

**Hautlipidanalytik mit der Flüssigchromatographie-
Massenspektrometrie (LC/MS)**

Untersuchung von endogenen und
topisch applizierten Lipiden



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jens-Peter Vietzke

aus Hamburg

Hamburg 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. W. A. König
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hühnerfuß

Mündliche Prüfungen:

24.02.2000	Lebensmittelchemie	Prof. Dr. H. Steinhart
29.02.2000	Analytische Chemie	Prof. Dr. W. Dannecker
02.03.2000	Organische Chemie	Prof. Dr. W. A. König

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1997 bis Januar 2000 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. A. König am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. A. König danke ich für seine konstruktive Betreuung und Unterstützung, die Ermöglichung einer Kooperation mit der Industrie und das fortwährende Interesse während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
2	Zielsetzung	3
3	Allgemeiner Teil	5
3.1	Haut	5
3.1.1	Aufbau der Haut	5
3.1.2	Lokalisierung und Aufbau der Permeabilitätsbarriere	7
3.1.3	Lipide der Haut	10
3.2	Massenspektrometrie	17
3.2.1	Aufbau und Technik von Massenspektrometern	17
3.2.2	Kopplung LC/MS	21
3.2.3	API-ES (Ion Trap) Massenspektrometer	22
3.2.4	Aufbau und Funktion elektrischer Ionenfallen	25
4	Spezieller Teil	27
4.1	Analytik von Hautlipiden (LC/MS)	27
4.1.1	Massenspektrometrische Charakterisierung von Hautlipiden	27
4.1.2	Flüssigchromatographische Trennung von Ceramiden	32
4.1.3	Electrospray-Ionenfallen MS/MS Fragmentierungsexperimente	35
4.1.4	Flüssigchromatographische Trennung von Glucosylceramiden	41
4.1.5	Flüssigchromatographische Trennung von Ceramiden aus isolierten menschlichen Stratum corneum Lipiden	44
4.1.6	Vergleichende Untersuchung der Ceramidverteilung menschlicher Stratum corneum-Lipide (LC/MS und dünnschichtchromatogr. Trennungen)	51

4.2	Untersuchung der Ceramidverteilung (LC/MS) im Rahmen von Probandenversuchen	60
4.2.1	Gewinnung von Stratum corneum-Lipiden: Vergleich der oberflächlichen Lipidextraktion und der Lipidgewinnung durch Cyanoacrylat-Abrisse	62
4.2.2	Vergleich der Ceramidverteilung von Probanden mit gesunder Haut und Probanden mit atopischem Ekzem vor und nach einer Bestrahlungstherapie	66
4.3	Analytik topisch applizierter Lipide (Acylglycerine) mit der LC/MS	75
4.3.1	Massenspektrometrische Charakterisierung	75
4.3.2	MS/MS-Fragmentierungsexperimente von Di- und Triglyceriden	76
4.3.3	Flüssigchromatographische Trennung von Mono-, Di- und Triglyceriden	78
4.4	Substantivität von Acylglycerinen auf Haut (LC/MS)	80
4.4.1	Aufbau und Durchführung des Probandenversuches	81
4.4.2	Quantitative Bestimmung von Triolein in Hautlipidextrakten	81
4.4.3	Ergebnis der Untersuchung zur Substantivität von Mandelöl auf Haut	84
5	Zusammenfassung	86
6	Summary	88
7	Experimenteller Teil	90
7.1	Gewinnung von Stratum corneum Lipiden	90
7.1.1	Lösungsmittel-Extraktion	90
7.1.2	Cyanoacrylat-Abrisse	90
7.2	Dünnschichtchromatographie	91
7.3	Hochleistungs-Flüssigchromatographie	92
7.3.1	Trennung der Ceramide	92
7.3.2	Trennung der Acylglycerine	95
7.3.3	Massenspektrometrie	96
7.3.4	Statistik	98

8	Tabellenanhang	99
8.1	Bestimmung der Ceramidverteilung in menschlichen Stratum corneum Lipiden: Untersuchung der Reproduzierbarkeit	99
8.2	Vergleich der Lipidgewinnungstechniken	100
8.2.1	Lipidgewinnung durch Lösungsmittlextraktion	100
8.2.2	Lipidgewinnung durch Cyanoacrylat-Abrisse	101
8.2.3	Berechnung von Veränderungen der relativen Ceramidgehalte Cyanoacrylat-Abriß / Lösungsmittlextraktion	102
8.3	Vergleich Ceramidverteilung gesunde Haut-atopisches Ekzem	103
8.3.1	Probanden mit gesunder Haut	103
8.3.2	Probanden mit atopischem Ekzem (unbestrahlte Areale)	104
8.4	Bestrahlungen von Probanden mit atopischem Ekzem	105
8.4.1	Zeitpunkt t1 Sonnensimulator	105
8.4.2	Zeitpunkt t1 UV-A	106
8.4.3	Zeitpunkt t2 Sonnensimulator	107
8.4.4	Zeitpunkt t2 UV-A	108
8.4.5	Berechnung von Veränderungen der Ceramide t0/t1 Sonnensimulator	109
8.4.6	Berechnung von Veränderungen der Ceramide t0/t1 UV-A	110
8.4.7	Berechnung von Veränderungen der Ceramide t2/t0 Sonnensimulator	111
8.4.8	Berechnung von Veränderungen der Ceramide t2/t1 UV-A	112
8.5	Bestimmung von Triolein	113
8.6	Chemikalien und Geräte	114
8.6.1	Chemikalien	114
8.6.2	Geräte und Zubehör	115
9	Literatur und Anmerkungen	116

Abkürzungsverzeichnis

amu	atomic mass unit
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
API	atmospheric pressure ionization
C	Kohlenstoff-Kettenlänge
Cer(AH)	N-(α -OH-acyl)-6-OH-Sphingosin
Cer(AP)	N-(α -OH-acyl)-6-OH-Sphingosin
Cer(AS)	N-(α -OH-acyl)-4-OH-Sphinganin
Cer(EOH)	O-acyl-N-(ω -OH-acyl)-6-OH-Sphingosin
Cer(EOP)	O-acyl-N-(ω -OH-acyl)-4-OH-Sphingosin
Cer(EOS)	O-acyl-N-(ω -OH-acyl)-Sphingosin
Cer(NP)	N-acyl-4-OH-Sphinganin
Cer(NS)	N-acyl-Sphingosin
CI	chemical ionization
CID	collision induced dissociation
DC	Dünnschichtchromatographie
EFAD	essential fatty acid deficiency
ELSD	evaporative light scattering detector
EI	electron impact
ES	electrospray
eV	Elektronenvolt
FAB	fast atom bombardment
FD	field desorption
GluCer(NS)	1-O-[β -D-Glucopyranosyl]-N-acyl-Sphingosin
h	Stunde
ICC	automatische Regulierung der Ionenfallenfüllung
ICP	inductive coupled plasma
HPLC	High-performance liquid chromatography
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
m/z	Masse pro Ladung
MALDI	matrix assisted laser desorption-ionization
max	Maximum

Medianw.	Medianwert
min	Minimum
Mittelw.	Mittelwert
MS	Massenspektrometer, massenspektrometrisch
MS/MS	Tandem-massenspektrometrisch
n	Anzahl Meßwerte
NMR	nuclear magnetic resonance
P	statistische Sicherheit
p	Signifikanzniveau
ppb	parts per billion
RF	radio frequency
RI	refractive index
RP	reversed-phase
RT	retention time
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIM	selected ion monitoring
SIMS	secondary ion mass spectrometry
St.-abw.	Standardabweichung
T	Streubereich
t0	Zeitpunkt t0 (Bestrahlung Probanden mit atop. Ekzem)
t1	Zeitpunkt t1 (Bestrahlung Probanden mit atop. Ekzem)
t2	Zeitpunkt t2 (Bestrahlung Probanden mit atop. Ekzem)
TEWL	transepidermal water loss
TIC	total ion current
TOF	time-of-flight
UV	ultraviolett
V	Volt
Var.-koeff.	Variationskoeffizient

1 Einführung

Die menschliche Haut ist mit einer Oberfläche von ca. $1,8 \text{ m}^2$ und einem Anteil von ca. 10 % des Körpergewichtes das größte Organ des Menschen (1). Sie übt zahlreiche lebenswichtige Funktionen aus. Über die Beteiligung an verschiedenen Stoffwechsel-, Speicherungs- und Regulationsvorgängen hinaus verfügt die Haut über wichtige Schutzfunktionen gegenüber äußeren Einflüssen. Neben der Wärmeregulation, dem Schutz vor UV-Strahlung, der Immunabwehr und dem mechanischen Schutz stellt die Bereitstellung einer Permeabilitätsbarriere die wohl wichtigste Funktion der Haut dar (16). Diese Barriere verhindert die Austrocknung des stark wasserhaltigen Körpers in einer trockenen Atmosphäre und ermöglicht somit ein Leben auf dem Land (17, 24, 56). Darüber hinaus wird in Gegenrichtung ein Schutz gegenüber Umweltstoffen wie Schmutz, Chemikalien oder Mikroorganismen gewährleistet (2). Die Haut besteht aus drei funktionellen Schichten. Man unterscheidet die Epidermis (Oberhaut), die Dermis bzw. das Corium (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut). Die Permeabilitätsbarriere ist in der äußersten Schicht der Epidermis, dem Stratum corneum lokalisiert (3, 24). Sie besteht, vereinfachend betrachtet, aus einem Zwei-Komponenten-System von proteinreichen Keratinozyten und interzellulären Lipiden, die in Membrandoppelschichten angeordnet sind (4, 5). Die interzellulären Lipide, die zu 10 % in der Trockenmasse des Stratum corneum enthalten sind (6, 54), bestehen hauptsächlich aus einem Gemisch aus Ceramiden, Cholesterin und freien Fettsäuren. Ceramide stellen eine heterogene Gruppe von Sphingolipiden dar, die mit bis zu 50 % den größten Anteil der Stratum corneum Lipide bilden (7). Die Barrierefunktion der Haut wird maßgeblich von dem Gehalt und der Zusammensetzung der interzellulären Lipidmatrix beeinflusst (8, 9), da selbst kleine Veränderungen in deren Zusammensetzung die Phaseneigenschaften der Lipiddoppelschichten beeinflussen können (34). Veränderungen der Lipidzusammensetzung und insbesondere Veränderungen der Sphingolipide im Stratum corneum sind daher von großer Bedeutung (10, 54). Das trifft sowohl für die Beurteilung der Haut im kosmetischen als auch im medizinischen Sinne zu, da Störungen der Barriereigenschaften mit trockener Haut bis hin zu Hautkrankheiten wie Schuppenflechte (Psoriasis) und atopischem Ekzem in Verbindung gebracht werden (38, 70, 76).

Die Untersuchung des Zustandes der Permeabilitätsbarriere kann neben der Erfassung physikalisch-physiologischer Hautparameter auch durch chemisch-analytische Untersuchung isolierter Stratum corneum Lipide erfolgen.

Neben der Analytik endogener Hautlipide ist auch die Untersuchung exogener Lipide von Interesse, die zur Verbesserung des Hautzustandes bei medizinischen oder kosmetischen Behandlungen topisch auf die Haut aufgebracht werden. Dabei ist sowohl das Aufziehvermögen der zugeführten Lipide als auch deren Einfluß auf die Zusammensetzung der endogenen Hautlipide von Interesse. Im kosmetischen Bereich werden häufig die als klassische rückfettende Substanzen geltenden Triglyceride eingesetzt (11). Darüber hinaus ist aber auch der Einfluß von speziellen hauteigenen Barrirelipiden untersucht worden (12, 13, 38).

Die besondere Wichtigkeit chemisch-analytischer Methoden zur selektiven Hautlipidanalytik ergibt sich auch aus § 5b der Kosmetik-Verordnung des *Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes* (LMBG) (14), nach der ein Hersteller den „(...) *Nachweis der Wirkung eines kosmetischen Mittels, sofern im Verkehr oder in der Werbung darauf hingewiesen wird (...) oder sofern eine Wirkung besonders hervorgehoben wird*“ bereitzuhalten hat. Erkenntnisse der Hautlipidanalytik sind demzufolge natürlich auch bei der Entwicklung von kosmetischen Formulierungen von Interesse.

Sowohl für die Untersuchung der barrierelevanten Sphingolipide als auch zur Quantifizierung der topisch applizierten Lipide ist die Verwendung leistungsfähiger Analysetechniken erforderlich. Im Falle der Sphingolipide gilt es, eine Vielzahl unterschiedlicher molekularer Varianten zu unterscheiden. Bei den topisch applizierten Lipiden müssen diese selektiv von den komplex zusammengesetzten Hautlipiden differenziert werden. Die Untersuchungen können grundsätzlich durch Auftrennung mit Hilfe chromatographischer Techniken wie der Dünnschichtchromatographie (DC) oder der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) vorgenommen werden. Zur weiteren Identifizierung einzelner Substanzen müssen auch spektroskopische Techniken wie die Massenspektrometrie (MS) oder die Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) eingesetzt werden.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen Hautlipide mit der Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie untersucht werden. Dabei steht die Darstellung und Differenzierung der endogenen Sphingolipide (Ceramide) des menschlichen Stratum corneums im Vordergrund, da deren Verteilung eine große Bedeutung im Rahmen der Hautbarrierefunktion zukommt.

Darüber hinaus soll auch die Möglichkeit zur Bestimmung topisch applizierter Lipide untersucht werden, die als rückfettende Komponenten zur Verbesserung der Hauteigenschaften in kosmetischen Formulierungen eingesetzt werden.

Im Einzelnen ergeben sich folgende Ziele:

- Charakterisierung der Hautbarriere-relevanten Sphingolipide (Ceramide) mit einem *atmospheric pressure ionization-electrospray* (API-ES)-Massenspektrometer
- Entwicklung von chromatographischen Trennungen (LC/MS) zur Differenzierung der menschlichen Stratum corneum-Ceramide und zur Quantifizierung von auf die Haut aufgezogenen rückfettenden Substanzen (Acylglycerine)
- Identifizierung isolierter Stratum corneum-Ceramide und Acylglycerine durch massenspektrometrische Fragmentierungsexperimente
- Vergleichende Untersuchungen der Ceramidverteilung im menschlichem Stratum corneum mit Hilfe der Kopplung LC/MS und der klassischen Dünnschichtchromatographie (DC)
- Untersuchung der Ceramidverteilung in Stratum corneum-Lipiden zum Vergleich unterschiedlicher Lipidgewinnungstechniken

- Anwendung der entwickelten LC/MS-Methoden auf hautrelevante Fragestellungen:
 - Vergleich der Ceramidverteilung im menschlichen Stratum corneum bei hautgesunden Probanden und Probanden mit atopischem Ekzem als extreme Form der trockenen Haut
 - Untersuchung möglicher Veränderungen der Ceramidverteilung bei Probanden mit atopischem Ekzem durch eine Bestrahlungstherapie mit einem Sonnensimulator bzw. ultraviolettem Licht
 - Bestimmung der Substantivität von Mandelöl auf Haut nach Anwendung eines mandelöhlhaltigen Testproduktes

3 Allgemeiner Teil

3.1 Haut

3.1.1 Aufbau der Haut

Die menschliche Haut besteht aus mehreren Schichten, die sich histologisch in die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Corium, Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut) differenzieren lassen. Sie ist mit Blutgefäßen, Nerven und Sinnesorganen ausgestattet und wird von den Hautanhangsgebilden, den Haaren bzw. Nägeln und den Talg- und Schweißdrüsen durchdrungen (15, 16). Die Epidermis besteht zu 90 % der Trockenmasse aus Keratinozyten, den eigentlichen Epidermiszellen. Sie bildet ein mehrschichtiges, verhorntes (keratinisiertes) Plattenepithel, das durch proteinreiche Ausstülpungen der Zellmembranen, den Desmosomen, zusammengehalten wird. Die Stärke kann je nach Körperregion zwischen 0,02 mm (Gesichtshaut) und 1-5 mm (Fußsohle) variieren. Die Schichtenbildung der Epidermis resultiert aus der Differenzierung der Keratinozyten auf dem Weg an die Hautoberfläche.

