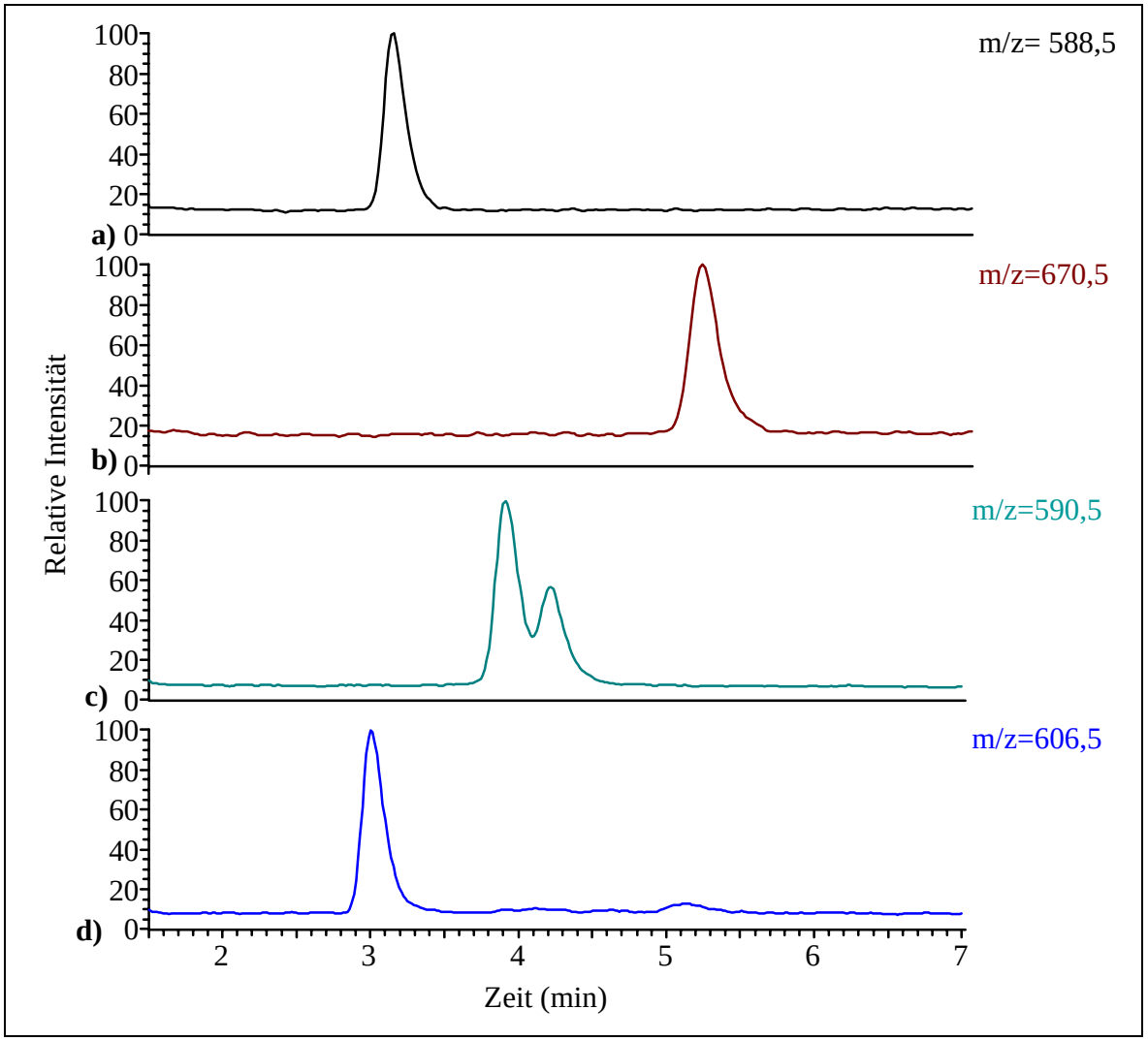


Abb. 23: Ceramidtrennung mittels LC/MS an einem Quadrupol-MS. Positiv-ESI, $[M+Na]^+$-Addukte. **a)** N-Stearoyl-sphingosin, **b)** N-Nervonoyl-sphingosin (beides Hauptbestandteile von Ceramid III (Sigma), jedoch eigtl. als Ceramid 2 anzusprechen), **c)** N-Stearoyl-sphinganin (Ceramid 2, Sederma), **d)** N-Stearoyl-phytosphingosin (Ceramid III, Cosmoferm).

Dies begrenzt die simultan quantifizierbaren Spezies auf eine Anzahl von 10.

Die Nachweisgrenze im SIM lag bei allen untersuchten Ceramiden sehr ähnlich bei ca. 2 ng/ml (S/N 3:1). Die relative Standardabweichung bei 5 aufeinanderfolgenden Messungen lag bei 5 %. Abb. 23 zeigt eine Ceramidtrennung am Single-Quadrupol-MS. Die Detektion der $[M-H]^-$ Ionen im Negativionen-Modus ergab eine etwas schlechtere Empfindlichkeit und wurde daher nicht zur Quantifizierung herangezogen.

LC/MS an einem Ionenfallen-Massenspektrometer. Im **Positivionen-Modus** wurde eine ESI-Spannung von + 6 kV angewandt. Die Heizkapillare war auf 230 °C temperiert, Sheath Gas und Hilfsgas wurden optimiert. Neben geringeren Mengen von $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ traten hauptsächlich die $[2M+Na]^+$-Addukte in Erscheinung. Sogar $[3M+2Na]^{++}$-Aggregate

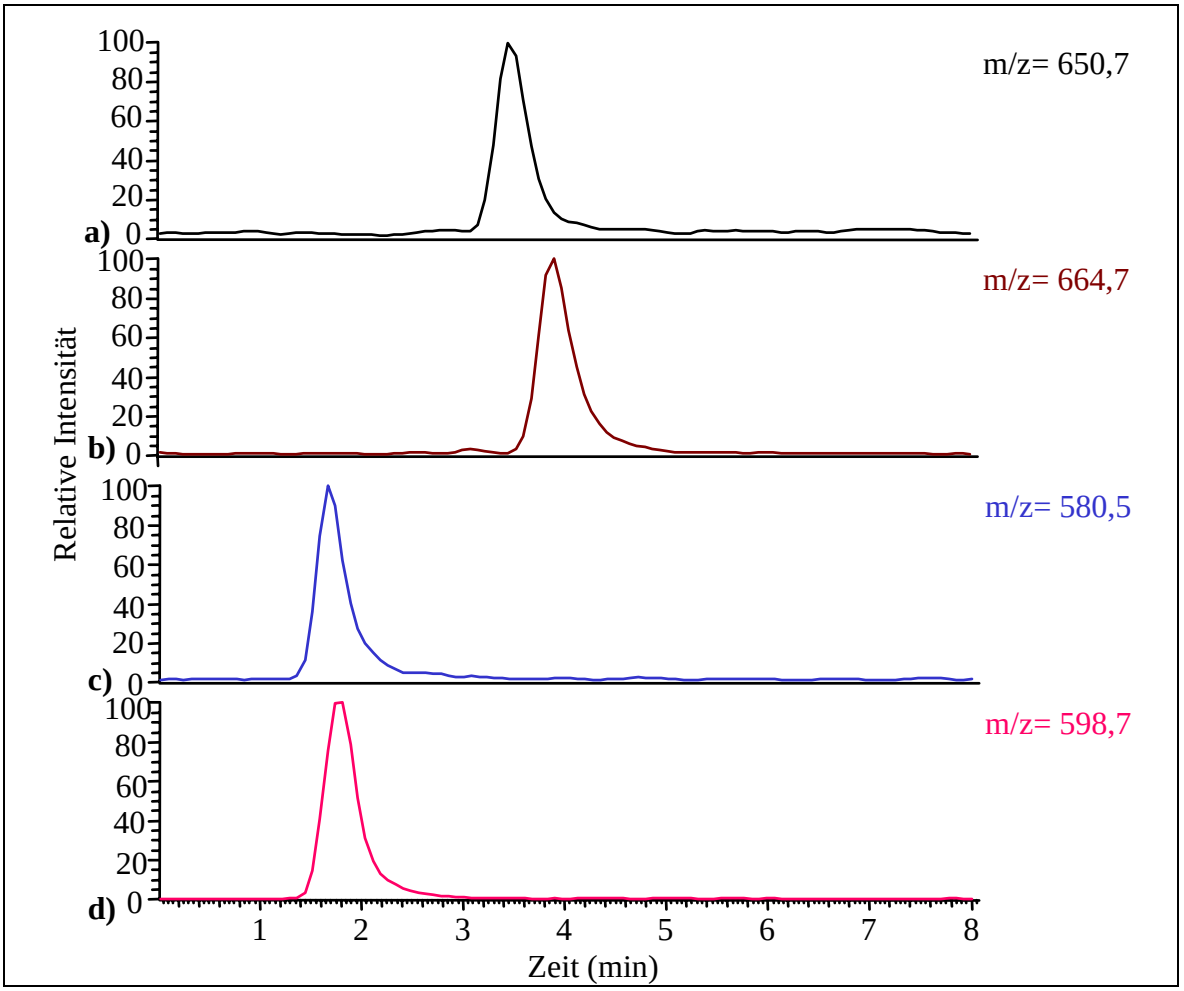


Abb. 24: Ceramidtrennung mit LC/MS an einem Ionenfallen-MS. Negativ-ESI, $[M-H]^-$-Ionen. **a)** N-(2-Hydroxytricosanoyl)-sphingosin, **b)** N-(2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin (beides Hauptbestandteile von Ceramid IV (Sigma)), **c)** N-(2-Hydroxystearoyl)-phyto-sphingosin (Ceramid VI, Cosmoferm), **d)** N-Oleoyl-phytosphingosin (Ceramid IIIb, Cosmoferm).

wurden gefunden. Diese Vielfalt der Ionen dürfte der Grund dafür sein, daß die im Positivmodus erhaltenen Quantifizierungsergebnisse schlechter ausfallen als am Quadrupol-MS. Die Erhöhung des Source CID zerstört zwar die größeren Aggregate, kann jedoch die Ausbeute an $[M+H]^+$ nicht merklich verbessern. Die beste Empfindlichkeit unter diesen Bedingungen wurde daher erreicht, wenn auf die $[2M+Na]^+$-Addukte optimiert wurde (Nachweisgrenze 2-5 ng/ml (S/N 3:1), relative Standardabweichung 6% (n=5)).

Der **Negativionen-Modus** erbrachte die $[M-H]^-$ Ionen. Die Anwendung von **Source CID** (25 % relative Kollisionsenergie) führte zu einer deutlichen Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses. Die Empfindlichkeit war im **SIM** geringfügig besser als im **Full Scan**, vorausgesetzt der isolierte Massenbereich wurde groß genug gewählt (mind. 2,5 amu), wahrscheinlich eine Folge der nicht idealen Form des Spannungsprofils der Injection Waveform. Dennoch bleibt festzuhalten, daß die Tatsache, daß die Empfindlichkeit im Full Scan ähnlich der im SIM ist, als ein großer Vorteil der Ionenfallenmassenspektrometer gegenüber Quadrupol-Geräten anzusehen ist, insbesondere für die Analytik komplexer Gemische, die unbekannte Substanzen enthalten.

Im Negativmodus wurde unter den beschriebenen LC/MS-Bedingungen an der Ionenfalle eine **Nachweisgrenze** von ca. 500 pg/ml (S/N 3:1) und eine relative Standardabweichung (RSD, n=5) von lediglich 3 % erreicht. Abb. 24 zeigt eine Ceramidtrennung am Ionenfallen-MS.

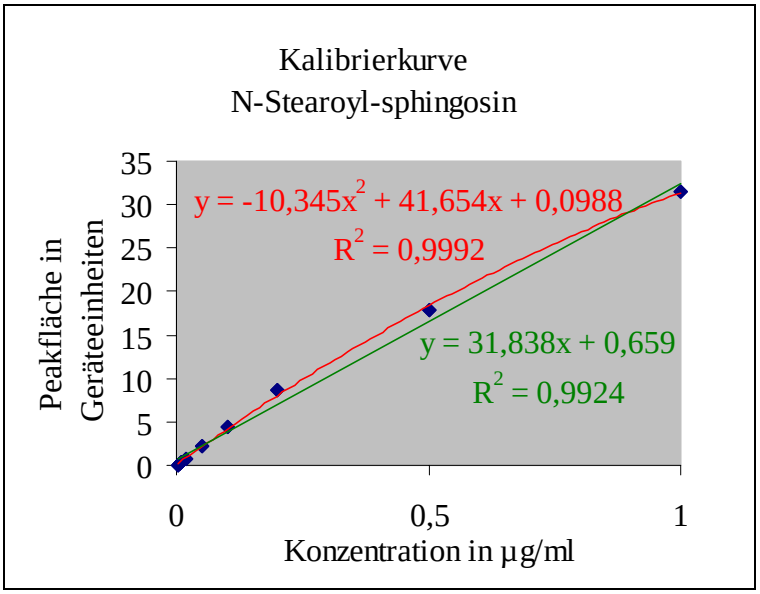


Abb. 25: Beispiel einer Kalibrierkurve für LC/MS mit Negativ-ESI an der Ionenfalle. Grün sind Kurve, Gleichung und Bestimmtheitsmaß für lineare Anpassung, rot für eine Polynomfunktion 2. Grades dargestellt.

Bei der Quantifizierung wurde mit externen Standards kalibriert. Abb. 25 demonstriert eine repräsentative Kalibrierkurve (Beispiel: N-Stearoyl-sphingosin), die eine akzeptable Linearität ($R^2 > 0,992$) über einen Konzentrationsbereich von drei Größenordnungen zeigt. Dennoch ist eine leichte Abflachung im oberen Bereich erkennbar. Polynomische Regressionsfunktionen verbesserten die Anpassung (2. Gra-

des $R^2 > 0{,}999$, 3. Grades $R^2 > 0{,}9999$). Die Quantifizierung basierte auf den Peakflächen, die durch automatische Integration erhalten wurden. Eine manuelle Integration ist ebenfalls möglich und in Einzelfällen erforderlich.

Da ein wirklicher interner Standard, d. h. eine Substanz mit identischer Ionisierbarkeit, also deuterierte Ceramide, nicht verfügbar war, kann der Zusatz einer bekannten Menge eines anderen Ceramids als eine Art Qualitätskontrollstandard dienen. Mögliche Veränderungen der ESI-Stabilität können durch Division der Peakfläche des Analyten durch die Peakfläche des Kontrollstandards kompensiert werden (was jedoch wegen der hervorragenden Stabilität meist nicht notwendig war). Die beschriebene Vorgehensweise hat sich bereits bei verschiedenen analytischen Assays bewährt [139-141].

LC/MS/MS-Untersuchungen im Negativionen-Modus wurden ebenfalls erfolgreich durchgeführt (vgl. 4.2.3). Die Empfindlichkeit entsprach dabei in etwa derjenigen im einfachen MS-Modus. Die theoretisch zu erwartende Steigerung trat in diesem Falle nicht ein, wohl wegen der Komplexität der Fragmentierung (siehe 4.2.2). Der Selected Reaction Monitoring Modus erlaubt die Zusammenfassung von drei m/z-Werten in einem Bereich, z.B. für die gemeinsame Quantifizierung der drei Tochterionen mit der höchsten Intensität.

Für die MS-Detektion in der HPLC ist es sehr nützlich, daß die LCQ-Software die Programmierung verschiedener sog. Scan Events (Programme für die Massenanalyse) ermöglicht, die alternierend ausgeführt werden. Dadurch konnte die Quantifizierung im Negativ-MS-Modus durchgeführt werden, während simultan im MS/MS-Modus akquiriert wird, so daß die entsprechenden Spektren mit ihren strukturellen Informationen zur Verfügung stehen. Dies ist hilfreich bei der Identifizierung unbekannter Verbindungen. Die Software erlaubt auch das zeitlich konsekutive Scannen mit unterschiedlichen Optimierungsparametern, die für jede Substanz abgespeichert werden können (sog. Tune Files). Dies ist hilfreich, wenn Substanzen mit unterschiedlicher Struktur und Ionisierbarkeit im gleichen Lauf analysiert werden sollen. Da die untersuchten Ceramide jedoch strukturell eng verwandt sind, war kaum eine Empfindlichkeitssteigerung durch Anwendung spezifischer Tune Files zu erzielen.

Die Ergebnisse zur LC/MS-Analytik von Ceramiden finden sich zusammengefaßt in [101].

Die bei der Diskussion der LC/MS-Methode für die Phospholipide aufgeführten Vorteile gelten für die Ceramide in gleicher Weise. Im Gegensatz zu den Phospholipiden ist das Retentionsverhalten der Ceramide weniger breit gefächert, so daß sich die Methode auch ohne Adaptationen auf spezielle Probleme anwenden läßt. Auch das Ionisationsverhalten beim Elektrospray ist wesentlich einheitlicher. Hinsichtlich der Empfindlichkeit wird sogar die Fluoreszenzdetektion übertroffen. Zudem ist die Reproduzierbarkeit außergewöhnlich gut.

4.2.1.2 GC/MS

In Literaturstudien wurden die Ceramide hydrolysiert [16] und die Fettsäuren und Sphingoidbasen getrennt gaschromatographisch analysiert. In einigen älteren Arbeiten wurde jedoch auch GC und GC/MS der intakten Ceramidmoleküle beschrieben [108,109,65,47,46]. Entsprechend dem damaligen technischen Entwicklungsstand wurde mit gepackten, großlumigen Säulen gearbeitet. Mittlerweile wurden diese jedoch durch die Kapillarsäulen nahezu vollständig abgelöst. Dabei ist festzustellen, daß die Übertragung von Methoden zwischen gepackten und Kapillarsäulen sich als sehr schwierig erwiesen hat. Eigenartigerweise wurde die GC-Analytik von Ceramiden mit den leistungsfähigeren Kapillarsäulen bisher kaum beschrieben [49].

Um die Verdampfbarkeit von Ceramiden zu gewährleisten, ist es notwendig, sie in flüchtige **Derivate** zu überführen. Dazu wurden verschiedene Techniken beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst drei verschiedene Regimes getestet. Der Erfolg wurde jeweils mittels ESI-MS kontrolliert. Bei der ersten Variante wurde 200 µg Ceramid mit 100 µl Pyridin, 20 µl HMDS und 10 ml TMCS versetzt und 20 min bei Raumtemperatur umgesetzt (vgl. [109]). Die Methode ist prinzipiell erfolgreich, jedoch möglicherweise nicht vollständig. Im Falle von Ceramid IV kam es zu starken Ausfällungen. Zudem ist das Arbeiten mit Pyridin sehr unangenehm. Zweitens wurden 6,8 mg Ceramid mit 0,5 ml TSIM umgesetzt (1 h bei 60°C) und anschließend 0,3 ml BSA und 0,15 ml TMCS zugegeben (über Nacht bei 60 °C). Diese Methode ist erfolgreich, jedoch relativ zeitraubend. Drittens wurde zu 1 mg Ceramideinwaage 0,5 ml eines Gemischs BSA/TMCS/TSIM 3:2:3 zugegeben und 6-24 h bei 60 °C umgesetzt. Diese Methode wurde später noch dahingehend modifiziert, daß die Temperatur auf 75°C erhöht und die Reaktionszeit auf 3 h verkürzt wurde. Auf diese Weise konnten die 2-4 Hydroxygruppen der Ceramide vollständig in Trimethylsilylderivate überführt werden.

Die GC/MS-Methode ist unter 3.5 beschrieben. Hinsichtlich der GC-Säule ist insbesondere auf die geringe Filmdicke hinzuweisen. Es erwies sich, daß bei größerer Filmdicke trotz Verschärfung des Temperaturprogramms die Retention zu stark ist. Zu achten ist weiterhin auf die Temperaturstabilität der GC-Säule. Bei den durchgeführten Messungen mit Temperaturen bis zu 360 °C manifestierte sich nach mehreren Messungen ein deutliches Säulenbluten. Sollen ganze Meßreihen durchgeführt werden, empfiehlt sich daher der Einsatz von Hochtemperatursäulen (bis 400 °C).

Die Ionisation erfolgte durch Elektronenstoß (EI). Zur Detektion kann ein Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt werden [104], jedoch war wegen der höheren Spezifität eine massenspektrometrische Detektion erwünscht. Da die Molekulargewichte der derivatisierten

Ceramide relativ hoch liegen (M+216 bei drei Hydroxygruppen), können viele GC/MS-Systeme nicht eingesetzt werden, so auch das institutseigene Gerät vom Typ Magnum (Finnigan MAT, Bremen), dessen Massenbereich bei 650 amu endet.

Abb. 26 zeigt die Trennung zweier natürlicher Ceramidgemische, die häufig als analytische Standards eingesetzt werden.

