

4 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Teil werden die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Analysemethoden 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. MSⁿ-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 Analysemethoden 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 MSⁿ-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. Ingvarsdson 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.

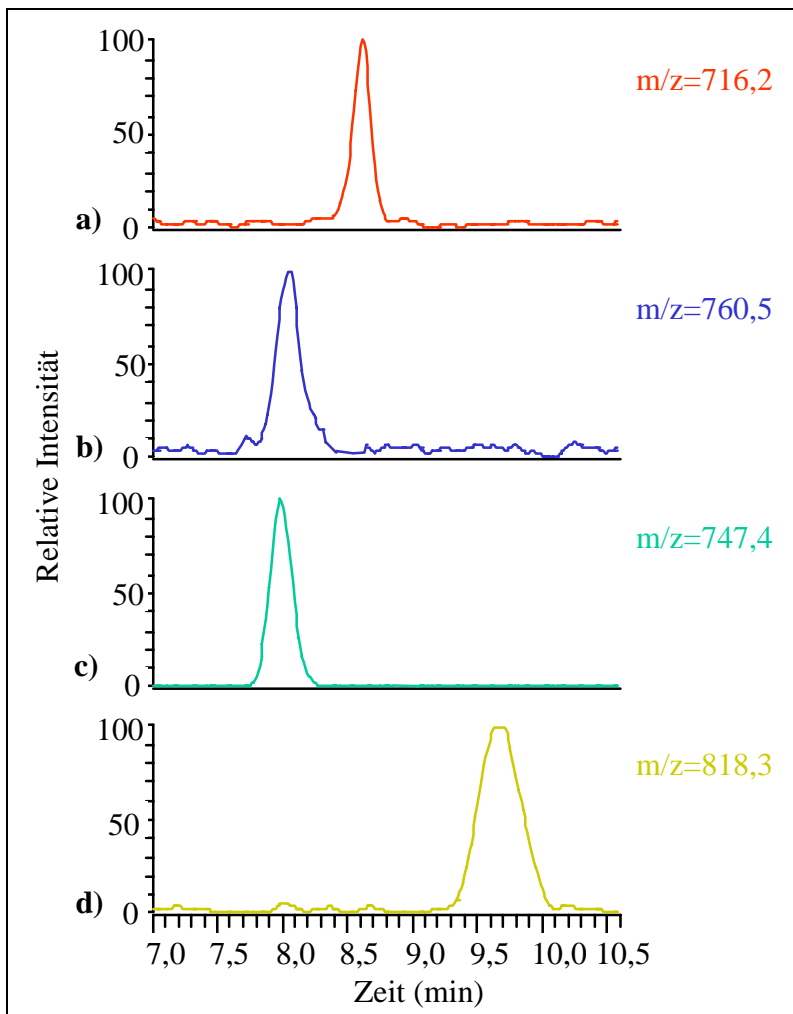


Abb. 17: CE/MS-Elektropherogramm. a) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamin (POPE), b) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylserin (POPS), c) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol, (POPG) d) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (POPC).

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

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.

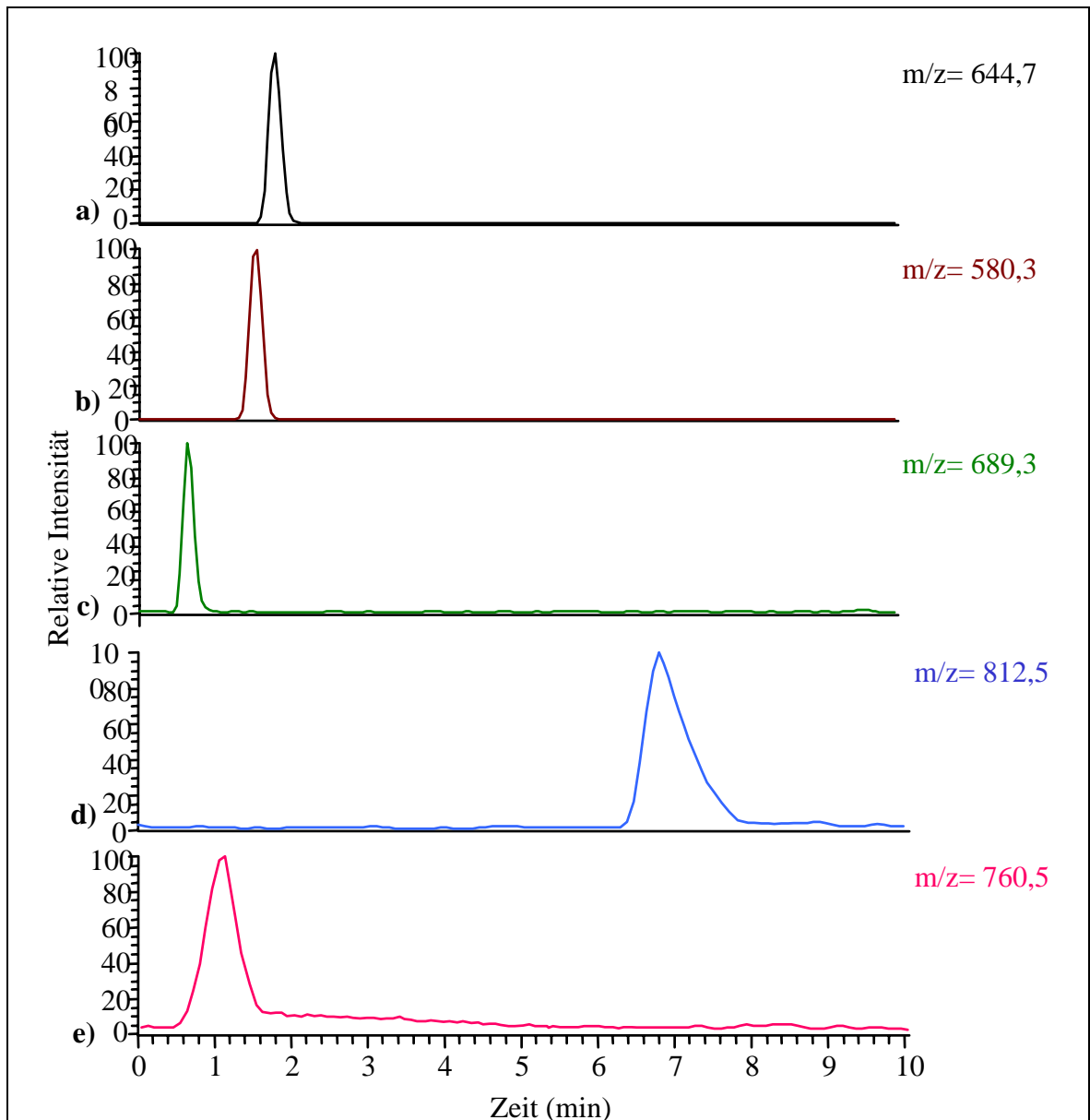


Abb. 18: LC/MS von Phospholipiden. a) Dilauroyl-phosphatidylcholin ($[M+Na]^+$), b) Dilauroyl-phosphatidylethanolamin ($[M+H]^+$), c) Dimyristoyl-phosphatidylglycerol ($[M+H]^+$), d) Distearoyl-phosphatidylcholin ($[M+Na]^+$), e) 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin ($[M+H]^+$).

Unter diesen Bedingungen zeigen Phospholipide mit länger-kettigen 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. MSⁿ (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.

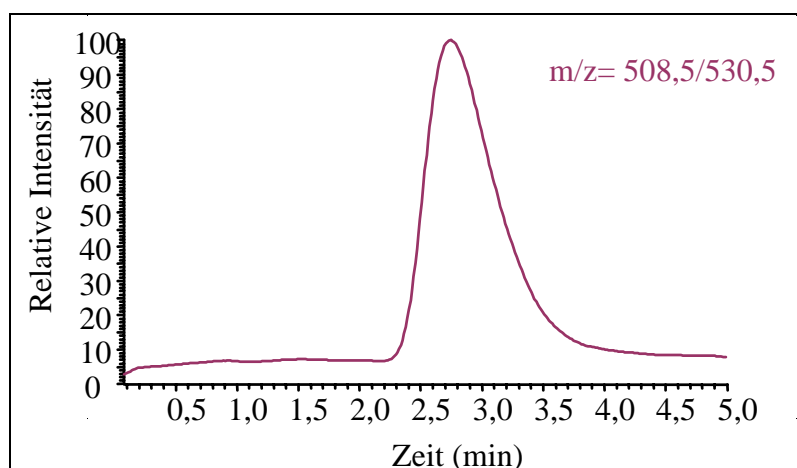


Abb. 19: LC/MS von 22-Hydroxydocosyl-phosphatidylcholin (Erläuterungen siehe Text).

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 Molekülonen 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 Fragmentationen (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 Fragmentationen 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 ($\Delta m = 59$). Bei den Phosphatidylcholinen wurden darüber hinaus Fragmente detektiert, die auf die Abspaltung von Fettsäuren schließen lassen (z.B. $\Delta m = 256$ im Falle von Palmitinsäure, $\Delta m = 282$ bei Ölsäure). Bei den Phosphatidylserinen findet

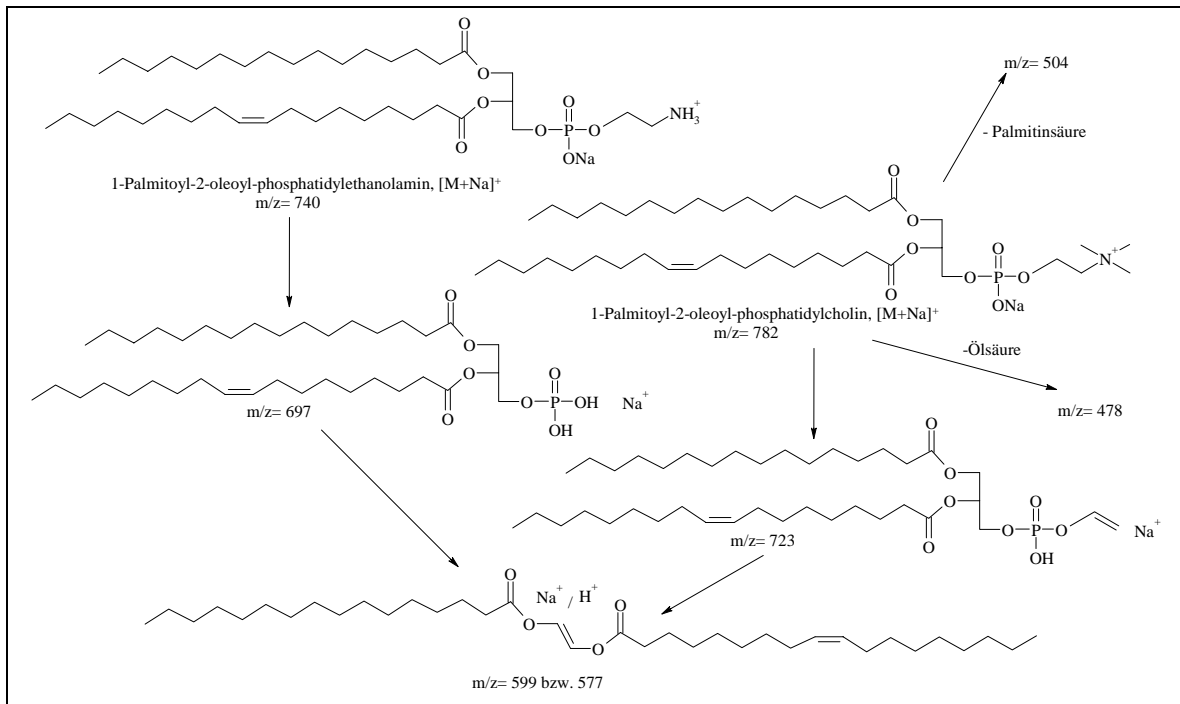


Abb. 20: Fragmentierungsschema von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamin und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin. Positiv-ESI-MS/MS bzw. MS^3 . Erläuterungen im Text.

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

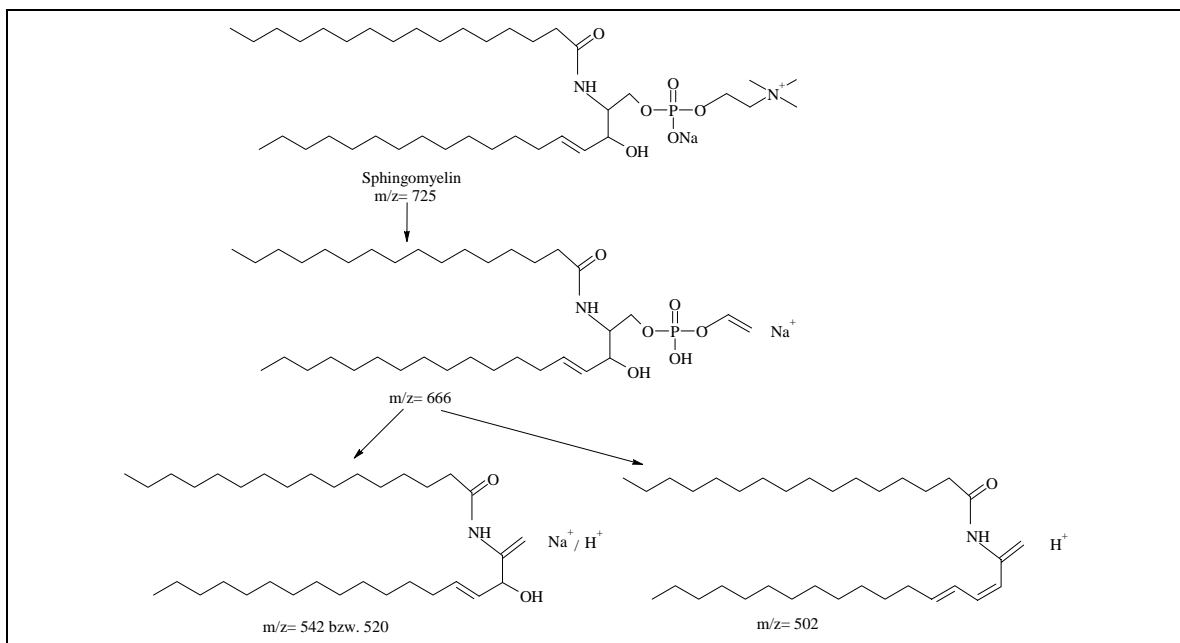


Abb. 21: Fragmentierungsschema von Sphingomyelin (aus Eigelb, Avanti Polar Lipids). Positiv-ESI-MS/MS bzw. MS^3 . Erläuterungen im Text.

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 quaternären 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 quaternären 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 quaternären Ammonium ein ungeladenes tertiäres Amin macht. Die resultierenden $[M-CH_3]^-$ Ionen tragen am Phosphat die negative Ladung.