Der Vorgang des Keratinisierungsprozesses wird in den zylindrischen, mitotisch sehr aktiven Zellen des **Stratum basale** initiiert. Die Tochterzellen werden durch rege Zellteilung in weiter außen gelegene Schichten verschoben. In dem sich anschließenden **Stratum spinosum** werden erstmals membranumgrenzte Vakuolen (Odland-Bodies) sichtbar, die die Vorläufersubstanzen der epidermalen Lipide enthalten. Im folgenden **Stratum granulosum** (Körnerschicht) beginnt die Verhornung (Keratinisierung) der Keratinozyten, im sich anschließenden **Stratum lucidum** (Glanzschicht) sind die Zellen bereits so stark abgeflacht, daß keine Zellgrenzen mehr sichtbar sind. Die oberste Schicht der Epidermis, das **Stratum corneum** (Hornschicht), stellt so das Endprodukt der Ausdifferenzierung der Keratinozyten dar (17, 27). Zur Hautoberfläche hin werden die Desmosomen enzymatisch abgebaut, es kommt zur Abschuppung (18, 19). Die Epidermis wird so durch eine stetige Nachproduktion, Differenzierung/Verhornung und Abschilferung der obersten Hornzelle etwa alle 28 Tage erneuert (18). In Abbildung 1 ist ein schematischer Querschnitt durch die drei obersten Schichten der Epidermis dargestellt (15, 16).

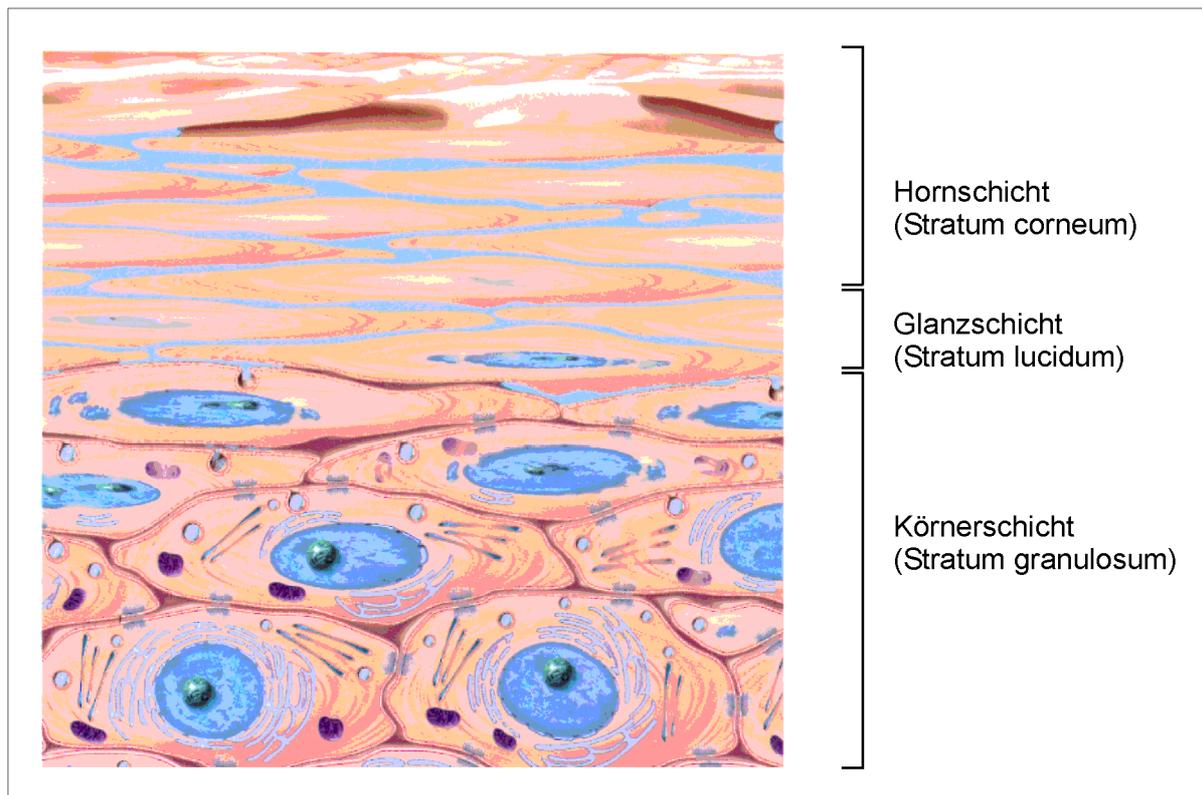


Abbildung 1: Schematische Darstellung der obersten drei Schichten der Epidermis (20)

Die Dermis stellt ein gut durchblutetes, von Lymphbahnen und Nerven durchzogenes Bindegewebe dar. Sie gliedert sich in ein dünnes, zell- und gefäßreiches Stratum papillare und ein dickes, faserreiches Stratum reticulare. Das Stratum papillare stellt die Nährstoffversorgung der untersten Epithelschicht der Epidermis, den Basalzellen, sicher. Das Stratum reticulare besteht zum größten Teil aus einem Netzwerk von kaum dehnbaren Kollagenfasern, die für die hohe Elastizität und Zugfestigkeit der Lederhaut verantwortlich sind. Darüber hinaus sind auch dehnbare Elastin- und Retikulinfasern enthalten. Die faserigen Proteine sind in eine gallertartige Grundsubstanz eingebettet, die aufgrund ihres hohen Wasserbindungsvermögens den Gewebeeindruck reguliert. Sie enthält als wesentliche Bestandteile makromolekulare Proteoglycan-Hyaluronat-Komplexe (15, 16). Die Subcutis (Unterhaut-Fettgewebe) wird von einem lockeren, stark dehnbaren Bindegewebe gebildet, das Agglomerate von Fettzellen enthält. Sie dient neben der Speicherung von Nährstoffen auch der Isolation des Körpers gegen Kälte. Die Subcutis ist nicht scharf von der Dermis abgetrennt und in ihrer Ausdehnung variabel, so daß eine gewisse Verschiebbarkeit der Haut ermöglicht wird.

3.1.2 Lokalisierung und Aufbau der Permeabilitätsbarriere

Die Regulierung des Wasserhaushaltes ist eine wichtige Hautfunktion. Modellrechnungen für den Verdunstungsverlust von hydratisiertem Gewebe zeigen, daß Lebewesen ohne Kontrolle eines übermäßigen Wasserverlustes nicht existieren können (21, 22). Der effektive Schutz vor einem zu großen transepidermalen Wasserverlust (*transepidermal water loss*, TEWL) ist bei Säugetieren auf die Ausbildung einer Permeabilitätsbarriere zurückzuführen. Diese Barriere wird durch die wenige μm dicke Schicht des Stratum corneum als spezifische Leistung der Epidermis gebildet (23, 24).

Der Nachweis für die Lokalisierung der Permeabilitätsbarriere gelang durch sogenannte Hautstripping-Versuche. Nachdem die aufeinanderfolgenden Schichten des Stratum corneums durch wiederholtes Anpressen und Abziehen von Klebeband entfernt wurden, stieg der TEWL sprunghaft an (25).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Stratum corneums zeigt bei Präparation mit speziellen Fixierungsverfahren (Ruthenium- oder Osmiumtetroxid) multilamellare Membransysteme, die zwischen den kernlosen Keratinozyten ausgebildet werden (26). Als wesentliche Bestandteile dieser Membransysteme wurden mit Hilfe chemisch-analytischer Untersuchungsverfahren neutrale Lipide identifiziert (6, 64).

Zum Verständnis der Morphologie und Funktion des Stratum corneums wurde das „bricks and mortar“ (Steine und Mörtel)-Barrieremodell entworfen (27, 28). Demnach besteht die Permeabilitätsbarriere aus keratinisierten Keratinozyten (bricks), die von einer interzellulären Lipidmatrix (mortar) umgeben sind.

Diese Vorstellung korreliert mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Gefrierbruch) des Stratum corneums (Abbildung 2). Die Aufnahme zeigt die Keratinozyten; die dazwischen befindlichen interzellulären Räume sind z. T. mit einer kittartigen Masse ausgefüllt, bei der es sich vermutlich um die Lipidmatrix handelt.

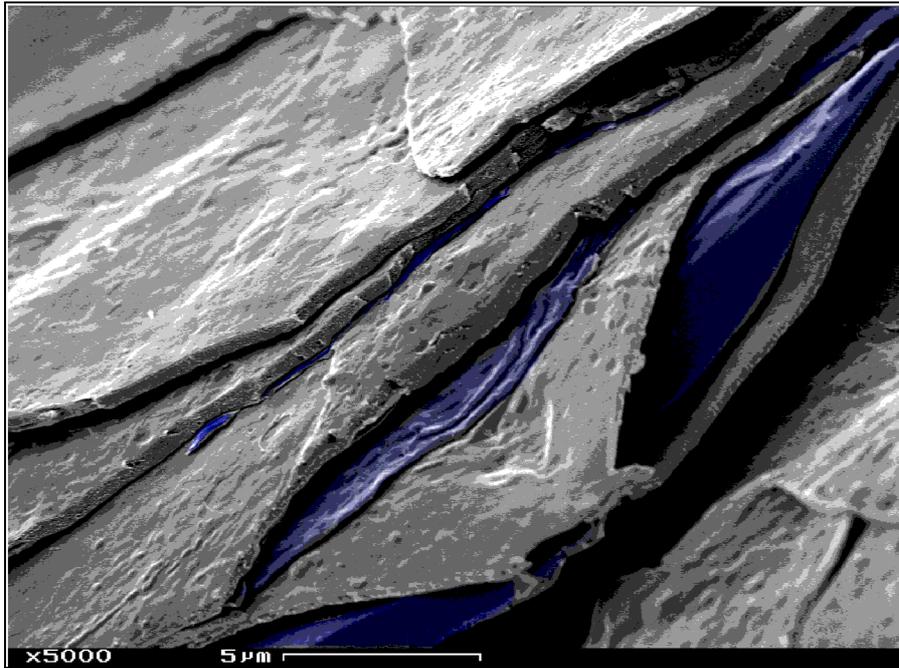


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Stratum corneums (29)

Hauptbestandteile der neutralen Lipide sind Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterin (24, 54). Die polaren Vorläufersubstanzen dieser Lipide, u. a. Glucosylceramide, werden im Golgi-Apparat der Keratinozyten im oberen Stratum spinosum gebildet (30, 31) und in Form membranbegrenzter Vakuolen („Odland-Bodies“ oder Keratinosomen) gespeichert. In der oberen Schicht des Stratum granulosum verschmelzen die Organellen mit der Zellmembran und geben ihren Inhalt durch Exozytose in den interzellulären Raum ab (30, 32). Durch enzymatisch katalysierte Vorgänge werden aus den polaren Lipidvorstufen anschließend neutrale Lipide gebildet.

Zur Erklärung der in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennbaren multilamellaren Strukturen ist in Abbildung 3 eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme dieser Strukturen mit einem Modell zur möglichen Anordnung der Lipide dargestellt. Die Ausbildung lamellarer Strukturen kann auf den amphiphilen Molekülaufbau der Ceramide, freien Fettsäuren und des Cholesterins zurückgeführt werden (3, 10). Die lamellaren Strukturen entstehen demnach durch eine spezielle Anordnung der Stratum corneum-Lipide, bei der sich polare und unpolare Molekülteile gegenüberstehen (42).

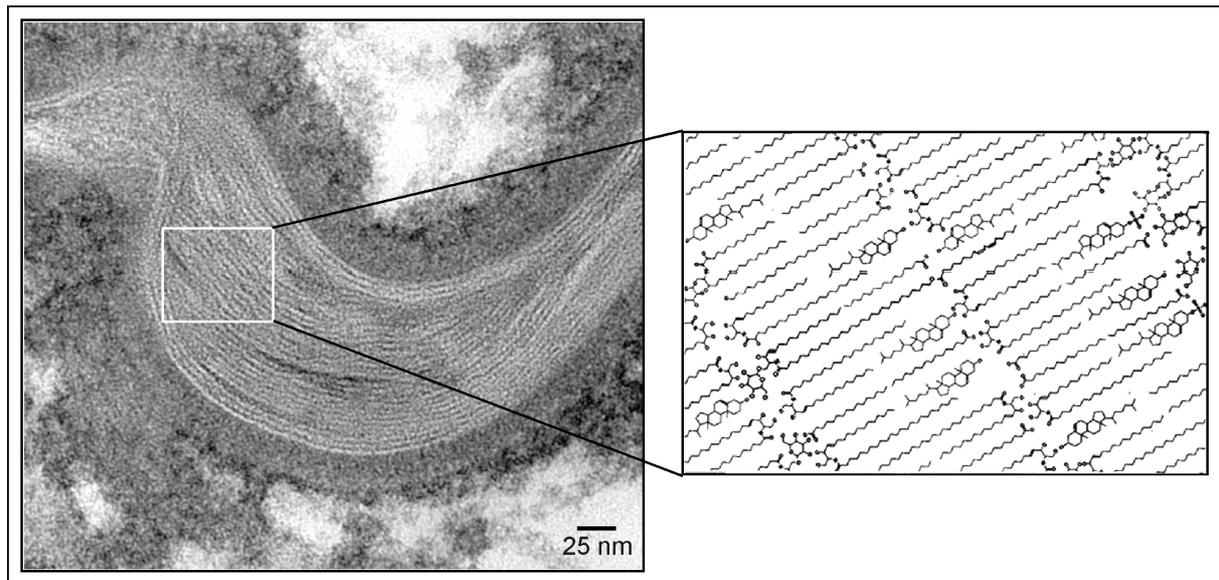


Abbildung 3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von lamellaren Strukturen in der interzellulären Lipidmatrix des Stratum corneums. Schematische Darstellung zur Anordnung der Stratum corneum-Lipide (29)

Mit der Vorstellung von ausschließlich kristallin vorliegenden Lipidstrukturen im Stratum corneum sind aber Mechanismen der selektiven Permeabilität von Substanzen nur schwer zu erklären. Aus diesem Grund wurden weitere Modellsysteme entwickelt, die von einer heterogenen Struktur ausgehen.

Zur Erklärung möglicher Penetrationsmechanismen wurde das „domain mosaic model“ entworfen, in dem die Lipide des Stratum corneums mosaikartig aufgebaut sind (33, 34). Die Mosaikbausteine bestehen aus mehreren kristallin vorliegenden Lipiden und Zwischenräumen, die flüssig-kristalline Zustände aufweisen. Diese flüssig-kristalline Zustandsform ist in gewisser Weise permeabel und ermöglicht so eine Regulierung der Diffusion.

3.1.3 Lipide der Haut

Die Lipide der Haut lassen sich in die oberflächlichen Sebumlipide und die interzellulären Lipide des Stratum corneums unterscheiden. Die Gewinnung bzw. Isolierung zur chemisch-analytischen Untersuchung kann mit verschiedenen Techniken erfolgen. Die Hautlipide können mit Lösungsmittelgemischen extrahiert (35, 36, 37) oder mit Hilfe von Cyanoacrylat- oder Klebebandabrissen gewonnen werden (38, 39). Weiterhin werden adsorptive Techniken unter Verwendung von auf die Haut aufgedrücktem Zigarettenpapier oder Bentonitpasten beschrieben, die zur Gewinnung von Sebumlipiden geeignet sind (40). Zur deren semiquantitativen Bestimmung kann auch die sogenannte Sebumetermethode verwendet werden. Hierbei wird eine Meßkassette auf die zu untersuchende Haut aufgedrückt. Die vorliegende Fettmenge bewirkt eine Transparenzvermehrung des enthaltenen Kunststoffbandes, die photometrisch vermessen wird (41).

Sebumlipide

Das Hautoberflächenfett (Sebum) wird zum größten Teil in den Talgdrüsen gebildet und durch Follikelöffnungen auf die Hautoberfläche gebracht. In Tabelle 1 ist die Zusammensetzung der Sebumlipide angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung menschlicher Sebumlipide (42)

Lipid	Anteil in %
Triglyceride	60
Wachsester	25
Squalen	12
Cholesterinester	2
Cholesterin	< 1

Auf der Hautoberfläche wird allerdings ein etwa um die Hälfte geringerer Anteil an Triglyceriden gefunden, da diese während der Passage durch die Ausführungsgänge der Hautanhangsorgane durch bakterielle Aktivitäten teilweise zu freien Fettsäuren hydrolysiert werden (42). Zu einem geringen Anteil sind im Hautoberflächenfett auch

die Lipide des Stratum corneum enthalten. Die Sebumlipide halten Haut und Haare geschmeidig, eine Korrelation zwischen Hauttrockenheit und Talgdrüsenaktivität besteht aber nicht (43, 44). Als lipophiler Anteil des Hydrolipidfilms der Haut vermitteln Sebumlipide auch eine antibakterielle und fungizide Wirkung.

In Hinblick auf die epidermale Barriere spielen die Sebumlipide nur eine untergeordnete Rolle (45). So konnte gezeigt werden, daß Körperregionen, die reich an Talgdrüsen sind, keine bessere Barrierefunktion aufweisen als Regionen, die arm an Talgdrüsen sind (46). In einer Untersuchung von Kindern vor der Pubertät, die beinahe keinen Talg produzieren, wurde ebenfalls bewiesen, daß die Haut zur Aufrechterhaltung des Schutzes vor Wasserverlust nicht von der Talgproduktion abhängig ist (47).