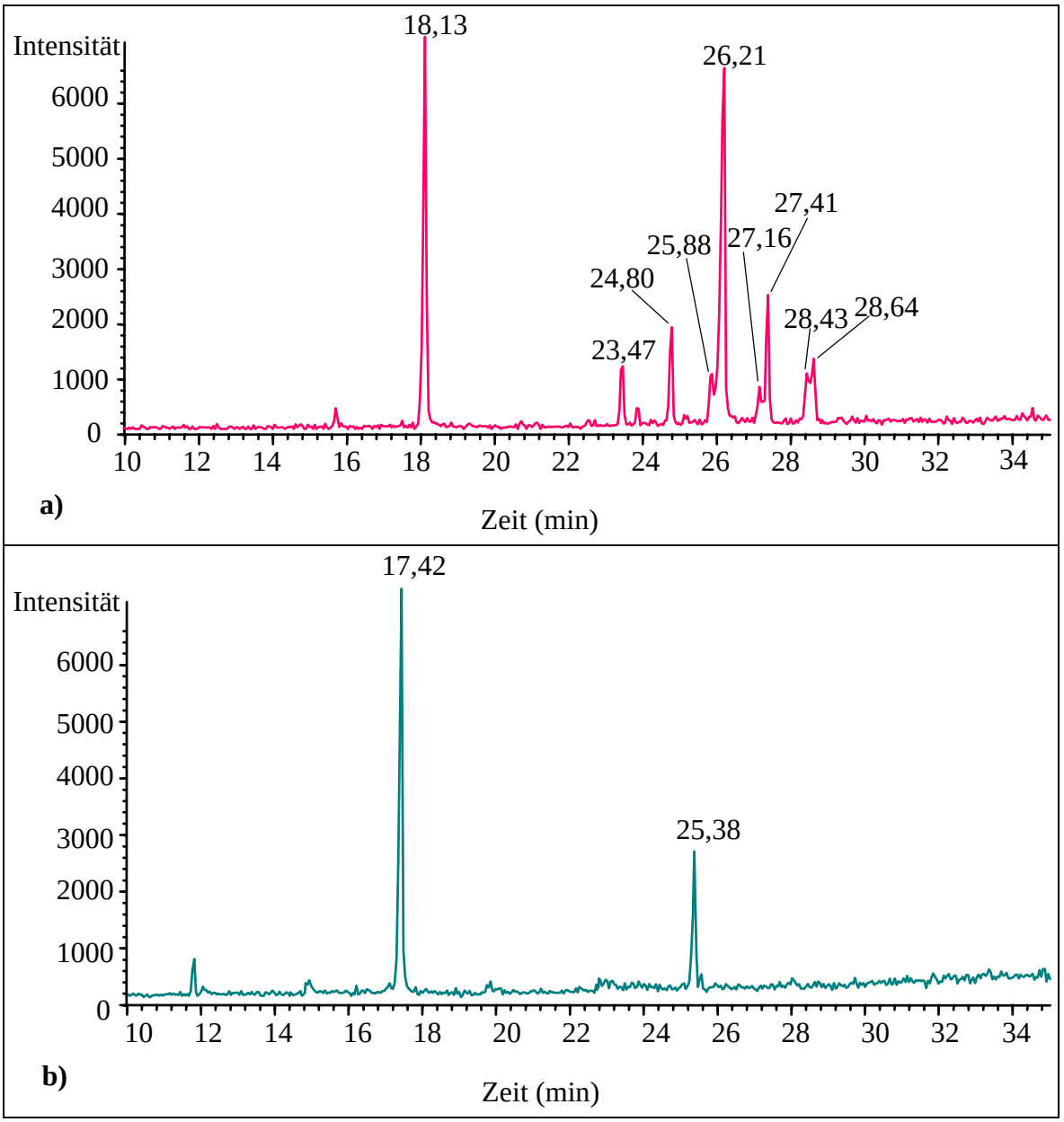


Abb. 26: GC/MS-Trennung von Ceramidgemischen. a) Ceramid IV (Sigma), b) Ceramid III (Sigma). Erläuterungen im Text.

Die Komponenten besitzen Retentionszeiten zwischen 17 und 29 min. Die Reihenfolge resultiert aus der Länge der Fettsäurekette, wobei auch geringe Unterschiede zur Trennung ausreichen. Die wegen der zusätzlichen α-Hydroxyfettsäure dreifach silylierten Ceramid IV-Spezies haben höhere Retentionszeiten als die zweifach silylierten Ceramid III-Spezies.

Die Gaschromatogramme haben frappierende Ähnlichkeit zu den ESI-Massenspektren dieser Gemische.

Abb. 27 zeigt das EI-Spektrum einer Komponente von Ceramid IV (Sigma) mit einer Retentionszeit von 26,2 min.

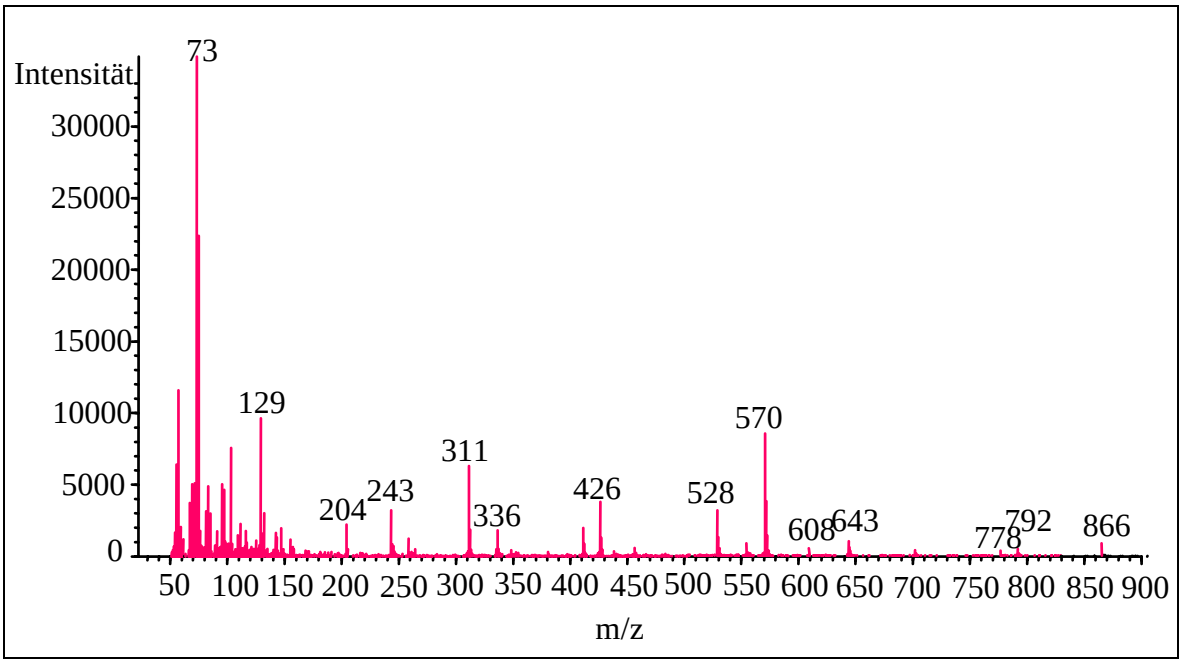


Abb. 27: EI-Massenspektrum von *Tris*-(Trimethylsilyl)-N-(2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin. Erläuterungen im Text.

In [108] wurden Elektronenstoßspektren von einigen Ceramiden präsentiert und ausführlich diskutiert. Die dortigen Ergebnisse wurden im wesentlichen bestätigt. Ebenda wurde auch die Struktur der auftretenden Fragmente untersucht. Das Molekulargewicht kann ermittelt werden anhand der Fragmente [M-15] (Abspaltung einer Methylgruppe) und [M-90] (Abspaltung von Trimethylsilanol). Besonders augenfällig ist jedoch die Spaltung zwischen C-2 und C-3 der Sphingoidbase. Die dabei entstehenden Fragmente ergeben nach Addition das Molekulargewicht (Beispiel in Abb. 27: M= 881, nach Abzug der drei Trimethylsilylgruppen M= 665). Im Falle des Sphingosins ist dies das Ion m/z= 311 sowie ein fettsäurehaltiges Fragment (in Abb. 27 m/z= 571 im Falle der 2-Hydroxylignocerinsäure). Weiterhin charakteristisch für Sphingosin sind m/z = 243 (Abspaltung von Fettsäureamid sowie von Tetradecyl am Ende der Sphingosinkette), m/z= 336 (Abspaltung von Fettsäureamid und Trimethylsilanol) und m/z= 426 (Abspaltung von Fettsäureamid). Auch die Ionen m/z= 103, m/z= 132 und m/z= 157, die in [108] genannt wurden, konnten bestätigt werden. Darüber hinaus wurde m/z= 73 für Trimethylsilyl detektiert.

Abb.28 zeigt zum Vergleich das Spektrum einer Komponente von Ceramid III (Sigma). Das Molekulargewicht beträgt M= 709 (nach Abzug der zwei Trimethylsilylgruppen: M= 566). Das Fragment m/z= 398 zeigt die Anwesenheit von Stearinsäure im Ceramidmolekül an.

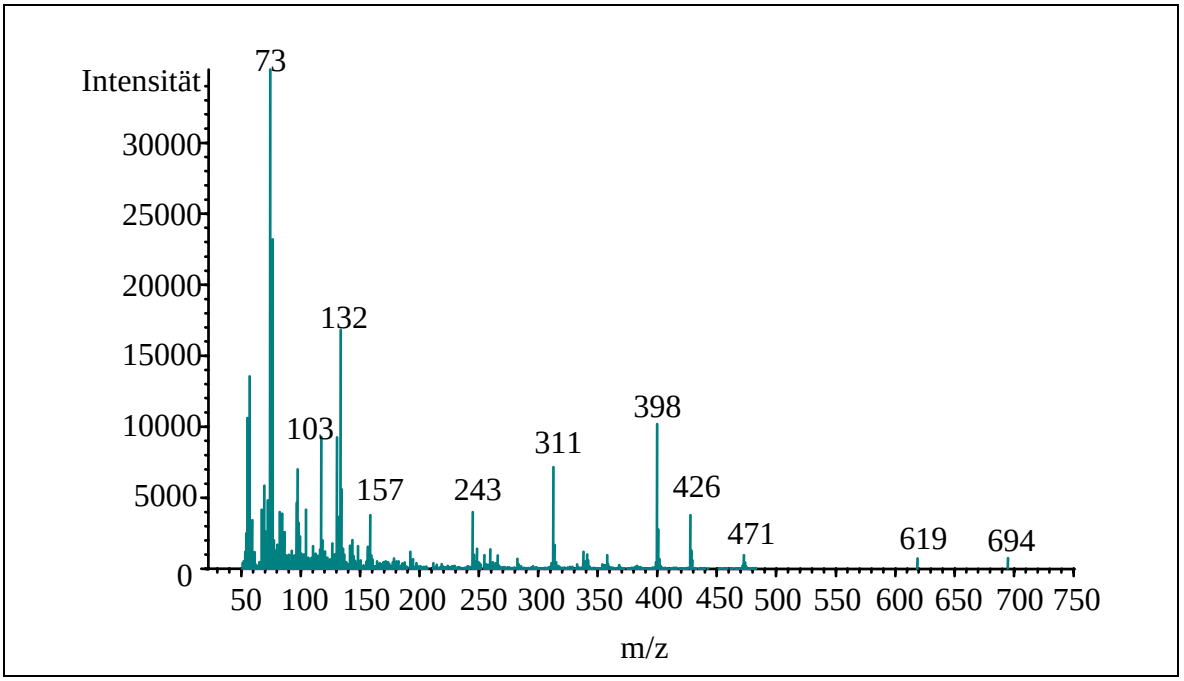


Abb. 28: EI-Spektrum von *Bis*-(Trimethylsilyl)-N-Stearoylsphingosin. Erläuterungen im Text.

Auf Grund der genannten Gesetzmäßigkeiten wurden die Peaks in den Gaschromatogrammen eindeutig identifiziert. Tab. 3 faßt dies für die Peaks aus Abb. 26 zusammen.

Quantitative Bestimmungen konnten aus Zeit- und Verfügbarkeitsgründen nur sehr begrenzt durchgeführt werden. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 1 ng (S/N 3:1) pro Einzelsubstanz (in 500 µl Derivatisierungsmittel, 0,5 µl Splitless-Injektion) im Full Scan Modus. Im SIM-Modus ist eine weitere Steigerung um ca. Faktor 10 möglich. Die Retentionszeiten und Peakflächen zeigten eine hervorragende Stabilität, die relative Standardabweichung kann jedoch wegen der geringen Anzahl der GC-Läufe nicht angegeben werden.
Im Falle von Hautceramiden wäre die Interpretation der EI-Spektren komplizierter, da die Sphingoidbasen eine hohe Variabilität aufweisen. Dennoch kann die Zuordnung prinzipiell genauso erfolgen; zu achten wäre ggf. auf eine modifizierte Probenvorbereitung.

Tab. 3: Peakzuordnung für die Gaschromatogramme in Abb. 24.

	Retentionszeit in min	Fettsäure	Ceramid
a)	18,13	18:0	N-(2-Hydroxystearoyl)-sphingosin
	23,47	22:0	N-(2-Hydroxybehenyl)-sphingosin
	24,80	23:0	N-(2-Hydroxytricosanoyl)-sphingosin
	25,88	24:1	N-(2-Hydroxytetracosenoyl)-sphingosin
	26,21	24:0	N-(2-Hydroxytetracosanoyl)-sphingosin
	27,16	25:1	N-(2-Hydroxypentacosenoyl)-sphingosin
	27,41	25:0	N-(2-Hydroxypentacosanoyl)-sphingosin
	28,43	26:1	N-(2-Hydroxyhexacosenoyl)-sphingosin
	28,64	26:0	N-(2-Hydroxyhexacosanoyl)-sphingosin
b)	17,42	18:0	N-Stearoyl-sphingosin
	25,38	24:1	N-Nervonoyl-sphingosin

Zusammenfassend ergeben sich für die beschriebene GC/MS-Methode für Ceramide folgende Vor- und Nachteile:

- sehr gute Trennleistung;
- sehr empfindliche Quantifizierung;
- sichere Identifizierung und weitgehende Strukturinformation durch Elektronenstoß-Spektren, Vergleich mit Spektrenbibliotheken möglich;
- Notwendigkeit der Derivatisierung;
- Vorliegen der Ceramide in einem Überschuß an Derivatisierungsreagens, wodurch das GC/MS-System auf Dauer kontaminiert werden kann;
- eine quantitative Extraktion der Trimethylsilylierten Ceramide ohne Hydrolyse ist leider nicht möglich.

4.2.2 Strukturuntersuchungen mittels Elektrospray-Massenspektrometrie

MS/MS und MS^n am Ionenfallen-Massenspektrometer. Im Positivionen-Modus zeigen die ESI-Massenspektren von Ceramiden $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$ sowie unter bestimmten Bedingungen $[3M+2Na]^{++}$ oder $[M-H_2O+H]^+$-Ionen. Für Tandem-MS-Untersuchungen eignen sich die $[M+H]^+$-Ionen am besten. Wenn man diese fragmentiert, tritt zunächst überwiegend eine unspezifische Wasserabspaltung auf (siehe Abb. 29). Neben dem $[M+H-2H_2O]^+$-Peak wird eine Serie von drei Peaks gefunden, die sich als typisch für den Sphinganinrest erweist (m/z= 266, 284 und 302). Ceramide mit einem Sphingosinrest ergeben Fragmente bei m/z= 264, 282 und 300, solche mit Phytosphingosin zeigen m/z= 264, 282, 300 und 318. Das MS^3-Spektrum ausgehend vom $[M-H_2O]^+$ (m/z= 550) ist in Abb. 30 dargestellt.

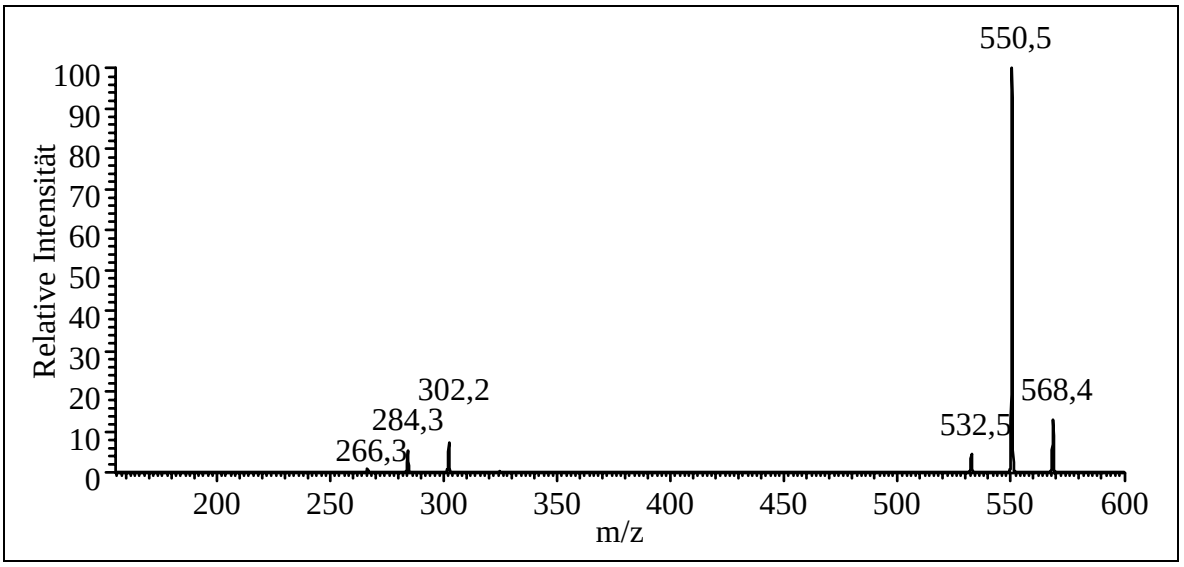


Abb. 29: Positiv-ESI-Tandem-Massenspektrum von N-Stearoyl-sphinganin.

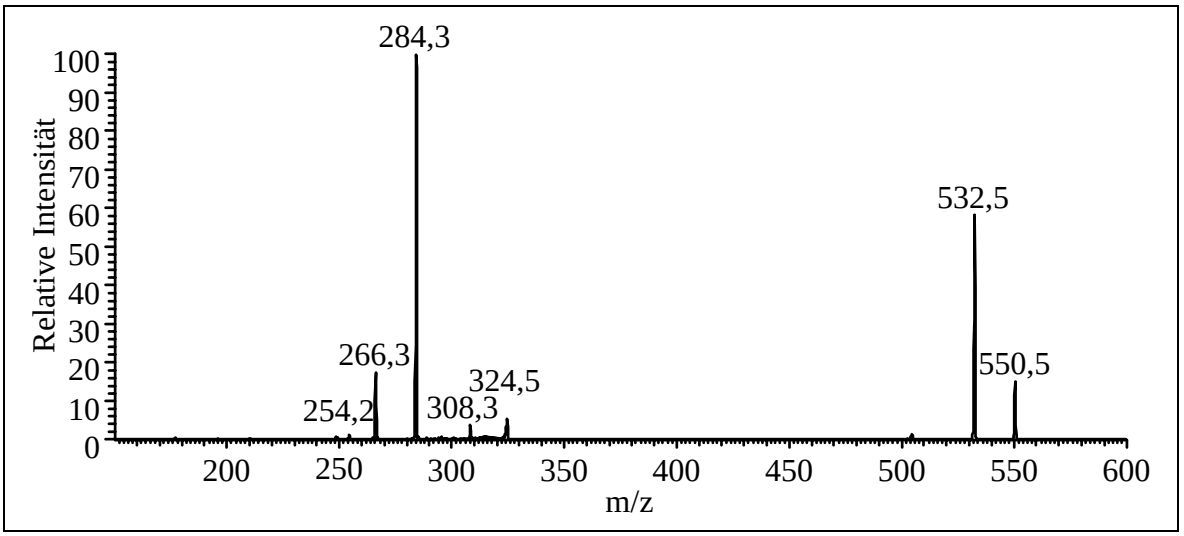


Abb. 30: Positiv-ESI-MS^3-Spektrum von N-Stearoyl-sphinganin.

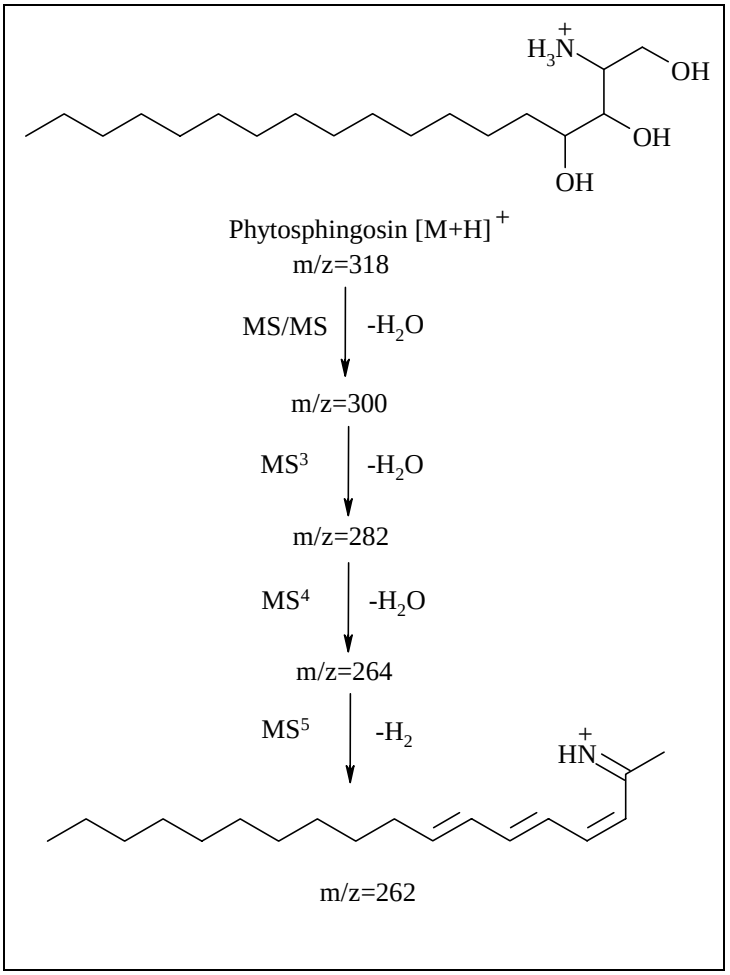


Abb. 31: Fragmentierungsschema Phytosphingosin. Positiv-ESI.

Abb. 31 zeigt zum Vergleich das Fragmentierungsschema von Phytosphingosin, das zugleich die Basenfragmente in den Positiv-Tochterionenspektren der Ceramide erklärt. Sphingosin und Sphinganin verhalten sich entsprechend.

Während im Positivionen-MS/MS lediglich die langkettige Base identifiziert werden kann, liefert das Negativionen-MS/MS-Spektrum mehr Strukturinformationen. Wie bereits unter 4.2.1.1 beschrieben, verbessert Source CID (25 % relative Kollisionsenergie) das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich und wurde daher auch bei MS/MS-Untersuchungen angewandt.

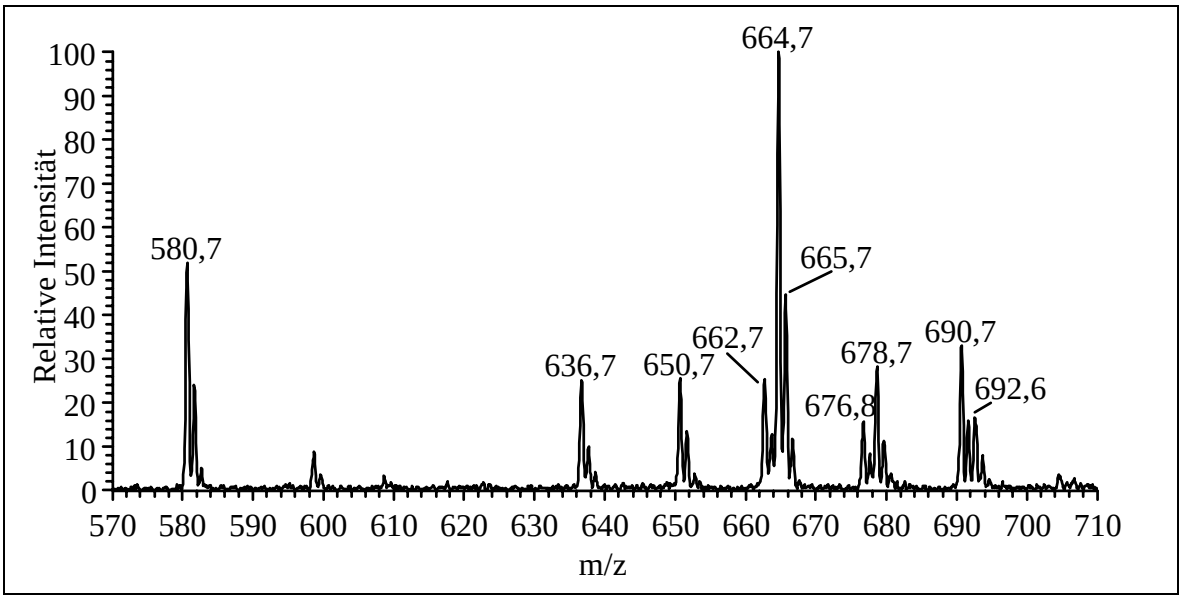


Abb. 32: Negativ-ESI-Massenspektrum von Ceramid IV (Sigma).