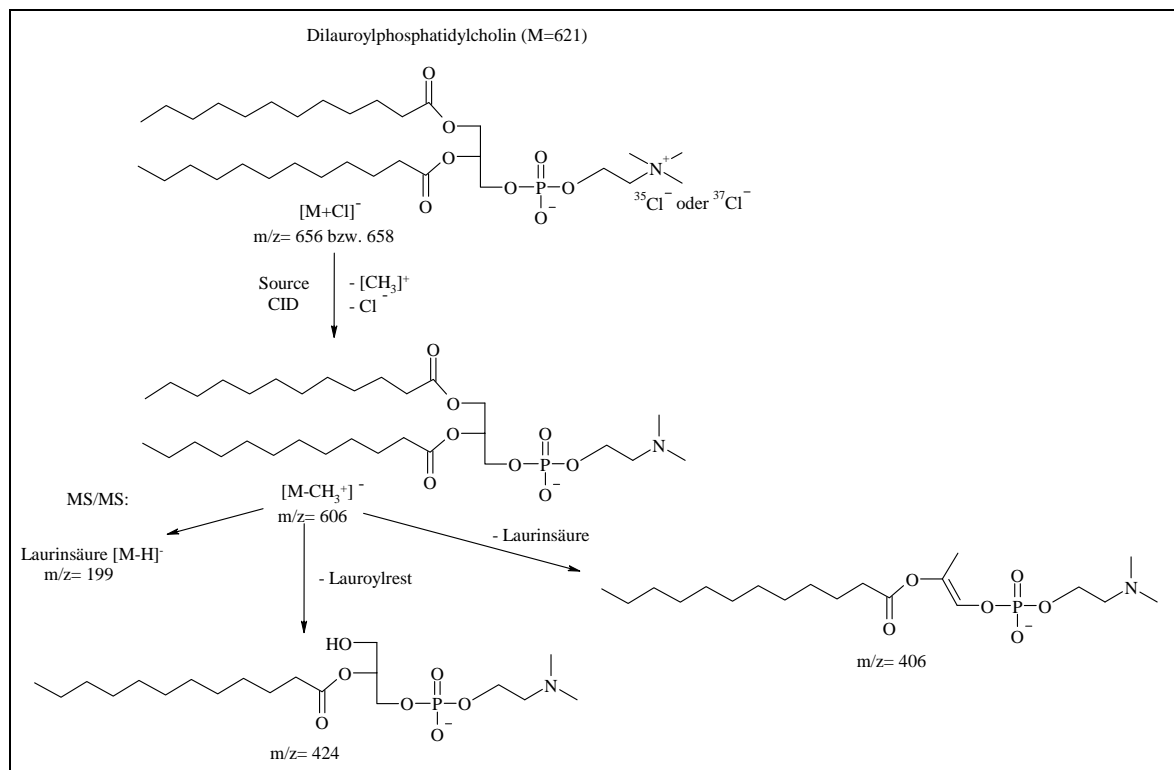


Abb. 22: Fragmentierungsschema von Dilauroyl-phosphatidylcholin bei Negativ-ESI-MS/MS.

Die $[M-H]^-$ -Ionen von Phosphatidylethanolaminen und Phosphatidylglycerolen ergeben ebenso wie die $[M-CH_3]^-$ -Ionen der Phosphatidylcholine im Tochterionenspektrum **Fettsäureabspaltungen** (z.B. $\Delta m = 256$ im Falle von Palmitinsäure, $\Delta m = 282$ 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-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 ($\Delta m = 43$ bei Phosphatidylethanolaminen, $\Delta m = 74$ bei -glycerolen, $\Delta m = 87$ 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	$[M\text{-Ölsäure}]^+$	478			
	$[M\text{-Palmitinsäure}]^+$	504			
	$[M\text{-N(CH}_3)_3]^+$	723			
	$[M\text{-Kopfgruppe}]^+$		697		719
	$[M\text{-Kopfgr.-Ölsre.}]^+$				437
	$[M\text{-Kopfgr.-Palmitinsre.}]^+$				463
pos. MS ³	$[M\text{-Kopfgr-Phosphat}]^+$	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	$[M\text{-Ölsäure}]^-$	463	452	465	
	$[M\text{-Palmitinsäure}]^-$	489	478	491	
	Ölsäure	281	281	281	281
	Palmitinsäure	255	255	255	255
	$[M\text{-Kopfgruppe}]^-$		673	673	673
neg. MS ³	$[M\text{-Kopfgr.-Ölsäure}]^-$		391	391	391
	$[M\text{-Kopfgr.-Palmitinsre.}]^-$		417	417	417
neg. MS ⁴	$[M\text{-Kopfgr.-Ölsäure-Palmitinsäure}]^-$		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-Stearyl-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, wengleich 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 stationären 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. Semi-quantitative 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 Tail-ling), 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.

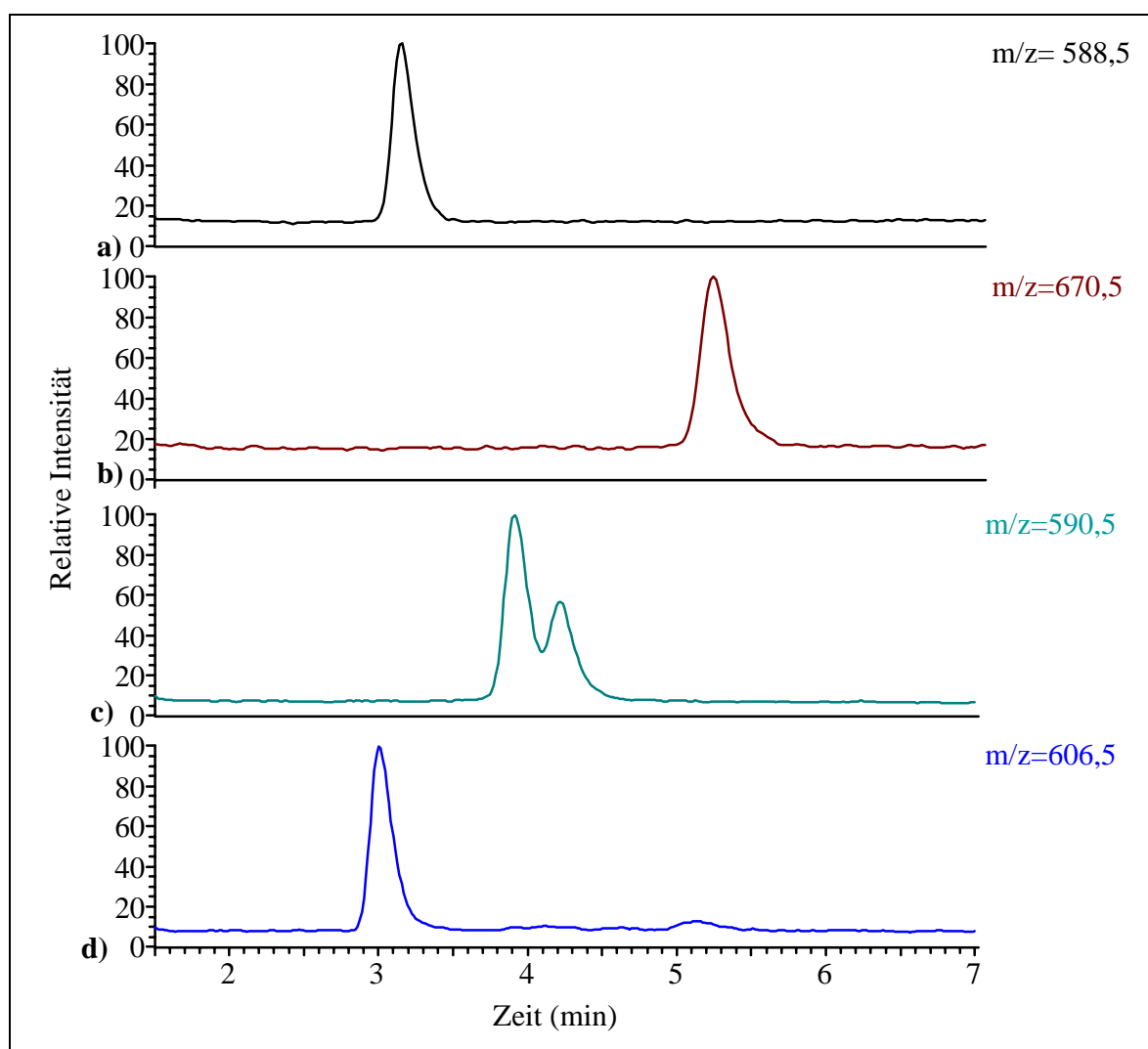


Abb. 23: Ceramidtrennung mittels LC/MS an einem Quadrupol-MS. Positiv-ESI, $[M+Na]^+$ -Addukte. **a)** N-Stearoyl-sphingosin, **b)** N-Nervonoyl-sphingosin (beides Hauptbestandteile von Ceramid III (Sigma), jedoch eigtl. als Ceramid 2 anzusprechen), **c)** N-Stearoyl-sphinganin (Ceramid 2, Sederma),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

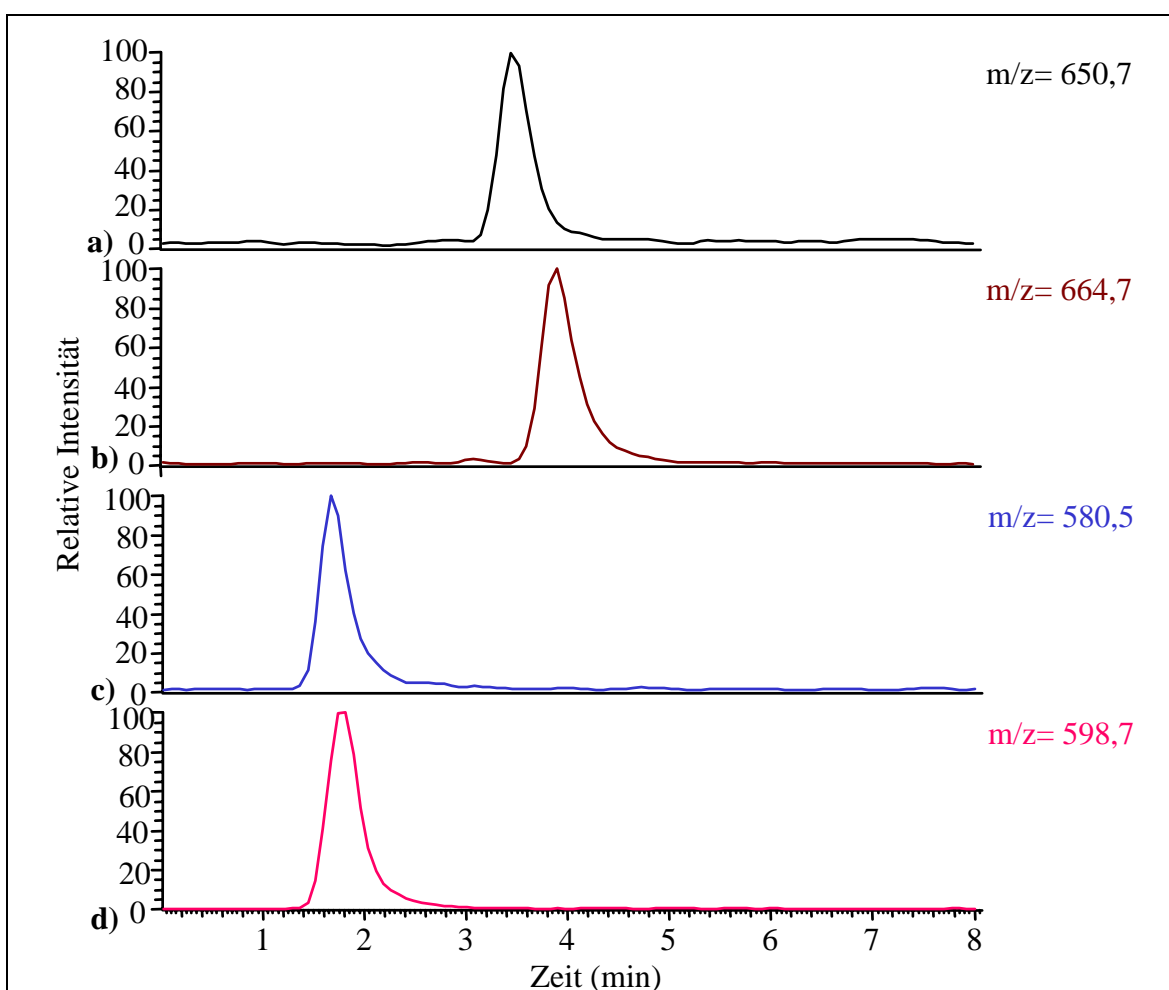


Abb. 24: Ceramidtrennung mit LC/MS an einem Ionenfallen-MS. Negativ-ESI, $[M-H]^-$ -Ionen. **a)** N-(2-Hydroxytricosanoyl)-sphingosin, **b)** N-(2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin (beides Hauptbestandteile von Ceramid IV (Sigma)), **c)** N-(2-Hydroxystearoyl)-phyto-sphingosin (Ceramid VI, Cosmoferm), **d)**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

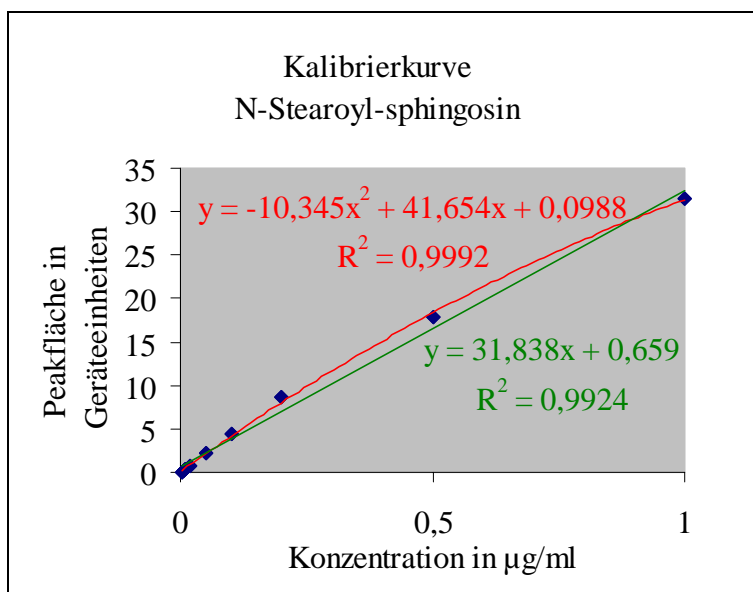


Abb. 25: Beispiel einer Kalibrierkurve für LC/MS mit Negativ-ESI an der Ionenfalle. Grün sind Kurve, Gleichung und Bestimmtheitsmaß für lineare Anpassung, rot für eine Polynomfunktion 2. Grades dargestellt.

n=5) von lediglich 3 % erreicht. Abb. 24 zeigt eine Ceramidtrennung am Ionenfallen-MS.