Lipide des Stratum corneums

Der Gesamtgehalt sowie die Zusammensetzung der Lipide im Stratum corneum ist nicht einheitlich. Je nach Körperareal (48) bzw. Schichttiefe (49), Lebensalter (50) und Jahreszeit (39, 51, 52) können die einzelnen Anteile variieren. Die in Tabelle 2 angegebene Zusammensetzung gibt eine typische Verteilung der vorkommenden Lipide wieder.

Tabelle 2: Zusammensetzung der menschlichen Stratum corneum-Lipide (53)

Lipid	Anteil in %
Ceramide	41
Cholesterin	27
Fettsäuren	10
Cholesterinester	10
Cholesterinsulfat	2
Andere	11

Die Stratum corneum-Lipide bestehen hauptsächlich aus Ceramiden, Cholesterin und Fettsäuren (54, 55). Als weitere Bestandteile der Stratum corneum-Lipide wurden zum Teil auch Alkane (Kohlenwasserstoffe) (56, 57) und Triglyceride beschrie-

ben, deren Anwesenheit in isolierten Hautlipiden auch im Zusammenhang mit Umweltkontaminationen (58) bzw. miterfaßtem Hautsebum (59) diskutiert wird.

Die größte Gruppe der Stratum corneum Lipide wird von den Ceramiden gebildet, die zu der Klasse der Sphingolipide gehören. Sie entstehen durch Hydrolyse von Glucosylceramiden, die aus den Odland-Bodies freigesetzt werden (60, 61) (vgl. Absatz 3.1.2). Ceramide bestehen aus Sphingosin-, Dihydrosphingosin (Sphinganin) bzw. Phytosphingosinbasen (4-OH-Sphinganin), die in Amidbindung eine Fettsäure, α -OH-Fettsäure oder ω -OH-Fettsäure enthalten (62, 63, 64).

Die Ceramide des menschlichen Stratum corneum können dünnschichtchromatographisch in Fraktionen aufgeteilt werden (38, 65, 66). Die Bezeichnung der Ceramide erfolgte zunächst durch Numerierung der getrennten Banden in der Reihenfolge steigender Polarität (67). Zur weitergehenden Untersuchung wurden die Ceramide nach dünnschichtchromatographischer Fraktionierung hydrolysiert und die entstandenen sphingoiden Basen und Fettsäuren nach Derivatisierung gaschromatographisch bestimmt (65, 68, 69). Neuere Ceramidbezeichnungen verwenden Kürzel zur Beschreibung des jeweilig enthaltenen Fettsäure- und Basentyps (70). Eine Aufschlüsselung dieser Kürzel ist in Tabelle 3 dargestellt, da diese Art der Bezeichnung auch in dieser Arbeit verwendet wird.

Tabelle 3: Kürzel zur Beschreibung des in Ceramiden enthaltenen Fettsäure- und Basentyps nach Motta et al. (70)

Kürzel	Bedeutung
E	estergebundene Fettsäure
O	ω -OH-Fettsäure
A	α -OH-Fettsäure
N	nichthydroxylierte Fettsäure
S	Sphingosin
H	6-OH-Sphingosin
P	Phytosphingosin

In Abbildung 4 ist eine Übersicht der im menschlichen Stratum corneum enthaltenen Ceramide angegeben, wie sie von Robson et al. (67) beschrieben wurden. Die Bezeichnungen entsprechen den Nomenklatura von Robson et al. und Motta et al. (70).

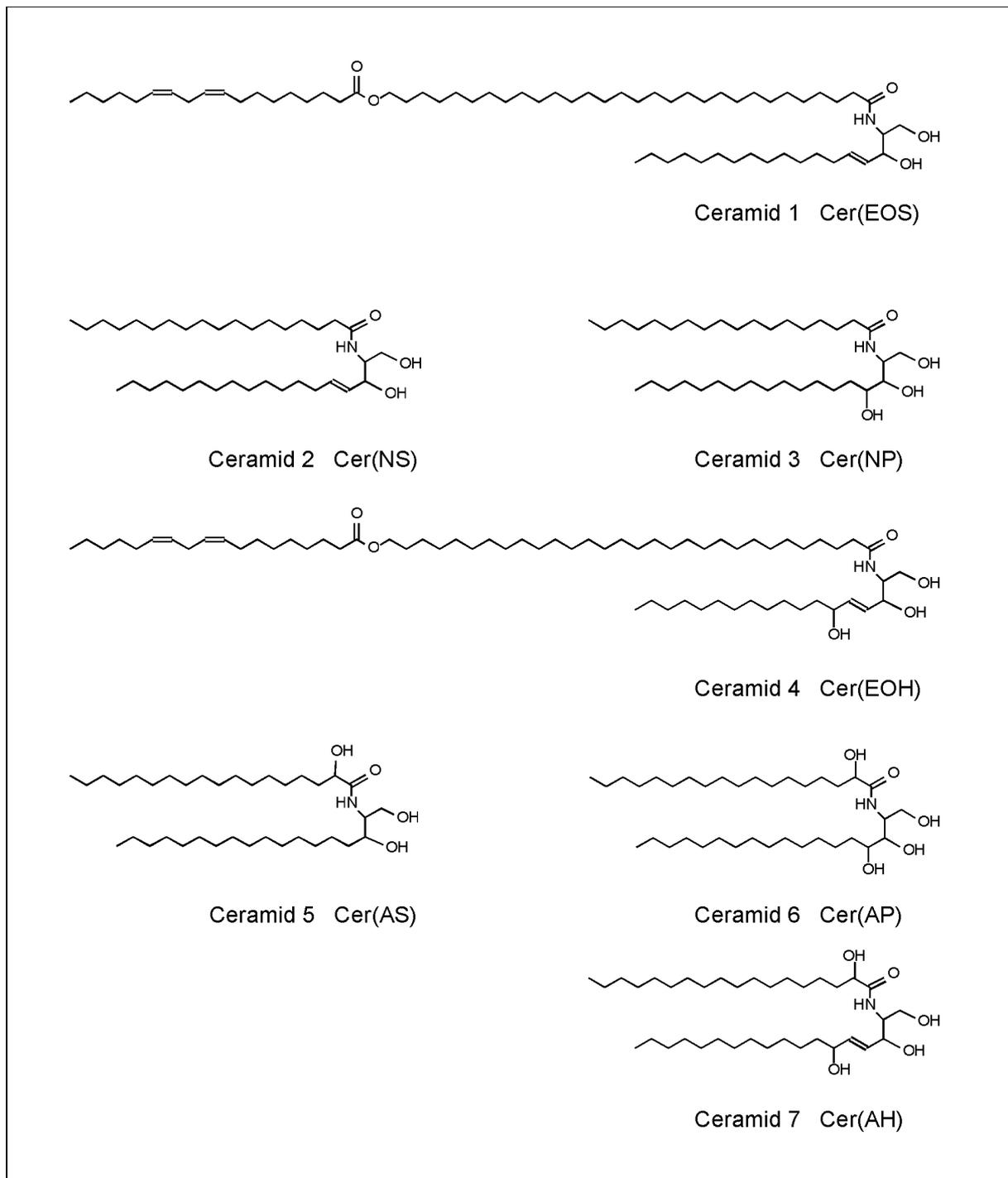


Abbildung 4: Ceramide des menschlichen Stratum corneum (67). Die Bezeichnungen der Ceramide folgen den Nomenklatura nach Robson et al. (67) und Motta et al. (70).

Ceramid 1 bzw. Cer(EOS) enthält Sphingosinbasen, die amidartig mit ω -OH-Fettsäuren verbunden sind. An diese ist eine weitere Fettsäure verestert, in der Regel Linolsäure. Ceramid 2 bzw. Cer (NS) enthält Sphingosin- und Sphinganinebasen, die mit nichthydroxylierten Fettsäuren amidartig vernüpft sind. Ceramid 3 bzw. Cer(NP) enthält ebenfalls nichthydroxylierte Fettsäuren, als sphingoide Basen sind Phytosphingosine enthalten (71). Ceramid 4 bzw. Cer(EOH) entspricht weitgehend dem Cer(EOS), jedoch sind als sphingoide Basen 6-OH-Sphingosine enthalten. Ceramid 5 bzw. Cer(AS) setzt sich aus Sphingosinbasen und α -OH-Fettsäuren zusammen, Ceramid 6 bzw. Cer(AP) wird aus Phytosphingosinbasen und α -OH-Fettsäuren gebildet. Die Fraktion Ceramid 7 bzw. Cer(AH) besteht aus 6-OH-Sphingosinbasen und α -OH-Fettsäuren (67).

In Tabelle 4 ist die Ceramidverteilung im Stratum corneum von erwachsenen Probanden mit gesunder Haut dargestellt, wie sie von Robson et al. (67) mit dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen bestimmt wurde. Die angegebenen Anteile können aber wie die Lipide des Stratum corneums Veränderungen unterliegen.

Tabelle 4: Verteilung der Ceramide aus menschlichem Stratum corneum (67)

Ceramide, Nomenklatur nach...		Anteil in %
Motta et al. (70)	Robson et al. (67)	
Cer(EOS)	1	8
Cer(NS)	2	21
Cer(NP)	3	13
Cer(EOH)	4	4
Cer(AS)	5	27
Cer(AP)	6	4
Cer(AH)	7	22

Dem unpolarsten Ceramid, Cer(EOS), wird im Hinblick auf die Ausbildung der lamellaren Lipidstrukturen innerhalb der Stratum corneum-Lipide eine besondere Rolle zugeschrieben. Durch die ω -veresterte Linolsäure, die in die darüberliegende Membranlage hineinreicht, wird eine Stabilisierung benachbarter Membranen vermutet

(72, 73). Bei Mangel an essentiellen Fettsäuren (*essential fatty acid deficiency*, EFAD) wird statt Linolsäure Ölsäure in das Cer(EOS) eingebaut. Dieser Austausch bewirkt veränderte interzelluläre Membraneigenschaften, einen gesteigerten transepidermalen Wasserverlust und ein gestörtes epidermales Gleichgewicht (74, 75). Veränderungen der Ceramidverteilung im Stratum corneum werden auch für eine Reihe von Hautanomalien wie atopisch ekzematöse oder an Schuppenflechte erkrankter Haut beschrieben. Das atopische Ekzem ist eine Hauterkrankung, von der ca. 10 % der Bevölkerung der westlichen Industrienationen betroffen sind. Neben einer Funktionsstörung des Immunsystems wird diese entzündliche Hautveränderung mit einer gestörten Hautbarriere in Verbindung gebracht, die durch eine qualitative und quantitative Veränderung der Lipidzusammensetzung der Epidermis charakterisiert ist (38, 76, 77, 78). Die Folgen sind ein vermindertes Wasserbindungsvermögen der Haut, ein erhöhter transepidermaler Wasserverlust und ein eingeschränkter Schutz gegenüber potentiellen exogenen Schadstoffen.

Patienten mit atopischem Ekzem leiden häufig an rauher und juckender Haut und zeigen eine extreme Form des trockenen Hautzustandes. In Abbildung 5 ist eine Aufnahme eines befallenen Hautareals abgebildet.



Abbildung 5: Aufnahme der Haut eines Patienten mit atopischem Ekzem [79]

In der sonnenreichen Jahreszeit ist bei den meisten Betroffenen ein Rückgang der klinischen Symptomatik zu verzeichnen. Aufgrund dieser Beobachtung ist die Bestrahlung der Patienten mit UV-Licht zu einem gängigen Therapieverfahren geworden. Als nebenwirkungsarme Behandlungsmethode hat sich in den letzten Jahren insbesondere die Bestrahlung mit langwelliger UV-A Strahlung (340-400 nm) etabliert.

Ultraviolettes Licht verfügt über immunmodulatorische Eigenschaften und vermag so die Entzündungsneigung der atopischen Haut günstig zu beeinflussen. Eine gleichzeitige Verbesserung des Zustandes der Hautbarriere in Form einer veränderten Lipidzusammensetzung ist bisher unklar.

3.2 Massenspektrometrie

Die Technik der Massenspektrometrie kann grundsätzlich auf die Arbeiten von Dempster (1918) und Aston (1919) zur Isotopentrennung bzw. Entwicklung eines Sektorfeld- „Massenspektrographen“ zurückgeführt werden (80). Der Durchbruch als Technik in der chemischen Analytik erfolgte in den 60er Jahren. Heute können mit Hilfe der Massenspektrometrie Isotopenverteilungen von Elementen dargestellt, die elementare oder molekulare Zusammensetzung von Proben charakterisiert und die Struktur und molekulare Masse einer Verbindung untersucht werden. Die Massenspektrometrie stellt neben der Kernresonanzspektroskopie (NMR) das wichtigste Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung chemischer Verbindungen dar (81).

In der Massenspektrometrie wird eine Substanzprobe in einen Strahl gasförmiger Ionen übergeführt, die entsprechend ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt werden. Als Ergebnis kann festgestellt werden, welche Ionen in welchen relativen Mengen entstanden sind (82, 83).

3.2.1 Aufbau und Technik von Massenspektrometern

Die Zuführung der zu untersuchenden Probe in benötigter Form und Menge erfolgt durch geeignete **Einlaßsysteme**. Da die massenabhängigen Eigenschaften neutraler Moleküle nicht für analytische Methoden verwendet werden können, ist die Erzeugung von Ionen mit Hilfe einer **Ionenquelle** notwendig. Die Ionen werden anschließend im Hochvakuum durch elektrische Beschleunigung in einen **Analysator** geleitet und dort nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Die Detektion der Ionen erfolgt in einem **Ionendetektor**. Die Darstellung wird in einer **Registriereinheit** in einer Art und Weise vorgenommen, die zur Bestimmung der Masse und Häufigkeit der Ionen geeignet ist (83).

Einlaßsysteme und Ionenquellen

Grundsätzlich lassen sich drei Möglichkeiten zur Einführung von Substanzen in ein Massenspektrometer unterscheiden:

- die Probe wird vor der Ionisierung verdampft
- Ionen werden direkt aus einer kondensierten Phase in die Gasphase übergeführt
- die gelöste Probe wird zu einem Nebel zerstäubt (Spray-Verfahren)

Im ersten Fall kann die Probe direkt oder indirekt zugeführt werden. Bei der direkten Zuführung wird die Probe mit einer Schubstange durch eine Vakuumschleuse direkt in die Ionenquelle gebracht. Bei indirekter Zuführung erfolgt die Verdampfung der Probe in einem heizbaren Gefäß, das durch eine feine Öffnung (sog. Molekularleck) mit der Ionenquelle verbunden ist. Auch bei der Kopplung mit einem Gaschromatographen bzw. Flüssigchromatographen unter Verwendung eines *particle beam*-Interfaces wird die Probe vor der Ionisierung verdampft.

Bei Verwendung dieser Einlaßsysteme erfolgt die Ionisierung des Analyten in der Regel durch Elektronenstoßionisation (*electron impact*, EI) bzw. Chemische Ionisierung (CI). In der Elektronenstoßionisation wird senkrecht zum Molekülstrom der Probe ein Elektronenstrahl von einer Glühkathode zu einer Anode hin beschleunigt. Die Energie der Elektronen wird in der Regel mit 70 eV gewählt. Da für die Bildung von Molekülionen aber nur 10-15 eV benötigt werden, führt die überschüssige Energie zu Fragmentierungen des Moleküls. Diese Fragmentierung verläuft reproduzierbar nach bestimmten Regeln, so daß mit Hilfe des Fragmentspektrums Hinweise auf die Struktur der untersuchten Substanz erhalten werden können. Bei der Chemischen Ionisierung erfolgt die Ionisierung der Probe indirekt in Gegenwart eines großen Überschusses eines Reaktandgases durch Ionen-Molekül-Reaktionen. Diese schonendere Ionisierung läßt einen größeren Prozentsatz an unfragmentierten Molekülionen (in der Regel $[M+H]^+$) entstehen, die für die Identifizierung von Substanzen wichtig sind (84).

Im zweiten Fall wird die zu messende Substanz direkt oder zusammen mit sog. Matrixsubstanzen auf eine feste Oberfläche aufgebracht und mit energiereichen Partikeln bzw. mit einem Laserstrahl beschossen oder einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Je nach Aufbau und Eigenschaften unterscheidet man dabei hauptsächlich in *field desorption* (FD), *fast atom bombardment* (FAB), *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) oder *secondary ion mass spectrometry* (SIMS). Die letztgenannte Methode zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß der zur Ionisierung verwendete Primärionenstrahl (z. B. Cs^+ oder O^-) gebündelt über die Probenoberfläche geführt werden kann, was die Bestimmung „orts aufgelöster“ Massenspektren ermöglicht (81).