Abb. 32 zeigt das Elektrospray-Massenspektrum eines kommerziellen Ceramidgemisches. Da bekannt ist, daß hierin nur Sphingosin als langkettige Base vorkommt und die Acylkomponente aus 2-Hydroxyfettsäuren besteht, kann aus dem Spektrum die Fettsäureverteilung direkt abgeleitet werden. Dabei fällt auf, daß hauptsächlich die Kettenlängen C-18, C-22, C-23, C-24, C-25 und C-26, nicht jedoch C-19, C-20 und C-21 vertreten sind. Setzt man voraus, daß die Ionisierbarkeit gleich ist, kann man anhand der Peakhöhen eine relative Häufigkeit der Einzelkomponenten kalkulieren (siehe Tab. 4). Diese Werte erwiesen sich auch als konstant über verschiedene Chargen.

Tab. 4: Relative Häufigkeit der Bestandteile von Ceramid IV (Sigma).

Fettsäure	Ceramid	Häufigkeit in %
18:0	N-(2-Hydroxystearoyl)-sphingosin	16,2
22:0	N-(2-Hydroxybehenyl)-sphingosin	7,8
23:0	N-(2-Hydroxytricosanoyl)-sphingosin	8,1
24:1	N-(2-Hydroxytetracosenoyl)-sphingosin	7,8
24:0	N-(2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin	31,0
25:1	N-(2-Hydroxypentacosenoyl)-sphingosin	4,8
25:0	N-(2-Hydroxypentacosanoyl)-sphingosin	8,7
26:1	N-(2-Hydroxyhexacosenoyl)-sphingosin	10,4
26:0	N-(2-Hydroxyhexacosanoyl)-sphingosin	5,2

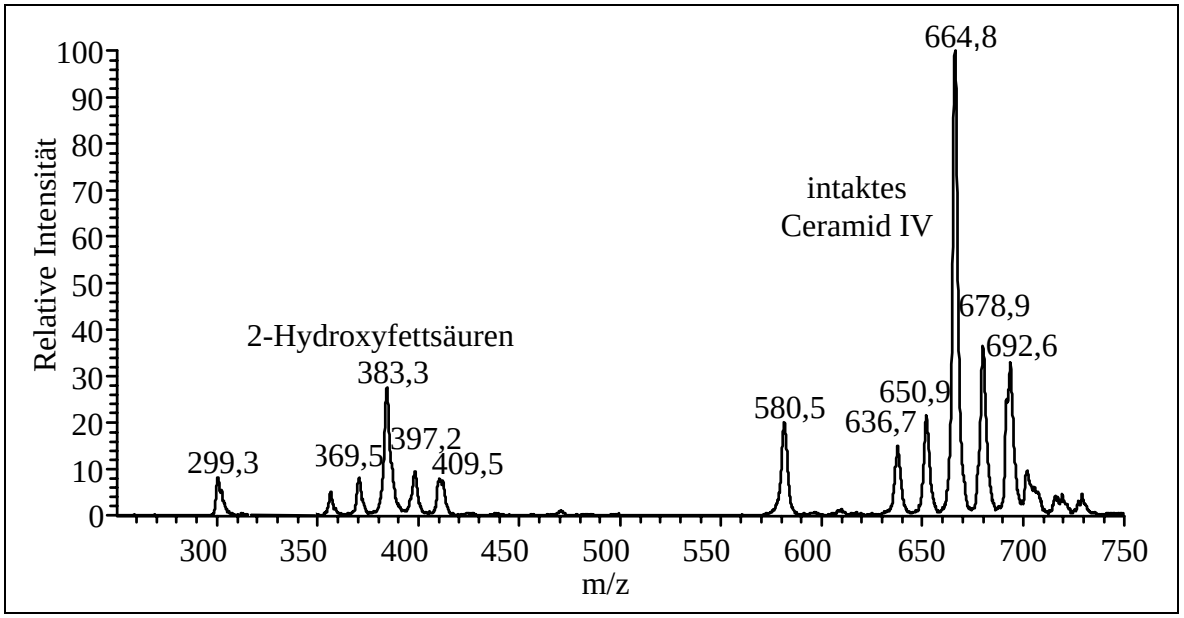


Abb. 33: ESI-Massenspektrum von Ceramid IV (Sigma) nach thermischer Degradation.

Im Rahmen einer Arbeit über die thermische Zersetzung von Ceramiden [85] konnte die Freisetzung der Fettsäuren durch Zerstörung der Amidbindung gezeigt werden (Abb. 33).
Die Negativionisation der Ceramide findet ausschließlich am Amidstickstoff durch Abspal-

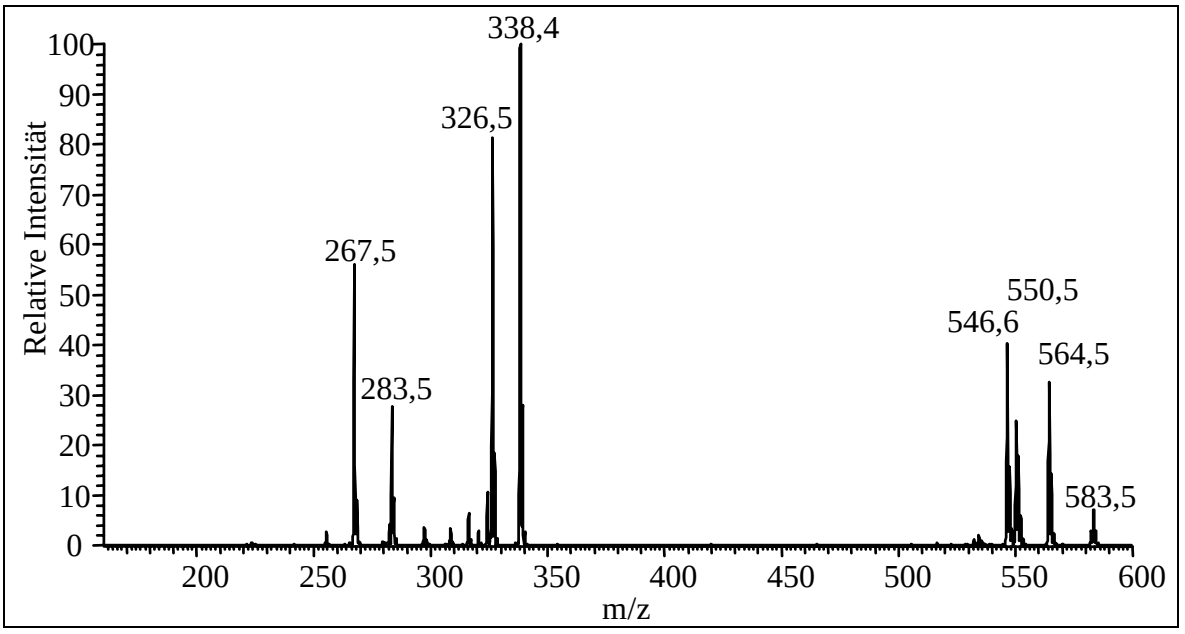


Abb. 34: Negativ-ESI-Tochterionenspektrum von N-Stearoyl-phytosphingosin (Ceramid III, Cosmoferm).

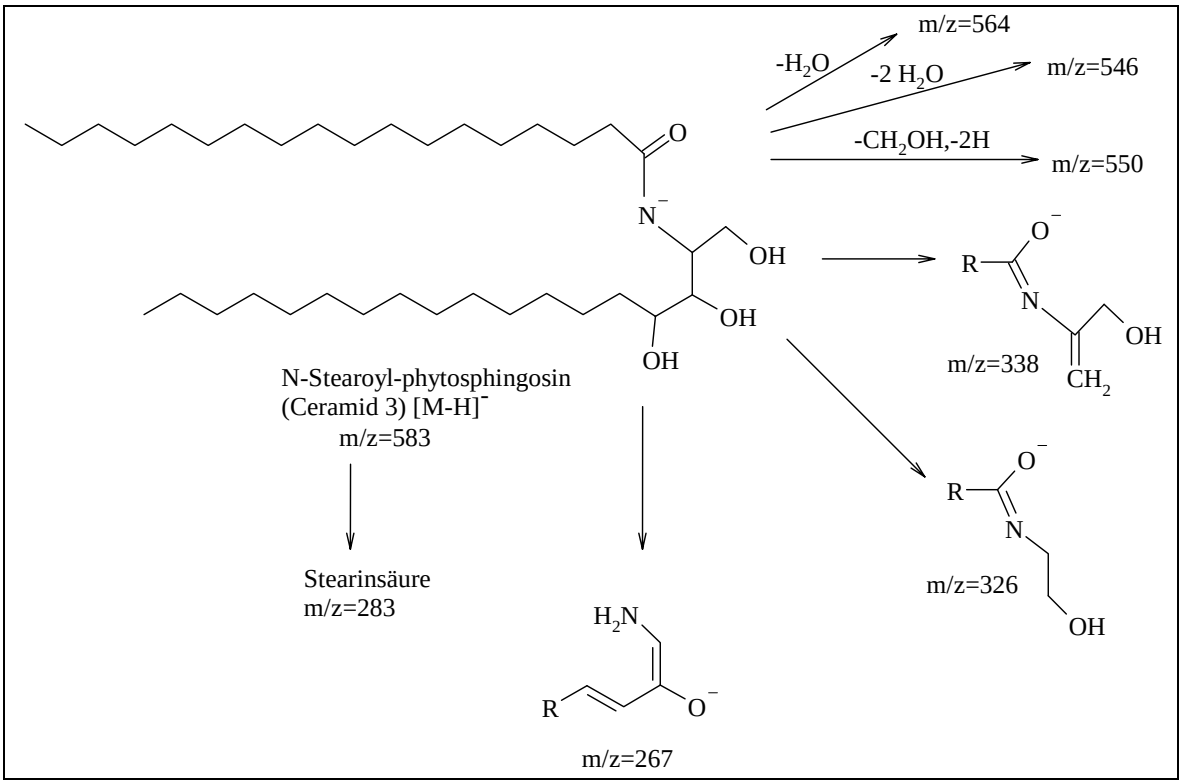


Abb. 35: Fragmentierungsschema für N-Stearoyl-phytosphingosin (Ceramid III, Cosmoferm). Erläuterungen im Text.

tung eines Wasserstoffs statt. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, daß ein synthetisch hergestelltes Pseudoceramid, N-(3-Hexadecyloxy-2-hydroxypropyl)-N-(2-hydroxyethyl)-palmitinsäureamid, nicht ionisiert wird, da es einen Alkylsubstituenten anstelle des Wasserstoffs besitzt.

Im MS/MS-Modus wurde wiederum die relative Kollisionsenergie soweit erhöht, daß die Intensität des Ausgangsions auf 10 % zurückging, was bei allen untersuchten Ceramiden im Bereich zwischen 28 und 30 % der Fall war. Abb. 34 zeigt das Tochterionenspektrum von Ceramid III (Cosmoferm).

Die Fragmentionen können in drei Gruppen eingeteilt werden:

a) Fragmente, die durch Abspaltung kleiner Neutralteilchen entstehen (m/z= 564, 550, 546),
b) Fragmente, die die langkettige Base charakterisieren (m/z= 267),
c) Fragmente, die die Acylkomponente widerspiegeln (m/z= 283, 326, 338).

Abb. 35 zeigt ein Schema, das die Strukturvorschläge für diese Fragmentionen illustriert.

Die Fragmentierung von Ceramid IIIb verlief analog (Abb. 36). Jene Fragmente, welche die Acylgruppe enthalten, hatten m/z-Werte um 2 amu geringer als bei Ceramid III, entsprechend der Differenz zwischen Ölsäure und Stearinsäure.

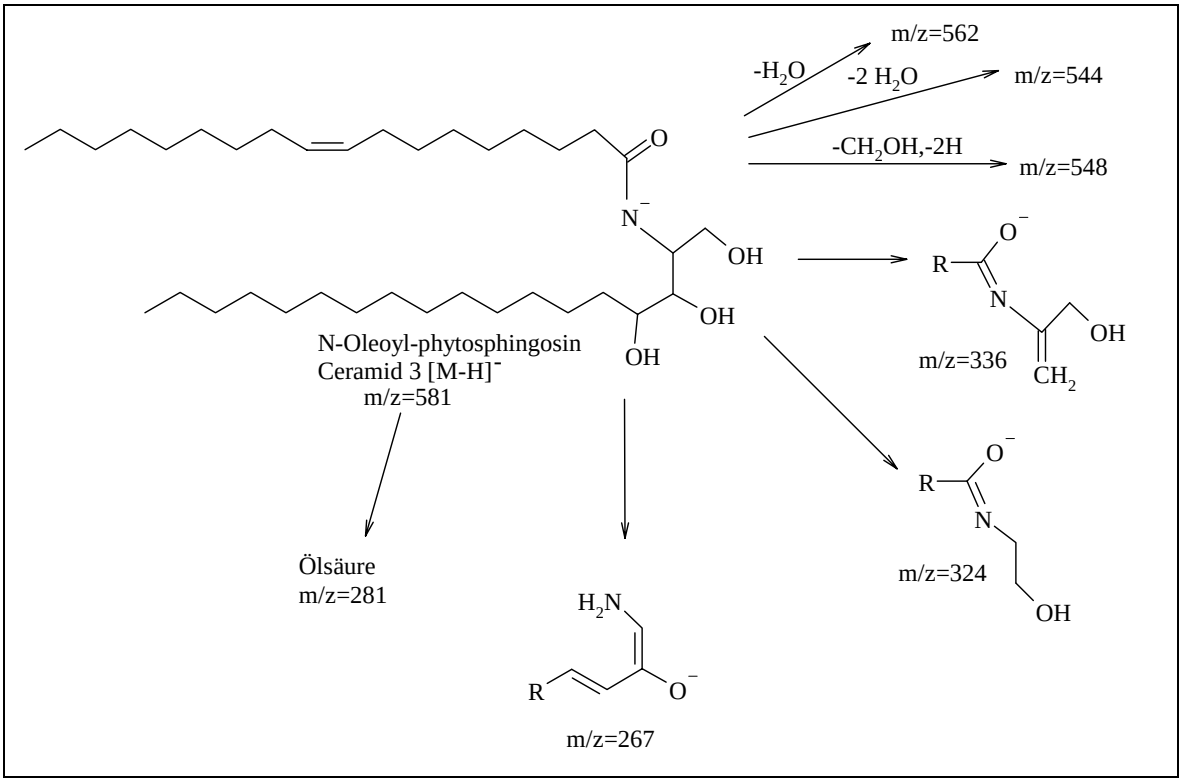


Abb. 36: Fragmentierungsschema für N-Oleoyl-phytosphingosin (Ceramid IIIb (Cosmoferm). Erläuterungen im Text.

Wie bereits oben ausgeführt, enthält Ceramid IV (Sigma) mehrere Hauptkomponenten. Abb. 37 und 38 zeigen Fragmentierungsschemata der beiden häufigsten Komponenten. Die homologen Substanzen verhielten sich analog.

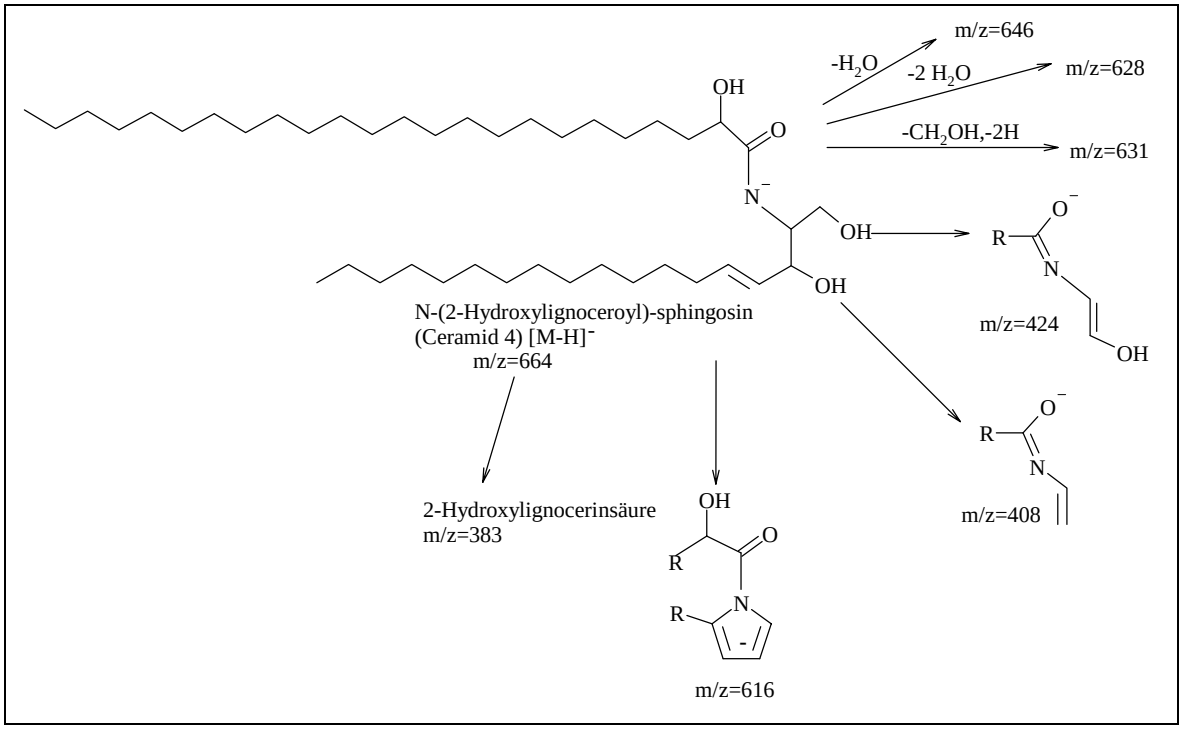


Abb. 37: Fragmentierungsschema von N-(2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin (Bestandteil von Ceramid IV (Sigma)).

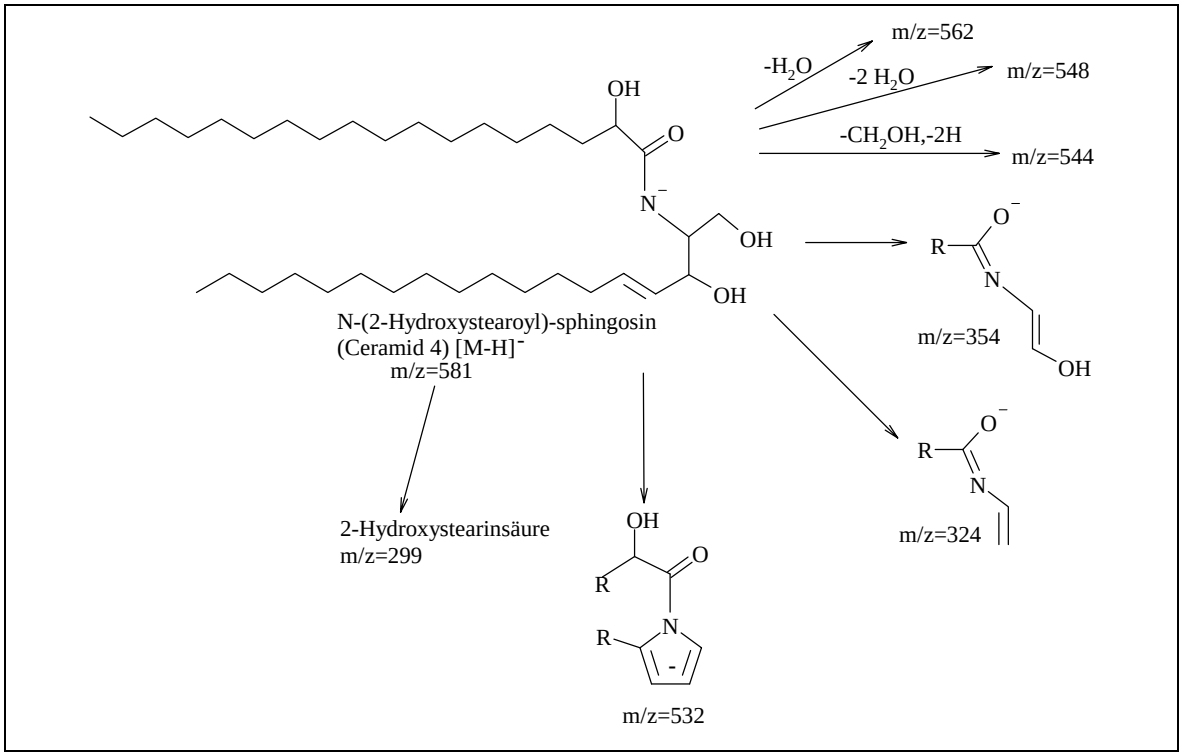


Abb. 38: Fragmentierungsschema von N-(2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin (Bestandteil von Ceramid IV (Sigma)).

Die Abspaltung kleiner Neutralteilchen erfolgt wie bei Ceramid III. Die 2-Hydroxyfettsäuren werden ebenfalls eindeutig identifiziert. Charakteristisch für Ceramide mit einem Sphingosinrest ist ein Fragment wie m/z= 616 (Verlust von 48 Da), das mit einer Ringstruktur erklärt werden könnte, deren Ausbildung durch die Doppelbindung im Sphingosin begünstigt werden dürfte.

Ceramid VI (Cosmoferm) hat wiederum Phytosphingosin als langkettige Base. Daher ist das Fragmentmuster (siehe Abb. 39) vergleichbar mit Ceramid III (Cosmoferm). Die 2-Hydroxyfettsäure kann wie bei Ceramid IV (Sigma) identifiziert werden.