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 Ceramid einwaage 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.

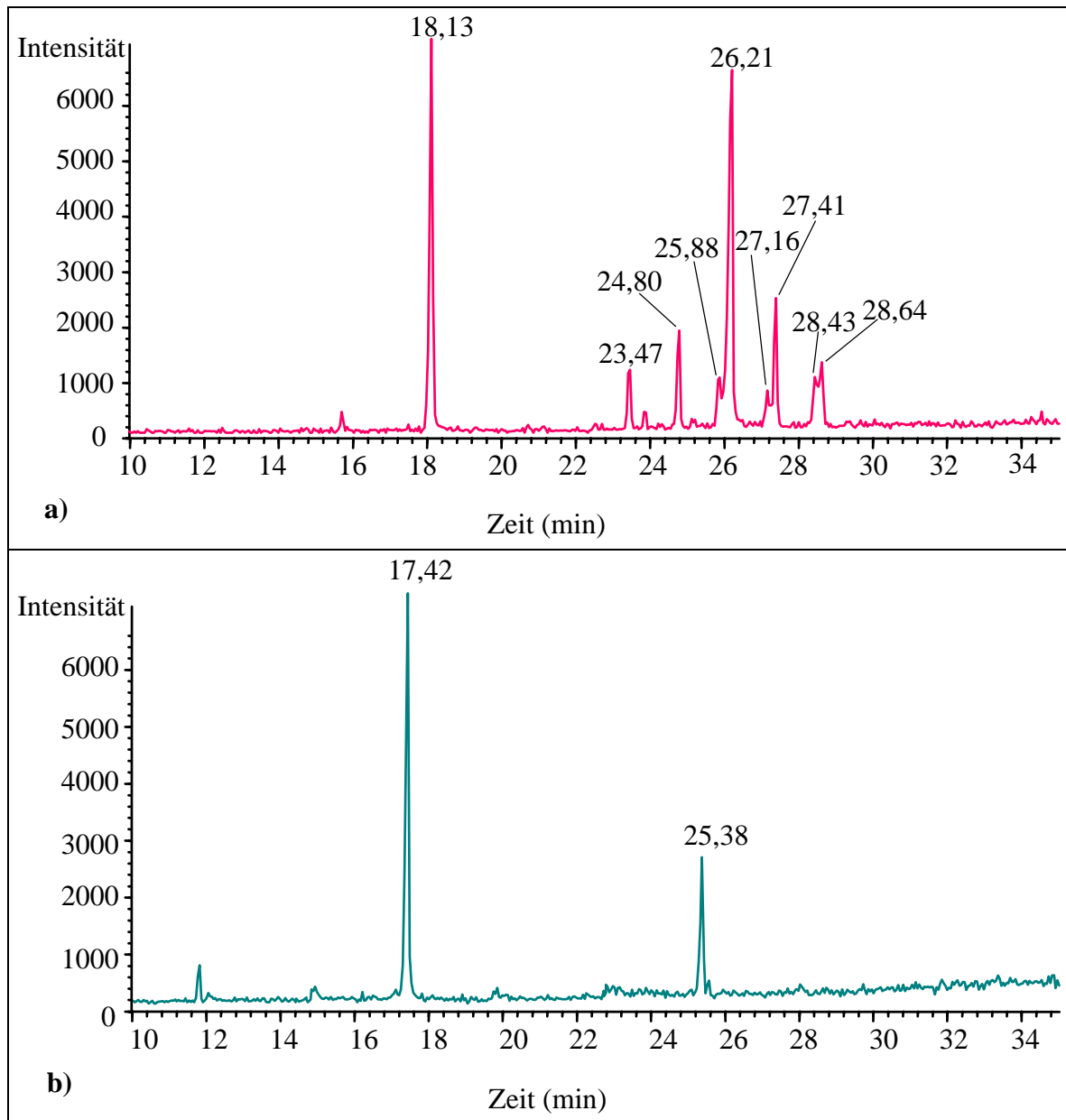


Abb. 26: GC/MS-Trennung von Ceramidgemischen. a) Ceramid IV (Sigma), b) Ceramid III (Sigma). Erläuterungen im Text.

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.

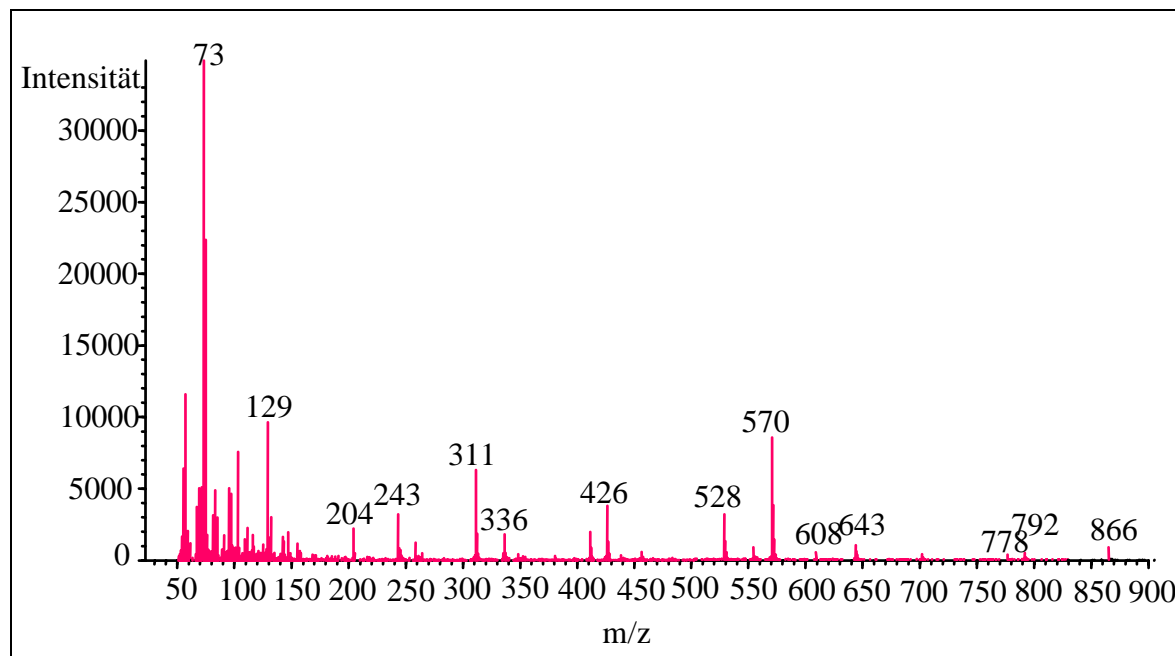


Abb. 27: EI-Massenspektrum von *Tris*-(Trimethylsilyl)-*N*-(2-Hydroxyignoceroyl)-sphingosin. Erläuterungen im Text.

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-Hydroxyignocerinsäure). 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.

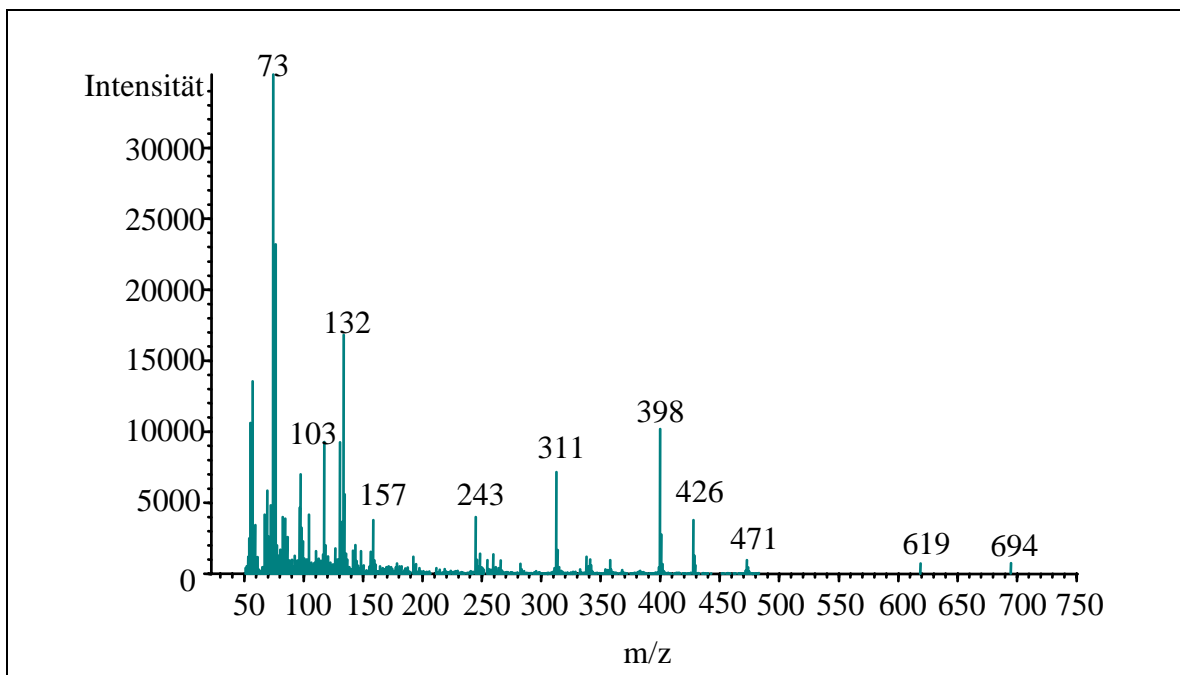


Abb. 28: EI-Spektrum von *Bis*-(Trimethylsilyl)-*N*-Stearoylsphingosin. Erläuterungen im Text.

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 MSⁿ 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 MS³-Spektrum ausgehend vom $[M-H_2O]^+$ ($m/z = 550$) ist in Abb. 30 dargestellt.

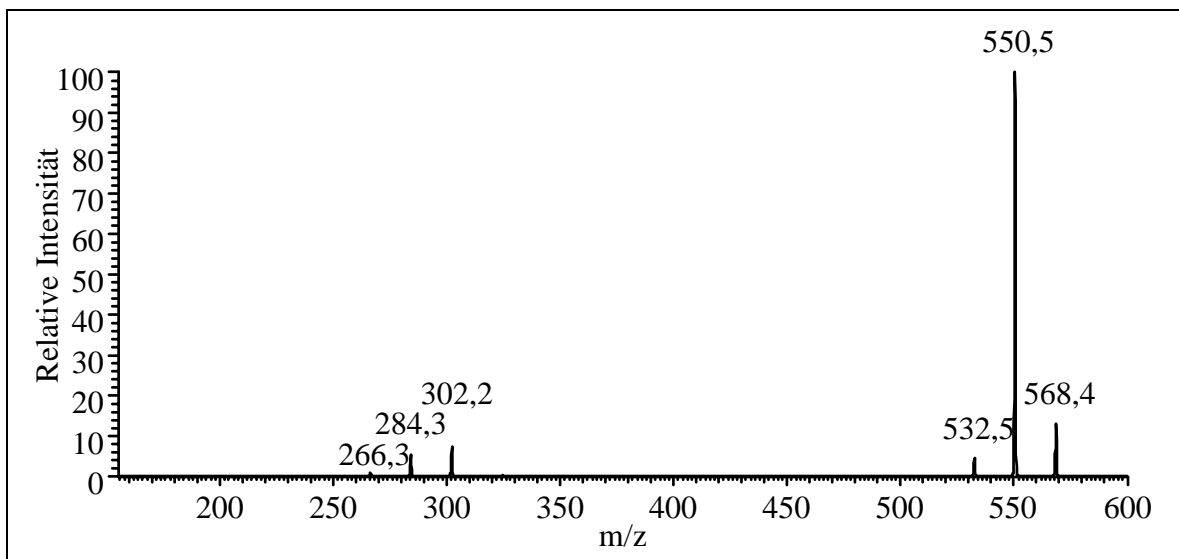


Abb. 29: Positiv-ESI-Tandem-Massenspektrum von N-Stearoyl-sphingamin.

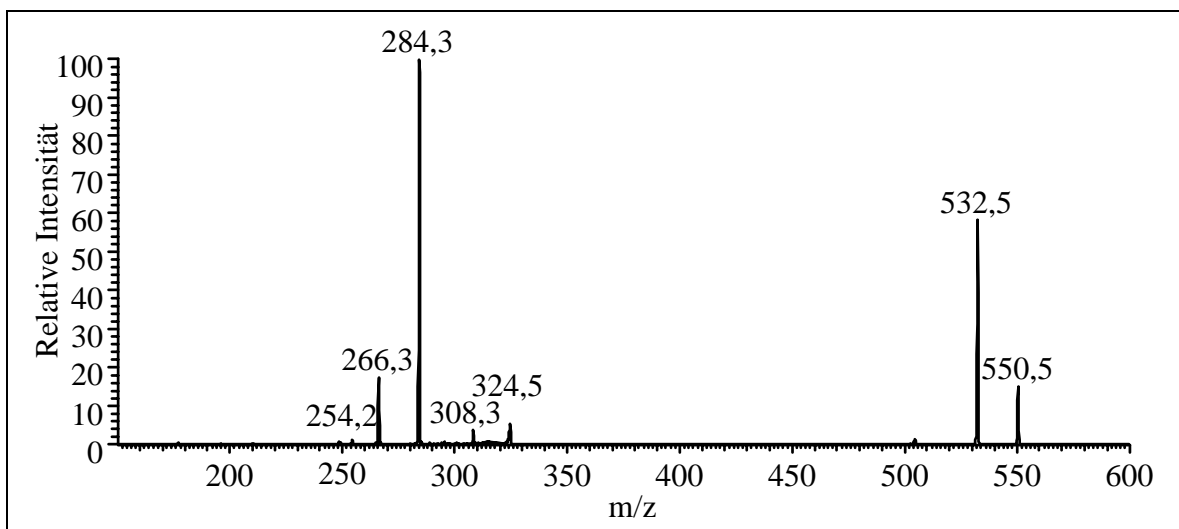


Abb. 30: Positiv-ESI-MS³-Spektrum von N-Stearoyl-sphingamin.