Die Sprayverfahren als die dritte genannte Möglichkeit werden heute in der Regel zur Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (LC/MS) verwendet. Je nach Ausführung unterscheidet man die Verfahren Thermospray bzw. Ionspray/Electrospray. Das Prinzip der Ionisierung besteht grundsätzlich darin, daß Nebeltröpfchen, die geladene positive oder negative Teilchen im Überschuß enthalten, durch Verdampfung neutrale Lösungsmittelmoleküle verlieren. Eine genauere Beschreibung dieser Mechanismen wird in Abschnitt 3.2.3 vorgenommen.

Weiterhin gibt es aber auch noch andere Ionisierungstechniken, wie sie z. B. in der *inductively coupled plasma* (ICP)- oder Funkenstrahl-Massenspektrometrie Verwendung finden. Diese Techniken gelangen bei der Analytik von Metallen und anorganischen Verbindungen zum Einsatz.

Analysatoren

Die Verwendung der Analysatoren richtet sich nach den gewünschten Eigenschaften der Massentrennung (z. B. Auflösung, Massenbereich) bzw. nach der eingesetzten Ionenquelle.

Bei elektromagnetischen Sektorfeldgeräten beruht die Massentrennung auf der Ablenkung der Ionen in einem Magnetfeld. Diese Technik ermöglicht eine sehr gute Massenauflösung, ist aber auch vergleichsweise aufwendig in der Handhabung und der Anschaffung. Quadrupol-Massenspektrometer enthalten vier parallel im Quadrat

angeordnete Metallstäbe, von denen jeweils zwei leitend miteinander verbunden sind. Die Ionentrennung erfolgt durch Ablenkung mit Hilfe elektrischer Felder. Durch geeignete Abstimmung angelegter Gleich- und Wechselspannungen wird erreicht, daß jeweils nur Ionen eines Masse/Ladungsverhältnisses das Stabsystem passieren können. Quadrupol-Massenspektrometer zeichnen sich durch eine gute quantitative Reproduzierbarkeit und einfache Handhabung aus. Ionenfallen (*ion trap*)-Massenspektrometer akkumulieren Ionen in einem geschlossenen quadrupolaren Hochfrequenzfeld. Durch Schwingungsanregungen werden die Ionen je nach Masse/Ladungsverhältnis wieder aus der Ionenfalle herausgeschleudert. Der genaue Aufbau bzw. die Funktion einer Ionenfalle wird in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Bei Flugzeit-Massenspektrometern (*time-of-flight*, TOF) treten die gebildeten und beschleunigten Ionen in ein feldfreies Flugrohr ein. Die Trennung der Ionen ist auf die massenabhängige Flugzeit zurückzuführen.

Durch Kombination mehrerer Trennprozesse (MS/MS oder Tandem-MS) können durch induzierte Fragmentierungen weitere Untersuchungen an den gebildeten Ionen vorgenommen werden. Als gängigste Ausführungen finden Triple-Quadrupol- und die Ionenfallen-Massenspektrometer Verwendung. Beim Triple-Quadrupol-Gerät dient der erste Quadrupol der Massenanalyse, der zweite zum Hindurchleiten durch eine mit Gas gefüllte Kollisionskammer und der dritte wiederum zum Scannen der gebildeten Fragmente. In der kostengünstigeren Ionenfallen-Variante finden die Schritte der Ionenisolierung, Fragmentierung und Produktionenanalyse nicht räumlich getrennt, sondern in zeitlicher Abfolge in der Ionenfalle statt. Darüber hinaus ist auch die Möglichkeit zu wiederholter Fragmentierung (MS^n) der „getrapten“ Ionen möglich.

Detektion und Registrierung

In der Massenspektrometrie werden zur Detektion der Ionen meist Sekundärionenvervielfacher (SEV) verwendet. Hierbei werden durch auftreffende Ionen Elektronen aus einer Kathode geschlagen, die durch eine Saugspannung zur Anode geleitet werden. Dabei werden durch Aufprall auf mehreren, mit immer höheren Spannungen geladenen Dynoden nach und nach kaskadenartig immer mehr Elektronen herausgeschlagen (Sekundärionen), was die Empfindlichkeit der Detektion wesentlich ver-

bessert. Die Gesamtzahl der durch den Analysator tretenden Ionen wird durch den Totalionenstrom (*total ion current*, TIC) ausgedrückt. Bei Aufzeichnung des TIC kann in der Kopplung mit chromatographischen Trenntechniken zu jeder Stelle im Chromatogramm ein Massenspektrum abgerufen werden. Werden nur einzelne Ionen in einem Chromatogramm dargestellt, wird dies als *extracted ion chromatogram* bzw. Massenspur bezeichnet. Durch Aufzeichnung einzelner Massen, dem *selected ion monitoring* (SIM-mode), kann in der Quadrupol-Massenspektrometrie die Empfindlichkeit bis zu 2-3 Zehnerpotenzen auf den unteren ppb-Bereich gesteigert werden.

3.2.2 Kopplung LC/MS

Die Kopplung Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie verbindet die Trennleistung flüssigchromatographischer Verfahren mit dem Informationsgehalt massenspektrometrischer Detektion. Die Anwendung dieser Technik ist speziell bei der Untersuchung nichtflüchtiger, polarer oder thermolabiler Substanzen interessant, die der Gaschromatographie nicht zugänglich sind.

Die Verbindung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit der Massenspektrometrie erscheint grundsätzlich inkompatibel, da die Massenspektrometrie ein Vakuum von ca. 10^{-5} mbar erfordert, Standardanwendungen der HPLC aber unter einem relativ hohen Volumenstrom ablaufen (1 ml/min). Die Überführung von gelösten Molekülen zu Ionen in der Gasphase stellt so ein apparatives Problem dar. Zur Überwindung dieses scheinbaren Gegensatzes wurden in der Vergangenheit mit verschiedenen Interface-Techniken Lösungen entwickelt. Eine der ersten Techniken stellte das *moving-belt*-System dar, bei dem der LC-Eluent auf ein Endlosband aufgetropft und über mehrere Vakuumstufen in das Massenspektrometer eingeführt wurde. Mit Entwicklung der *direct liquid introduction*, dem *particle beam*- und *thermo-spray*-Interface wurde eine gewisse Alltagstauglichkeit erreicht, obgleich der hohe Stoffeintrag schnell zu Verschmutzungen des Massenspektrometers führte und so Wartungsintervalle verkürzte.

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von Kopplungstechniken stellt die *atmospheric pressure ionization* (API)-Technik dar. Obwohl die Verwendung der API-Technik als Ionenquelle in der Massenspektrometrie bereits 1958 beschrieben wurde (85, 86), gelang dieser Technik erst 30 Jahre später der Durchbruch, nachdem über die Darstellbarkeit mehrfachgeladener Proteine berichtet wurde (87). In der *electrospray ionization* (ES) bzw. der *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI)-Ionenquelle werden die Analytmoleküle bei Atmosphärendruck ionisiert und durch elektrostatische Potentiale unter Abtrennung neutraler Lösungsmittelmoleküle in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers geleitet. Eine genaue Beschreibung des Ionisierungsprozesses erfolgt in Abschnitt 3.2.3. Die APCI-Ionenquelle unterscheidet sich von der ES-Quelle durch ein beheiztes Sprührohr, an dessen Ende eine Corona-Entladung die Ionisierung der Analytmoleküle mit Ladungsübertragungen unterstützt.

Veränderungen in der Ausführung der ES-Ionenquellen stellen die jüngsten Entwicklungen dar, um Beeinträchtigungen des Electrospray-Ionisierungsprozesses durch matrixbelastete Proben zu verringern und bessere Signal-Rauschverhältnisse zu erhalten. In den ersten Ausführungen der ES-Ionenquellen wurde der HPLC-Eluent noch direkt (bzw. leicht dezentral) in Richtung der Öffnung des eigentlichen Massenspektrometers versprüht. Neuere Ausführungen enthalten sogenannte *off-axis* nebulizer (88), die den Eluent orthogonal versprühen (Fa. Agilent) bzw. sog. Z-Spray Ionenquellen, die die versprühten Tröpfchen doppelt orthogonal ablenken (Fa. Micromass).

3.2.3 API-ES (Ion Trap) Massenspektrometer

Ionisierung in der API-ES-Ionenquelle

In einer Electrospray-Ionenquelle wird der Flüssigkeitsstrom unter Atmosphärendruck infolge eines starken elektrostatischen Potentialgefälles von ca. 4 - 6 kV versprüht. Bei höheren Flußraten wie z. B. bei der Kopplung mit der HPLC wird der Vorgang pneumatisch mit Stickstoff als Sprühgas unterstützt. Der Aufbau einer ES-Ionenquelle und ein Schema der Ionisierung ist in Abbildung 6 dargestellt.

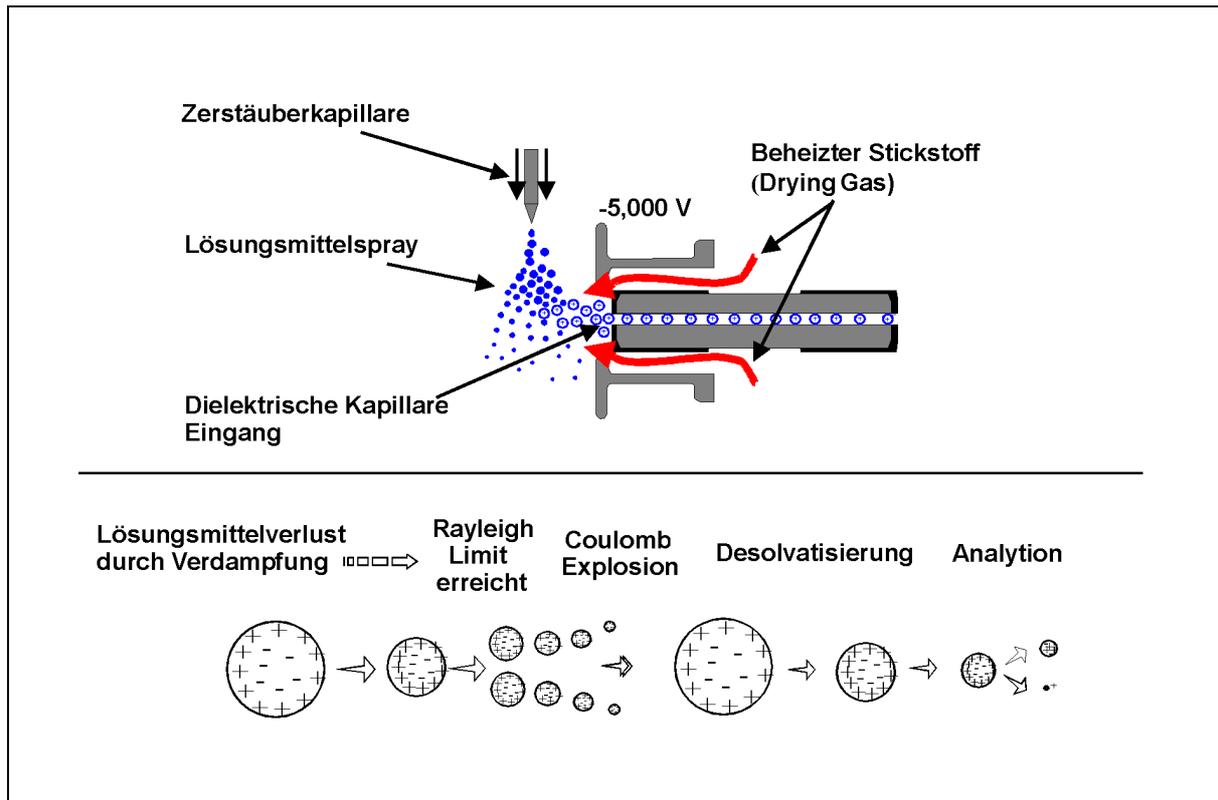


Abbildung 6: API-Electrospray Ionisierung (89)

Durch die Kombination des starken elektrostatischen Feldes und der Scherkräfte des Sprühgas wird der Flüssigkeitsstrom bei Austritt aus der Zerstäuberkapillare in kleine Tröpfchen gebrochen. Unter Einwirkung eines geheizten Stickstoff-Trockengasstromes (drying gas) verdampfen neutrale Lösungsmittelmoleküle aus den Tröpfchen. Der geheizte Trockengasstrom wirkt auch als sogenannter „gas curtain“ Clusterbildungen von Lösungsmittel- und Analytionen entgegen, die bei Expansion von Analytionen und Lösungsmittelmolekülen im Vakuum durch die Abkühlung entstehen würden.

Der Zusammenhang zwischen der Ladung der Tröpfchen, der Oberflächenspannung und dem Radius wird durch die Rayleigh-Gleichung beschrieben:

$$Q^2 = 64\pi^2 \cdot \epsilon_0 \cdot \gamma \cdot r^3$$

Q Ladung

γ Oberflächenspannung

r Radius

ϵ_0 Dielektrizitätskonstante im Vakuum

Wenn die Ladungsdichte bei hinreichender Verkleinerung der Tröpfchen die Oberflächenspannung übersteigt, wird das „Rayleigh-Limit“ erreicht, was in einer „Coulomb“-Explosion resultiert. Es wird so eine Vielzahl geladener Mikrotröpfchen erzeugt, die nach entsprechender Verkleinerung erneut explodieren. Nach Verdampfen der Lösungsmittelmoleküle geht die Ladung auf den Analyten über. Diese Modellvorstellung wird auch als *charge residue model* bezeichnet (90). Eine weitere Modellvorstellung, das *ion evaporation model*, beschreibt, daß ab einer Tröpfchengröße von ca. 10 nm geladene Analytionen aus den Tröpfchen herausgeschleudert werden (91, 92).

In dem in dieser Arbeit verwendeten ESQUIRE-Massenspektrometer (Esquire= **external source quistor resonance ejection**; quistor= **quadrupolar ion storage**; Fa. Bruker Daltonik, Bremen) gelangen die geladenen Analytionen durch eine Transferkapillare in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers. Nach Abtrennung neutraler Lösungsmittelmoleküle an einem Skimmersystem werden die Ionen mit Hilfe eines Octopols fokussiert und in der Ionenfalle nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. In Abbildung 7 ist der schematische Aufbau des Massenspektrometers abgebildet.

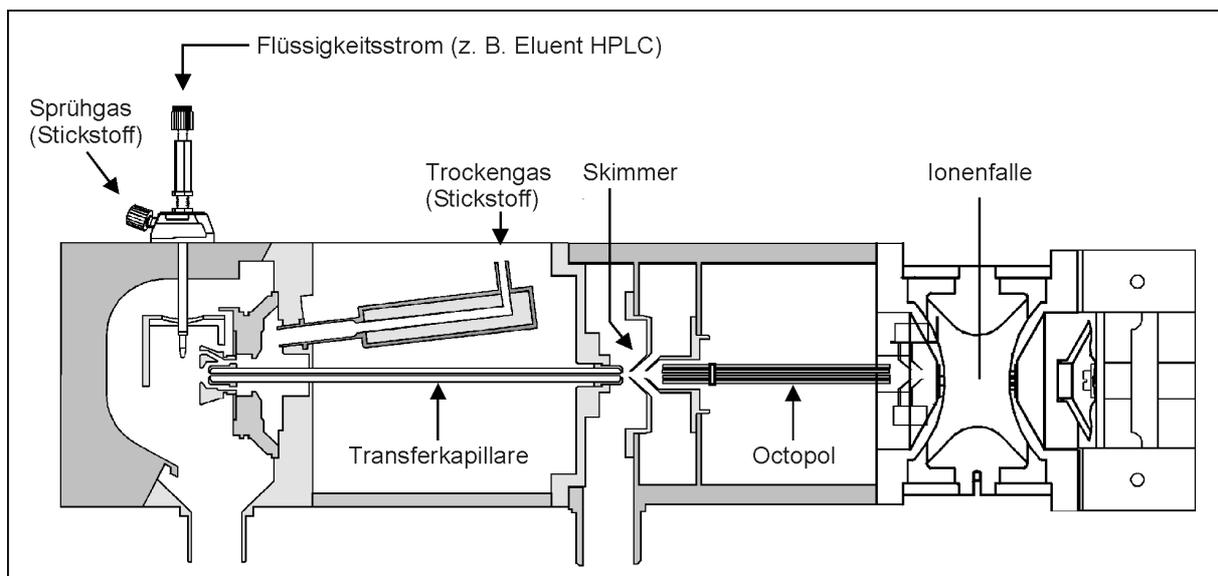


Abbildung 7: Schematischer Aufbau des ESQUIRE-Massenspektrometers (95)

Durch die Möglichkeit des Umpolens der elektrostatischen Potentiale in der Ionenquelle bzw. beim Ionentransfer können sowohl positive als auch negative Ionen erzeugt werden. Die Ionisierung der Analytmoleküle erfolgt in der Regel als Quasimolekülion $[M+H]^+$ oder $[M+Na]^+$ bzw. $[M+K]^+$ im positiven Ionenmodus oder $[M-H]^-$ im negativen Ionenmodus. Bei Verwendung von Chloroform als Lösungsmittelbestandteil oder NH_4Ac zur Verbesserung der Ionisierbarkeit ist im negativen Ionenmodus auch die Bildung von $[M+Cl]^-$ bzw. $[M+Ac]^-$ -Ionen möglich.