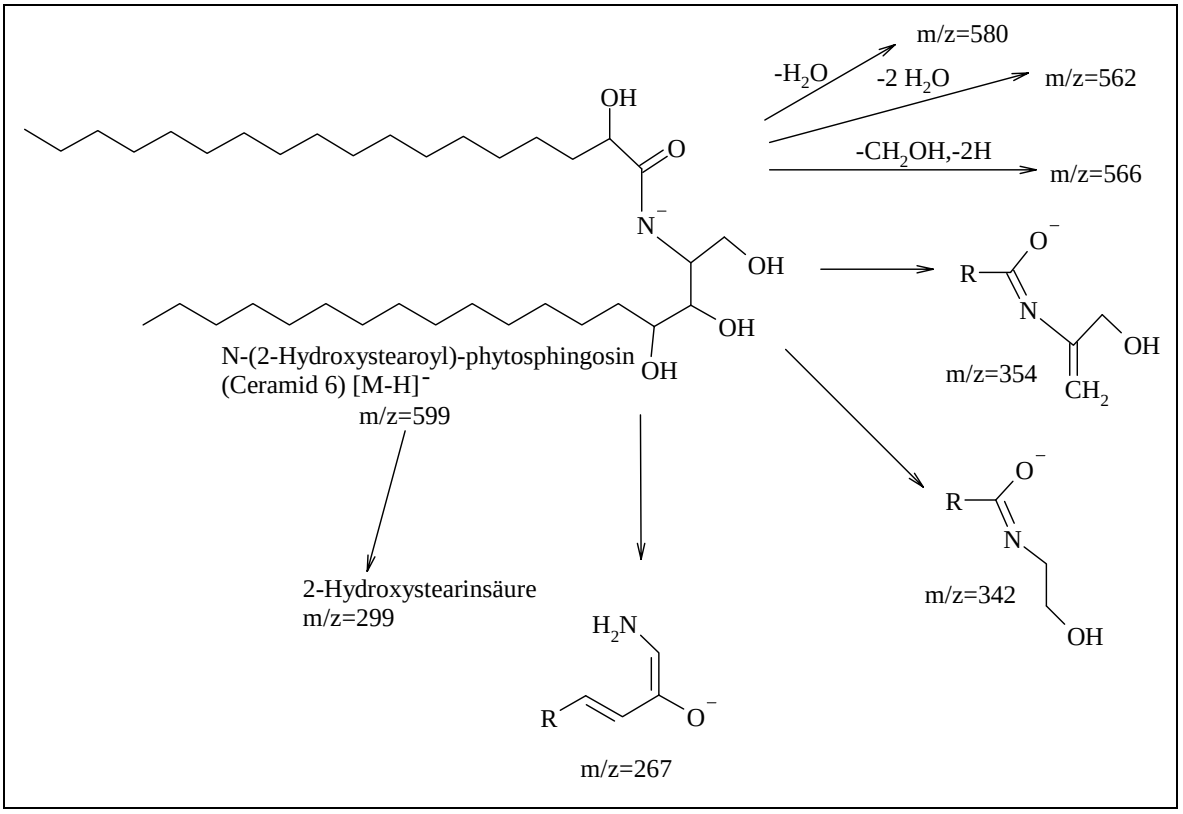


Abb. 39: Fragmentierungsschema für N-(2-Hydroxystearoyl)-phytosphingosin (Ceramid VI (Cosmoferm)).

Ceramid 2 (Sederma) enthält Sphinganin als langkettige Base. Die Fragmentierung zeigt sich entsprechend modifiziert (siehe Abb. 40 für das Tochterionenspektrum und Abb. 41 für das daraus abgeleitete Fragmentierungsschema).

Ceramid III (Sigma) wird häufig als Standard benutzt. Die Bezeichnung ist irreführend, denn da hierin Sphingosin und nicht Phytosphingosin als langkettige Base vorkommt, sind die Substanzen als Ceramid 2 einzuordnen. Die Fragmentierungsschemata der beiden Hauptkomponenten sind ebenfalls angegeben (Abb. 42 bzw. 43).

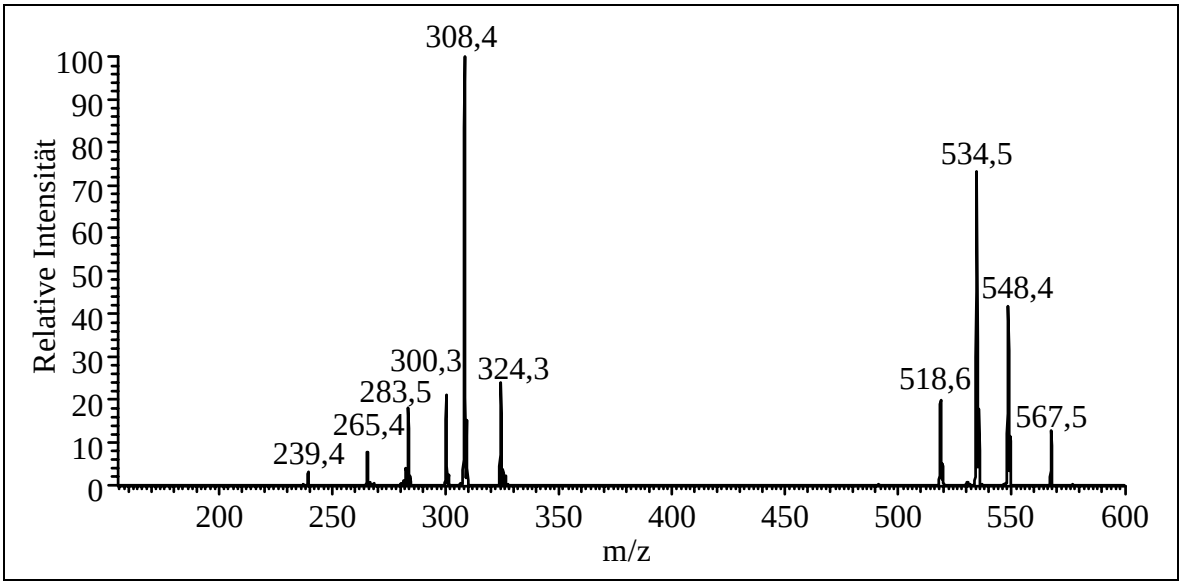


Abb. 40: Negativ-ESI-Tochterionenspektrum von N-Stearoyl-sphinganin (Ceramid 2, Sederma).

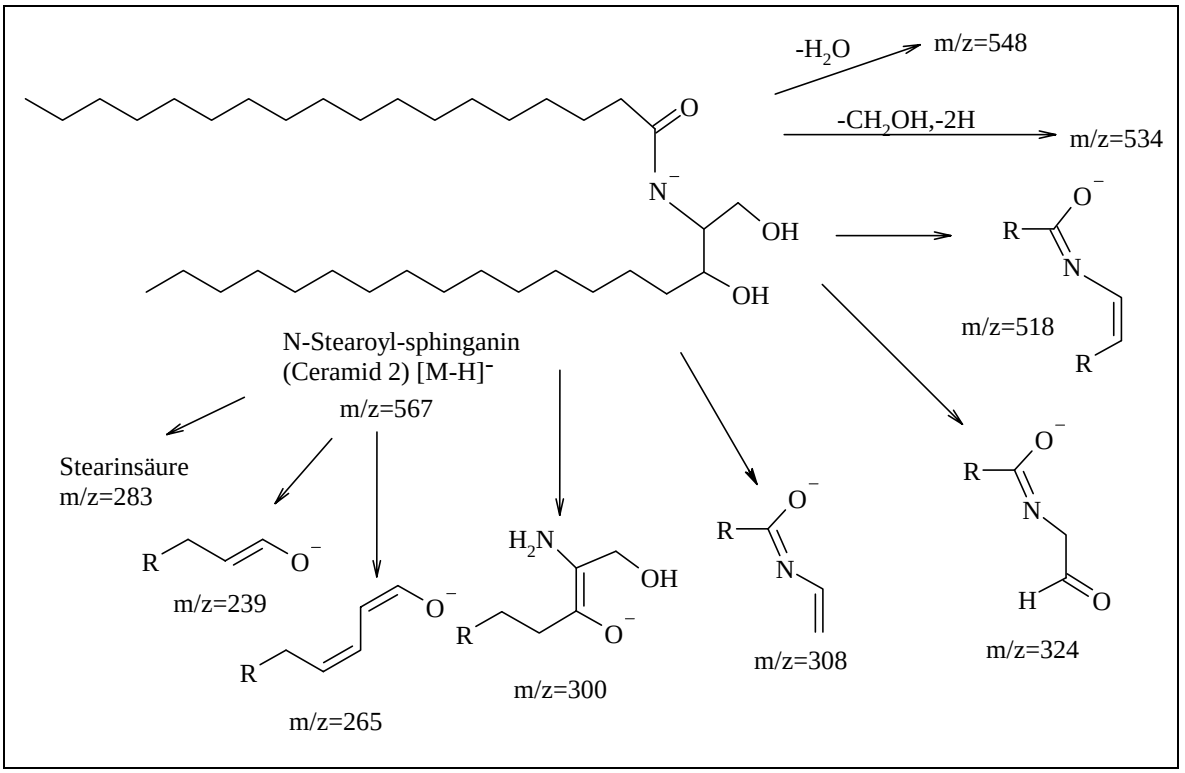


Abb. 41: Fragmentierungsschema für N-Stearoyl-sphinganin (Ceramid 2, Sederma).

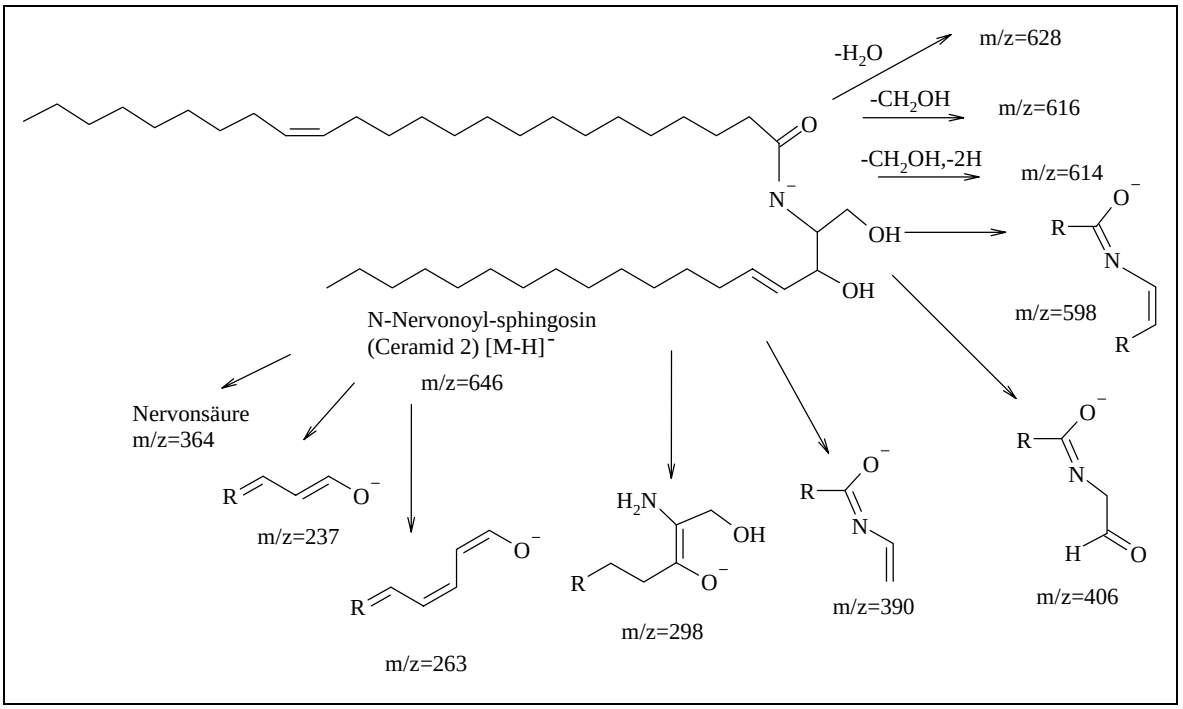


Abb. 42: Fragmentierungsschema für N-Nervonoyl-sphingosin (häufigste Komponente von Ceramid III, Sigma).

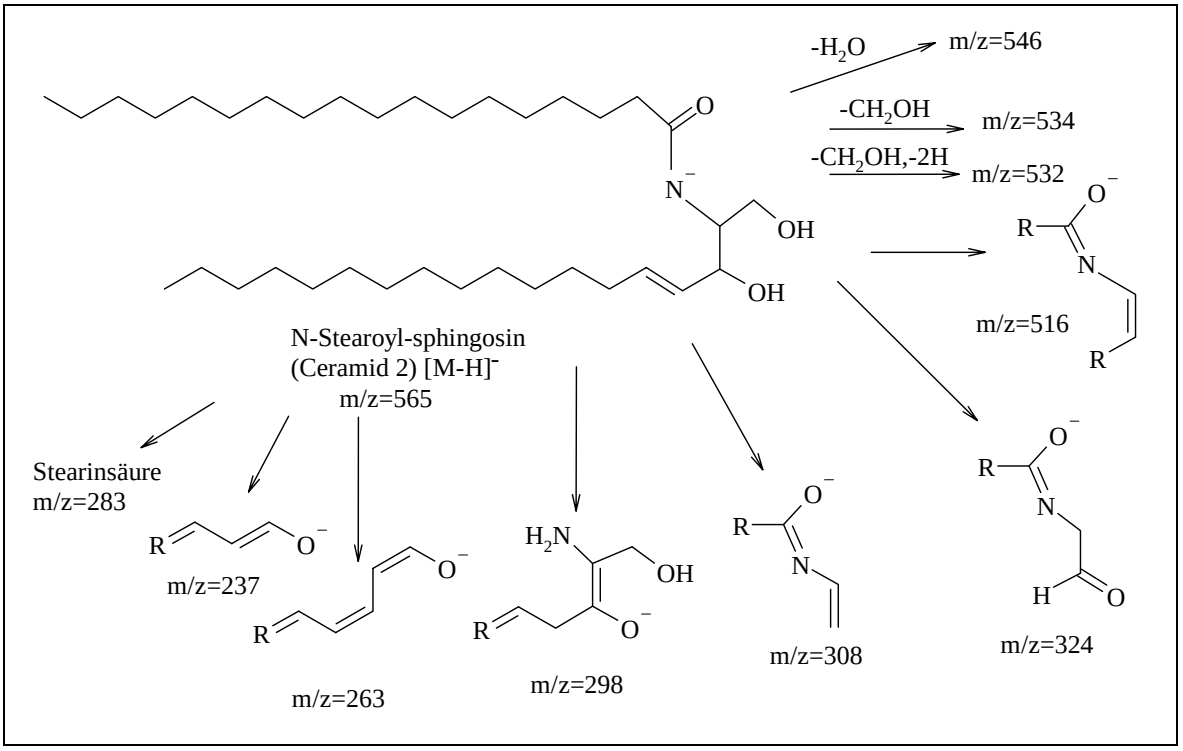


Abb. 43: Fragmentierungsschema für N-Stearoyl-sphingosin (zweithäufigste Komponente von Ceramid III (Sigma)).

N-Palmitoyl-sphingosin zeigt, wie zu erwarten, ein sehr ähnliches Tochterionenspektrum (siehe Abb. 44).

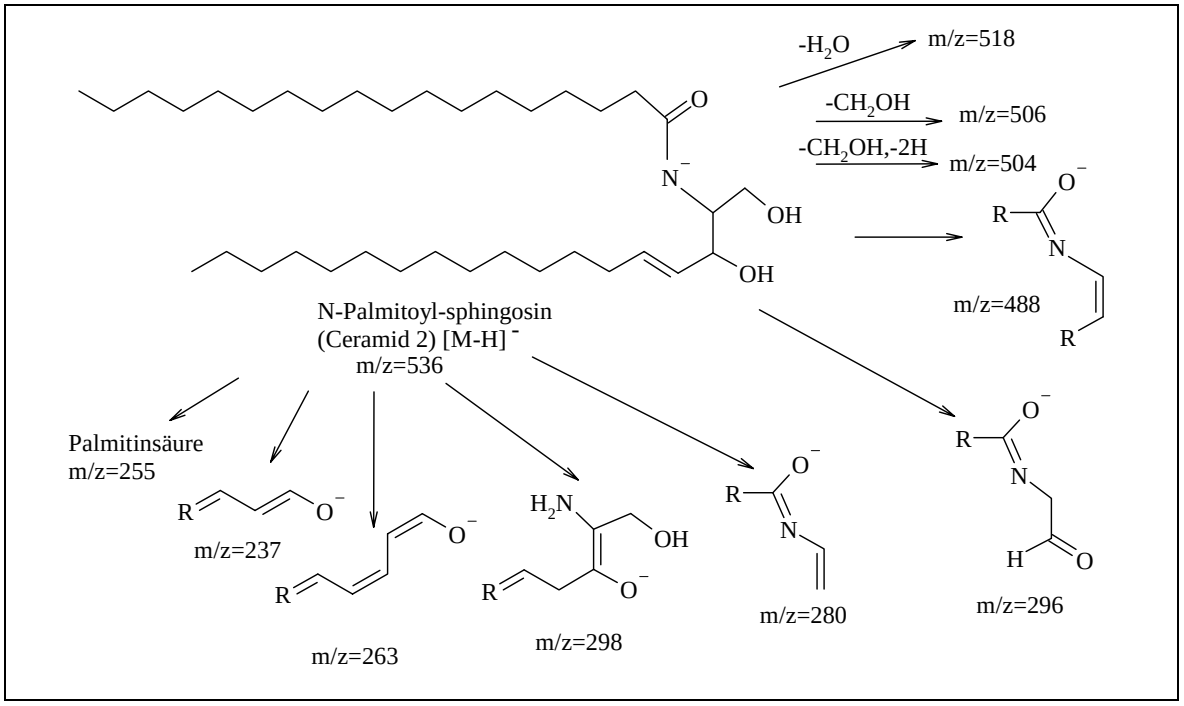


Abb. 44: Fragmentierungsschema für N-Palmitoyl-sphingosin (am Hause synthetisiert [6]).

Die Identifizierung sowohl der Acylkomponente als auch der langkettigen Base ist also möglich durch Aufnahme eines einzigen Massenspektrums unter optimierten Bedingungen, das man somit als „Fingerprint" für das Molekül bezeichnen kann [99,101].

MS/MS-Experimente am Triple Quadrupol. Angesichts der Konkurrenz von Ionenfallen und Triple-Quadrupol-Geräten auf dem MS/MS-Markt ist es interessant, die mit beiden Prinzipien erzielten Ergebnisse zu vergleichen. Positivionen-ESI liefert hier nahezu ausschließlich die $[M+H]^+$-Ionen, wahrscheinlich wegen der am Turbo-Ionspray-Interface „härteren" Ionisationsbedingungen als am Finnigan-ESI-Interface. Die Tochterionenspektren sind prinzipiell ähnlich wie an der Ionenfalle, d.h., daß die gleichen typischen Fragmente vorhanden sind, die Sphinganin, Sphingosin bzw. Phytosphingosin charakterisieren. Jedoch zeigen die Basenfragmente und nicht das Wasserabspaltungsfragment (wie an der Ionenfalle) von vornherein die höchste relative Intensität - ein Ergebnis, das an das MS^3-Spektrum der Ionenfalle erinnert. Die Negativionen-Tandem-Massenspektren sind fast identisch mit den an der Ionenfalle aufgenommenen, d.h. sie liefern die gleiche umfangreiche Strukturinformation. Die Stabilität war jedoch offenbar etwas schlechter.

Vorläuferionen-Analysen (Precursor Ion Scan) ermöglichen im Falle der Ceramide, alle jene Ionen zu analysieren, die bestimmte Fragmente bilden, also z.B. solche, die für die langkettigen Basen Sphinganin, Sphingosin und Phytosphingosin charakteristisch sind. So wurde der 3. Quadrupol auf das Fragment m/z= 318 eingestellt, und der 1. Quadrupol scannte alle Ionen, die dieses Fragment bilden, also z.B. alle Ceramide, die Phytosphingosin enthalten. Dies ist ein Vorteil des Triple-Quadrupol-MS gegenüber der Ionenfalle. Es ist jedoch denkbar, daß dieser Nachteil der Ionenfalle in Zukunft durch entsprechende Softwaremodifikationen ausgeglichen wird. LC/MS/MS-Experimente wurden aus Zeit- und Kapazitätsgründen am Triple-Quadrupol nicht durchgeführt. An der Durchführbarkeit bestehen keine Zweifel, die Empfindlichkeit dürfte im gleichen Bereich liegen. Zu bedenken ist, daß dazu jedoch am Triple Quadrupol unbedingt im SIM-Modus gearbeitet werden muß. Dies beschränkt die Anzahl der gleichzeitig analysierbaren Spezies und ist nachteilig bei der Analytik komplexer Gemische mit unbekannten Substanzen.

Faßt man die Ergebnisse der MS/MS- und MS^n-Untersuchungen an Ceramiden zusammen, kann festgestellt werden:

- Tandem-Massenspektren erlauben bei allen untersuchten Ceramiden die schnelle und einfache Identifizierung von Fettsäure und langkettiger Sphingoidbase;
- Ionenfallen- und Triple-Quadrupol-MS sind hierbei prinzipiell gleichwertig;
- der Positiv-ESI-MS/MS-Modus erlaubt die sichere Identifizierung der Sphingoidbase anhand mehrerer charakteristischer Fragmente;
- der Negativ-ESI-MS/MS-Modus ermöglicht unter für alle Ceramide sehr ähnlichen Bedingungen die gleichzeitige Identifizierung von Fettsäuren und langkettigen Basen;
- Mehrfach-MS-Experimente sind an der Ionenfalle durchführbar und ergeben gut erklärbare Fragmente, die insbesondere im Positiv-ESI-Modus eine nützliche Ergänzungsinformation bieten (Beispiel für MS^6: Phytosphingosin-Abspaltung aus einem Ceramid, anschließend die in Abb. 31 gezeigte Kaskade), sie sind jedoch zur Strukturaufklärung nicht unbedingt erforderlich.

4.2.3 Untersuchung von Ceramiden des menschlichen Stratum corneum

Um die Ceramide des Stratum corneum analysieren zu können, müssen sie zunächst aus einem allgemeinen Lipidextrakt gewonnen werden. Darüber hinaus empfiehlt es sich wegen der außerordentlichen strukturellen Variabilität, eine Vortrennung in Fraktionen vorzunehmen, ehe sich die LC/MS-Analytik anschließt. Um beide Schritte zu vereinen, wurde eine Methode der Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung (**AMD-HPTLC**) angewandt.