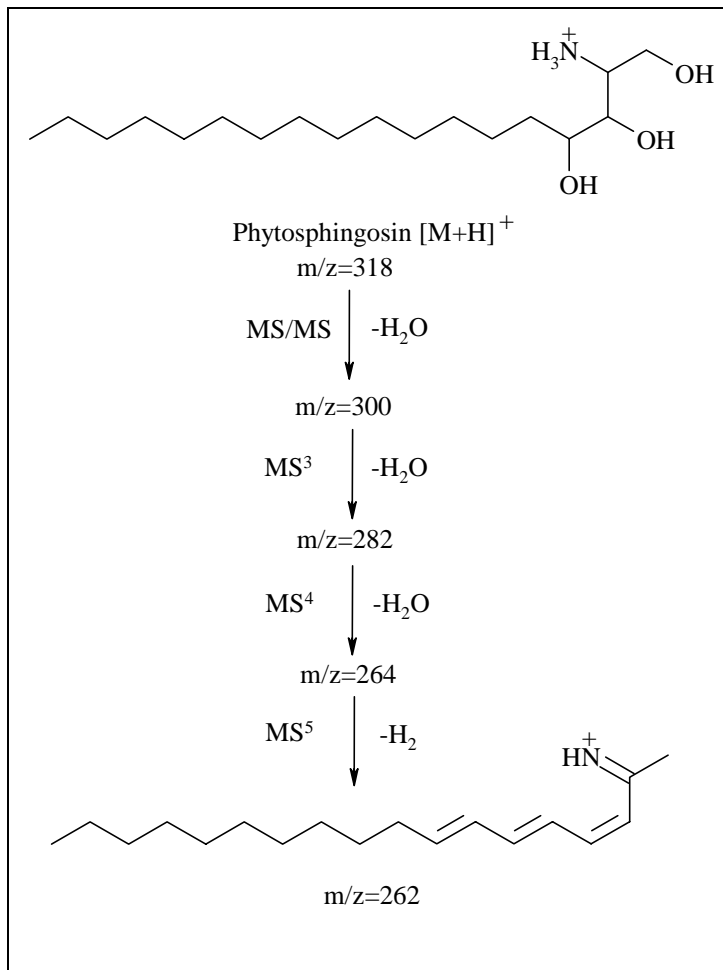


Abb. 31: Fragmentierungsschema Phytosphingosin. Positiv-ESI.

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.

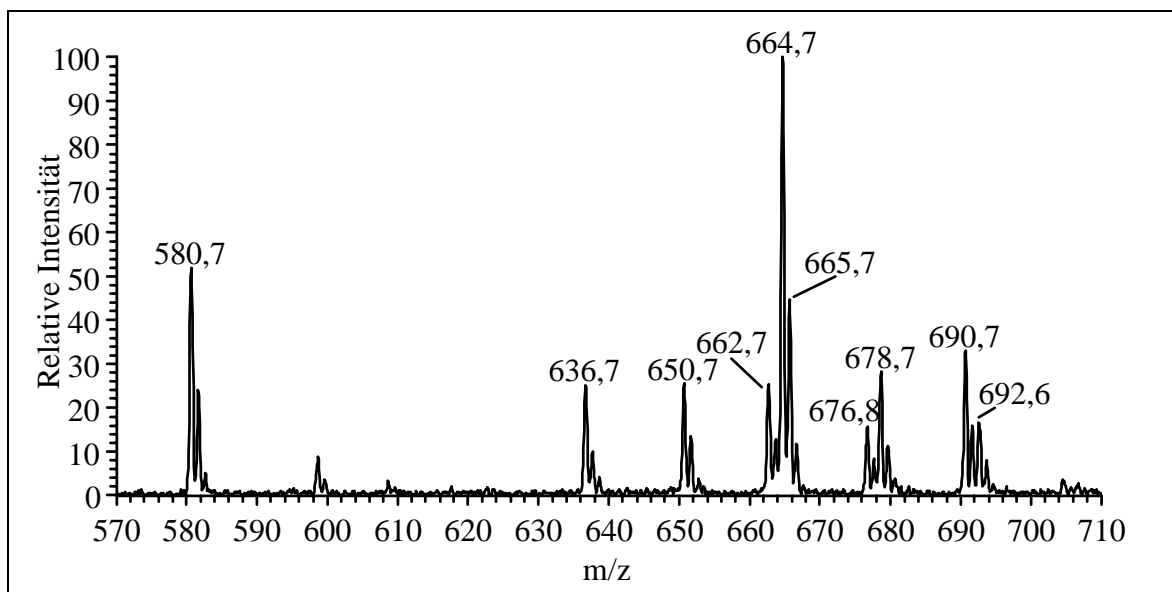


Abb. 32: Negativ-ESI-Massenspektrum von Ceramid IV (Sigma).

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

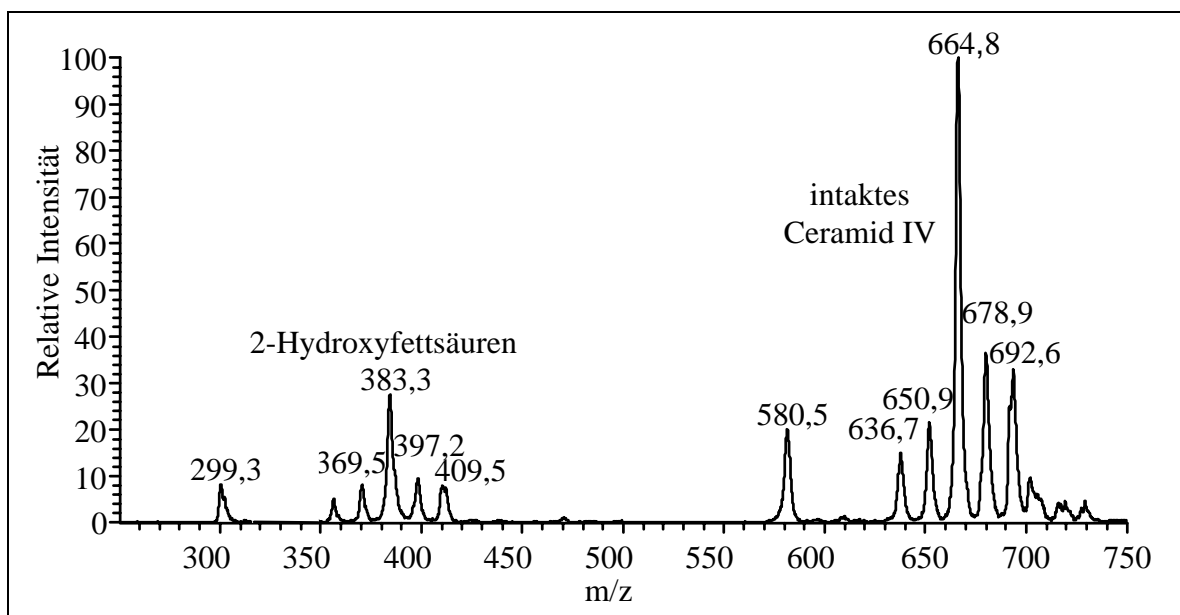


Abb. 33: ESI-Massenspektrum von Ceramid IV (Sigma) nach thermischer Degradation.

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-

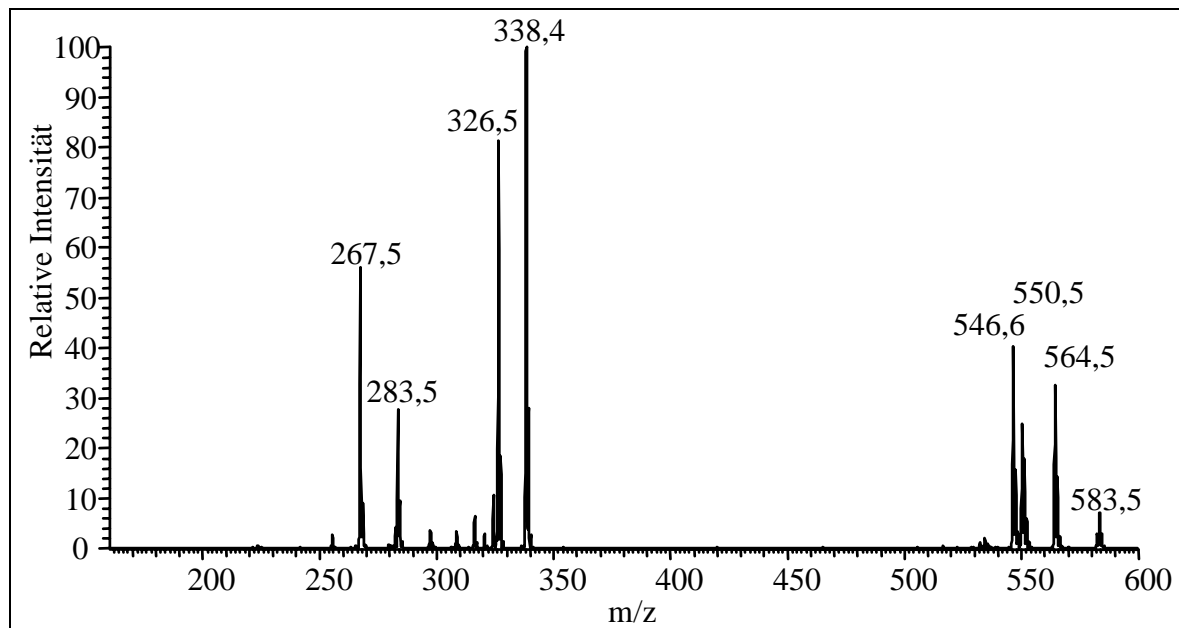


Abb. 34: Negativ-ESI-Tochterionenspektrum von N-Stearoyl-phytosphingosin (Ceramid III, Cosmoferm).

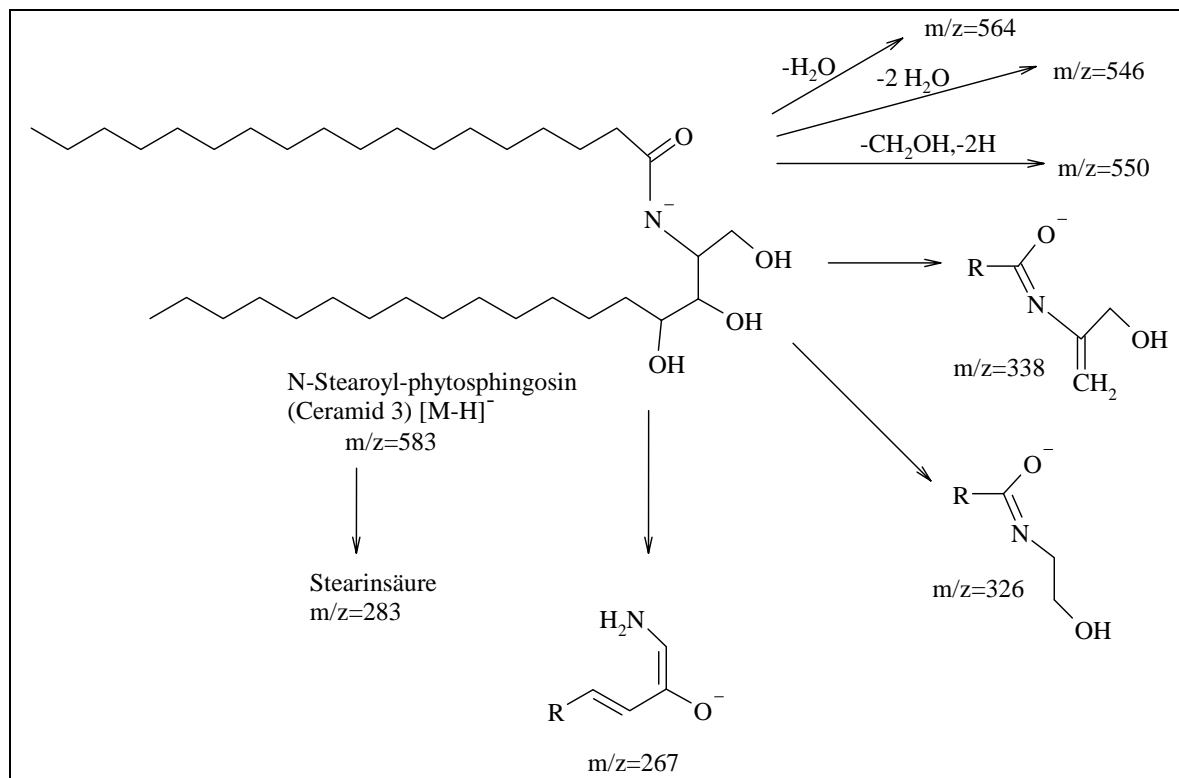


Abb. 35: Fragmentierungsschema für N-Stearoyl-phytosphingosin (Ceramid III, Cosmoferm). Erläuterungen im Text.

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 Fragmentationen können in drei Gruppen eingeteilt werden:

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

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

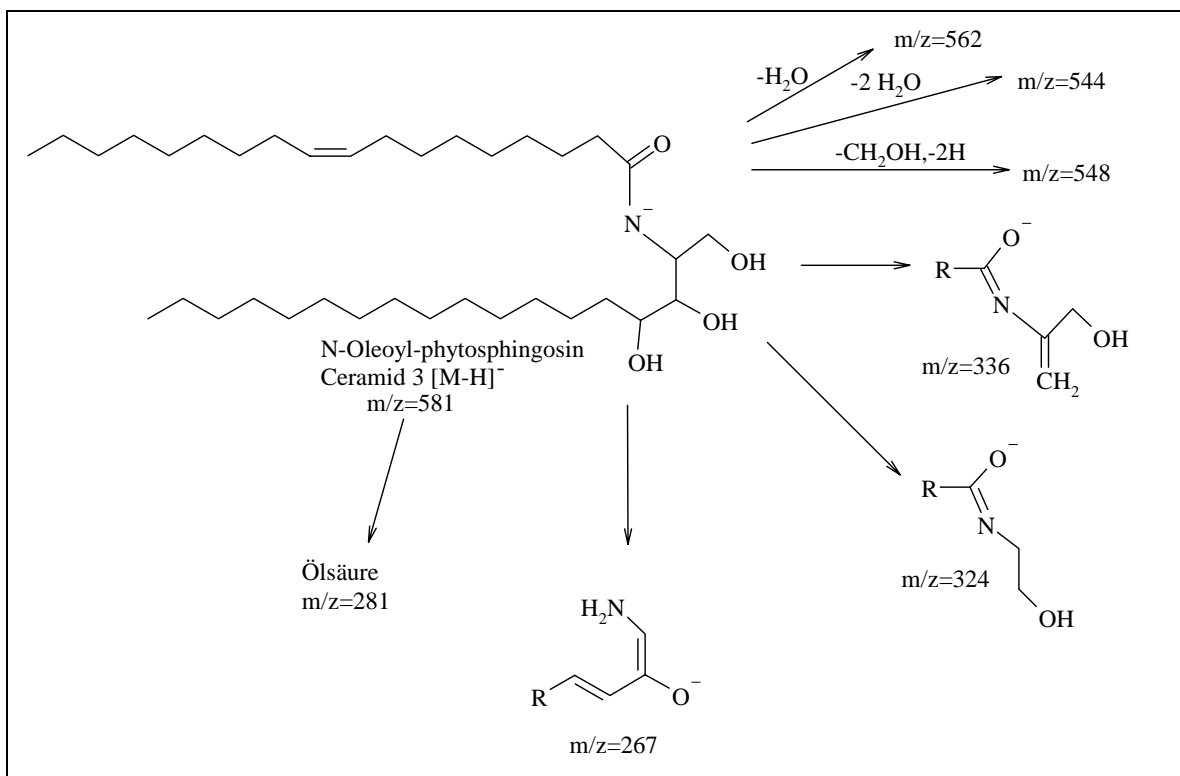


Abb. 36: Fragmentierungsschema für N-Oleoyl-phytosphingosin (Ceramid IIIb (Cosmoferm)). Erläuterungen im Text.