3.2.4 Aufbau und Funktion elektrischer Ionenfallen

Die bereits 1953 entwickelte Ionenfalle oder auch Paul-Falle (93) stellt eine Art Ionenkäfig dar, in dem Ionen mit Hilfe hochfrequenter Spannungen in einem nahezu quadrupolaren Feld auf stabilen Bahnen gehalten werden. Mit Entwicklung der „massenselektiven Ioneninstabilität“ in den frühen 80er Jahren werden Ionenfallen auch in der Massenspektrometrie eingesetzt, da die „gefangenen“ Ionen durch Änderung der angelegten Spannungen selektiv nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aus der Falle herausgeschleudert werden können (94). Ionenfallen-Massenspektrometer zeichnen sich durch ihre hohe Empfindlichkeit (fmol-amol) und die Möglichkeit zu wiederholten Fragmentierungsexperimenten an vorher isolierten Ionen (MS^n) aus. Der schematische Aufbau einer Ionenfalle ist in Abbildung 8 dargestellt.

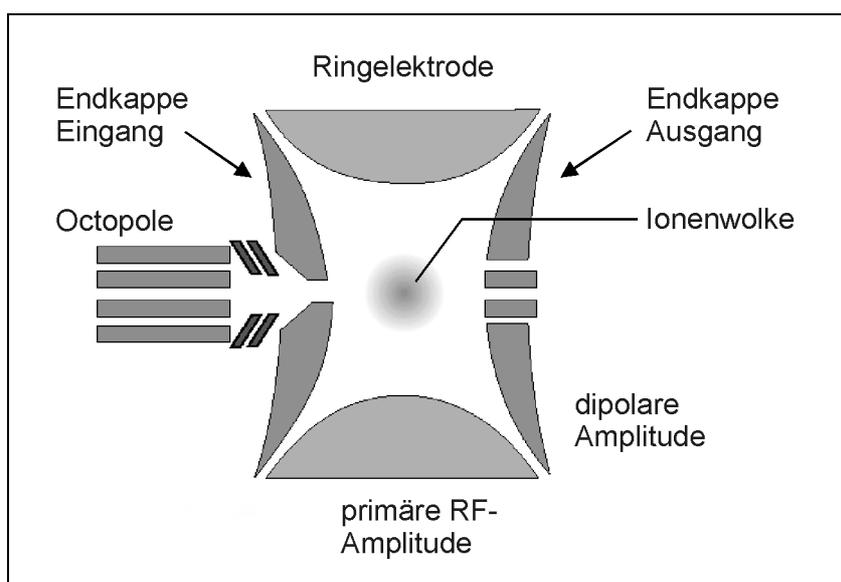


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer elektrischen Ionenfalle (95)

Eine elektrische Ionenfalle besteht aus einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden, die Öffnungen zum Eintritt bzw. Austritt der Ionen aus der Ionenfalle enthalten. Die innere Oberfläche der drei Elektroden folgt einem dreidimensional nahezu hyperbolischem Profil. Eine an die Ringelektrode angelegte RF-Spannung (*radio frequency*) erzeugt eine oszillierende Potentialdifferenz zwischen den Ring- und den Endkappenelektroden und bildet so ein nahezu quadrupolares Feld, in dem Ionen nach dem Stabilitätsdiagramm von Mathieu auf stabilen Umlaufbahnen gespeichert und so „gefangen“ werden können. Im Inneren der Ionenfalle ist als Kollisionsgas bzw. Bremsgas Helium von ca. 1 mbar enthalten.

Ein Massenscan mit der Ionenfalle besteht aus zwei grundsätzlichen Schritten, der Ionenakkumulation und dem eigentlichen Scan der isolierten Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis. Zunächst werden die von der Ionenquelle kommenden Ionen für eine gewisse Zeit akkumuliert (ca. 20 ms). Durch ein an die Endkappen der Ionenfalle angelegtes dipolares Feld werden die gefangenen Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis unterschiedlich stark zum Schwingen angeregt und schließlich aus der Ionenfalle herausgeschleudert. Bei MS/MS Fragmentierungen werden nach erfolgter Ionenakkumulation Ionen ausgewählter Masse/Ladungsverhältnisse isoliert, durch das dipolare Feld zum Schwingen angeregt und unter Einwirkung des Kollisionsgases fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden anschließend je nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis nach und nach aus der Ionenfalle herausgeschleudert. Bei MS^n -Experimenten können die Schritte der Ionenisolierung und -fragmentierung mehrfach wiederholt werden. Die zeitliche Abfolge der einzelnen Schritte ist in Abbildung 9 dargestellt.

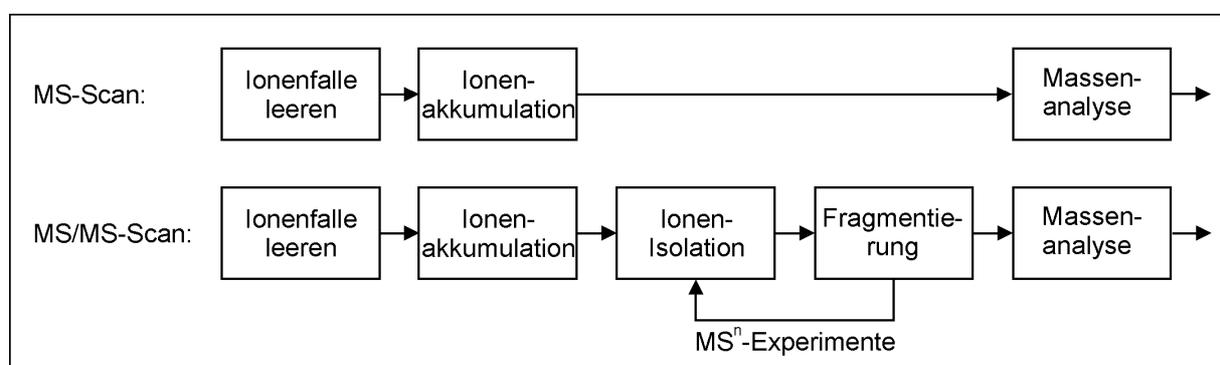


Abbildung 9: Funktionsschritte eines Ionenfallen-Massenspektrometers

4 Spezieller Teil

4.1 Analytik von Hautlipiden (LC/MS)

4.1.1 Massenspektrometrische Charakterisierung von Hautlipiden

Der Einsatz der LC/MS setzt voraus, daß die zu untersuchenden Substanzen in gelöster Form vorliegen. Die Verwendung einer API-ES Ionenquelle erfordert dabei die Verwendung polarer Lösungsmittel (z. B. Wasser, Methanol), die den Ionisierungsprozeß unterstützen und eine gute Analytionenausbeute ermöglichen. Die Verwendung unpolarer Lösungsmittel wie z. B. Hexan nach Zugabe polarer Modifier (15 % Isopropanol) wird zwar ebenfalls beschrieben (95), ist jedoch aus Gründen der Empfindlichkeit nicht zu empfehlen.

Zur Untersuchung der massenspektrometrischen Darstellbarkeit (LC/MS) von isolierten Hautlipiden wurde zunächst ein Hautlipidextrakt angefertigt. Die Extraktion wurde mit Ethanol/Aceton an der Innenseite eines Unterarms mit einer Spülkammer in Anlehnung an Deffond et al. (36) vorgenommen (vgl. Abschnitt 7.1.1). Der zur Trockne eingeeengte Hautlipidextrakt (ca. 10 µg) wurde in Methanol aufgenommen, das 2 mMol Ammoniumacetat enthielt. Die Zugabe von Ammoniumacetat ermöglicht die Ionisierung der in den Extrakten enthaltenen unpolaren Fettsäuren, Triglyceride und Ceramide mit der verwendeten ES-Ionenquelle durch Ladungsübertragungen während des Ionisierungsprozesses. Methanolische Lösungen von Fettsäure-, Triglycerid- und Ceramid-Referenzsubstanzen ohne Ammoniumacetat-Zusatz konnten zum Vergleich nur unter Verwendung einer APCI-Ionenquelle ionisiert werden. Die Hautlipidextrakt-Lösung wurde ohne weitere Probenaufarbeitung kontinuierlich mit einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer injiziert. Auf diese Weise können die Spannungseinstellungen der Ionenquelle bzw. des Ionentransfers in das Massenspektrometer optimiert und eine große Ionenausbeute und intensive Massensignale erhalten werden. Die Lipidlösung wurde dabei mit einer Flußrate von 80 µl/h gefördert. Mit 7 psi als Sprühgas und 4 l/min als Trockengasstrom wurden entsprechend geringe Stickstoff-Gasströme gewählt. In Abbildung 10 sind zwei Massenspektren im negativen und positiven Ionenmodus dargestellt.

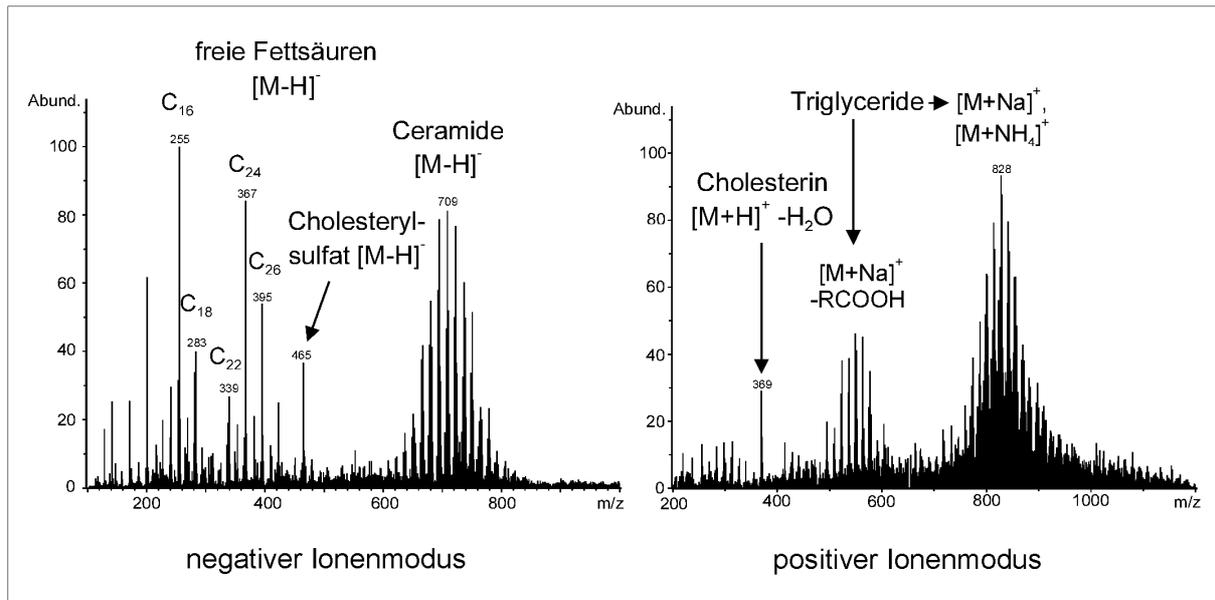


Abbildung 10: API-ES Massenspektren (positiver- und negativer Ionenmodus) eines Hautlipid-extraktes

Je nach Polarität der elektrostatischen Potentiale werden von der gleichen Hautlipidlösung unterschiedliche Massenspektren erhalten, so daß die Wahl der Polarität bereits eine Möglichkeit zur Differenzierung einzelner Substanzgruppen darstellt. Im negativen Ionenmodus werden die freien Fettsäuren, Ceramide und das Cholesteryl-sulfat als $[M-H]^-$ Quasimolekülonen ionisiert, im positiven Ionenmodus das Cholesterin als $[M+H]^+$ unter Verlust eines Moleküls Wasser und die Triglyceride als $[M+Na]^+$ bzw. $[M+NH_4]^+$. Ceramide lassen sich im positiven Ionenmodus auch als $[M+Na]^+$ ionisieren. Im Vergleich zum negativen Ionenmodus ist dies aber mit einer wesentlich geringeren Signalintensität verbunden. Die massenspektrometrische Darstellbarkeit der einzelnen Lipide wurde mit Hilfe entsprechender Referenzsubstanzen überprüft.

Bei diesen Gesamt-Massenspektren über einen großen Massenbereich besteht immer eine gewisse Schwierigkeit in der gleichzeitigen Darstellung aller enthaltenen Substanzen. Veränderungen der Spannungseinstellungen in der Ionenquelle und besonders im Ionentransferweg können die massenspektrometrische Darstellbarkeit einzelner Substanzen entscheidend beeinflussen. Dieses geht so weit, daß nur durch Veränderungen von Spannungseinstellungen unterschiedliche Massenspektren aus gleichen Proben erhalten werden können.

Von besonderer Bedeutung ist hierbei die angelegte Spannung am Ausgang der Transferkapillare und am Skimmer 1. Die Spannungsdifferenz bestimmt die sogenannte *collision induced dissociation* (CID). Während eine gewisse CID der Clusterbildung von Analytionen entgegenwirkt und daher für intensive Massensignale unerlässlich ist, induziert eine zu starke CID massenunabhängige Fragmentierung und bewirkt so eher das Gegenteil (96).

Eine Optimierung der Signalintensität der freien Fettsäuren im negativen Ionenmodus hat zur Folge, daß nur die einfach veresterten Ceramide mit molekularen Massen von 600-800 amu im Spektrum sichtbar sind (vgl. Abbildung 10). Wenn die Ionisierung hingegen auf die Darstellung der ω -veresterten Ceramide Cer(EOS) und Cer(EOH) im Massenbereich von 1000-1200 amu optimiert wird, sind die Signalintensitäten der freien Fettsäuren entsprechend gering. Im positiven Ionenmodus ist ebenfalls eine Optimierung der Spannungseinstellungen notwendig. Bei zu großer CID werden Fettsäuren aus den Triglyceriden abgespalten und im Massenspektrum wird eine zweite Massenverteilung der entsprechenden $[M-RCOOH] H^+$ -Signale sichtbar. Zur Aufnahme der in Abbildung 10 dargestellten Massenspektren wurde jeweils ein Kompromiß gewählt, um möglichst viele Komponenten der extrahierbaren Hautlipide gemeinsam darzustellen.

Zur Identifizierung der einfach veresterten Ceramide in der in Abbildung 10 sichtbaren Massenverteilung wurde zunächst eine Liste mit möglichen Ceramiden erstellt, die in den menschlichen Stratum corneum-Lipiden theoretisch enthalten sein können (Tabelle 5). Hierbei wurden die molekularen Massen von den von Robson et al. (67) beschriebenen einfach veresterten Ceramiden Cer(NS), Cer(NP), Cer(AS), Cer(AP) und Cer(AH) jeweils für die möglichen enthaltenen Fettsäure-Varianten nach Wertz et al. (65, 68) berechnet.

Die in Tabelle 5 angegebenen Zahlenwerte stellen die berechneten molekularen Massen der Ceramide dar. Obwohl die Ionisierung als $[M-H]^-$ erfolgt, sind aber letztendlich die in der Tabelle angegebenen ungeraden Zahlenwerte für die Ceramid-Signale in den Massenspektren maßgeblich, da bei mittleren molekularen Massen > 500 amu der Einfluß des Massendefektes für entsprechend höhere Signale sorgt. Dieses gilt auch für alle in dieser Arbeit angegebenen molekularen Massen bei den

abgebildeten Strukturformeln. Die Angabe der molekularen Massen mit einer Dezimalstelle erschien nicht sinnvoll, da je nach Füllungsgrad der Ionenfalle des Massenspektrometers ein Massenshift von bis zu 0,3 amu möglich ist.