Dazu wurde ein Gesamtlipidextrakt aus palmoplantarem Stratum corneum nach einer validierten Methode [149] auf Kieselgelplatten chromatographiert. Anhand der R_f-Werte von Standardsubstanzen (Detektion im Randbereich der Platte) erfolgte die Identifikation der Hautlipidbanden. Die Banden von Ceramid 2, 3, 4 und 6 sowie Cholesterol und Cholesterolsulfat wurden möglichst quantitativ von der HPTLC-Platte gewonnen. Die jeweiligen Kieselgelfraktionen wurden im Anschluß mit Chloroform/Methanol 1:1 reextrahiert. Nach Abzentrifugieren des Kieselgels standen diese Proben der LC/MS-Analytik unmittelbar zur Verfügung. Die Kombination von AMD-HPTLC und LC/MS ist deshalb besonders nutzbringend, weil die Dünnschichttrennung am Kieselgel hauptsächlich anhand der Zahl und Stellung der Hydroxygruppen erfolgt. Daher können die Banden der HPTLC strukturellen Klassen zugeordnet werden, die jeweils Substanzgemische von Homologen mit verschiedener Kettenlänge von Fettsäuren und langkettigen Basen enthalten. Ist die Grundstruktur des jeweiligen Moleküls somit bekannt, ist die Erklärung der Massenspektren wesentlich erleichtert. Anzumerken ist, daß der benutzte AMD-Gradient auf die Trennung eines Gesamtlipidextraktes aus palmoplantarem Stratum corneum optimiert ist. Will man eine Trennung der Ceramide in sechs Fraktionen erreichen, muß zuvor eine Abtrennung der polaren Lipide von den Neutrallipiden erfolgen und anschließend eine erneute Chromatographie der polaren Lipide. Hierfür hätte ein neuer AMD-Gradient entwickelt werden müssen, wozu leider nicht die Möglichkeit bestand. Für Ceramid 1 und Ceramid 7 sind Vergleichssubstanzen nicht erhältlich, daher konnten diese Klassen bei der HPTLC nicht eindeutig zugeordnet werden. Da diese die beiden Extrema hinsichtlich der Polarität darstellen, war zu befürchten, daß sie bei dem gegebenen Regime von anderen Lipidbanden überlagert werden. In der Cholesterolbande konnte jedoch kein Ceramid 1 gefunden werden. Ceramid 7 zeigt wahrscheinlich unter den gegebenen Bedingungen ein sehr ähnliches Retentionsverhalten wie Ceramid 6 (siehe unten).

Daher konzentrierten sich die Untersuchungen zunächst auf die zuzuordnenden Banden von Ceramid 2, 3, 4 und 6.

Abb. 45 zeigt die Trennung von Bestandteilen der Ceramid 2 zugeordneten Bande.

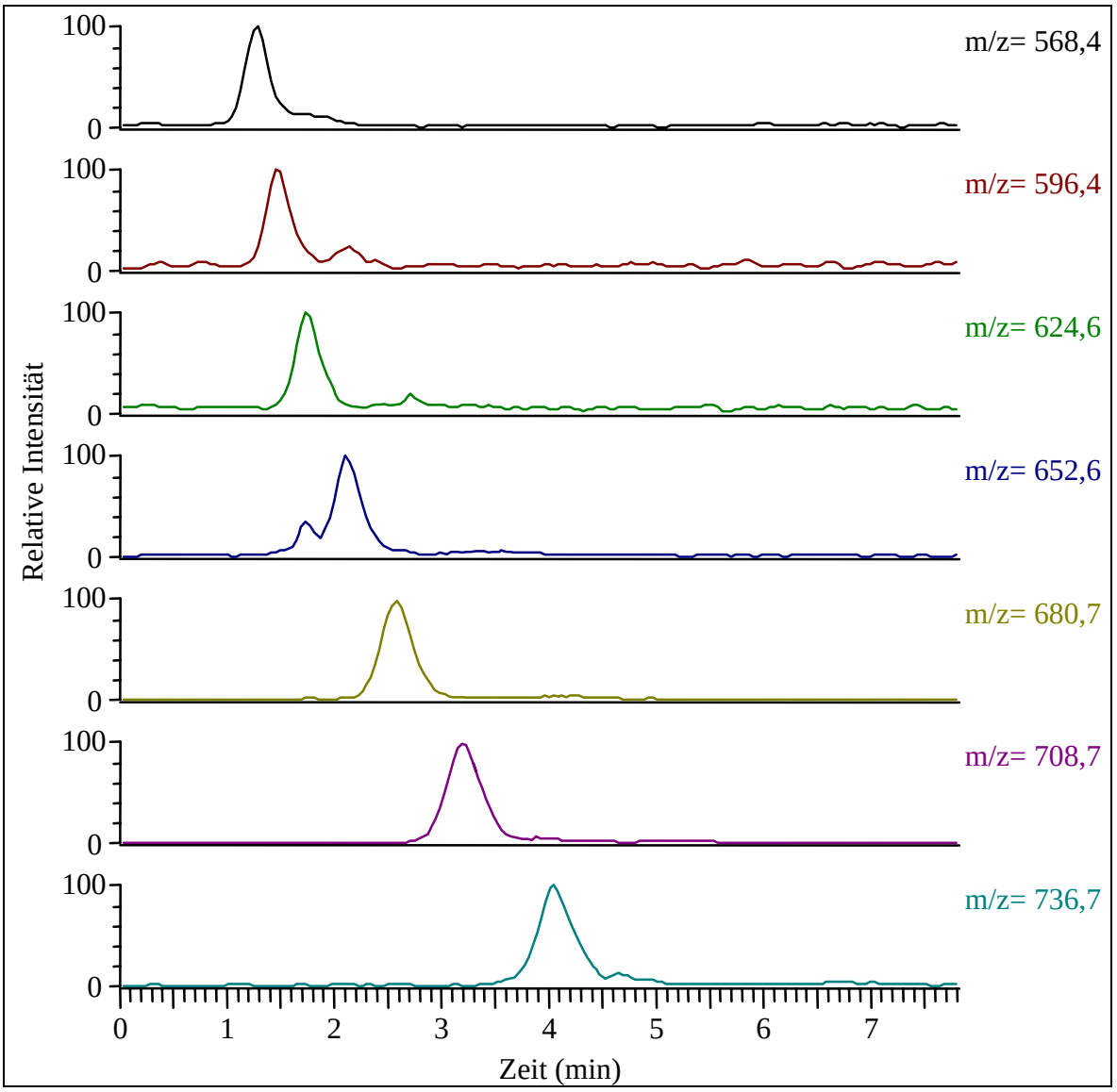


Abb. 45: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 2 in palmoplantarem Stratum corneum.

Die hierbei gefundenen m/z-Werte entsprechen weitgehend denen, die sich durch Berechnungen anhand der Kombination der häufigsten Fettsäuren und langkettigen Basen [132] voraussagen ließen. Dazu wurden die prozentualen Häufigkeiten von je einer langkettigen Base und einer Fettsäure miteinander multipliziert. Für die Kombinationen mit dem größten Produkt (bei statistischer Kombination der Komponenten wären dies folglich die wahrscheinlichsten) wurden die Molekulargewichte der resultierenden Ceramide errechnet. Die entsprechenden Ionen (im Negativ-ESI-Modus also $[M-H]^-$, d.h. bei einem m/z-Wert um 1 amu geringer als das Molekulargewicht) wurden gezielt zur Auswertung der im Full Scan aufgenommenen

LC/MS-Chromatogramme herangezogen. Weiterhin wurde das (nahezu) über die gesamte Laufzeit der HPLC gemittelte Massenspektrum (1-8 min) ausgewertet. Die m/z-Werte, bei denen die Signale mit der höchsten relativen Intensität gefunden wurden, wurden (jeweils mit einer Bandweite von 1 amu) in der LC/MS zur Detektion eingesetzt. Da im Full Scan zu jedem Zeitpunkt der gesamte Massenbereich gescannt wird, ist es möglich, diese Information nachträglich herauszufiltern.

Es zeigte sich, daß die o. g. Vorausberechnung bereits gute Anhaltspunkte liefert und die errechneten Ionen meist auch die intensivsten Signale im gemittelten Massenspektrum zeigen. Im Falle von **Ceramid 2** (HPTLC-Referenzsubstanz: N-Stearoyl-sphinganin) war die Kombination von C-20-Sphinganin mit den gesättigten Fettsäuren der Kettenlänge C-24 bzw. C-26 am wahrscheinlichsten. Tatsächlich wurden die intensivsten Signale bei den m/z-Werten von 680 bzw. 708 detektiert (allerdings in umgekehrter Reihenfolge, d.h. das Signal von m/z= 708 war höher als jenes von m/z= 680). N-Lignoceroyl-sphinganin und N-Hexacosanoyl-sphinganin konnten durch das Tochterionenspektrum als eindeutig häufigste Komponenten identifiziert werden.

Um eine relative Häufigkeitsverteilung der Ceramide (zunächst anhand der m/z-Werte) angeben zu können, wurden zwei Verfahren angewendet und verglichen.

Erstens wurden die Peakflächen aller auswertbaren Peaks errechnet und zur größten Peakfläche ins Verhältnis gesetzt. Da z. T. bei einem m/z-Bereich mehrere Peaks zu trennen waren (Homologe mit gleichem Molekulargewicht, die sich im Retentionsverhalten stark genug unterscheiden) und über das Tochterionenspektrum (bei ausreichender Intensität) eine Identifizierung prinzipiell möglich ist, ist dies eine sehr spezifische Auswertung. Nachteilig ist die Ungenauigkeit bei schlechteren Peakformen, da nicht selten verschiedene Spezies mit gleichem Molekulargewicht ein sehr ähnliches Retentionsverhalten zeigen und die Peaks ineinander übergehen.

Zweitens wurde daher auf die Auswertung der Peakhöhen in den gemittelten Massenspektren (1-8 min) zurückgegriffen. Da es sich um homologe Substanzen mit identischer Struktur des polaren Molekülteils handelt, kann davon ausgegangen werden, daß das Ionisationsverhalten sehr ähnlich ist. Nachteilig ist, daß Homologe mit gleichem Molekulargewicht gemeinsam erfaßt werden. Eine detaillierte Nachuntersuchung mittels LC/MS/MS wäre daher ggf. erforderlich. Vorteilhaft ist allerdings die im Vergleich zur erstgenannten Methode größere Empfindlichkeit (größere Zahl quantifizierbarer Komponenten) und Genauigkeit. Die relative Standardabweichung (n= 5) der ermittelten relativen Häufigkeitswerte lag beim Peakflächenverfahren zwischen 5 und 10 %, beim Spektrenverfahren bei 3-4 %. Daher wurde letzteres zur Berechnung der relativen Häufigkeitsverteilungen benutzt.

Abb. 46 zeigt die relative Häufigkeit der verschiedenen Komponenten von Ceramid 2, dargestellt als Säulendiagramm in Form eines Massenspektrums. Berücksichtigt wurden darin zunächst nur die 16 häufigsten Komponenten.

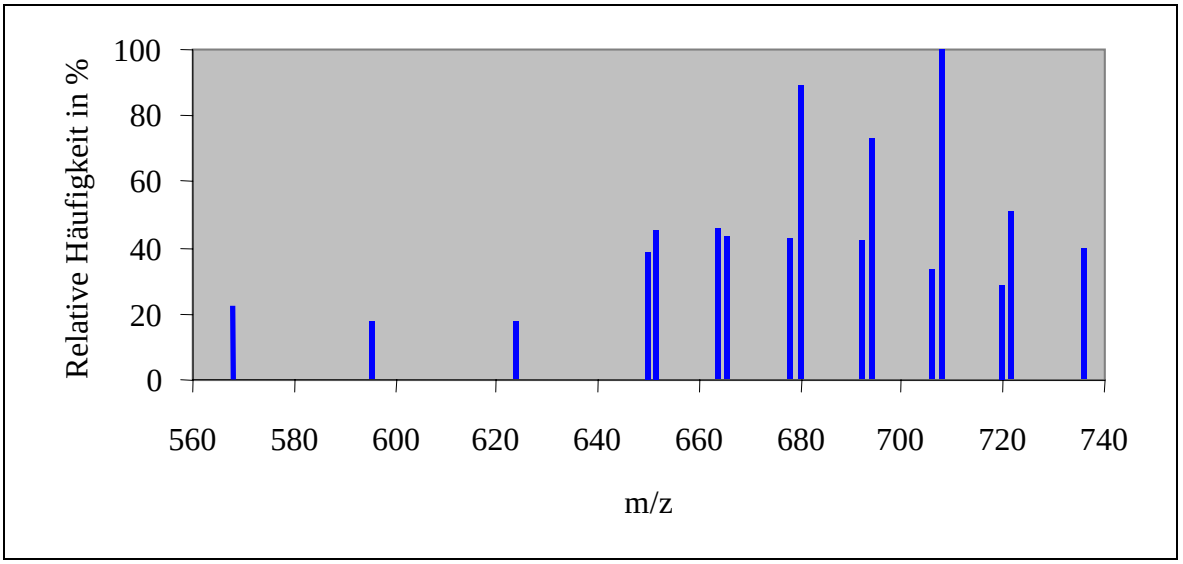


Abb. 46: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-2-Fraktion. Erläuterungen im Text.

Die Untersuchung der **Ceramid-3**-Fraktion (HPTLC-Referenzsubstanz: N-Stearoyl-phytosphingosin) ergab wiederum, daß die vorausberechneten Massen unter den häufigsten Komponenten zu finden sind, allerdings teilweise mit deutlich modifizierter Häufigkeitsreihenfolge.

m/z= 723 wurde in Übereinstimmung als häufigste Masse gefunden und darin das aus C-22-Phytosphingosin und Lignocerinsäure gebildete Ceramid durch MS/MS als Hauptkomponente identifiziert. Dagegen kam das in der Berechnung nach Daten von [132] als ebenso wahrscheinlich vorausgesagte N-Palmitoyl-Derivat des C-22-Phytosphingosins deutlich seltener vor. Auf Platz 2 der Häufigkeitsrangliste rangierte m/z= 695, wobei allerdings 4 Spezies identifiziert wurden, namentlich die Kombinationen aus C-18-, C-20-, C-22- bzw. C-26-Phytosphingosin mit den Fettsäuren C-26, C-24, C-22 bzw. C-18. Allgemein zeigt das LC/MS-Chromatogramm (siehe Abb. 47) im Falle des Ceramid 3 eine wesentlich stärkere Aufspaltung der Peaks, d.h. mehr Homologe mit unterscheidbarem Retentionsverhalten als bei anderen untersuchten Ceramidfraktionen. Abb. 48 zeigt die relative Häufigkeitsverteilung.

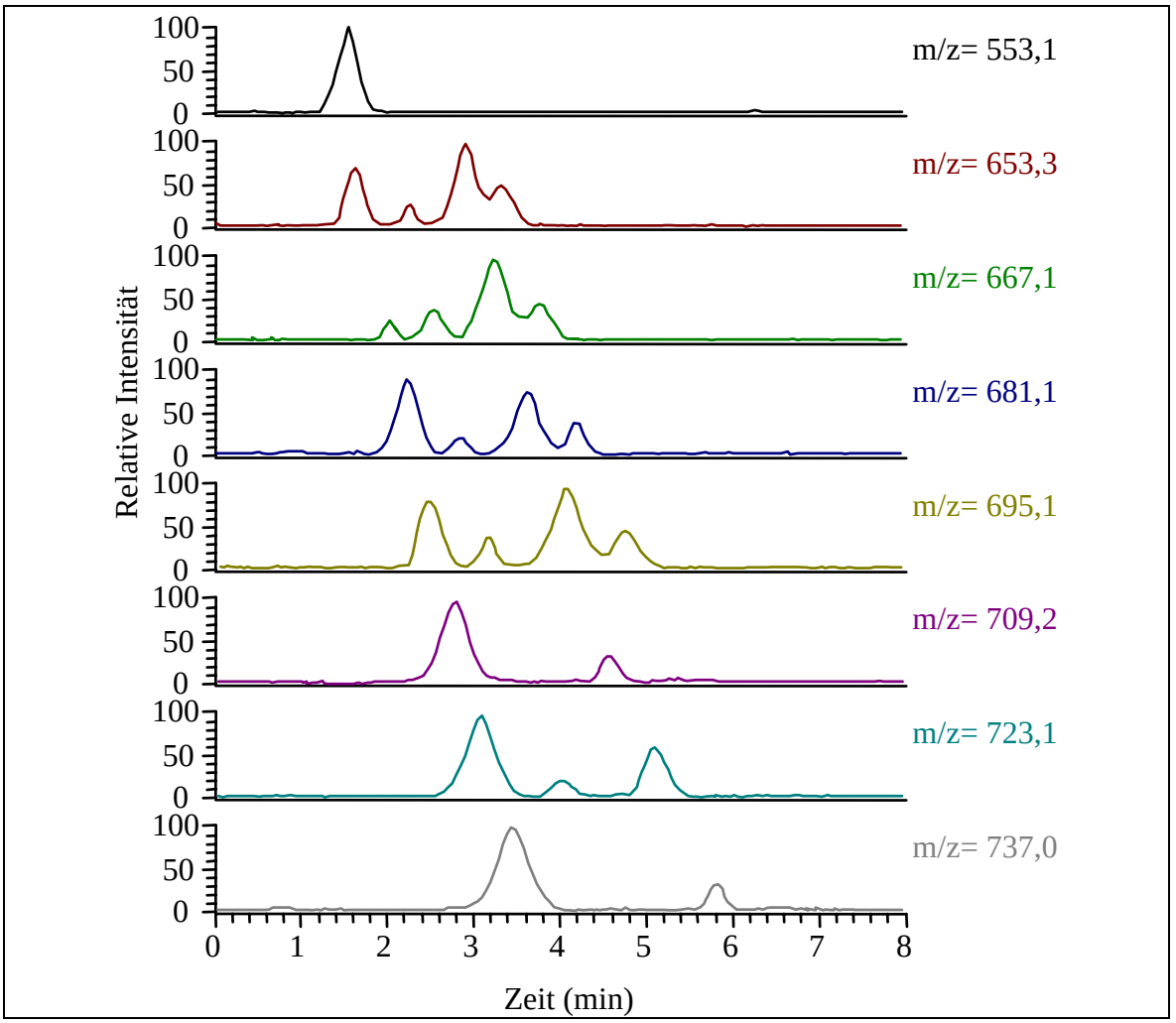


Abb. 47: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 3.

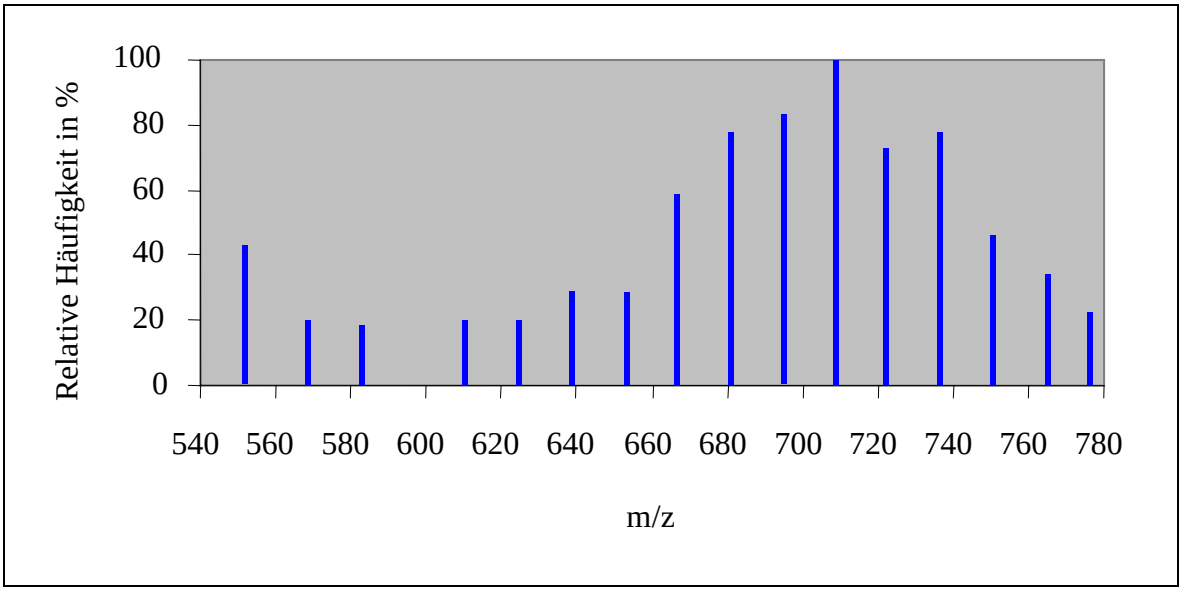


Abb. 48: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-3-Fraktion. Erläuterungen im Text.

Bei **Ceramid 4** (HPTLC-Referenzsubstanz: Ceramid IV (Sigma)) fällt auf, daß wiederum die berechneten Massen zu den häufigsten gehören, daß aber auch eine große Ähnlichkeit zu dem aus Rinderhirn-Sphingomyelin gewonnenen Ceramid 4 besteht. C-18-Sphingosin dominiert unter den langkettigen Basen. Sphinganinbasen werden erst bei höheren Kettenlängen gegenüber ihren ungesättigten Pendants vom Sphingosin-Typ bevorzugt, wofür sich bereits in [132] Hinweise finden. Die häufigste Komponente ist N-(2-Hydroxyhexacosanoyl)-sphingosin, gefolgt von N-(2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin und N-(2-Hydroxypentacosanoyl)-sphingosin.

Abb. 49 zeigt die Trennung von Ceramid-4-Komponenten aus dem palmoplantaren Lipidextrakt. Abb. 50 gibt das Häufigkeitsspektrum an.