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.

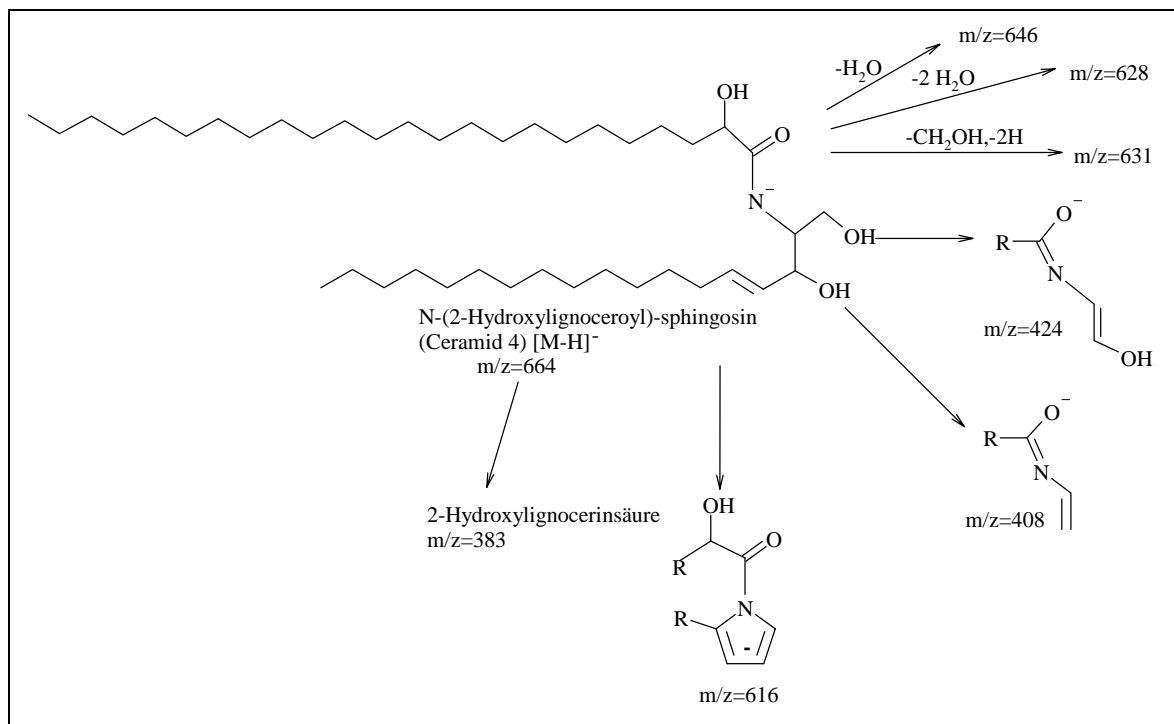


Abb. 37: Fragmentierungsschema von N-(2-Hydroxylinolenoyl)-sphingosin (Bestandteil von Ceramid IV (Sigma)).

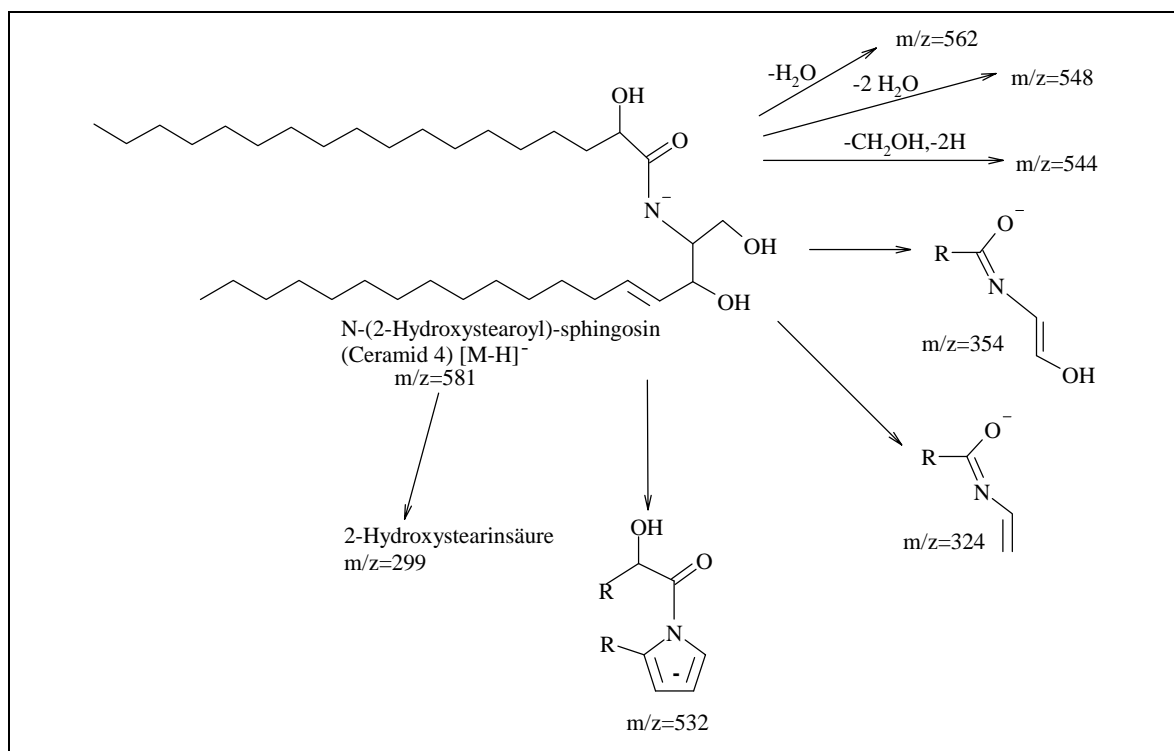


Abb. 38: Fragmentierungsschema von N-(2-Hydroxystearoyl)-sphingosin (Bestandteil von Ceramid IV (Sigma)).

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.

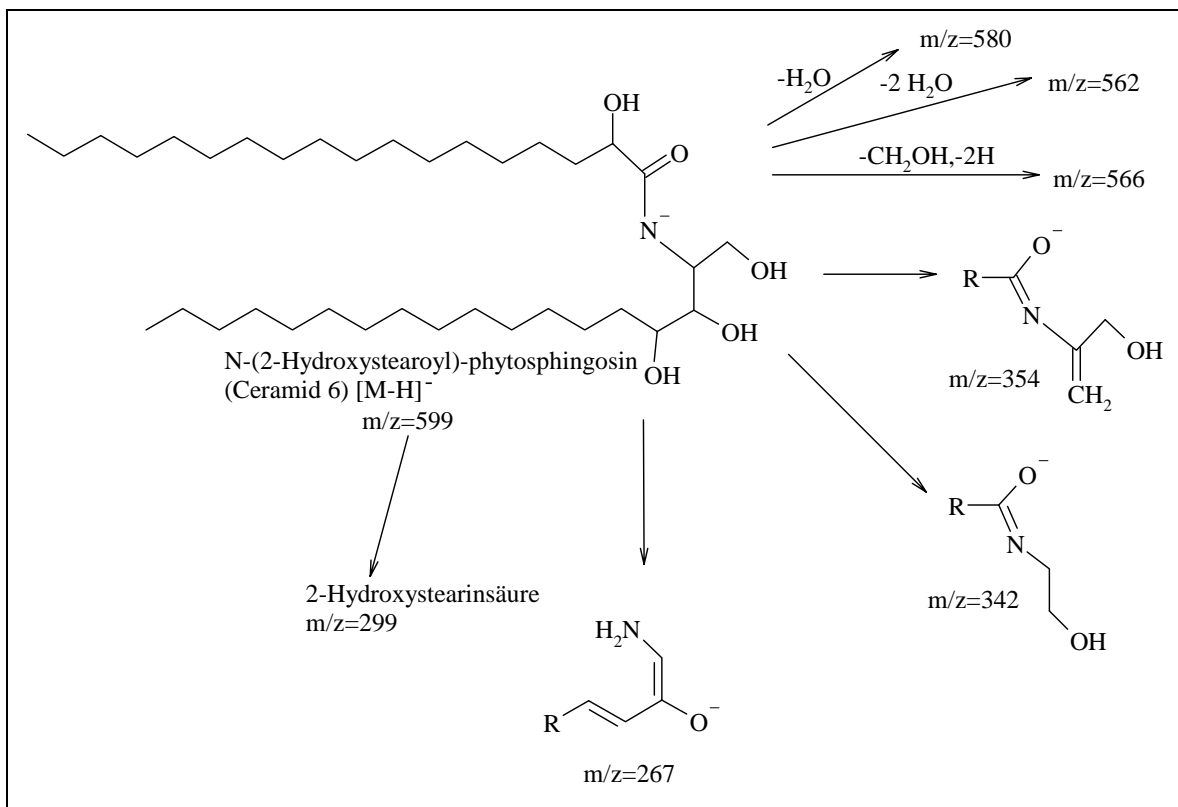


Abb. 39: Fragmentierungsschema für N-(2-Hydroxystearoyl)-phytosphingosin (Ceramid VI (Cosmoferm)).

Ceramid 2 (Sederma) enthält Sphingalin 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).

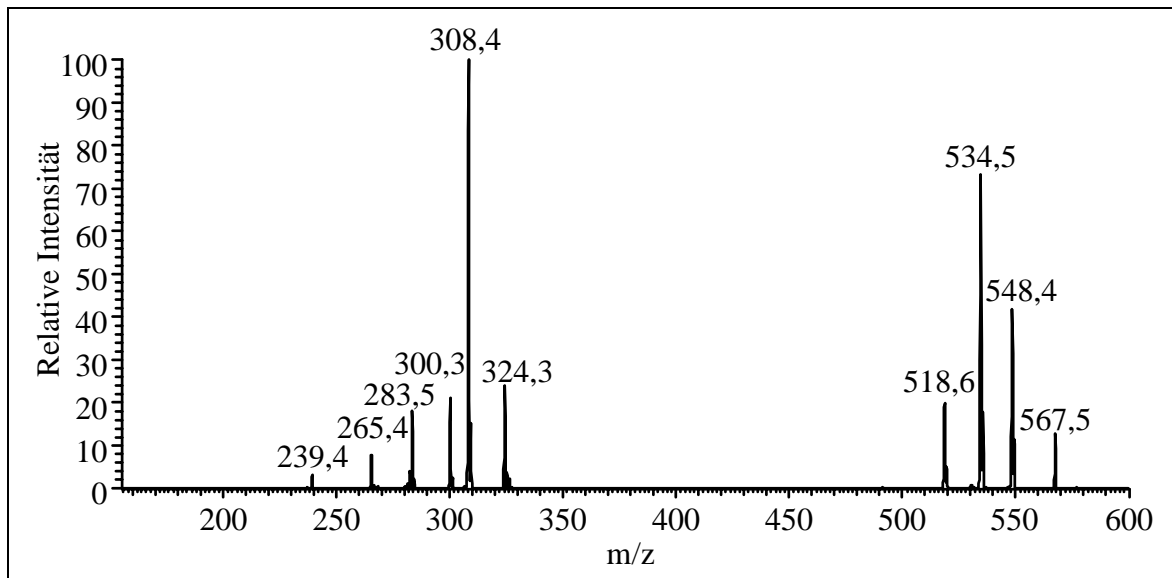


Abb. 40: Negativ-ESI-Tochterionenspektrum von N-Stearoyl-sphinginin (Ceramid 2, Sederma).

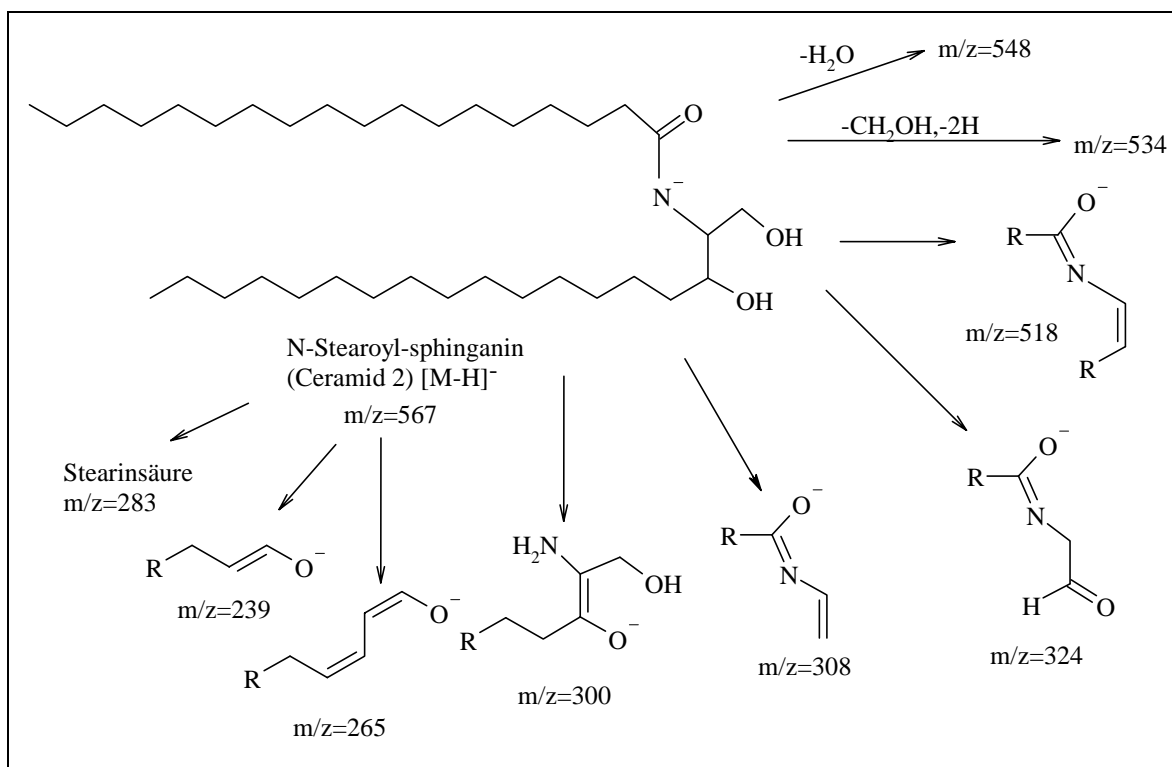


Abb. 41: Fragmentierungsschema für N-Stearoyl-sphinginin (Ceramid 2, Sederma).