Tabelle 5: Molekulare Massen möglicher Ceramide (Kettenlänge der sphingoiden Base: C₁₈)

amid- gebund. Fettsäure	Cer (NS)	Cer (NP)	Cer (AS)	Cer (AP)	Cer (AH)
	molekulare Massen				
C 14	509	527	525	543	541
C 15	523	541	539	557	555
C 16	537	555	553	571	569
C 17	551	569	567	585	583
C 18	565	583	581	599	597
C 19	579	597	595	613	611
C 20	593	611	609	627	625
C 21	607	625	623	641	639
C 22	621	639	637	655	653
C 23	635	653	651	669	667
C 24	649	667	665	683	681
C 25	663	681	679	697	695
C 26	677	695	693	711	709
C 27	691	709	707	725	723
C 28	705	723	721	739	737
C 29	719	737	735	753	751
C 31	747	765	763	781	779
C 32	761	779	777	795	793
C 33	775	793	791	809	807
C 34	789	807	805	823	821
C 35	803	821	819	837	835
C 36	817	835	833	851	849

In Abbildung 11 ist eine vergrößerte Darstellung der Massenverteilung einfach veresterter Ceramide aus Abbildung 10 abgebildet. Die im vergrößerten Spektrum sichtbaren Signale können nun theoretischen Ceramidvarianten aus Tabelle 5 zugeordnet werden. Diese Zuordnung ist aber nicht eindeutig: Das intensivste Signal der Massenverteilung in Abbildung 11 mit 709 amu kann sowohl ein Cer(AH) mit amidgebundener C₂₆-Fettsäure als auch ein Cer(NP) mit amidgebundener C₂₇-Fettsäure sein.

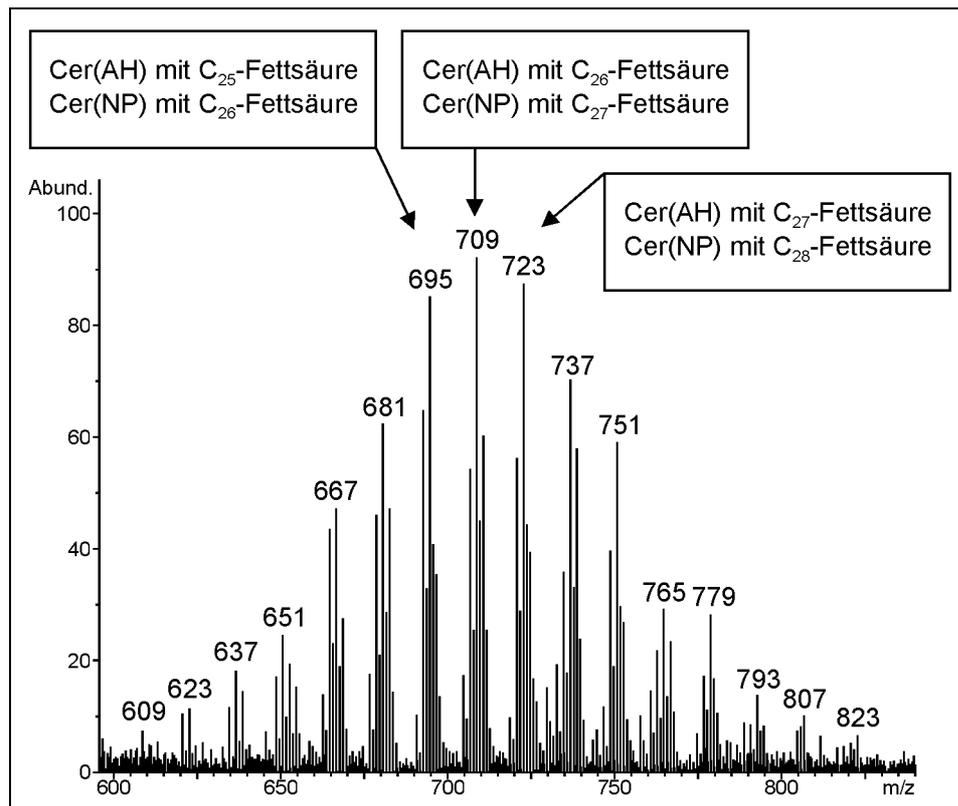


Abbildung 11: API-ES Massenspektrum (negativer Ionenmodus): Verteilung einfach veresterter Ceramide aus einem Hautlipidextrakt. Die Zuordnung der Signale zu bestimmten Ceramiden ist nicht eindeutig, da mehrere Ceramidvarianten die gleiche molekulare Masse haben können.

Darüber hinaus gibt es aber auch noch andere Varianten, da auch die Kettenlänge der in den Ceramiden enthaltenen sphingoiden Basen variieren kann (65, 68): Eine Verkürzung der Kettenlänge der sphingoiden Base um eine Methylengruppe (14 amu) verbunden mit einer entsprechenden Verlängerung der amidgebundenen Fettsäure resultiert ebenfalls in der gleichen molekularen Masse.

Zur weiteren Differenzierung einzelner Spezies bietet sich eine chromatographische Trennung der Ceramide an, um neben der molekularen Masse auch das chromatographische Verhalten zur Identifizierung heranziehen zu können.

Die massenspektrometrische Darstellung von Ceramiden (LC/MS) wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Gu et al. (97) untersuchten einige Ceramide im positiven Ionenmodus und stellten mit einem Triple-Quadrupol Gerät in Vorläuferionen (*precursor ion*) Spektren diejenigen Varianten selektiv dar, die das Fragment der sphingoiden Base enthielten. Durch Auswertung der Signalintensitäten bei der

Untersuchung von Ceramid-Verdünnungsreihen wurde auch die Möglichkeit zur quantitativen Analyse beschrieben. Diese Technik wurde auch von Liebisch et al. (98) zur Bestimmung von Ceramiden in Zellextrakten verwendet. Die Quantifizierung erfolgte hier mit einem natürlich nicht vorkommenden Ceramid als internen Standard. Die einzelnen Lösungen wurden hier mit einem Autosampler in einen kontinuierlich in das Massenspektrometer eingelassenen Flüssigkeitsstrom injiziert (*flow injection*). Neubert et al. (99) untersuchten die Veränderungen an temperaturbelasteten Ceramiden durch kontinuierlichen Einlaß entsprechender Lösungen in ein Electrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer. Die im negativen Ionenmodus aufgenommenen Spektren zeigten nach Belastung die Signale der abgespaltenen amidgebundenen Fettsäuren $[M-H]^-$. Neben der Untersuchung von Ceramiden kann der Einsatz der Electrospray-Massenspektrometrie natürlich auch zur Identifizierung anderer Sphingolipide (z. B. Sphingomyelin, (100)) verwendet werden.

4.1.2 Flüssigchromatographische Trennung von Ceramiden

Zur chromatographischen Trennung der Ceramide wurde ein *reversed-phase* (RP) Trennsystem verwendet. Der Trennmechanismus beruht hier hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen des alkylierten Kieselgels in der Trennsäule mit den unpolaren Alkylketten der Ceramide, wodurch eine Auftrennung nach Kettenlängen möglich ist. Darüber hinaus unterstützen die üblicherweise in der RP-Chromatographie verwendeten polaren Lösungsmittel den Ionisierungsprozeß in der API-ES Ionenquelle des Massenspektrometers. Um eine Überlastung der Ionenquelle zu vermeiden, wurde eine Trennsäule mit 2 mm Innendurchmesser (*microbore*) verwendet. Eine Säule dieser Dimension ermöglicht gute Trennleistungen bei der verwendeten Flußrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$, was eine Flußteilung des Eluenten bei Koppelung mit einem Massenspektrometer erübrigt. Als stationäre Phase wurde modifiziertes Kieselgel (RP-18, *encapsulated*) gewählt. Bei diesem Füllmaterial sind die freien nichtalkylierten Silanolgruppen des Kieselgels vollständig abgeschirmt, wodurch eine besonders inerte Trennphase erhalten wird.

Als Eluent kam ein wasserfreier Methanol (incl. 2 mMol NH₄Ac)-*tert*-Butylmethylether-Gradient zur Anwendung. Das Methanol unterstützt zusammen mit dem Ammoniumacetat die Ionisierung der unpolaren Ceramide (vgl. Abschnitt 4.1.1), während der *tert*-Butylmethylether die Elution langkettiger Spezies ermöglicht.

Die Spannungen im elektrostatischen Potentialgefälle der Ionenquelle bzw. im Ionen-Transfer des Massenspektrometers wurden auf die mit Hilfe von Spritzenpumpen-Experimenten ermittelte empfindlichste Ionisierung der Ceramide optimiert. Für den Ausgang der Transferkapillare wurde so im verwendeten negativen Ionenmodus eine Spannung von 195 V und für den Skimmer 1 von 45 V gewählt. Die automatische Regulierung der Ionenfallen-Füllung (ICC) wurde mit 3000 Skalenteilen und einer maximalen Akkumulationszeit von 200 ms eingestellt und so auf die Ionenbelastung komplex zusammengesetzter isolierter Hautlipide abgestimmt.

Zur Abschätzung der Empfindlichkeit dieses Analysenverfahrens wurden Verdünnungsreihen von synthetischen Ceramiden (Ceramid III, Cosmoferm, The Netherlands) angefertigt und mit der oben beschriebenen Methode untersucht. Die Nachweisgrenze der Ceramide (3-faches Signal-Rauschverhältnis) liegt demnach bei ca. 1 ng/ml (ppb) bei einer relativen Standardabweichung von < 5 %.

Zur Überprüfung der entwickelten Chromatographie wurden zwei Ceramid-Standardgemische aufgetrennt. Hierbei wurde das aus Rinderhirn isolierte Ceramid Typ III (N-acyl-Sphingosin, Cer(NS)) und Ceramid Typ IV (N- α -OH-acyl-Sphingosin, Cer(AS)) der Fa. Sigma verwendet. In Abbildung 12 ist ein Chromatogramm des Ceramid Typ III abgebildet. Die enthaltenen Ceramidvarianten sind jeweils mit ihren entsprechenden Massenspuren [M-H]⁻ dargestellt.

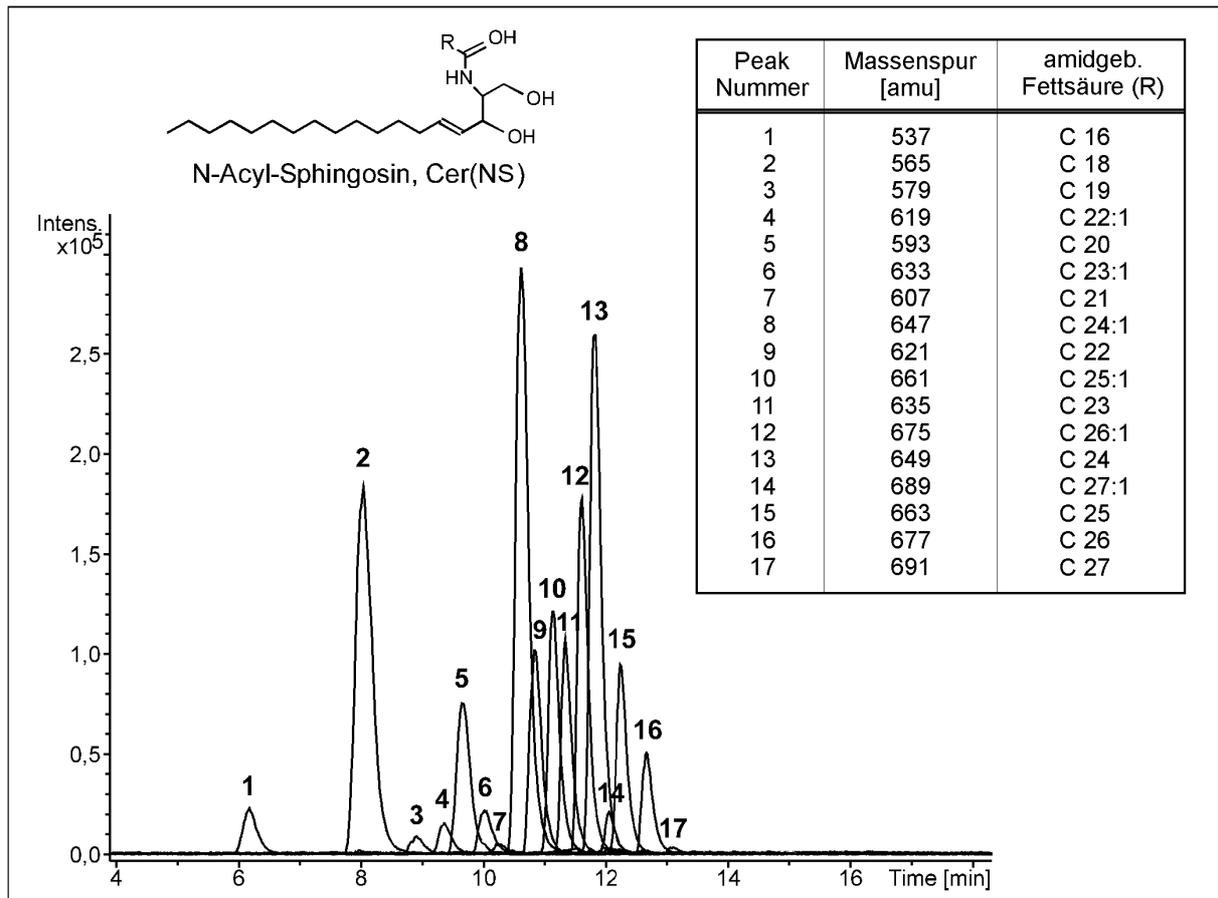


Abbildung 12: HPLC-API-ES-MS Trennung von Ceramid Typ III (N-acyl-Sphingosin, Cer(NS), Fa. Sigma). Darstellung einzelner Massenspuren [M-H]⁻.

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, wurden die einzelnen enthaltenen Ceramidspezies nach ihrer Polarität und damit nach Kettenlänge bzw. Doppelbindung in der amidgebundenen Fettsäure aufgetrennt. Die Identifizierung der einzelnen Substanzen wurde über die molekulare Masse und mit Hilfe von MS/MS-Fragmentierungsexperimenten vorgenommen.

4.1.3 Electrospray-Ionenfallen MS/MS Fragmentierungsexperimente

Die Durchführung von MS/MS-Fragmentierungsexperimenten kann durch direkte kontinuierliche Injektion der interessierenden Lipidlösungen mit Hilfe einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer erfolgen. Weiterhin sind die Fragmentierungsexperimente aber auch während einer chromatographischen Trennung „online“ möglich. In beiden Fällen werden die jeweils interessierenden Ionen in der Ionenfalle des verwendeten Massenspektrometers isoliert und anschließend selektiv fragmentiert (vgl. Abschnitt 3.2.4). Je nach Polarität werden dabei verschiedene Fragmentspektren erhalten.

Im positiven Ionenmodus werden hauptsächlich Fragmente erhalten, die mit Dehydratisierungen und der Abspaltung der Sphingoidbase erklärt werden können. Diese Art der Fragmentierung wird auch von Gu et al. (97) und Couch et al. (101) beschrieben. Die Fragmentspektren ermöglichen zwar die Identifizierung der Art der sphingoiden Base und deren Kettenlänge, erlauben darüber hinaus aber keine komplette Identifizierung des Ceramids.

Im negativen Ionenmodus wird bereits bei der ersten Fragmentierung (MS/MS) ein aussagekräftiges Fragmentspektrum erhalten. Neben Fragmenten, die durch Verlust von kleinen Neutralteilchen aus dem Gesamtmolekül entstehen (H_2O , Methanol), sind auch Fragmente der sphingoiden Base und der amidgebundenen Fettsäure enthalten. Diese Art der Fragmentierung gelingt jedoch nur bei den einfach veresterten Ceramiden, die ω -veresterten Ceramide Cer(EOS) und Cer(EOH) sind diesem Verfahren nicht zugänglich, da nur wenig aussagekräftige Fragmente gebildet werden.

Durch Gegenüberstellung und Vergleich der Fragmentspektren von verschiedenen einfach veresterten Ceramiden mit nichthydroxylierten und α -OH-Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen lassen sich allgemeine Ceramid-Fragmentierungsmuster ableiten. Mit Hilfe dieser Muster ist die Identifizierung der im Ceramid enthaltenen sphingoiden Base und der amidgebundenen Fettsäure möglich.

In Abbildung 13 sind die Fragmentspektren von einem **Sphingosin-Ceramid** mit amidgebundener **nichthydroxylierter** (Cer(NS)) und α -**hydroxylierter** Fettsäure (Cer(AS)) dargestellt.

In Abbildung 14 sind entsprechend die Fragmentspektren von einem **Phytosphingosin-Ceramid** mit amidgebundener **nichthydroxylierter** (Cer(NP)) und α -**hydroxylierter** Fettsäure (Cer(AP)) ausgewählt. Unter den Spektren sind jeweils die möglichen Fragmente abgebildet.