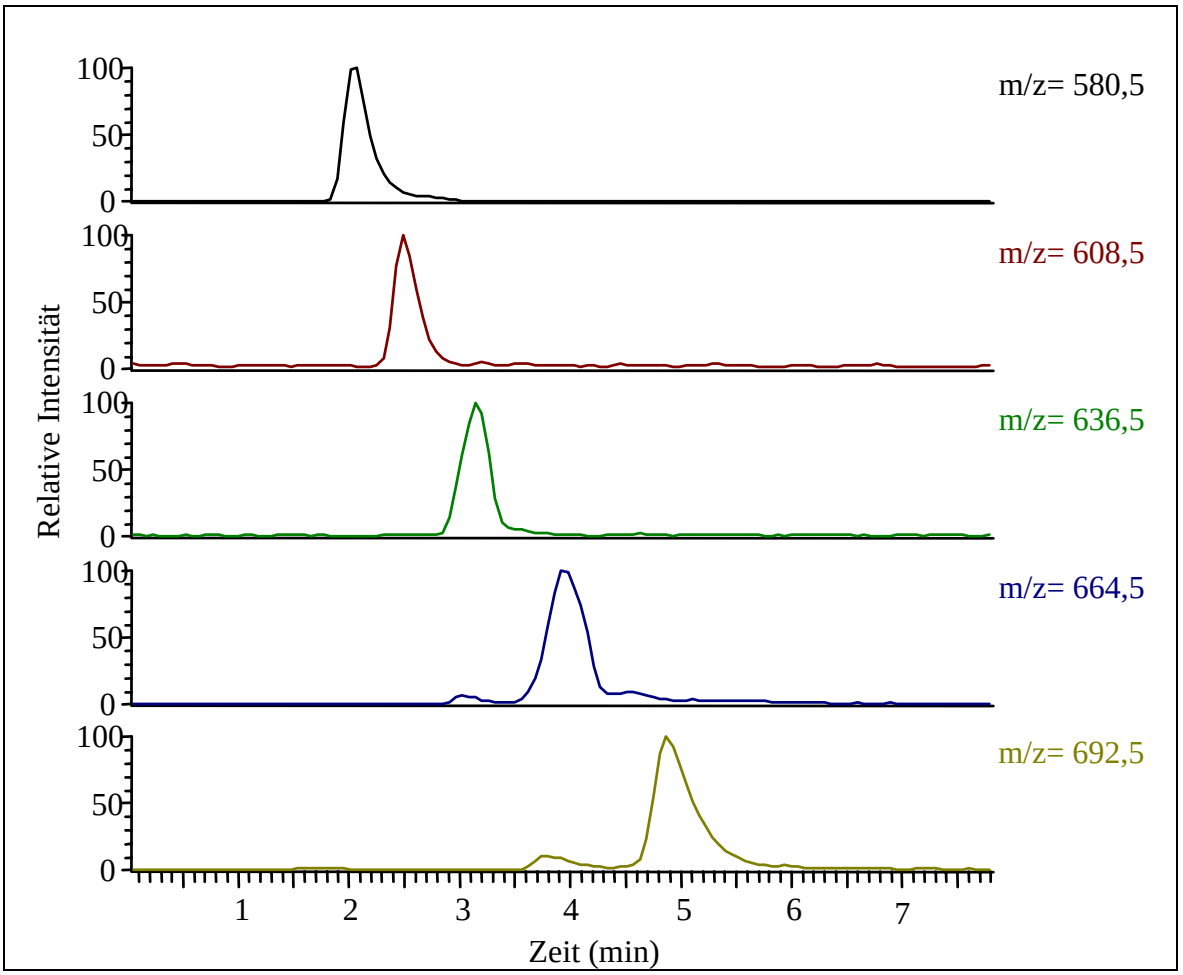


Abb. 49: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 4 in palmoplantarem Stratum corneum.

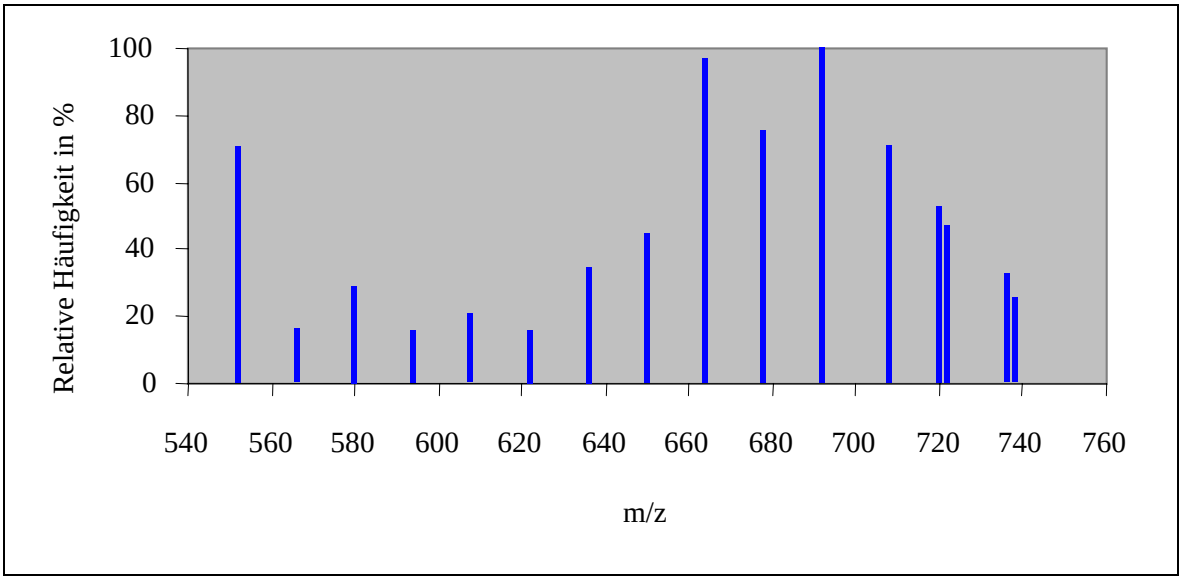


Abb. 50: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-4-Fraktion. Erläuterungen im Text.

Bei **Ceramid 6** (HPTLC-Referenzsubstanz: N-(2-Hydroxystearoyl)-phytosphingosin) wurde in älteren Arbeiten ein Aufspaltung der HPTLC-Bande beschrieben [131,132], weshalb eine Einteilung in Ceramid 6 I und 6 II vorgenommen wurde. Während für das häufigere Ceramid 6 II (heute nur noch Ceramid 6) die Struktur bald klar war, wurden für 6 I verschiedene Strukturen vorgeschlagen, ehe in [103] 6-Hydroxysphingosin als neuartige langkettige Base erstmals beschrieben wurde und die entsprechenden Ceramide als Ceramid 7 definiert wurden. Entsprechend diesen Vorgaben wurde die Ceramid-6-Fraktion untersucht. Es zeigte sich, daß die nach den Daten aus [132] berechneten Hauptmassen von Ceramid 6 (II) tatsächlich in großem Ausmaß vorkommen, am häufigsten erwartungsgemäß die Kombination aus C-22-Phytosphingosin und 2-Hydroxylignocerinsäure.

Daneben konnte die Existenz von Ceramid-7-Komponenten nachgewiesen werden. Dies zeigt sich am Vorhandensein von Komponenten mit einem um 2 amu geringeren Molekulargewicht als die jeweiligen Ceramid-6-Spezies,wenngleich über die Stellung der Doppelbindung keine Aussage gemacht werden kann. Als häufigste Komponente wurde m/z= 709 gefunden und mittels MS/MS der Kombination aus C-20-(6-Hydroxysphingosin) und 2-Hydroxylignocerinsäure zugeordnet. Hingegen ergaben sich für anders strukturierte Ceramid-6-Vertreter, insbesondere solche mit einer esterartig gebundenen Fettsäure, keine Hinweise.

Abb. 51 zeigt ein LC/MS-Chromatogramm und Abb. 52 die Häufigkeitsverteilung für die Ceramid-6-Fraktion.

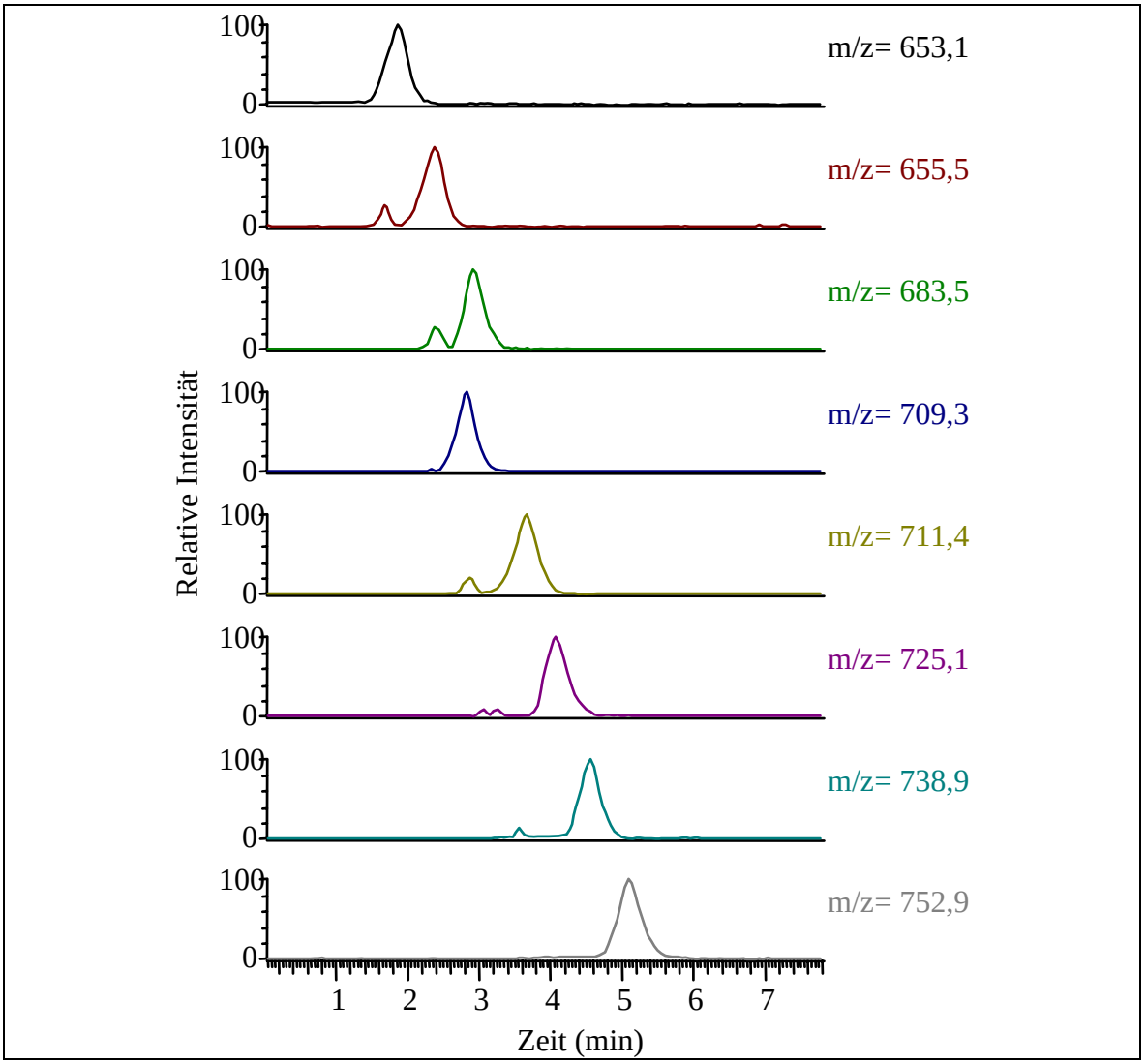


Abb. 51: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 6.

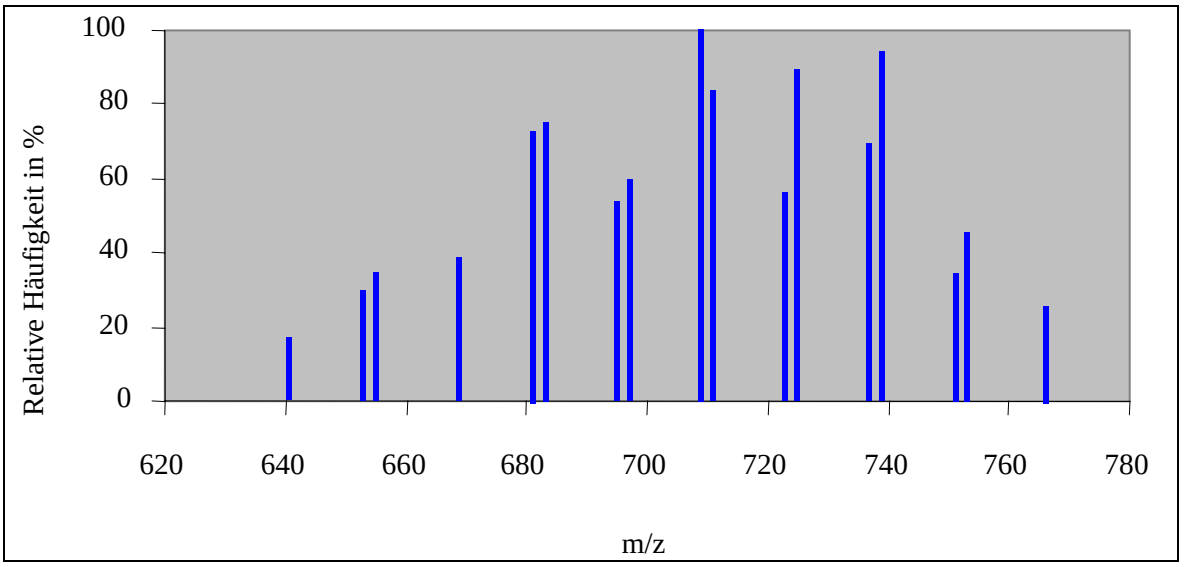


Abb. 52: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-6-Fraktion. Erläuterungen im Text.

Tabelle 5 faßt die Ergebnisse der Untersuchungen zur relativen Häufigkeitsverteilung noch einmal zusammen.

Tab. 5: Relative Häufigkeit des Vorkommens von Ceramiden (bezogen auf die häufigste Komponente) in vier mittels semipräparativer AMD-HPTLC gewonnenen Fraktionen eines Lipidextrakts aus humanem palmoplantarem Stratum corneum, die den Strukturtypen Ceramid 2, 3, 4 und 6 zugeordnet werden konnten (vgl. Abb. 7).

Ceramid 2		Ceramid 3	
Molekulargewicht M in µ, amu oder Da	Relative Häufigkeit in %	Molekulargewicht M in µ, amu oder Da	Relative Häufigkeit in %
568	22	554	42
596	17	570	19
624	17	584	18
650	38	612	19
652	45	626	19
664	45	640	28
666	43	654	28
678	42	668	58
680	88	682	77
692	41	696	82
694	72	710	100
706	32	724	72
708	100	738	77
720	28	752	45
722	50	766	33
736	39	778	22
Ceramid 4		Ceramid 6	
Molekulargewicht M in µ, amu oder Da	Relative Häufigkeit in %	Molekulargewicht M in µ, amu oder Da	Relative Häufigkeit in %
553	70	654	29
567	16	656	34
581	28	670	38
595	15	682	73
609	20	684	74
623	15	696	53
637	34	698	59
651	44	710	100
665	96	712	83
679	75	724	55
693	100	726	89
709	70	738	69
721	52	740	93
723	46	752	33
737	32	754	45
739	25	768	25

Eine absolute Quantifizierung ist nicht unproblematisch. Um den Anteil einzelner Ceramide in Gewichtsprozent angeben zu können, müßten zunächst die einzelnen Fraktionen quantifiziert werden. Die dabei erhaltene Ceramidmenge müßte dann entsprechend der relativen Häufigkeitsverteilung aufgeteilt werden. Mit dieser Vorgehensweise umgeht man elegant die Probleme, daß im Zuge der Probenvorbereitung (Extraktion, HPTLC, Abkratzen von der Platte, Reextraktion) unvermeidbar Substanzverluste auftreten und andererseits mit Matrixeffekten bei der LC/MS-Quantifizierung gerechnet werden muß. Dazu hätte allerdings eine neue AMD-HPTLC-Methode ausgearbeitet werden müssen, die die sichere Trennung und Quantifizierung der Fraktionen erlaubt. Die Möglichkeit dazu bestand zum gegebenen Zeitpunkt leider nicht. Es war jedoch möglich, eine Gesamtceramidmenge sowie Angaben für Ceramid 2 (bezogen auf Ceramid III (Sigma)) und Ceramid 4 zu erhalten. Ersatzweise könnten auch bereits veröffentlichte quantitative Angaben zu den einzelnen Ceramidklassen [132] als Anhaltspunkt herangezogen werden, wobei auf die Herkunft der Proben (z.B. Hautareal) zu achten ist.

Die Quantifizierung des für semipräparative AMD-HPTLC verwendeten Lipidextrakts mit Hilfe der densitometrischen Auswertung (sog. Michaelis-Menten-Regression 2. Ordnung) ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Quantifizierung des bei den beschriebenen LC/MS-Untersuchungen benutzten Lipidextrakts mit Hilfe der AMD-HPTLC. Berechnet nach [150]. Weitere Erläuterungen im Text.

[#] entspricht der Menge in µg pro 5 mg getrockneter Extrakt.

* Quantifizierung über Peakhöhe, da Peakfläche nicht verfügbar.

Substanzklasse	Konzentration in der Lipidextrakt-Stammlösung in µg/ml [#]	Anteil in %
Ceramide	561	19,97
davon Cer 2	247	
davon Cer 4	78	
Freie Fettsäuren	316	11,24
Sterole	1258	44,75
Cholesterolsulfat	19	0,68
Sterol(fettsäure)ester	360 *	12,81
Triacylglycerole	297 *	10,46
Summe	2811	100,00

Wie unter 3.2 ausgeführt, wurde aus ca. 100 mg menschlichem palmoplantarem Stratum corneum ein Extrakt hergestellt, vollständig getrocknet und eine Stammlösung mit einer Gesamtsubstanzkonzentration von 5 mg/ml hergestellt. In dieser Substanzmenge sind neben den Lipiden auch noch Substanzen enthalten, die bei der HPTLC am Startfleck verbleiben, wobei es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Proteine handelt. Daher ergibt die Summe der quantifizierten Lipide nicht 5 mg, sondern nur 2,8 mg. Zu semipräparativen Zwecken wurde 100 µl dieser Lösung aufgetragen.

Weiterhin wurde Cholesterolsulfat als Referenzsubstanz quantifiziert, um die Ausbeute der Probenvorbereitung (insbesondere Extraktion) zu kontrollieren (siehe 4.3).

Drittens wurde den Fraktionsproben eine bekannte Menge eines künstlichen, im Stratum corneum nicht vorkommenden Ceramids (N-Hexanoyl-sphingosin) als interner Kontrollstandard zugesetzt. Die ansonsten häufig benutzte Quantifizierung mittels externem Standard war nicht möglich, da nur für wenige der Stratum-corneum-Ceramide Vergleichssubstanzen erhältlich sind, und zweitens ist mit einer geringeren Peakfläche der gleichen Probenkonzentration bei komplexerer Matrix zu rechnen. Dagegen kann der interne Standard der gleichen Matrix zugesetzt werden. Tests haben ergeben, daß die Standardsubstanz ein sehr ähnliches Ionisationsverhalten wie die untersuchten Ceramide zeigt, was wegen der Strukturverwandtschaft erwartet werden konnte. Trotz dieser Maßnahmen bleibt die Angabe absoluter Konzentrationen

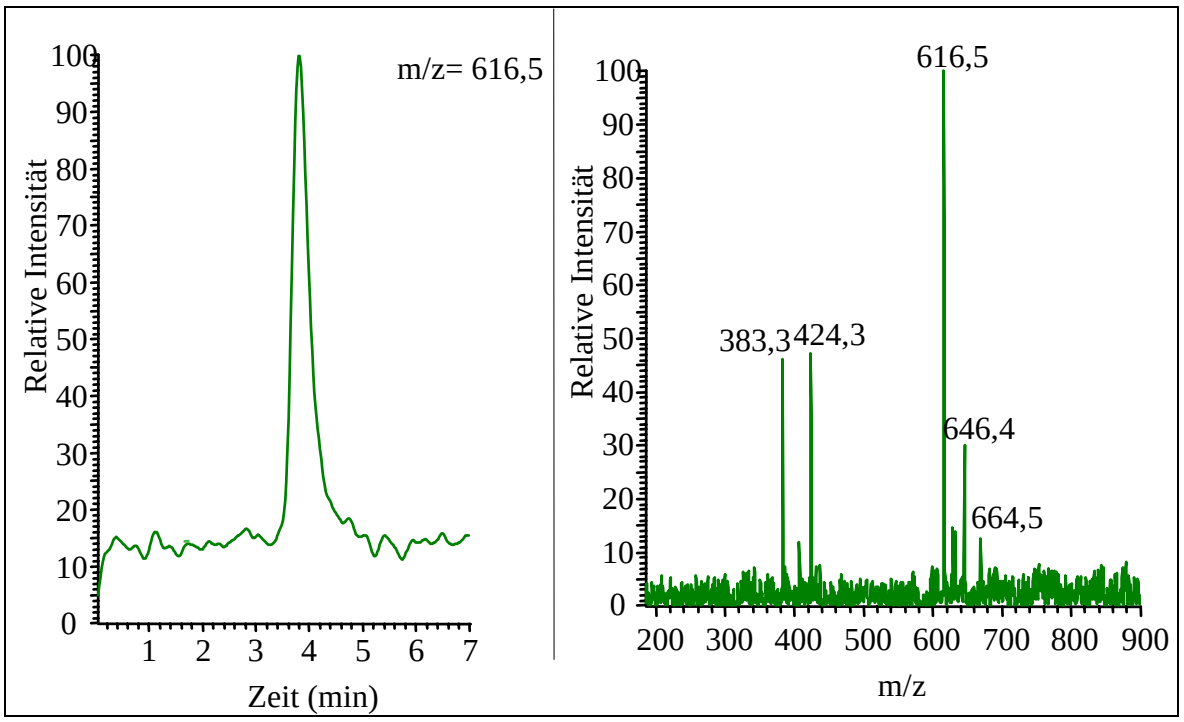


Abb. 53: LC/MS/MS-Chromatogramm und Tochterionenspektrum von (2-Hydroxy-lignoceroyl)-sphingosin, einem Bestandteil der Ceramid-4-Fraktion des Hautlipidextrakts.

problematisch. Dagegen läßt sich eine relative Häufigkeitsverteilung zuverlässig angeben. Für eine eingehendere Quantifizierung der einzelnen Ceramidspezies sind weitere Experimente, insbesondere zur getrennten Quantifizierung von Homologen mit gleichem Molekulargewicht und sehr ähnlichem Retentionsverhalten, erforderlich. Hierbei sind zur LC/MS/MS-Quantifizierung umfangreiche Untersuchungen durchzuführen. Dies ist jedoch möglich, wobei die jeweilige Nachweisgrenze die Anzahl der erfaßbaren Komponenten determiniert.
Abb. 53 zeigt das LC/MS/MS-Chromatogramm und das Tochterionenspektrum von (2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin in der Ceramid-4-Fraktion des Lipidextrakts.