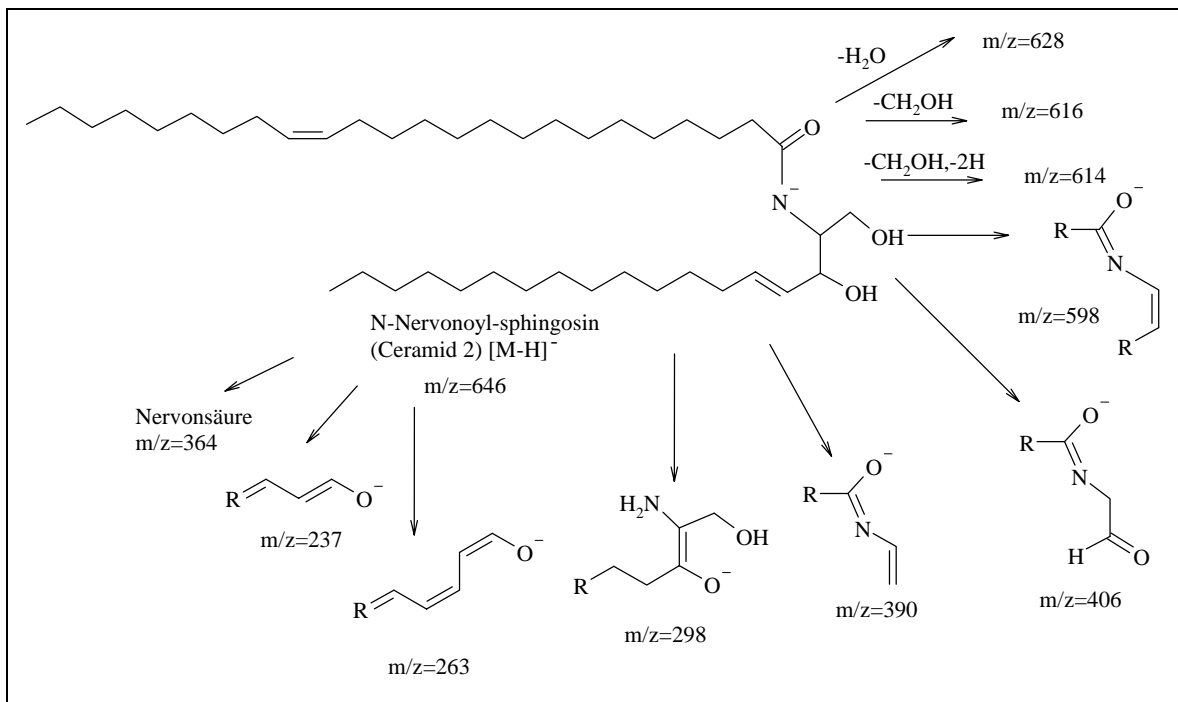


Abb. 42: Fragmentierungsschema für N-Nervonoyl-sphingosin (häufigste Komponente von Ceramid III, Sigma).

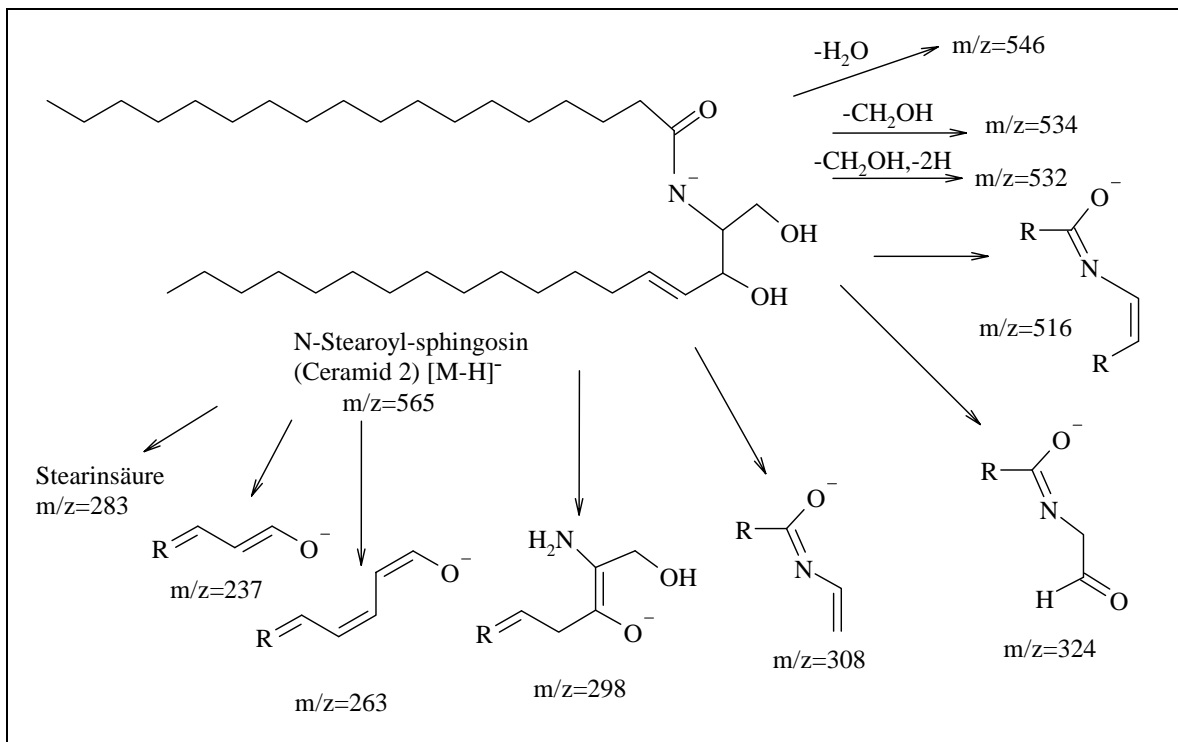


Abb. 43: Fragmentierungsschema für N-Stearoyl-sphingosin (zweithäufigste Komponente von Ceramid III (Sigma)).

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

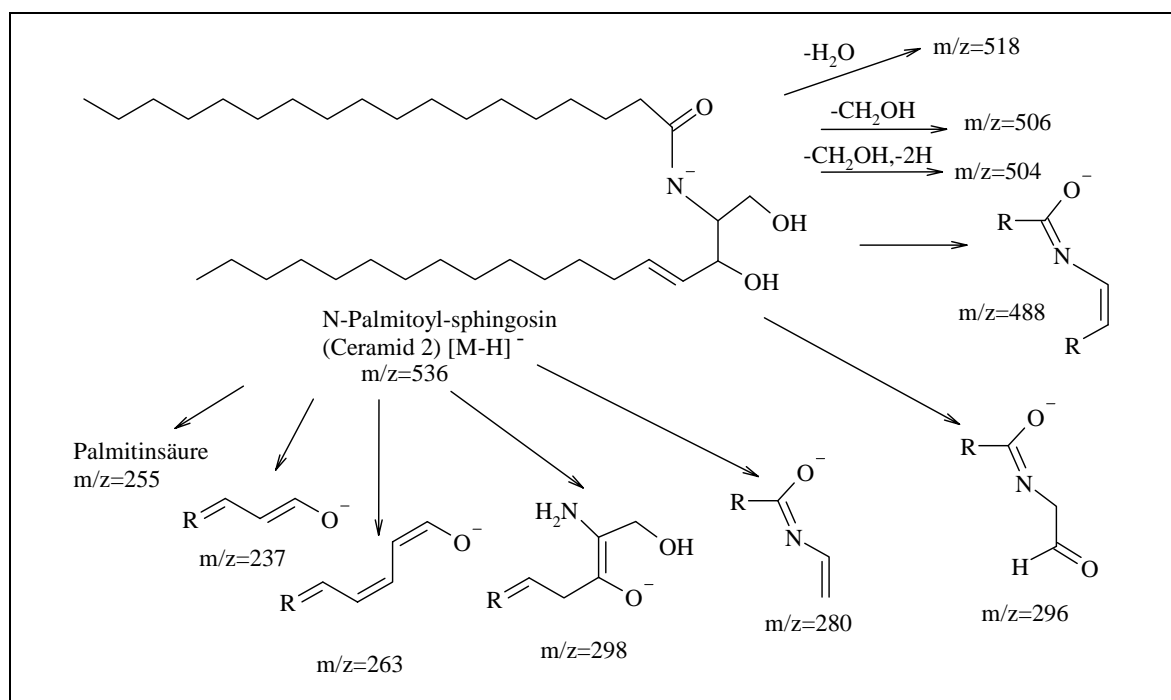


Abb. 44: Fragmentierungsschema für N-Palmitoyl-sphingosin (am Hause synthetisiert [6]).

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 Sphingamin, 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 Sphingamin, 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 unbekanntem 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 Cholesterol-sulfat wurden möglichst quantitativ von der HPTLC-Platte gewonnen. Die jeweiligen Kieselgelfractionen 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.

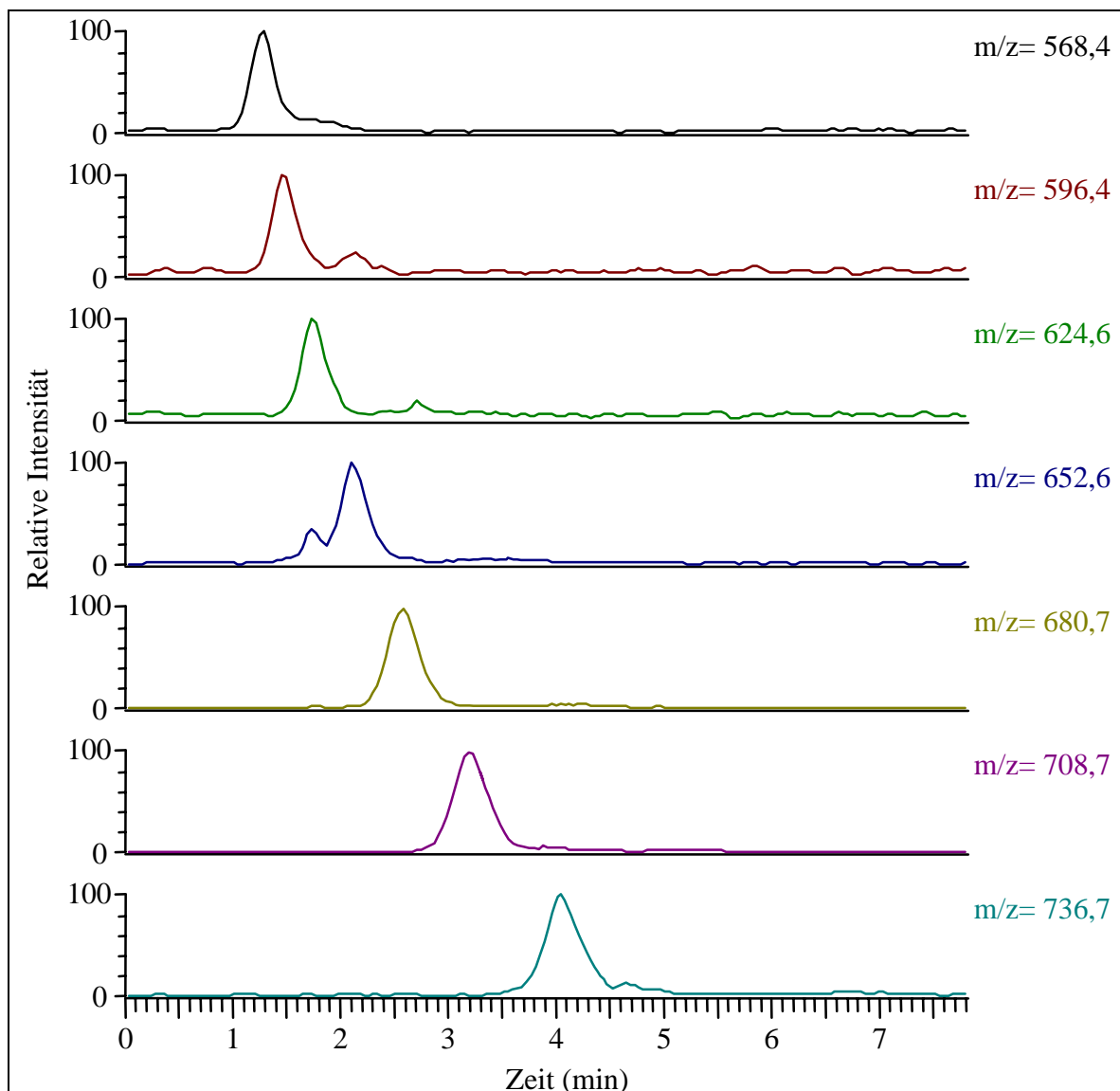


Abb. 45: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 2 in palmoplantarem Stratum corneum.

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-sphingarin) war die Kombination von C-20-Sphingarin 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-sphingarin und N-Hexacosanoyl-sphingarin 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.

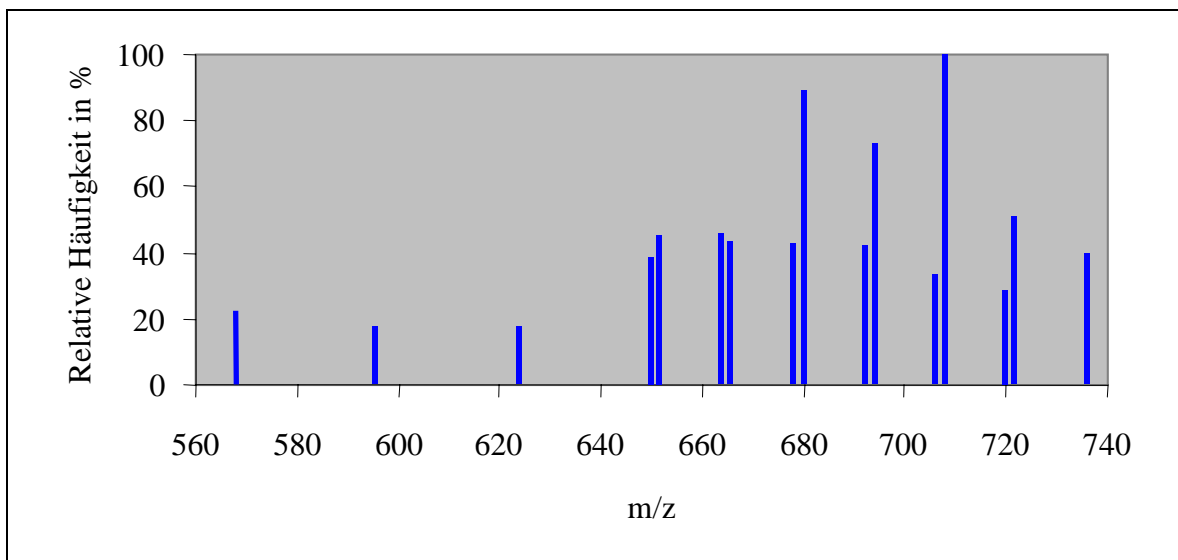


Abb. 46: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-2-Fraktion. Erläuterungen im Text.