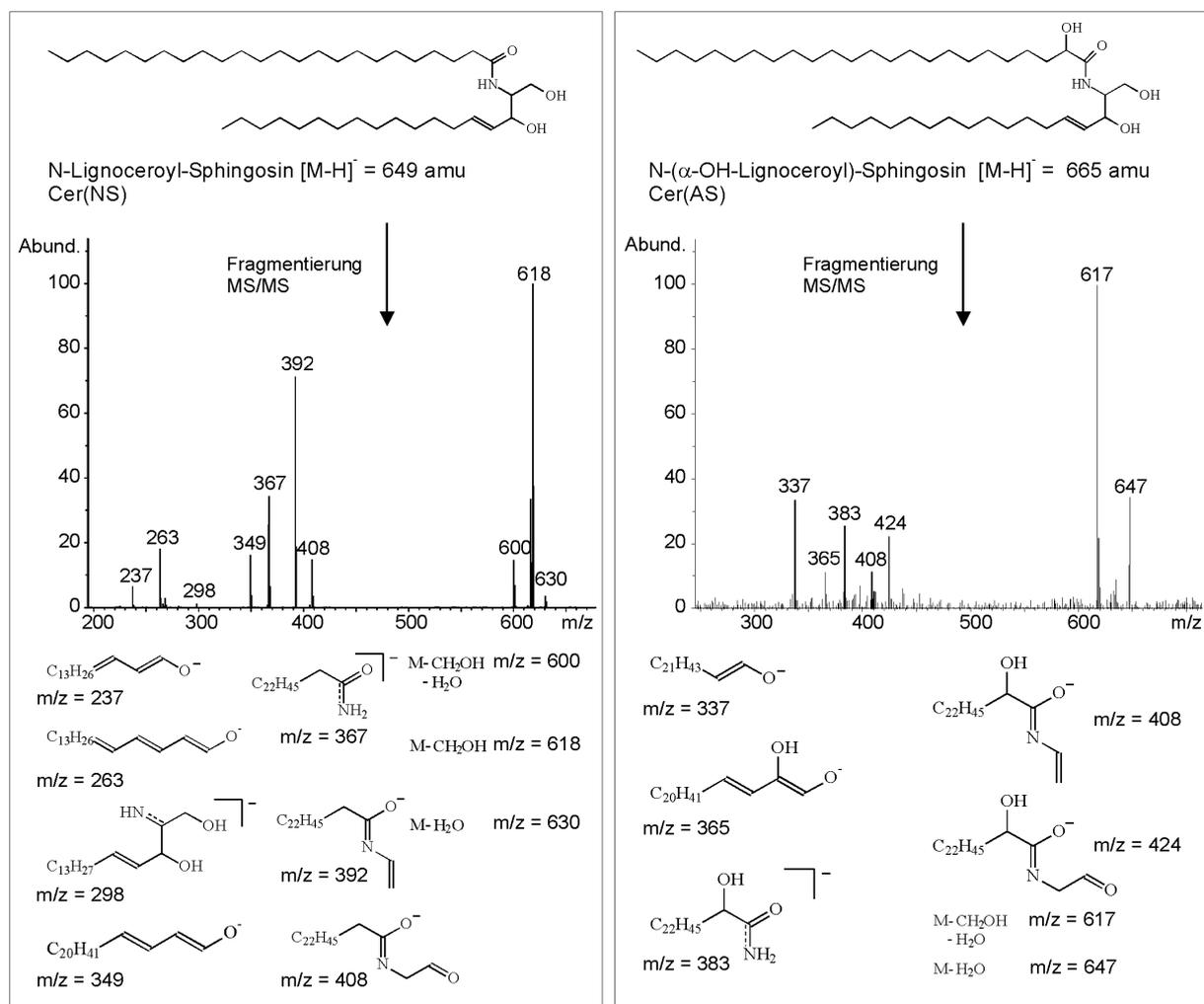


Abbildung 13: API-ES MS/MS Fragmentierungsexperimente der Ceramide 2 (Cer(NS)) und 5 (Cer(AS)) (negativer Ionenmodus).

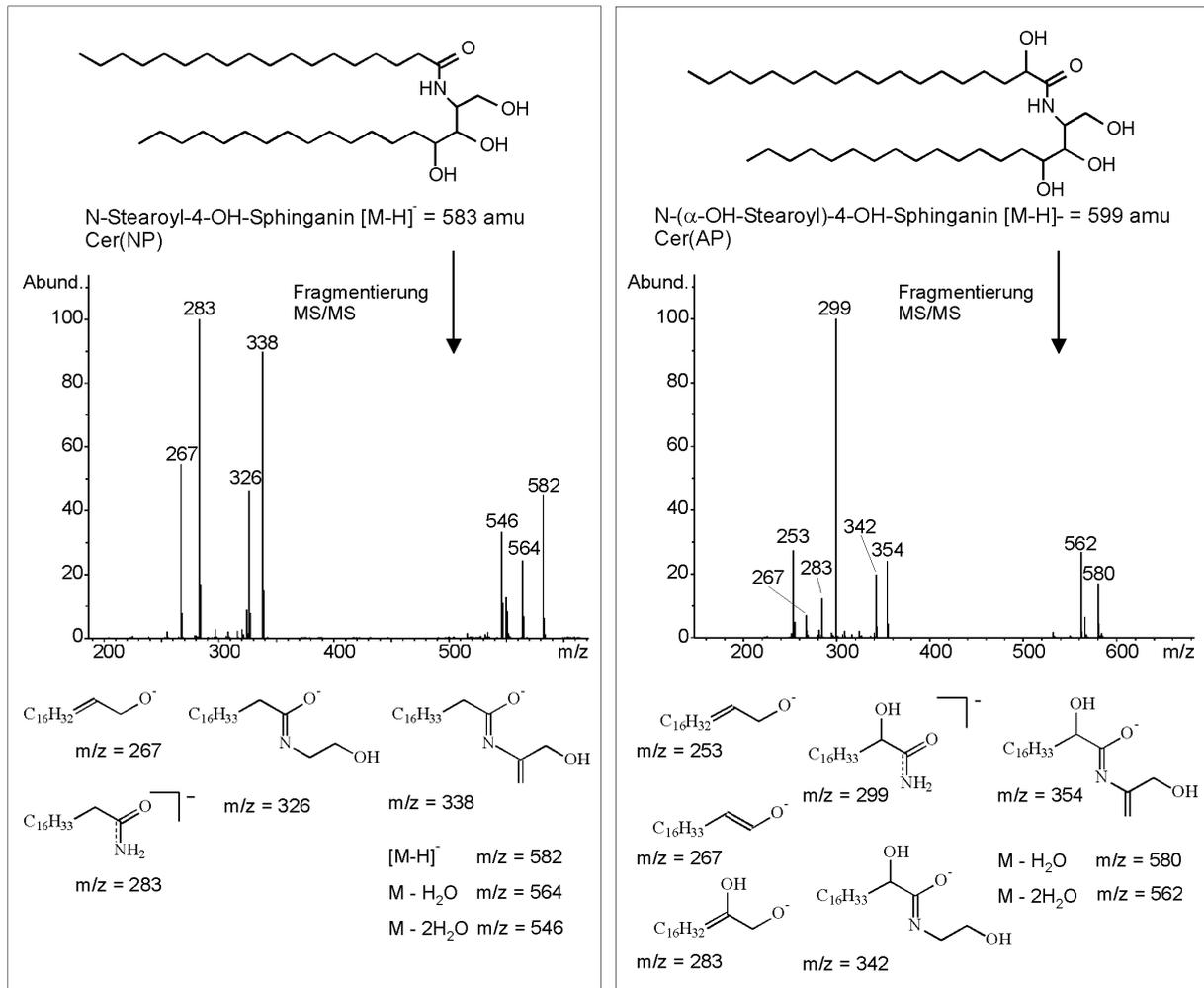


Abbildung 14: API-ES MS/MS Fragmentierungsexperimente der Ceramide 3 (Cer(NP)) und 6 (Cer(AP)) (negativer Ionenmodus).

Zur eindeutigen Identifizierung eines Ceramids ist sowohl die Kenntnis der enthaltenen sphingoiden Base als auch der amidgebundenen Fettsäure erforderlich. Aus den Fragmentenspektren in Abbildung 13 und Abbildung 14 geht hervor, daß je nach enthaltener sphingoider Base (Sphingosin oder Phytosphingosin) bzw. amidgebundener Fettsäure (nichthydroxylierte oder α -OH-) unterschiedliche Fragmentenspektren erhalten werden. Die unterschiedlichen Fragmentierungen können vereinfachend in einem allgemeinen Ceramid-Fragmentierungsschema zusammengefaßt werden (Abbildung 15). Dieses Schema zeigt die zur Identifizierung eines Ceramids wichtigen Fragmente in einer Art „Maske“. Die Ziffern benennen jeweils die charakteristischen Massendifferenzen zwischen den einzelnen Fragmentionen.

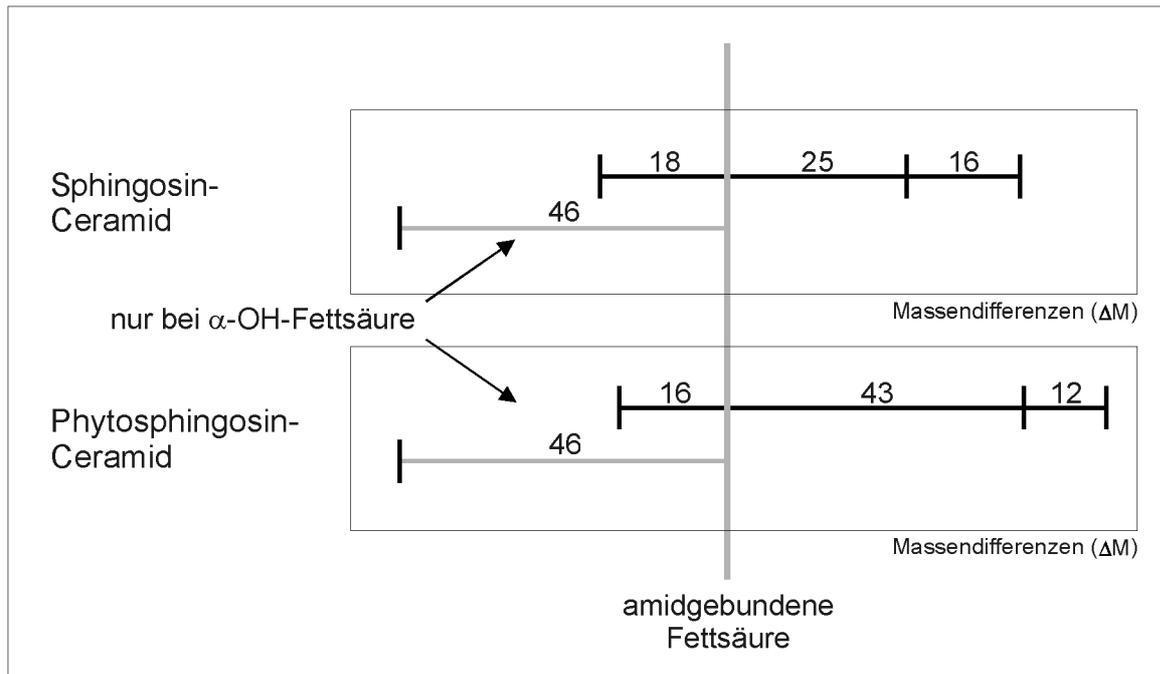


Abbildung 15: Fragmentierungsschema einfach veresterter Ceramide

Die Abstände zwischen den Fragmentationen in der Abfolge 18-25-16 sind jeweils für die Sphingosin-Ceramide Cer(NS), Cer(AS), Cer(AH) und Cer(NH) charakteristisch, wobei das Fragment zwischen den Massendifferenzen 18 und 25 die amidgebundene Fettsäure darstellt. Die Abfolge 16-43-12 steht für die Phytosphingosin-Ceramide Cer(NP) und Cer(AP), die amidgebundene Fettsäure ist jeweils das Fragment zwischen den Massendifferenzen 16 und 43.

Ist im Ceramid eine α -OH-Fettsäure enthalten, ist in jeder der beiden Abfolgen ein weiteres charakteristisches Fragment enthalten, das 46 Masseneinheiten kleiner ist als das der amidgebundenen Fettsäure. Zur Identifizierung eines Ceramids wird demnach zunächst das Molekülion $[M-H]^-$ fragmentiert. Das erhaltene Fragmentmuster wird dann auf Übereinstimmung mit einer der „Identifizierungsmasken“ überprüft. Ist die richtige gefunden, ist die Art der sphingoiden Base und der amidgebundenen Fettsäure bereits festgelegt. Die Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäure kann anhand der molekularen Masse des entsprechenden Fragments abgelesen werden. Die Kettenlänge der sphingoiden Base ergibt sich aus den entsprechenden Fragmenten bzw. der Rückrechnung über die molekulare Masse des Gesamtmoleküls.

Obwohl mit den ω -veresterten Ceramiden keine aussagekräftigen MS/MS-Fragmentspektren erhalten werden, kann durch Einstellung von jeweils hohen Spannungen am Ende der Transferkapillare bzw. am Skimmer 1 eine Abspaltung der ω -veresterten Fettsäure erreicht werden (CID). Die abgespaltene Fettsäure erscheint im Massenspektrum als $[M-H]^-$ -Ion und kann zusammen mit der molekularen Masse zur Identifizierung des Gesamtmoleküls herangezogen werden.

In Abbildung 16 und Abbildung 17 sind die API-ES (CID) Massenspektren von zwei ω -veresterten Ceramid-Standardsubstanzen dargestellt. Die Spektren wurden durch Direkteinlaß von entsprechenden Lösungen (Spritzenpumpe) erhalten. Für das Ende der Transferkapillare wurde eine Spannung von -200 V eingestellt, die Spannung am Skimmer 1 wurde mit -60 V gewählt.

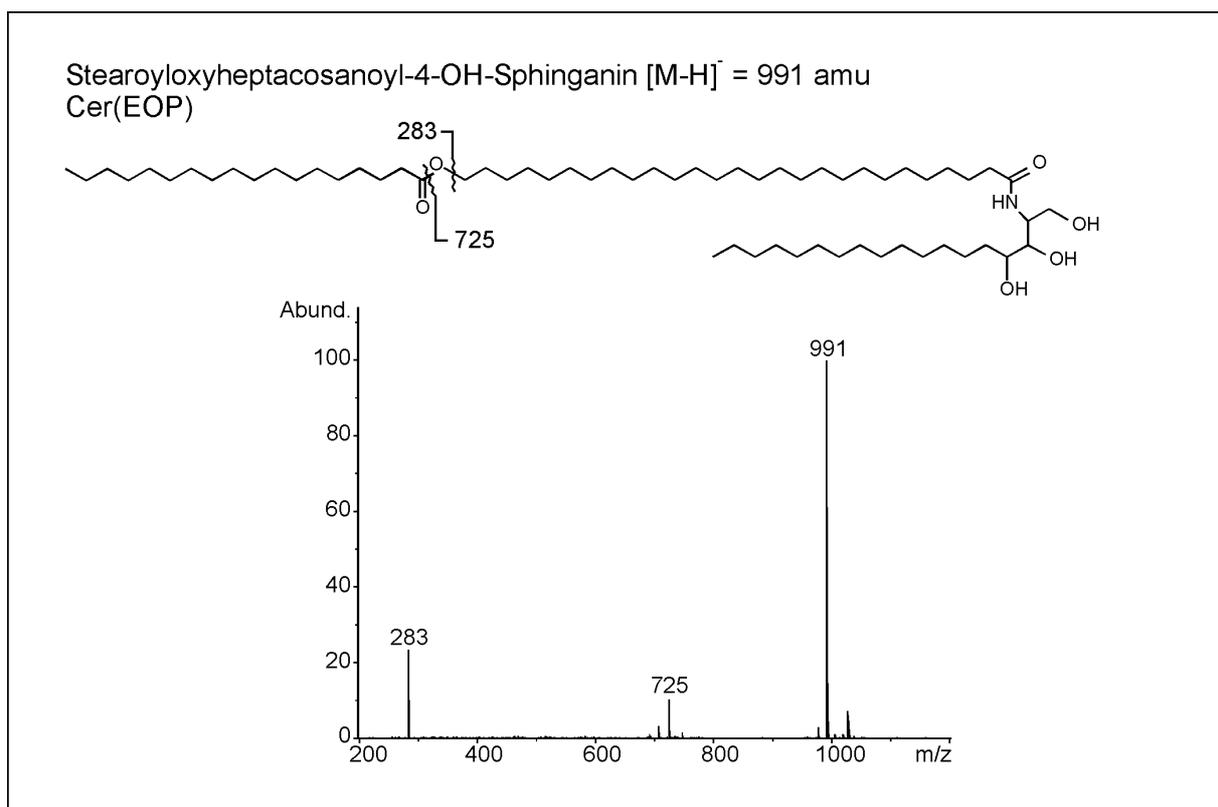


Abbildung 16: API-ES Massenspektrum (negativer Ionenmodus) von Stearoyloxyheptacosanoyl-4-OH-Sphinganin (Cer(EOP)) bei CID-Spannungseinstellungen.