4.3 Cholesterolsulfat

Im Gegensatz zu freiem Cholesterol und Estern des Cholesterols mit Fettsäuren, die wegen zu geringer Polarität der Elektrospray-Ionisierung nicht zugänglich sind, eignet sich Cholesterol-3-sulfat im Negativionen-Modus sehr gut. Unter den Lipiden der Epidermis nimmt es eine gewisse Sonderstellung ein, da es sich als einzelne molekulare Spezies klar von anderen variablen Lipidklassen unterscheidet. Dieser Umstand prädestiniert die Substanz für die Massenspektrometrie. Daher könnte es, mit gewissen Einschränkungen, als Standard für die Ausbeute der Probenvorbereitung benutzt werden, wenn man davon ausgeht, daß die extrahierte Lipidmenge zwar Schwankungen unterliegt, das Verhältnis der einzelnen Substanzklassen zu-

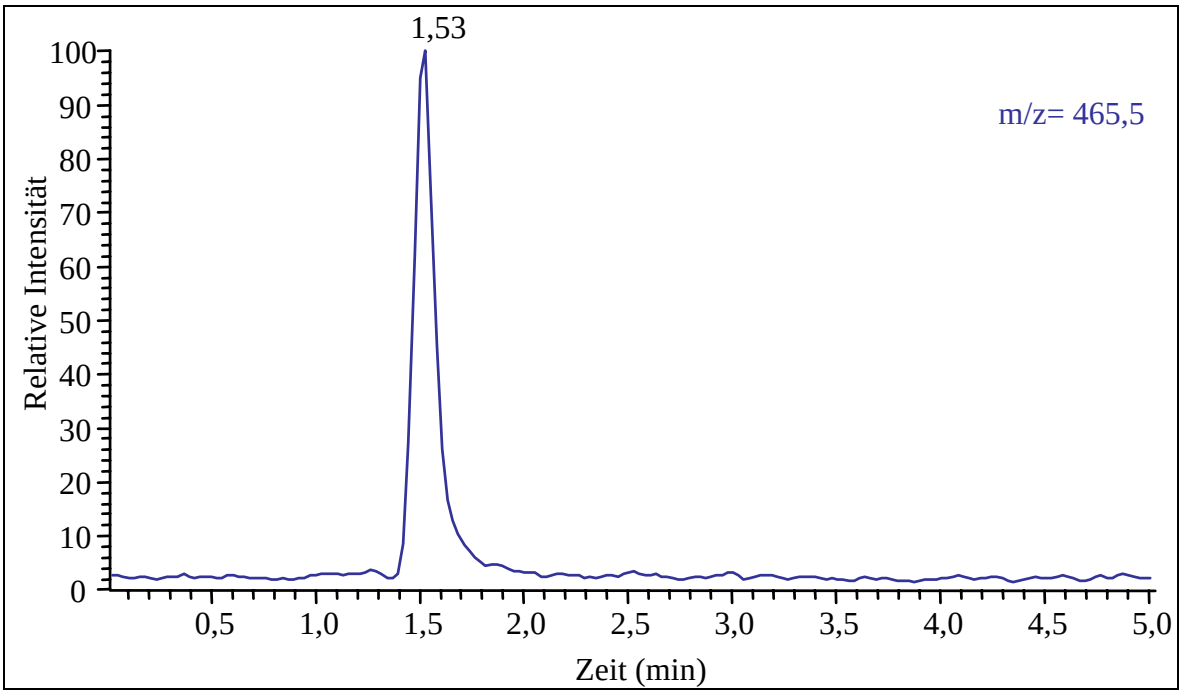


Abb. 54: LC/MS-Chromatogramm von Cholesterolsulfat. Erläuterungen im Text.

einander aber konstant bleibt [149]. Zu diesem Zwecke wurde eine quantitative LC/MS-Analytik für Cholesterolsulfat entwickelt. Da es nicht auf die Trennung von Substanzen ähnlicher Polarität ankommt, muß lediglich mit möglichst minimalem chromatographischem Aufwand ein gut quantifizierbarer Peak erzeugt werden. Dazu wurde eine RP-8-Säule mit dem Laufmittel Methanol/Wasser 80:20 benutzt. Mit einer Retentionszeit von ca. 1,5 min wird Cholesterolsulfat detektiert. Abb. 54 zeigt das entsprechende LC/MS-Chromatogramm.
Abb. 55 gibt eine Kalibrierkurve für die Quantifizierung an.

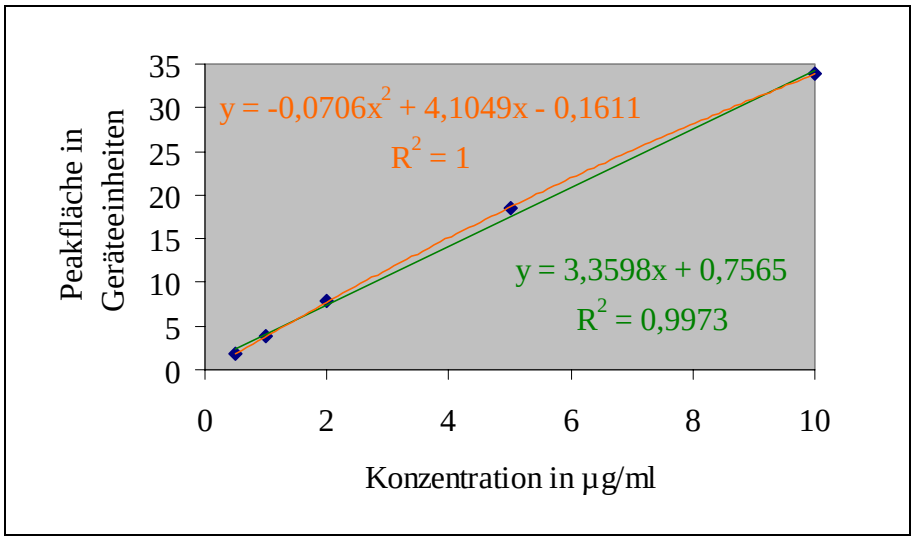


Abb. 55: Kalibrierkurve für Cholesterol-3-sulfat. LC/MS mit Negativ-Elektrospray-Ionisation. Grün sind Kurve, Gleichung und Bestimmtheitsmaß für lineare Anpassung, orange für eine Polynomfunktion 2. Grades dargestellt.

Die relative Standardabweichung (RSD, n=5) der einzelnen Kalibrierwerte lag zwischen 0,67 und 6 % (∅ 3%). Die Nachweisgrenze lag bei ca. 10 ng/ml. Eine weitere Optimierung ist u.U. möglich, war jedoch bislang nicht erforderlich. Die Methode erwies sich als gut geeignet, den Cholesterolsulfatgehalt in einer Lipidextraktfraktion zu bestimmen. Die Wiederfindungsrate für Cholesterolsulfat lag bei ca. 90 % (1,7 µg in 2 ml LC/MS-Probenlösung versus 1,9 µg in 100 µl Auftragelösung bei der AMD-HPTLC).
Im Negativionen-Modus wird, wie zu erwarten, das $[M-H]^-$-Ion bei m/z= 465 detektiert, das das Schwefelisotop ^{32}S enthält (ca. 95% natürliche Häufigkeit [102]). Daneben wird der ^{34}S entsprechende Isotopenpeak bei 467 amu detektiert.

Im MS/MS-Modus (siehe Abb. 56) ist zu vermuten, daß hauptsächlich die Sulfatgruppe unter Mitnahme der negativen Ladung abgespalten wird. Diese entzieht sich jedoch aus gerätetechnischen Gründen der Detektion (m/z= 96 liegt unterhalb des meßbaren Massenbereichs im MS/MS). Daneben finden jedoch weitere interessante Fragmentierungen statt, u.a. die Abspaltung einer Methylgruppe (vermutlich das anguläre C-19 an C-10) sowie die zusätzliche Abspaltung der Seitenkette an C-17. Die Intensität dieser Fragmentionen ist jedoch gering, so daß sich MS/MS zur Detektion in der HPLC in diesem Falle wenig eignet.

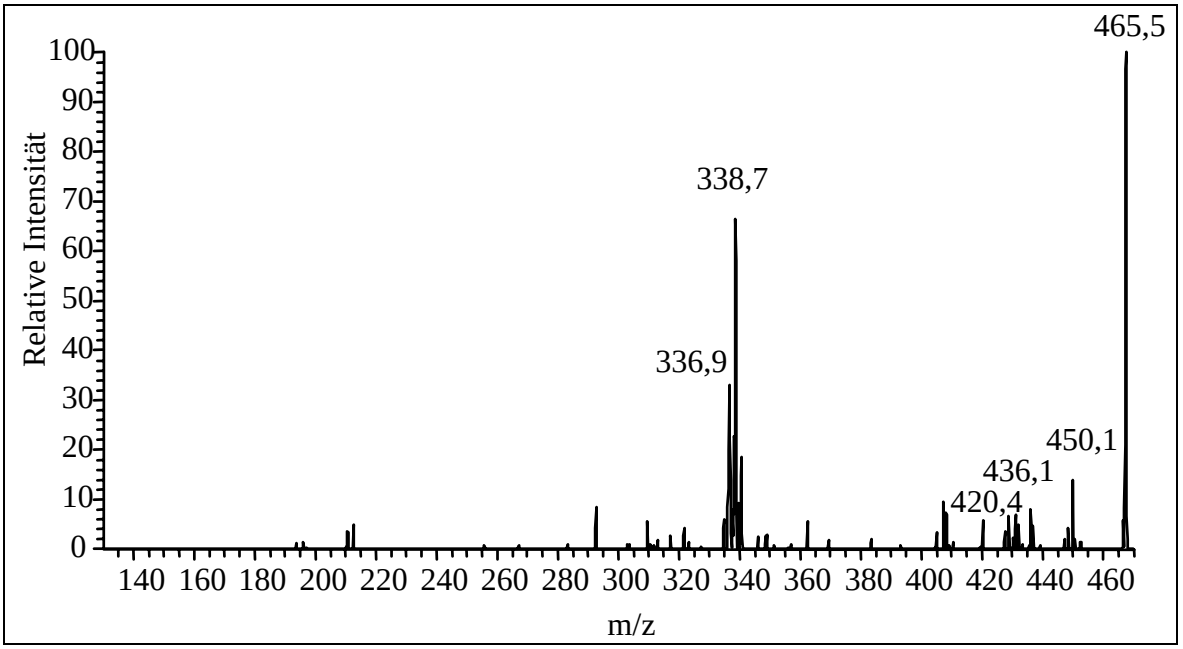


Abb. 56: Negativ-ESI-Tochterionenspektrum von Cholesterolsulfat.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den technologischen Fortschritt auf dem Gebiet der instrumentellen analytischen Chemie, insbesondere in der Massenspektrometrie und bei den Kopplungsverfahren LC/MS und CE/MS, auf die Analytik ausgewählter Lipide anzuwenden.

Insbesondere die Kopplung von Umkehrphasen-HPLC und ESI-MS ist als Routinemethode hervorragend geeignet, ein breites Spektrum von Analyten, die lediglich eine ausreichende Ionisierbarkeit im Positiv- oder Negativmodus aufweisen müssen, quantitativ auch in komplexer Matrix zu analysieren. Dabei hat die Chromatographie nicht länger die Aufgabe, eine möglichst vollständige Trennung zu bewerkstelligen, da die hohe Spezifität der Detektion dies meist überflüssig macht. Die Methodenoptimierung ist daher vorwiegend auf Schnelligkeit, Effizienz und Leistungsfähigkeit der Quantifizierung ausgerichtet.

Im Grundlagenteil wird eine kurze Übersicht über die Substanzklassen der Lipide gegeben, und die derzeit wichtigsten (insbesondere instrumentellen) analytischen Methoden werden genannt.

Die Elektrospray-Massenspektrometrie eignet sich vorzugsweise zur Analytik polarer Lipide. Diese sind oftmals nicht bzw. erst nach Derivatisierung unzersetzt verdampfbar. Somit ergänzt die ESI-MS in hervorragender Weise den Anwendungsbereich der klassischen Elektronenstoß-MS in der Lipidanalytik, wobei es auch ein großes Überschneidungsgebiet gibt. Die Tandem-Massenspektrometrie entfaltet ihr großes Potential v.a. bei komplexeren Lipidklassen wie Phospho- und Sphingolipiden. Hierbei ist die Möglichkeit der speziesspezifischen Quantifizierung auch bei sehr ähnlichen Substanzen hervorzuheben.

Bei Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten die Tochterionenspektren eine hervorragende Reproduzierbarkeit, und auch Spektrenvergleiche zwischen einem Ionenfallen- und einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ergaben prinzipielle Übereinstimmungen. Es ist also zu erwarten, daß sich in Zukunft, zumindest optional, standardisierte Algorithmen werden durchsetzen können.

Phospholipide sind eine Substanzklasse von überragender Bedeutung in der Biochemie. Die Variabilität von Kopfgruppe und Fettsäureketten hat eine Vielzahl von Verbindungen hervorgebracht. Das Spektrum der Phospholipidanalytik ist noch immer im Wachstum begriffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Nichtwäßrigen Kapillarelektrophorese mit massenspektrometrischer Detektion entwickelt. Dabei wurde eine ungewöhnliche Elektrolytlösung bestehend aus Acetonitril/Isopropanol/n-Hexan 57:38:5 sowie Essigsäure und Ammo-

niumacetat angewendet. Es gelang eine kopfgruppenspezifische Trennung von Phosphatidylcholinen, -ethanolaminen, -serinen und -glycerolen mit Detektion in der Negativ-Elektrospray-MS. Als derzeit einzige Möglichkeit, ohne größere Umbauten CE/MS zu betreiben, wurde das Sheath-Liquid-Interface, das durch konzentrische Zufuhr von Hilfsflüssigkeit gekennzeichnet ist, angewendet. Die Zusammensetzung der Hilfsflüssigkeit wurde optimiert mit dem Ziel einer möglichst geringen Flußrate. Diese Untersuchungen waren in erster Linie methodisch von Interesse, da sich sowohl die Nichtwäßrige Kapillarelektrophorese als auch die CE/MS-Kopplung noch im Anfangsstadium der Entwicklung befinden. Für eine quantitative, automatisierbare Routineanalytik waren die mit den derzeitigen apparativen Möglichkeiten erzielbaren Ergebnisse jedoch nicht befriedigend, insbesondere hinsichtlich Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit.

Daher wird alternativ eine LC/MS-Methode vorgestellt, die diesen Ansprüchen gerecht wird. Die Trennung erfolgt auf einer Umkehrphasen-HPLC-Säule vom Typ RP-8 mit einem isokratischen Laufmittelgemisch Methanol/10 mM Ammoniumacetat 90:10 bei einer Temperatur von 60 °C. Die Detektion erfolgte bei Phosphatidylcholinen und -ethanolaminen bevorzugt durch Positiv-, bei Phophatidylserinen bevorzugt im Negativ-ESI-MS; Phosphatidylglycerole nehmen eine Zwischenstellung ein. Bei der Quantifizierung lag die Nachweisgrenze im unteren ng/ml-Bereich. Die relative Standardabweichung war zwischen 3 und 5 %. Diese Methode wurde bewußt allgemein entwickelt, d.h., daß auf die Anwendbarkeit bei verschiedensten Phospholipiden Wert gelegt wurde. Dies wurde z.B. dadurch erreicht, daß die Trennung sowohl von der Kopfgruppe als auch von den Fettsäureresten beeinflußt wird. Diese Herangehensweise impliziert aber auch, daß zur Lösung spezieller analytischer Probleme evtl. Modifikationen vorzunehmen sind, die vorgestellte Methode also eine Art Gerüst darstellt.

Die Tandem-Massenspektrometrie ergab bei den Phospholipiden sowohl im Positiv- als auch im Negativ-Ionisationsmodus wichtige Strukturinformationen. Im Positivmodus wurden vorwiegend Abspaltungen an der Kopfgruppe beobachtet, besonders charakteristisch ist die Trimethylamin-Abspaltung ($\Delta m = 59$) bei Phosphatidylcholinen und Sphingomyelin. Daneben traten z.T. Fettsäureabspaltungen auf, wonach das Restmolekül detektiert wurde. Im Negativmodus sind hauptsächlich Informationen über die Acylreste erhältlich. Nach Abspaltung der Fettsäuren werden sowohl die Molekülreste als auch die Fettsäuren selbst detektiert. Interessant ist der Umstand, daß bei den Phosphatidylcholinen die Negativ-Fragmentierung erst dadurch ermöglicht wird, daß mittels zusätzlicher Kollisionsenergie die Ausbildung von Chloridaddukten unterdrückt wird.

Die Ceramide sind in den letzten Jahren sowohl als intrazelluläre Botenstoffe als auch als wichtigste Substanzklasse der Hautlipide immer mehr in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Sie zeigen ebenso wie die Phospholipide eine außerordentlich hohe strukturelle Variabilität, insbesondere wenn sie Strukturfunktionen erfüllen. Hintergrund der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war das Bestreben, die Ceramide des menschlichen Stratum corneum, die die Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut spielen, genauer untersuchen zu können. Die klassischen Analysenmethoden beschränken sich entweder auf die Quantifizierung von Fraktionen wie im Falle der Dünnschichtchromatographie oder auf die Bestimmung von Molekülbestandteilen (Gaschromatographie nach Hydrolyse). Eine speziesspezifische Analytik ist jedoch aus vielerlei Gründen wünschenswert und erforderlich. Daher wurde eine leistungsfähige LC/MS-Methode entwickelt. Eine Umkehrphasen-HPLC-Säule vom Typ RP-18 lieferte die für eine Trennung nach Kettenlängen erforderliche Selektivität. Um trotz der hohen Affinität der Ceramide zur stationären Phase eine schnelle Elution zu gewährleisten, wurde Methanol/Tetrahydrofuran 97:3 als isokratische mobile Phase eingesetzt. Die Ionisation der Ceramide kann sowohl im Positiv- als auch im Negativ-ESI-Modus erreicht werden. LC/MS-Untersuchungen wurden mit einem Quadrupol- sowie einem Ionenfallen-Massenspektrometer durchgeführt. Die besten Werte in der Quantifizierung wurden an der Ionenfalle im Negativ-ESI-Modus mit zusätzlicher Kollisionsenergie erreicht. Die Nachweisgrenzen lagen in diesem Falle bei 500 pg/ml bei einer relativen Standardabweichung knapp unter 3 %.

Die Tandem-Massenspektrometrie liefert auch bei den Ceramiden wichtige Strukturinformationen. Positiv-ESI-MS/MS ergibt neben Wasserabspaltungen jeweils drei bis vier typische Fragmente, die die langkettige Base charakterisieren. Im Negativ-ESI-MS/MS-Modus war es sogar möglich, unter optimierten und für alle untersuchten Ceramide praktisch gleichen Bedingungen Tochterionenspektren zu erzeugen, die neben Fragmenten, die durch Abspaltung kleiner Neutralteilchen gebildet werden, sowohl für die langkettige Base als auch für die amidartig gebundene Fettsäure charakteristische Fragmente zeigen. Ein solcher „Fingerabdruck“ eines Moleküls erlaubt eine schnelle Identifizierung, z.B. wenn die Methode bei der LC/MS als zusätzliche Detektion eingesetzt wird.

Als Alternative zur LC/MS wird eine GC/MS-Methode zur Ceramidanalytik vorgestellt. Moderne Kapillarsäulen ermöglichen eine sehr gute Trennung der Trimethylsilylderivate, auch bei nur geringen Unterschieden in der Kettenlänge. Elektronenstoß-Spektren erlauben die eindeutige Identifizierung der Ceramide. Die Notwendigkeit der Derivatisierung verbunden mit einer hohen Belastung der GC-Säule durch hohe Temperatur und überschüssiges Derivatisierungsmittel läßt die Methode jedoch gegenüber der LC/MS etwas in den Hintergrund

treten. Allerdings erreicht letztere eine vergleichbare Spezifität nur durch die Tandem-MS, d.h. ein Ionenfallen- oder Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ist erforderlich.
Ein großer Vorteil der Ionenfalle besteht darin, daß sie im Full Scan ähnliche Empfindlichkeiten erreicht wie im Selected Ion Monitoring. Dadurch kann bei einem Gemisch, welches unbekannte Substanzen enthält, zunächst der gesamte in Frage kommende Massenbereich analysiert werden und nachträglich jeder beliebige Massenbereich selektiert werden, z.B. anhand der abrufbaren Massenspektren.
Um die Ceramide in menschlichem Stratum corneum zu analysieren, wurde zunächst ein Lipidextrakt hergestellt und mit Hilfe einer semipräparativen Methode der Hochleistungsdünnschichtchromatographie mit automatischer Mehrfachentwicklung fraktioniert. Da auf einer Kieselgelplatte die Ceramide hinsichtlich Zahl und Stellung der Hydroxygruppen, nicht aber nach Kettenlängen getrennt werden, resultiert eine Auftrennung in Fraktionen, die bestimmten Grundstrukturen zugeordnet werden können. Die Fraktionen wurden durch Abkratzen von der Platte gewonnen, reextrahiert und ohne weitere Probenvorbereitung der LC/MS zugeführt. In den Fraktionen von Ceramid 2, 3, 4 und 6 wurden im wesentlichen die nach Kombination der in der Literatur beschriebenen Fettsäuren und langkettigen Basen zu erwartenden Spezies gefunden. Ceramid 1 konnte mangels Vergleichssubstanz nicht identifiziert werden, wohingegen das erst relativ spät entdeckte Ceramid 7 in der Ceramid-6-Fraktion gefunden wurde. Eine Quantifizierung der Gesamtceramide und anderer Lipidklassen ist durch densitometrische Auswertung nach Detektion der Dünnschichtplatten möglich. Angaben zum Anteil der einzelnen Ceramidklassen finden sich in der Literatur. Eine Absolutquantifizierung der einzelnen Ceramidspezies bei der LC/MS ist wegen der Komplexität der Probenvorbereitung und Matrixeffekten nicht ganz einfach. Als interner Kontrollstandard wurde das nicht natürlich vorkommende N-Hexanoyl-sphingosin eingesetzt. Um die Probenvorbereitung (Extraktion, Dünnschichtchromatographie, Fraktionspräparation) zu kontrollieren, wurde Cholesterolsulfat mit Hilfe einer neuentwickelten LC/MS-Methode quantifiziert und eine Wiederfindungsrate von nahezu 90 % ermittelt. Sehr zuverlässig lassen sich für die einzelnen Fraktionen relative Häufigkeitsverteilungen angeben. Dabei zeigen sich durchaus Abweichungen von der Gaußschen Normalverteilung, z.B. hinsichtlich der Kettenlänge und bezüglich des Vorkommens von Doppelbindungen insbesondere in den langkettigen Basen. Um Homologe mit gleichem Molekulargewicht und nicht ausreichend verschiedenem Retentionsverhalten getrennt quantifizieren zu können, muß die LC/MS/MS eingesetzt werden. Ein Beispiel hierfür ist angeführt. Eine erschöpfende Bearbeitung dieser Aufgabe für sämtliche der weit über tausend möglichen Spezies hätte den Rahmen gesprengt. Es erscheint sinnvoller, zunächst Hautlipidproben ver-

schiedener Provenienz mittels LC/MS zu untersuchen und nach Sichtung der Häufigkeitsverteilung und der Tandem-Massenspektren gezielt nach eventuellen Abweichungen zu suchen.
Möglichkeiten zur Verbesserung bestehen bei der Fraktionentrennung in der Dünnschichtchromatographie. Allerdings würde ein zusätzlicher Trennschritt, z.B. eine Vortrennung von polaren und Neutrallipiden, den Aufwand und die Substanzverluste erhöhen. Die Kombination von HPTLC und LC/MS kann in Zukunft zur vergleichenden Untersuchung der Lipidextrakte von verschiedenen Hautarealen sowie von gesunder und kranker Haut eingesetzt werden. Denkbar ist auch, daß topisch applizierte Ceramide im Rahmen von Penetrationsstudien in Extrakten von verschiedenen Hautschichten zu quantifizieren sind. Den Anlaß dazu liefern Berichte über Veränderungen des Ceramidmusters bei verschiedenen Krankheitszuständen sowie der zunehmende Einsatz von Ceramiden in Produkten der kosmetischen Industrie.