Die Untersuchung der **Ceramid-3**-Fraktion (HPTLC-Referenzsubstanz: N-Stearoyl-phytosphingosin) ergab wiederum, daß die vorausgerechneten 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.

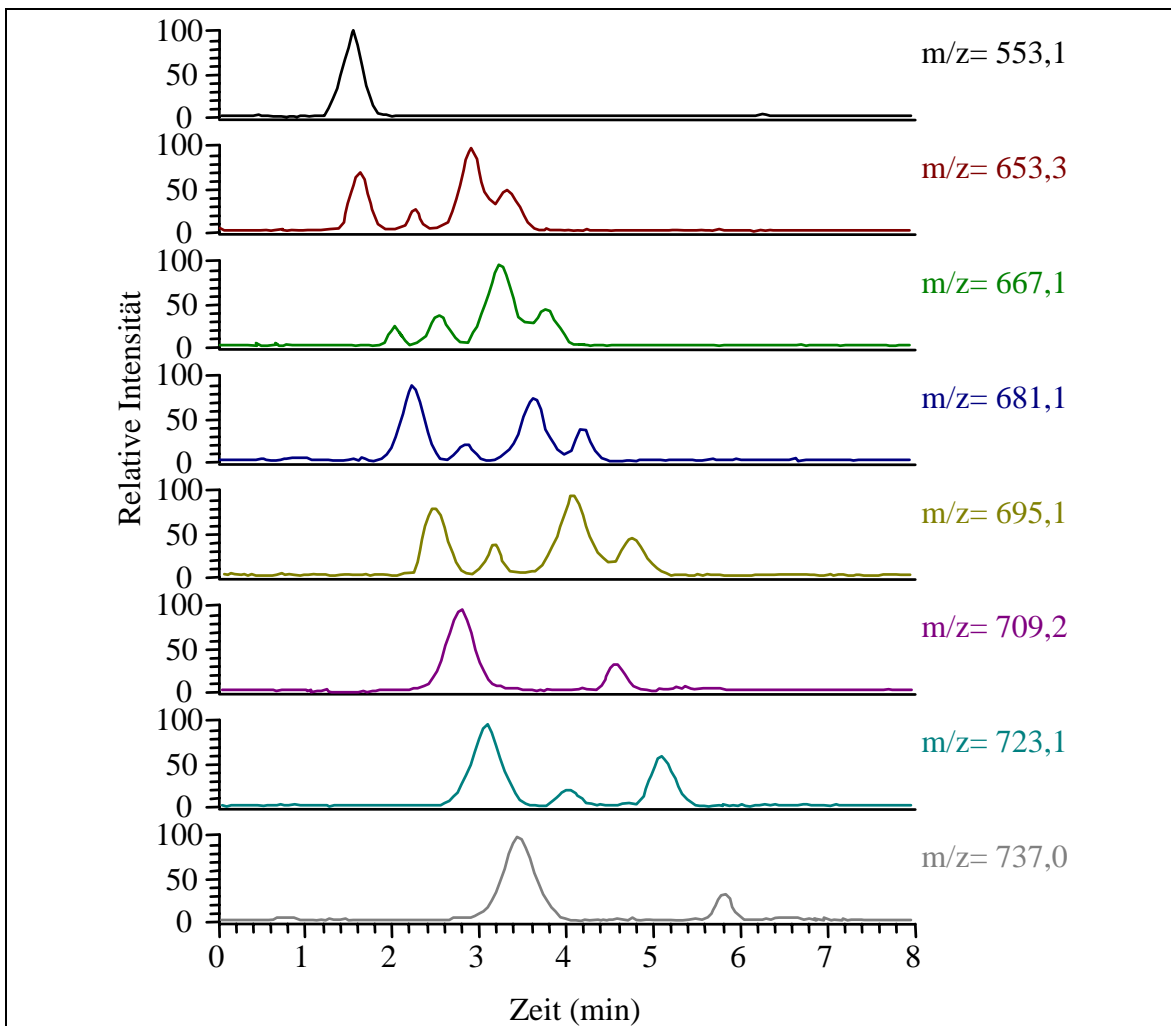


Abb. 47: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 3.

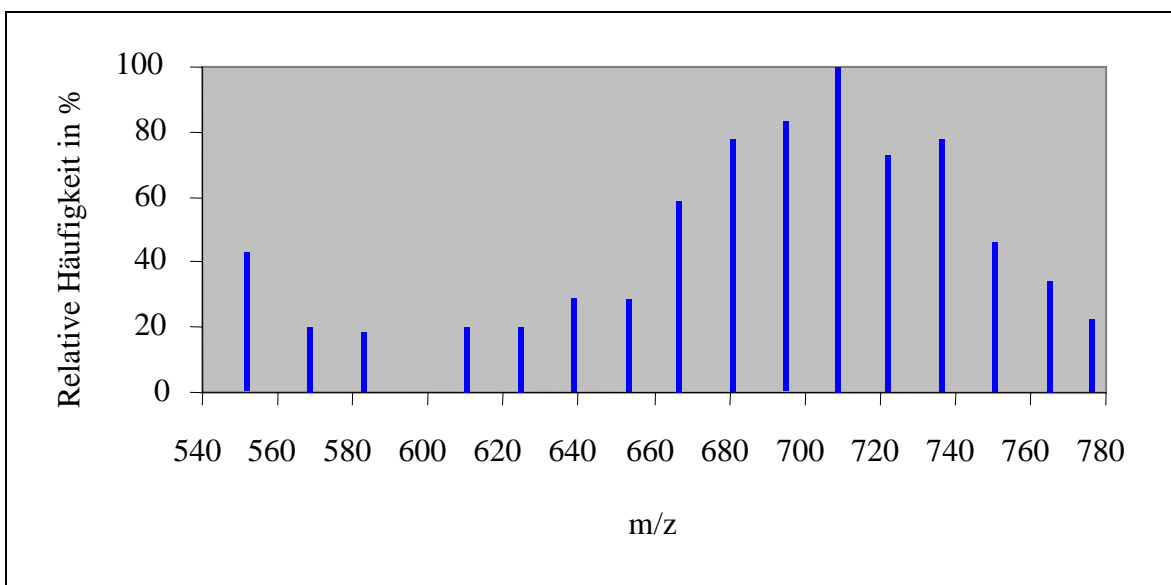


Abb. 48: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-3-Fraktion. Erläuterungen im Text.

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 palmoplastaren Lipidextrakt. Abb. 50 gibt das Häufigkeitsspektrum an.

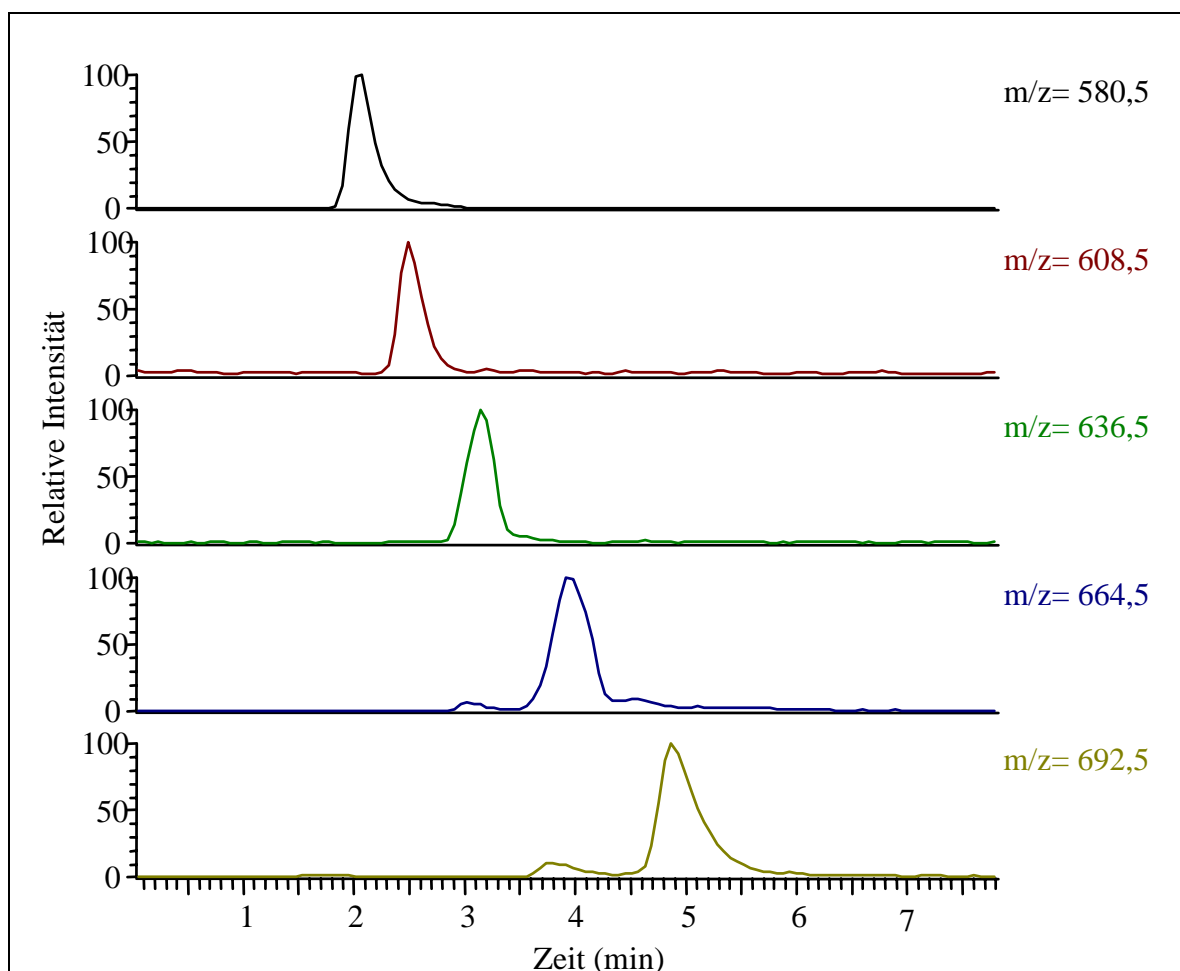


Abb. 49: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 4 in palmoplastarem Stratum corneum.

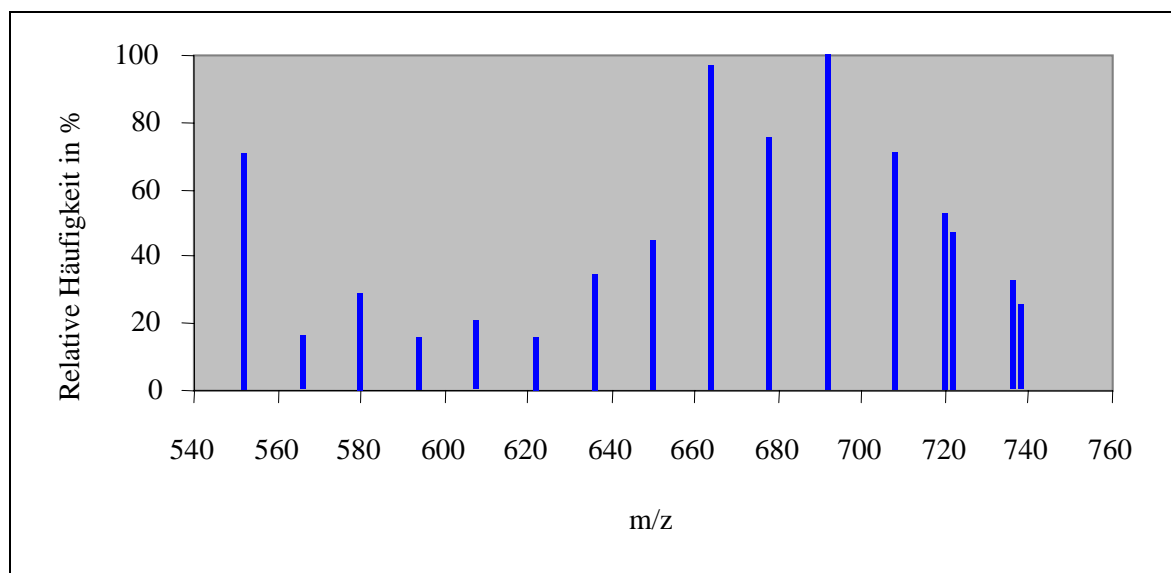


Abb. 50: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-4-Fraktion. Erläuterungen im Text.

Bei **Ceramid 6** (HPTLC-Referenzsubstanz: N-(2-Hydroxystearoyl)-phytosphingosin) wurde in älteren Arbeiten eine 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.

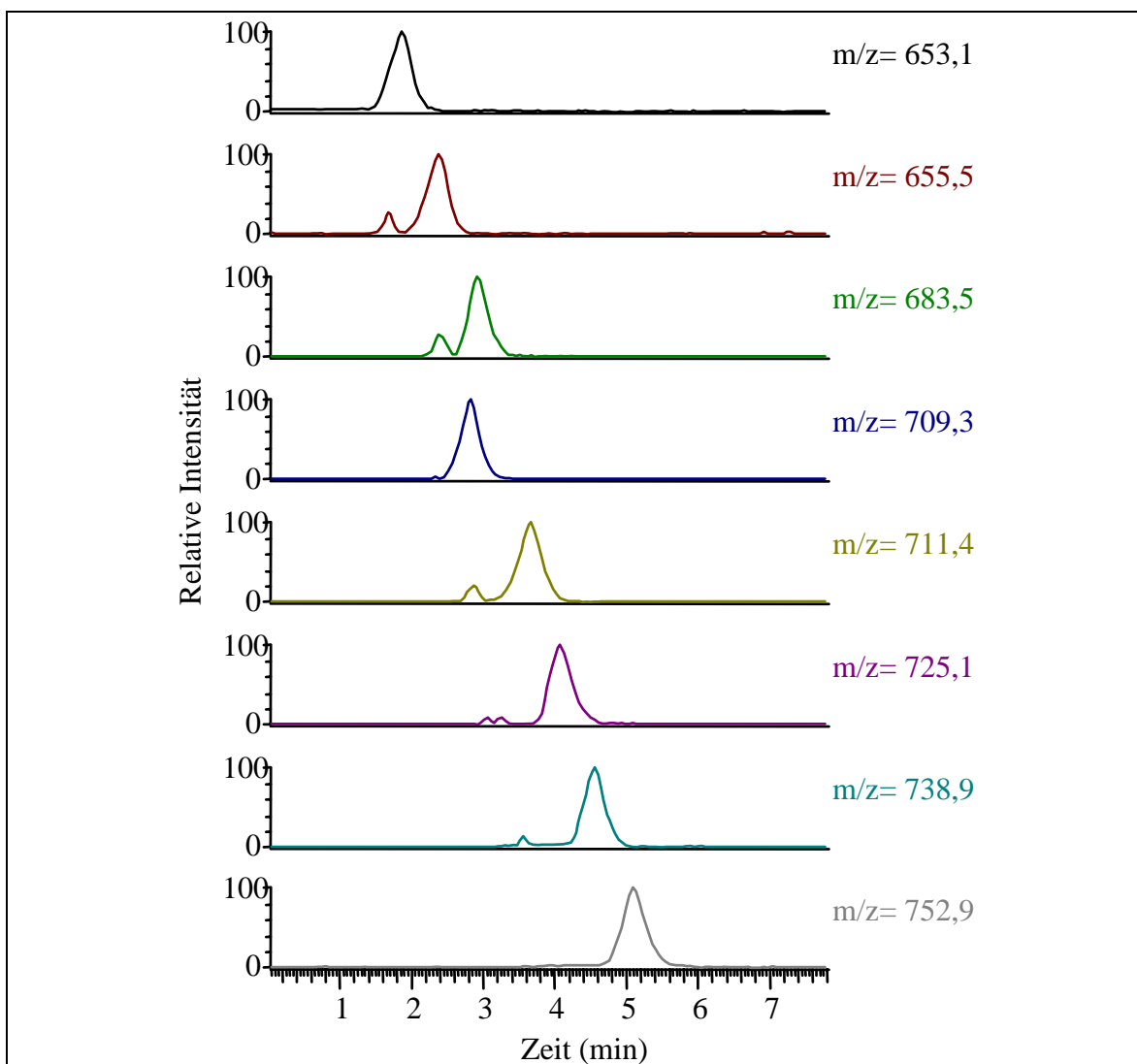


Abb. 51: Trennung einiger Hauptkomponenten von Ceramid 6.

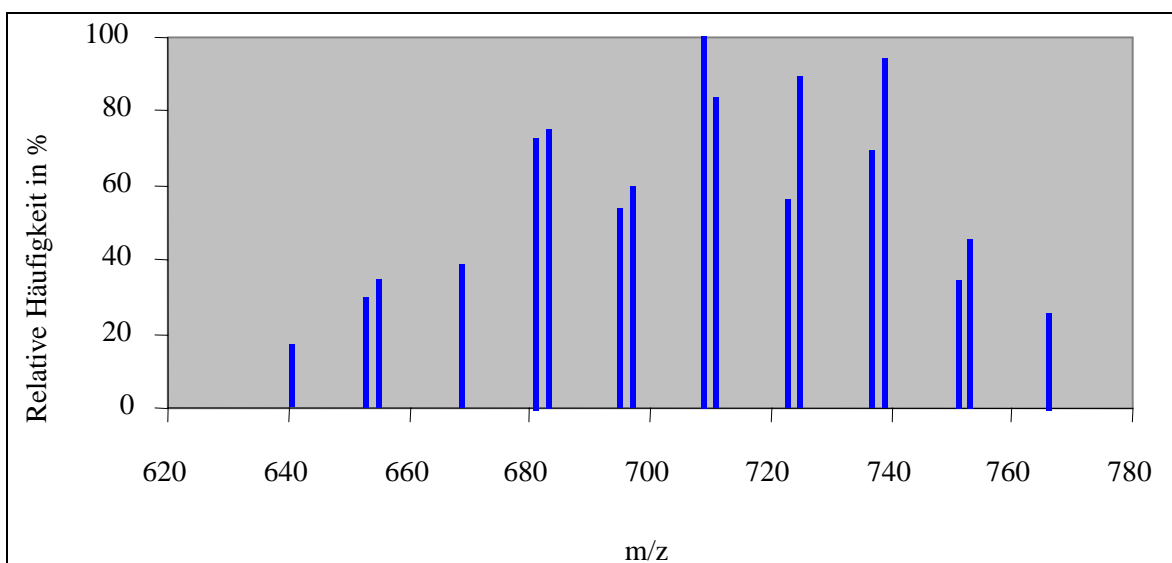


Abb. 52: Relative Häufigkeitsverteilung der Komponenten der Ceramid-6-Fraktion. Erläuterungen im Text.

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

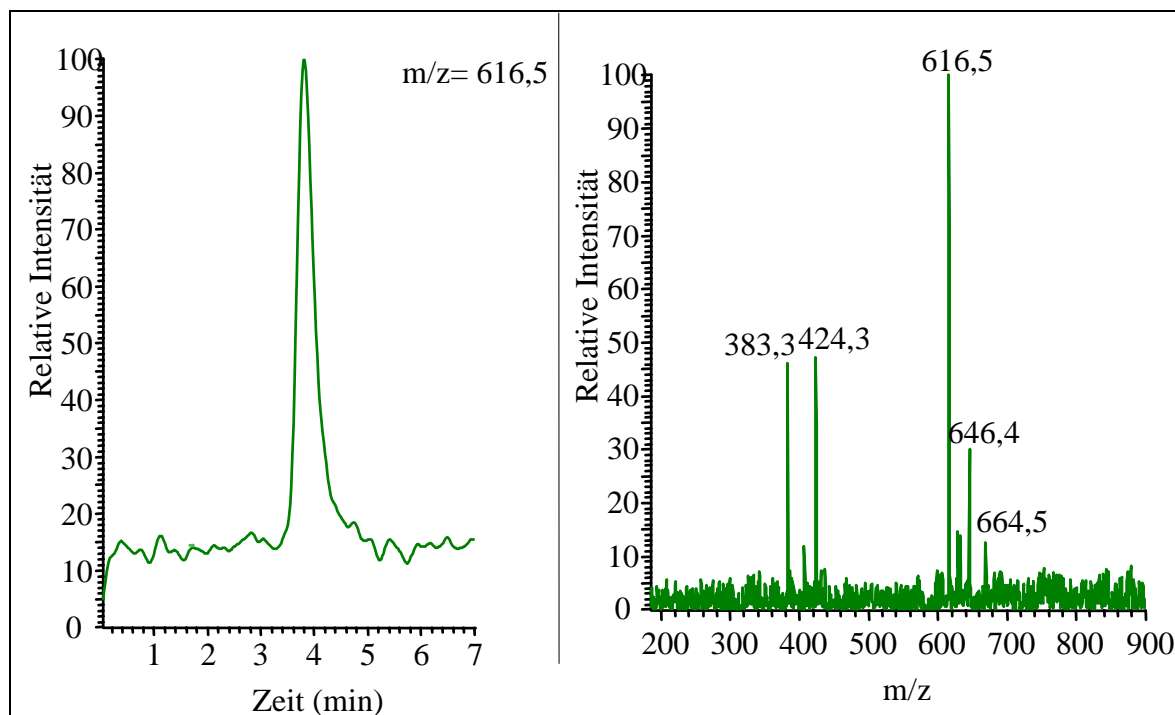


Abb. 53: LC/MS/MS-Chromatogramm und Tochterionenspektrum von (2-Hydroxylignoceroyl)-sphingosin, einem Bestandteil der Ceramid-4-Fraktion des Hautlipidextrakts.

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-

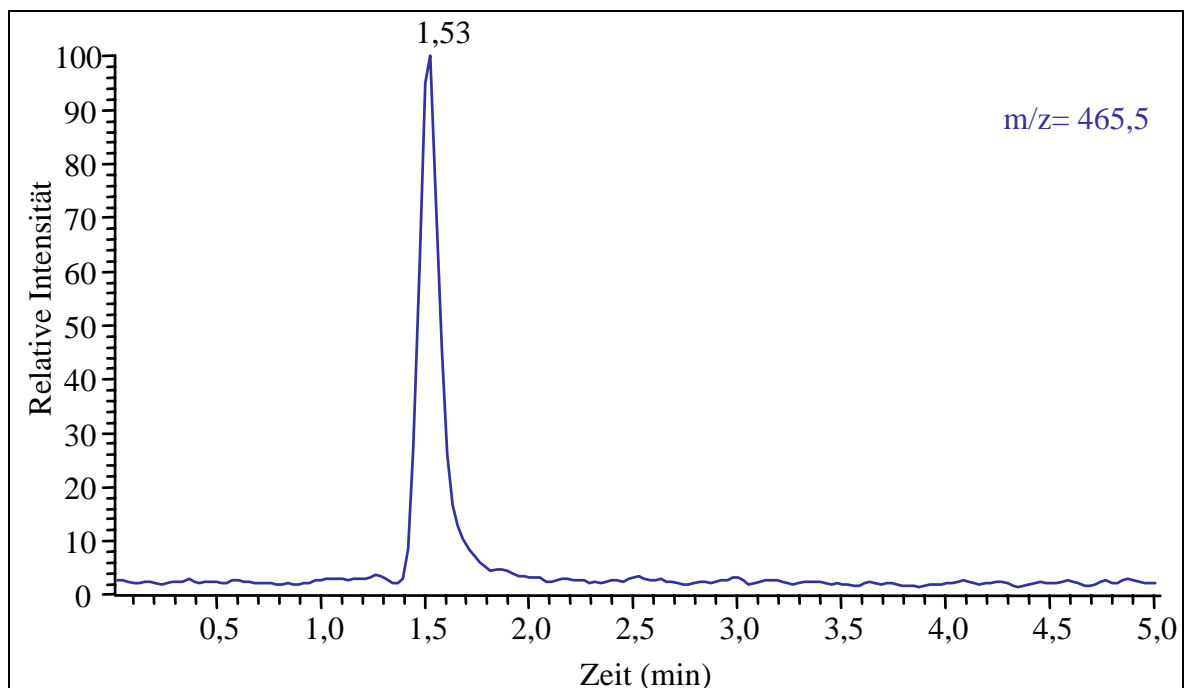


Abb. 54: LC/MS-Chromatogramm von Cholesterolsulfat. Erläuterungen im Text.

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.

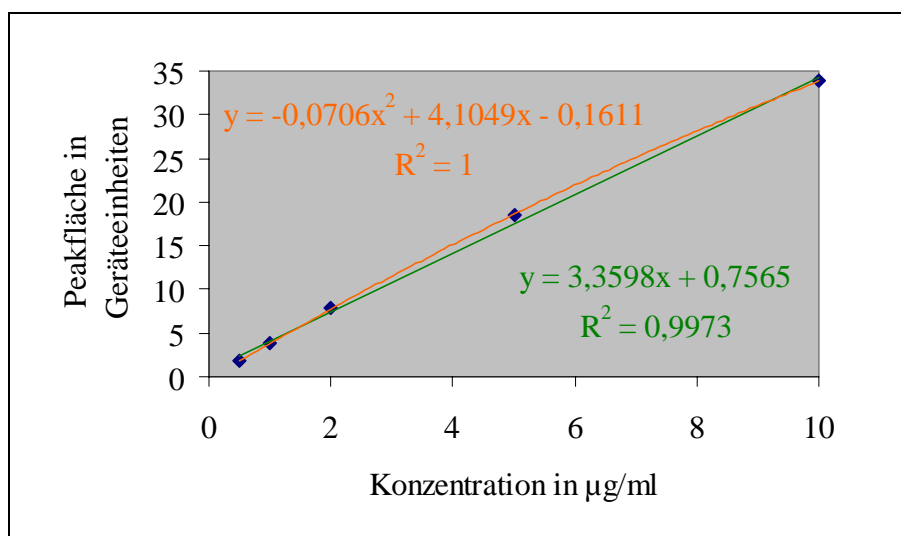


Abb. 55: Kalibrierkurve für Cholesterol-3-sulfat. LC/MS mit Negativ-Elektrospray-Ionisation. Grün sind Kurve, Gleichung und Bestimmtheitsmaß für lineare Anpassung, orange für eine Polynomfunktion 2. Grades dargestellt.

Die relative Standardabweichung (RSD, n=5) der einzelnen Kalibrierwerte lag zwischen 0,67 und 6 % (\varnothing 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 Auftragslösung 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.

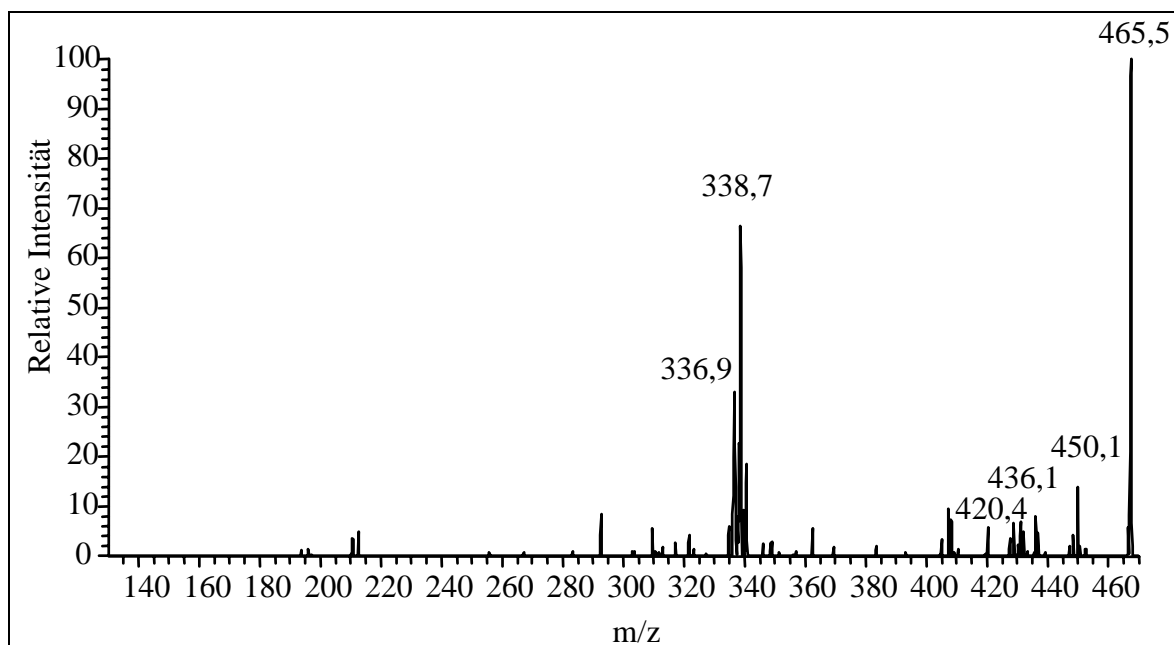


Abb. 56: Negativ-ESI-Tochterionenspektrum von Cholesterolsulfat.