6 Literaturverzeichnis

[1] Abidi, S.L., Mounts, T.L., Rennick, K.A.; *J. Chromatogr.* 639 (2) (1993), 175-184.

[2] Abidi, S.L., Mounts, T.L.; *J. Chromatogr.* 741 (2) (1996), 213-222.

[3] Ansari, M.N.A., Nicolaides, N., Fu, H.C.; *Lipids* 5 (10/1970), 838- 845.

[4] Asiaie, R., Huang, X., Farnan, D., Horvath, C; *J. Chromatogr. A* 806 (1998), 251-263.

[5] Banks, F.J.; *Electrophoresis* 18 (1997), 2255-2266.

[6] Bäuml-Just, K.; Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle, Institut f. Pharmazeutische Chemie, 1998.

[7] Beale, S. C.; *Anal. Chem.* 70 (1998), 279R-300R.

[8] Bligh, E.G., Dyer, W.J.; *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959), 911-917.

[9] Bouwstra, J.A., Cheng, K., Gooris, G.S., Weerheim, A.M., Ponec, M.; *Biochim. Biophys. Acta* 1300 (1996), 177-186.

[10] Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Dubbelaar, F.E., Weerheim, A.M., Ijzerman, A.P., Ponec, M.; *J. Lipid Res.* 39 (1/1998), 186-196.

[11] Brudel, M.; Präsentation der aQa-Quelle, Seminar der Fa. ThermoQuest, Potsdam 9.9.1998.

[12] Burlingame, A.L., Boyd, R.K., Gaskell, S.J.; *Anal. Chem.* 66 (1994), 634R-683R.

[13] Cai, J., Henion, J.; *J. Chromatography A* 703 (1995), 667-692.

[14] Careri, M., Dieci, M., Mangia, A., Manini, P., Raffaelli, A.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (6/1996), 707-714.

[15] Casparrini, G., Horning, E.C., Horning, M.G.; *Chem. Phys. Lipids* 3 (1969) 1-10.

[16] Cole, R.B. (Hrsg.); Electrospray Ionization Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, New York 1997.

[17] Conti, A., Rogers, J., Verdejo, P., Harding, C.R., Rawlings, A.V.; *Int. J. Cosmet. Sci.* 18 (1996), 1-12.

[18] Cosmoferm B.V. (Delft, Niederlande); Technical Product Information Ceramide III, IIIb, VI. 1997.

[19] Couch, L.H., Churchwell,, M.I., Doerge, D.R., Tolleson, W.H., Howard, P.C.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997), 504-512.

[20] De Paepe, K., Roseeuw, D., Rogiers, V.; *Cosmetic World Journal* (1998), http://www.cosmetic-register.com/cwjournal/798 , 1-4.

[21] Dittmann, M.M., Wienand, K., Bek, F., Rozing, G.P.; *LC-GC* 13 (10/1995), 800-814.

[22] Dorsey, J. G., Cooper, W. T., Siles, B. A., Foley, J. P., Barth, H. G.; *Anal. Chem.* 70 (1998), 591R-644R.

[23] Downing, D.T., Stewart, M.E., Wertz, P.W., Colton, S.W., Strauss, J.S.; *Comp. Biochem. Physiol.* 76B (4/1983), 673-678.

[24] Dulay, M.T., Yan, C., Rakestraw, D.J., Zare, R.N.; *J. Chromatogr. A* 725 (1996), 361-366.

[25] Eckerskorn, C.; Massenspektrometrie. In: Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.); Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin 1998, 323-368.

[26] Elias, P.M.; *J. Invest. Dermatol.* 80 (1983), 44-49.

[27] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T.; Kapillarelektrophorese-Methoden und Möglichkeiten. Vieweg-Verlag Braunschweig/Wiesbaden 1994.

[28] Eppert, G.J.; Flüssigchromatographie.Vieweg-Verlag Braunschweig/Wiesbaden 1997.

[29] Erim, F.B., Xu, X., Kraak, J.C.; *J. Chromatogr. A* 694 (1995), 471-479.

[30] Fang, L., Zhang, R., Zare, R.N.; 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and allied Topics, San Francisco, CA, 1993.

[31] Farin, F., Lambers, H., Keuning, W., Van der Wilden, W.; *Cosmetics Toiletries* 3 (1995), 126-132.

[32] Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.; *J. Biol. Chem.* 226 (1957), 497-509.

[33] Gale, D.C., Smith, R.D.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7 (1993), 1017-1021.

[34] Gaver, R.C., Sweeley, C.C.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42 (1965), 294-298.

[35] Gildenast, T., Lasch, J.; *Biochim. Biophys. Acta* 1346(1) (1997), 69-74.

[36] Gray, G.M., Yardley, H.J.; *J. Lipid Res.* 16 (1975), 434-440.

[37] Gray, G.M., White, R.J.; *J. Invest. Dermatol.* 70 (1978), 336-341.

[38] Gu, M., Kerwin, J.L., Watts, J.D., Aebersold, R.; *Anal. Biochem.* 244 (1997), 347-356.

[39] Gutnikov, G., Beck, W., Engelhardt, H.; *J. Microcol. Sep.* 6 (1994), 565-570.

[40] Hannun, Y.A., Obeid, M.L., Wolff, R.A.; *Advances in Lipid Research* 25 (1993), 43-64.

[41] Hayashi, A., Matsubara, T., Morita, M.; *Iyo Masu Kenkyukai Koenshu* 13 (1988), 65.

[42] Heiger, D.N.; High Performance Capillary Electrophoresis - An introduction. Hewlett Packard GmbH Waldbronn 1992, Publ. No. 12-5091-6199E.

[43] Heinig, K., Hissner, F., Martin, S., Vogt, C.; *International Laboratory* 28 (6/1998), 9-12, 37-40.

[44] Hjertén, S.; *Arkiv Kemi* 13 (1958), 151-157.

[45] Hollmann, J., Melnik, B.C., Lee, M.-S., Hofmann, U., Plewig, G.; *Hautarzt* 42 (1991), 302-306.

[46] Horning, M.G., Murakami, S., Horning, E.C.; *Am. J. Clin. Nutr.* 24 (1971), 1086-1096.

[47] Huang, R.T.C.; *Hoppe-Seyler´s Z. Physiol. Chem.* 352 (1971), 1306-1308.

[48] Hübschmann, H.-J.; Handbuch der GC/MS. VCH, Weinheim 1996.

[49] Hussler, G., Kaba, G., Francois, A.M., Saint-Leger, D.; *Int. J. Cosmetic Sci.* 17 (1995), 197-206.

[50] Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M., Hidano, A.; *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991), 523-526.

[51] Imokawa, G., Akasaki, S., Kawamata, A., Yano, S., Takaishi, N.; *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40 (1989), 273-285.

[52] Ingvardsen, L., Michaelsen, S., Sørensen, H.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (2/1994), 183-188.

[53] Iribarne, J.V., Thomson, B.A.; *J. Chem. Phys.* 64 (1976), 2287-2292.

[54] Jass, H.E., Elias, P.M.; *Cosmetics Toiletries* 106 (1991) 47-53.

[55] Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D.; *Anal. Chem.* 53 (1981),1298-1302.

[56] Karlson, P.; Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 13. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York 1988.

[57] Karlsson, A.Å., Michelsen, P., Larsen, Å., Odham, G.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996), 775-780.

[58] Kebarle, P., Tang, L.; *Anal. Chem.* 65 (1993), 972A-986A.

[59] Kellner, R.; Chromatographische Trennmethoden. In: Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.); Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin 1998, 195-215.

[60] Kerwin, J.L.; In: Snyder, A.P. (Hrsg.); Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *ACS Symposium Series* 619 (1995), 244-266.

[61] Kerwin, J.L., Tuininga, A.R., Ericsson, L.H.; *J. Lipid Res.* 35 (1995), 1102.

[62] Kerwin, J.L., Wiens, A.M., Ericsson, L.H.; *J. Mass Spectrom.* 31 (2/1996), 184-192.

[63] Kim, H.-Y., Wang, T.-C.L., Ma, Y.C.; *Anal. Chem.* 66 (22/1994), 3977-3982.

[64] Koezuka, K., Ozaki, H., Matsubara, N., Terabe, S.; *J. Chromatogr. B* 689(1) (1997), 113-133.

[65] Krivit, W., Hammarström, S.; *J. Lipid Res.* 13 (1972), 525-530.

[66] Kromidas, S.; HPLC-Tips, Band I. Hoppenstedt, Darmstadt 1997.

[67] Kühn, H.; Lipidanalytik. In: Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.); Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin 1998, 537-568.

[68] Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J.A., Williams, M.L., Brown, B.E., Roitman, E., Elias, P.M.; *J. Lipid Res.* 24 (1983) 121-129.

[69] Lavrijsen, A.P.M., Higounenc, I.M., Weerheim, A., Oestmann, E., Tuinenburg, E.E., Boddé, H.E., Ponec, M.; *Arch. Dermatol. Res.* 286 (1994), 495-503.

[70] Lehmann, W.D.; Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin 1996.

[71] Lima, L.R., Synovec, R.E.; *Talanta* 41 (4/1994), 581-588.

[72] Lintner, K., Mondon, P., Girard, F., Gibaud, C.; *Int. J. Cosmetic Sci.* 19 (1/1997), 15-25.

[73] Long, S.A., Wertz, P.W., Strauss, J.S., Downing, D.T.; *Arch. Dermatol. Res.* 277 (1985), 284-287.

[74] Mano, N., Oda, Y., Yamada, K., Asakawa, N., Katayama, K.; *Anal. Biochem.* 244 (1997), 291-300.

[75] Mao-Qiang, M., Feingold, K.R., Thornfeldt, C.R., Elias, P.M.; *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996), 1096-1101.

[76] Mathias,M., Kolesnick, R.; *Advances in Lipid Research* 25 (1993), 65-90.

[77] Mc Howat, J., Jones, J.H., Creer, M.H.; *J. Lipid Res.* 37 (11/1996), 2450-2460.

[78] Melnik, B.C., Hollmann, J., Erler, E., Verhoeven, B., Plewig, G.; *J. Invest. Dermatol.* 92 (1989), 231-234.

[79] Miller, J.L., Khaledi, M.G.; *High Performance Capillary Electrophoresis* 146 (1998), 525-555.

[80] Moseley, M.A., Jorgenson, J.W., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Tomer, K.B.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 3 (1992), 289-300.

[81] Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., Ghidoni, R.; *Biochim. Biophys. Acta* 1182 (1993), 147-151.

[82] Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Mellesi, L., Ghidoni, R., Caputo, R.; *Arch. Dermatol.* 130 (1994), 452-456.

[83] Mukherjee, K.D., Weber, N. (Hrsg.); Handbook of Chromatography, Analysis of Lipids. CRC Press, Boca Raton 1993.

[84] Murphy, R.C.; Mass Spectrometry of Lipids. In: The Handbook of Lipid Research, Vol. 7, Plenum Press, New York 1993.

[85] Neubert, R., Raith, K., Raudenkolb, S.; Wartewig, S.; *Anal. Commun.* 35 (1998), 161-164.

[86] Neubert, R., Schmalfuß, U., Huschka, C., Wohlrab, W.A.; *Pharm. Ind.* 60 (1998), 149-156.

[87] Neubert, R., Wohlrab, W., Lasch, J.; DFG, SFB 197, TP A8, Finanzierungsantrag 1999-2001, 113-133.

[88] Niessen, W.M.A., van der Greef, J.; Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Marcel Dekker, New York 1992.

[89] Niessen, W.M.A., Tjaden, U.R., van der Greef, J.; *J. Chromatogr.* 636 (1993), 3-19.

[90] Norlén, L., Nicander, I., Lundsjö, A., Cronholm, T., Forslind, B.; *Arch. Dermatol. Res.* 290 (1998), 508-516.

[91] Nuhn, P.; Naturstoffchemie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2. Auflage 1990.

[92] Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R., Smith, R.D.; *Anal. Chem.* 59 (1987), 1230-1232.

[93] Olsson, N.U., Salem, N. Jr.; *J. Chromatogr. B* 692(2) (1997), 245-256.

[94] Pleasance, S., Thibault, P.; In: Capillary Electrophoresis: Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton 1993, 311-369.

[95] Ponec, M., Weerheim, A.; In: Packer, L. (Hrsg.); Methods in Enzymology 190 (1990), 30-41.

[96] Previati, M., Bertolaso, L., Tramarin, M., Bertagnolo, V., Capitani, S.; *Anal. Biochem.* 233 (1996), 108-114.

[97] Raith, K., Schiewe, J., Neubert, R.; *Pharmazie* 52 (3/1997) 212-215.

[98] Raith, K., Wolf, R., Wagner, J., Neubert, R.; *J. Chromatogr. A* 802 (1998), 185-188.

[99] Raith, K., Neubert, R.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (14/1998), 935-938.

[100] Raith, K., Althoff, E., Banse, J., Neidhardt, H., Neubert, R.; *Electrophoresis* 19 (1998), 2907-2911.

[101] Raith, K., Neubert, R.; eingereicht bei *Anal. Chem.*.

[102] Rauscher, K., Voigt, J., Wilke, I., Wilke, K.-T.; Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 8. Auflage, Leipzig 1986.

[103] Robson, K.J., Stewart, M.E., Michelsen, S., Lazo, N.D., Downing, D.T.; *J. Lipid Res.* 35 (1994), 2060-2068.

[104] Röder, W.; Macherey-Nagel Applikationsservice (Oensingen, Schweiz), persönliche Mitteilung, 19.05.1998.

[105] Roldan-Assad, R., Gareil, P.; *J. Chromatogr. A* 708 (1995), 339-350.

[106] Sahota, R.S., Khaledi, M.G.; *Anal. Chem.* 66 (1994), 1141.

[107] Sakairi, M., Kato, Y.; *J. Chromatogr. A* 794 (1998), 391-406.

[108] Samuelsson, K., Samuelsson, B.; *Chem. Phys. Lipids* 5 (1970) 44-79.

[109] Samuelsson, B., Samuelsson, K.; *Biochim. Biophys.Acta* 164 (1968), 121.

[110] Schaefer, H., Redelmeier, T.E; Skin barrier. Karger, Basel 1996.

[111] Schmelzeisen-Redeker, G., Buttering, L., Röllgen, F.W.; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 90 (1989), 139-150.

[112] Schneider, I.-M., Wohlrab, W.A., Neubert, R.; *Hautarzt* 48 (5/1997), 303-310.

[113] Schwarz, M.A., Raith, K., Rüttinger, H.-H., Dongowski, G., Neubert, R.; *J. Chromatogr. A*, 781 (1997), 377-389.

[114] Schwarz, M.A., Raith, K., Dongowski, G., Neubert, R.; *J. Chromatogr. A*, 809 (1998), 219-229.

[115] Schwarz, M.A., Raith, K., Neubert, R.; *Electrophoresis* 19 (1998), 2145-2150.

[116] Schwedt, G.; Analytische Chemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York 1995.

[117] Schwer, C.; Kapillarelektrophorese. In: Lottspeich, F., Zorbas, H. (Hrsg.); Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin 1998, 253-284.

[118] Sederma GmbH (Nettetal); Analysenzertifikat Ceramid 2, 14.11.1996.

[119] Siethoff, C., Nigge, W., Linscheid, M.; *Anal. Chem.* 70 (1998), 1357-1361.

[120] Snada, S., Uchida, Y., Anraku, Y., Izawa, A., Iwamori, M., Nagai, Y.; *J. Chromatogr. A* 400 (1987), 223-231.

[121] Taylor, G.W., Rendell, N.B.; *Current Opinion in Lipidology* 2 (1991), 385-391.

[122] Tsambaos, D., Kalofoutis, A., Stratigos, J., Miras, C., Capetanakis, J.; *Br. J. Dermatol.* 97 (1977), 135-138.

[123] Therond, P., Couturier, M., Demelier, J.F., Lemonnier, F.; *Lipids* 28 (3/1993), 245-249.

[124] Thompson, T.J., Foret, F., Karger, B.L., Vouros, P.; 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and allied Topics, Chicago, IL, 1994.

[125] Unger, K.K., Weber, E. (Hrsg.); Handbuch der HPLC, Teil I. GIT Verlag, Darmstadt 1995.

[126] Valko, I.E., Siren, H., Riekkola, M.L.; *LC-GC* 15 (6/1997), 560.

[127] Vogel, M., Kibat, P.-G.; *PZ Prisma* 5 (1/1998), 57-67.

[128] Voyksner, R., Price, P., Bartmess, J., Little, J., Wang-Iverson, D.; ASMS Terms and Definitions. http://www.asms.org/TermsDefsPoster.html, 1-13.

[129] Wahl, J.H., Smith, R.D.; *J. Cap. Electrophoresis* 1 (1994), 62-71.

[130] Wakefield, M., Lopez, L., Burhman, D., Newton, J., Folk, B., Burton, R.; Application Report # 258 (1996), Finnigan Corporation (San Jose, CA, USA).

[131] Wertz, P.W., Downing, D.T.; *J. Lipid Res.* 24 (1983), 759-765.

[132] Wertz, P.W., Miethke, M.C., Long, S.A., Strauss, J.S., Downing, D.T.; *J. Invest. Dermatol.* 84 (1985), 410-412.

[133] Wertz, P.W., Downing, D.T.; Epidermal Lipids. In: Goldsmith, L.A. (Hrsg.): Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin. Oxford University Press, 2. Aufl. 1991, 205-235.

[134] Wertz, P.W., Downing, D.T.; *Lipids* 23 (5/1988), 415-418.

[135] Wertz, P.W., Downing, D.T.; *Science* 217 (1982), 1261-1262.

[136] Wertz, P.W., Downing, D.T.; *J. Invest. Dermatol.* 94 (1990), 159-161.

[137] Wertz, P.W., van den Bergh, B.; *Chem. Phys. Lipids* 91 (1998), 85-96.

[138] Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B.; *Anal. Chem.* 57 (1985), 675-679.

[139] Willoughby, R., Sheehan, E., Mitrovich, S.; A Global View of LC/MS. Global View Publishing, Pittsburgh, PA 1998.

[140] Wilm, M.S., Mann, M.; *Anal. Chem.* 68 (1996), 1.

[141] Wolf, R., Raith, K., Neubert R.; *J. Chromatogr. A* 766 (1997), 71-75.

[142] Wolf, R., Huschka, C., Raith, K., Wohlrab, W., Neubert, R.; *Anal. Commun.* 11 (1997), 335-337.

[143] Wolf, R., Huschka, C., Raith, K., Wohlrab, W., Neubert, R.; *J. Liq. Chromatogr.*, im Druck.

[144] Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M., Sato, Y.; *Arch. Dermatol. Res.* 283 (1991), 219-223.

[145] Yamashita, M., Fenn, J.B.; *J. Phys. Chem.* 88 (1984), 4451-4459.

[146] Yardley, H.J., Summerley, R.; *Pharmacol. Ther.* 13 (1981), 357-383.

[147] Yergey, A.L., Edmonds, C.G., Lewis, I.A.-S., Vestal, M.L.; Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Plenum Press, New York 1990.

[148] Zeleny, J.; *Phys. Rev.* 10 (1917), 1-6.

[149] Zellmer, S., Lasch, J.; *J. Chromatogr. B* 691 (1997), 321-329.

[150] Zellmer, S.; persönliche Mitteilung, 26.02.1998.

[151] Video-Animation Ionenfalle. http://www.finnigan.com/newfeatures/animation.html.

Lebenslauf

Persönliches:	
Name:	Klaus Raith
geboren:	am 09.03.1971 in Sömmerda (Thüringen)
Familienstand:	verheiratet (seit 16.08.1997)
Ehefrau:	Silke Raith, geb. Adomeit, 16.07.1970, Apothekerin
Eltern:	Mutter: Dr.med. Sigrid Raith, geb.Thiem, 12.04.1945, Fachärztin für Innere Medizin
	Vater: Dr.med. Ludwig Raith, geb. am 23.08.1943, Facharzt für Hautkrankheiten
Werdegang:	
Grundschule:	1977-1987 Pestalozzi-Oberschule in Sömmerda
Gymnasium:	1987-1989 EOS „Ernst Schneller“ Sömmerda
	Juni 1989 Reifeprüfung (Abitur) „mit Auszeichnung“ bestanden
Wehrdienst:	September 1989 - April 1990 Grundwehrdienst als Funker in der Nationalen Volksarmee der DDR in Mühlhausen (Thür.)
Zivildienst:	Mai - August 1990 in der Stadt-Apotheke Buttstädt (Thür.)
Studium:	1990-1994 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	September 1992 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
	August 1994 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Diplom:	Oktober 1994 - März 1995 Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut f. Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie zum Thema „Trennung von Fettsäuren des Stratum Corneum durch Kapillarzonenelektrophorese“
	Verteidigung am 12.04.1995 (Prädikat „sehr gut“)
Pharmaziepraktikum:	April - September 1995 Neue Apotheke in Sömmerda
Staatsexamen:	12.10.1995 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
	Gesamtnote „sehr gut“
Approbation:	30.10.1995 Erteilung der Approbation als Apotheker
Promotion:	seit Oktober 1995 Doktorand am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie bei Prof. Dr. R. Neubert
	Oktober 1995-März 1998 Stipendiat der Landesgraduierten-förderung des Landes Sachsen-Anhalt

.....

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 (2) b) der Promotionsordnung der Fakultät, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

.....

Klaus Raith