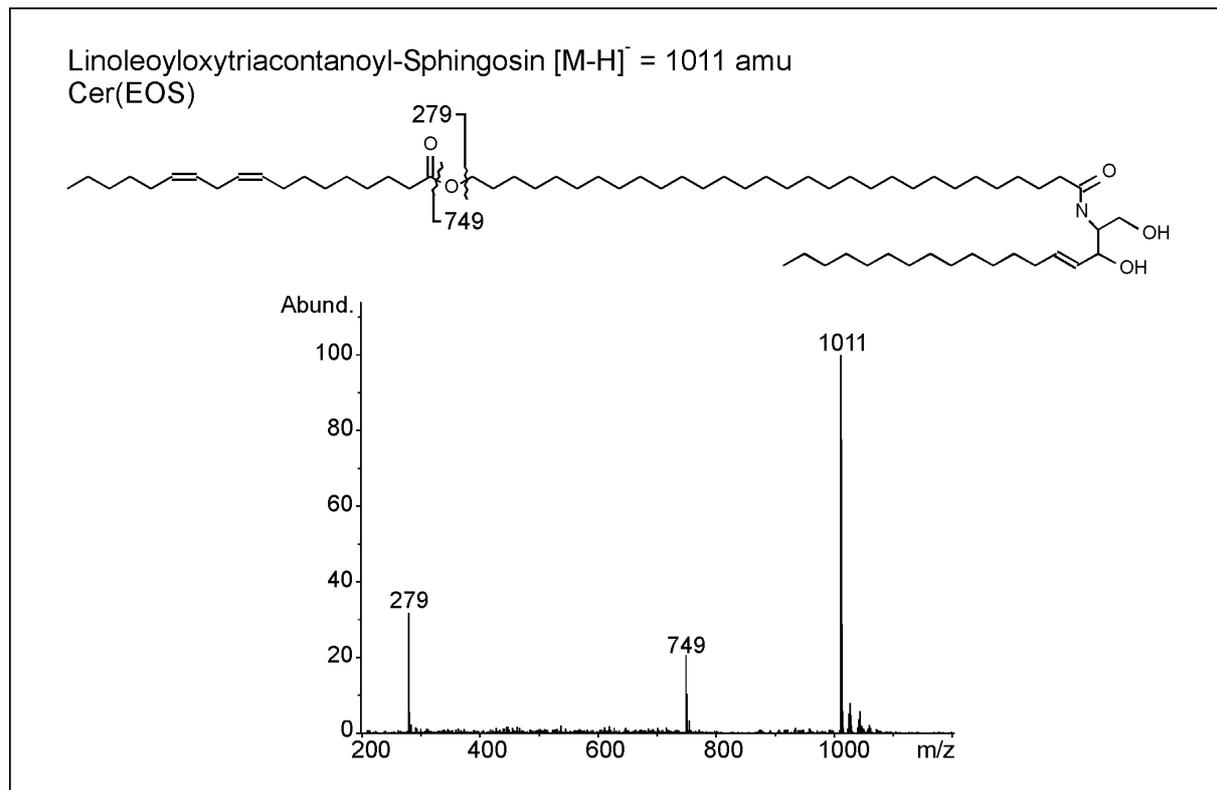


Abbildung 17: API-ES Massenspektren (negativer Ionenmodus) von Linoleoyloxytriacontanoyl-Sphingosin (Cer(EOP)) bei CID-Spannungseinstellungen.

Die (MS/MS)-Fragmentierung von Ceramiden mit einem Electrospray-Massenspektrometer im negativen Ionenmodus wurde auch von Raith et al. (102) untersucht. Die entstehenden Fragmente werden hier ebenfalls drei Gruppen zugeordnet: Fragmente, die durch Verlust von kleinen Neutralteilchen aus dem Gesamtmolekül entstehen, sowie Fragmente der sphingoiden Base und der amidgebundenen Fettsäure. Obwohl diese Untersuchungen ebenfalls mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer durchgeführt wurden, enthalten die Fragmentspektren der Ceramide mit α -OH-Fettsäuren nicht das charakteristische Fragment der molekularen Masse (amidgebundene Fettsäure -46 amu), das für die Ceramide mit amidgebundener α -OH-Fettsäure charakteristisch ist. Die MS/MS-Fragmentierungsexperimente der Ceramide im negativen Ionenmodus ermöglichen eine eindeutige Identifizierung einzelner Ceramidspezies. Die Anwendung dieser Technik ist für die Charakterisierung der Ceramide in isolierten Stratum corneum-Lipiden von besonderer Bedeutung, da unterschiedliche Ceramidvarianten mit gleicher molekularer Masse differenziert werden können.

4.1.4 Flüssigchromatographische Trennung von Glucosylceramiden

Mit Hilfe der entwickelten Methode zur LC/MS-Trennung der Ceramide lassen sich auch Glucosylceramide chromatographieren, die als polare Lipidvorstufen in den unteren Schichten der Haut vorkommen. In Abbildung 18 ist ein Chromatogramm des Glucosylceramid-Mischstandards 1-O-[β -D-Glucopyranosyl]-N-acyl-Sphingosin (GluCer(NS)) abgebildet. Die einzelnen enthaltenen Glucosylceramid-Spezies sind jeweils mit ihren Massenspuren $[M-H]^-$ dargestellt. Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, werden die einzelnen Spezies analog den normalen Ceramiden nach ihrer Polarität und damit ebenfalls nach Kettenlänge bzw. Doppelbindung in der amidgebundenen Fettsäure aufgetrennt. Die Nachweisgrenze der Glucosylceramide wurde wegen fehlender einzelner Referenzsubstanzen nicht explizit bestimmt. Die Empfindlichkeit des Analyseverfahrens kann aber wegen der mit den nichtglucosylierten Ceramiden vergleichbaren Molekülstrukturen und Ionisierungsmechanismen mit dem unteren ppb-Bereich abgeschätzt werden (matrixfreie Meßlösungen).

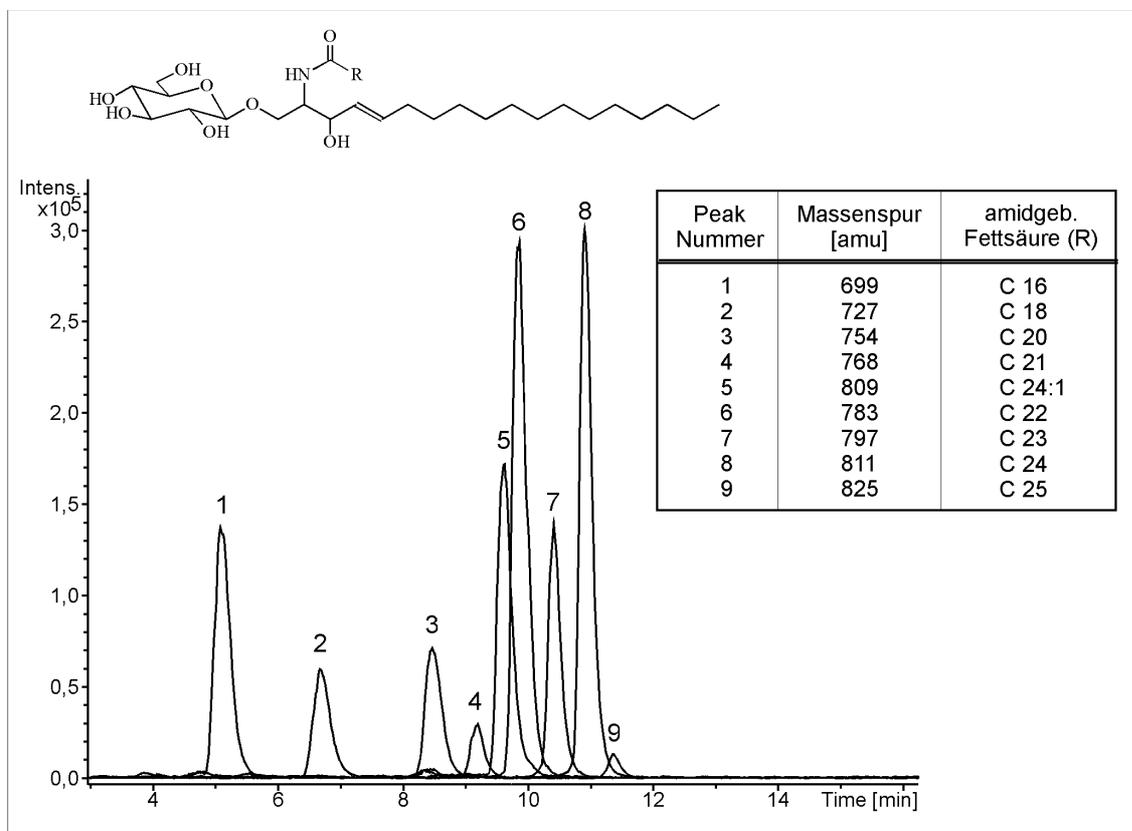


Abbildung 18: HPLC-API-ES-MS Trennung von 1-O-[β -D-Glucopyranosyl]-N-acyl-Sphingosin, GluCer(NS). Darstellung einzelner Massenspuren $[M-H]^-$.

Glucosylceramide lassen sich ebenfalls mit Hilfe von MS/MS Fragmentierungsexperimenten untersuchen (Abbildung 19).

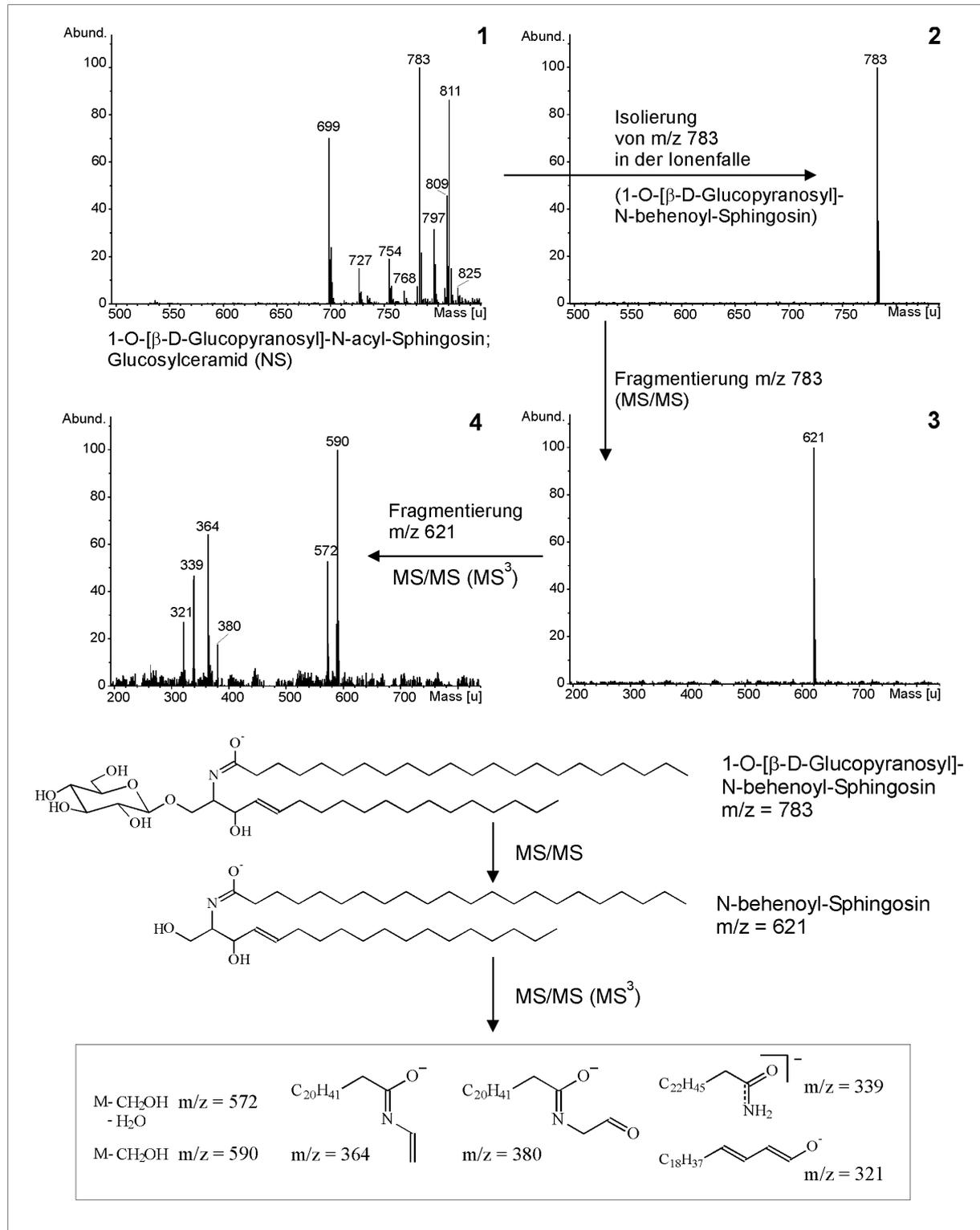


Abbildung 19: API-ES MS/MS Fragmentierungsexperimente von (1-O-[β-D-Glucopyranosyl]-N-behenoyl-Sphingosin) (negativer Ionenmodus).

Im Bild 1 oben links ist das Gesamtspektrum des Mischstandards GluCer(NS) dargestellt. Bild 2 oben rechts zeigt das isolierte Ion des 1-O-[β -D-Glucopyranosyl]-N-behenoyl-Sphingosin [M-H]⁻ mit der molekularen Masse 783 amu.

Im ersten Schritt der Fragmentierung (MS/MS, Bild 3) wird zunächst der Glucosylrest abgespalten, es verbleibt das Fragment 621 amu. Im zweiten Schritt der Fragmentierung (MS³, Bild 4) wird dann das Fragmentmuster für das Cer(NS) mit amidgebundener Behensäure erhalten. Dieses Fragmentmuster folgt dem in Abbildung 15 angegebenen typischen Fragmentierungsschema für Sphingosin-Ceramide mit nichthydroxylierter amidgebundener Fettsäure.

Im unteren Teil der Abbildung 19 sind die möglichen Fragmente des MS³-Spektrums abgebildet.

4.1.5 Flüssigchromatographische Trennung von Ceramiden aus isolierten menschlichen Stratum corneum Lipiden

Zur Chromatographie der menschlichen Stratum corneum-Ceramide wurden isolierte Hautlipide verwendet, die mit Hilfe von Cyanoacrylat- (Sekundenkleber-) Abrissen nach Imokawa et al. (38) gewonnen wurden (vgl. Abschnitt 7.1.2). Die so erhaltenen Lipide (ca. 10 µg) wurden mit 1,5 ml Methanol (incl. 2 mMol NH₄Ac) aufgenommen und davon 5 µl zur LC/MS Analyse eingesetzt.

Der Scanbereich des Massenspektrometers wurde mit 200-1200 amu gewählt. Dieser große Scanbereich erlaubt die Detektion der großen doppeltveresterten Ceramide Cer(EOS) und Cer(EOH), bietet darüber hinaus aber auch die Möglichkeit, die im verwendeten negativen Ionenmodus ionisierten freien Fettsäuren und das Cholesterolsulfat simultan mitzuerfassen.

In Abbildung 20 ist ein Chromatogramm einer entsprechend isolierten Hautlipidprobe dargestellt. Durch den großen Scanbereich erscheint der Totalionenstrom als Abfolge von Überlagerungen und Koelutionen einzelner Substanzen wenig aussagekräftig. Durch die Anzeige einzelner Massenspuren [M-H]⁻ der Ceramide entsprechend der Zusammenstellung aus Tabelle 5 wird dann die ganze Vielfalt der im Stratum corneum enthaltenen Ceramidspezies erkennbar.

Die Darstellung des Totalionenstroms und der einzelnen Massenspuren in Abbildung 20 verdeutlicht die Notwendigkeit einer leistungsfähigen und selektiven Detektion zur Differenzierung der in den menschlichen Stratum corneum-Lipiden enthaltenen Ceramide. Die massenspektrometrische Detektion ermöglicht hier quasi eine weitere Dimension der Trennleistung, da durch die Möglichkeit der Anzeige einzelner Massenspuren alle enthaltenen Ceramidspezies grundliniengetrennt dargestellt werden können.

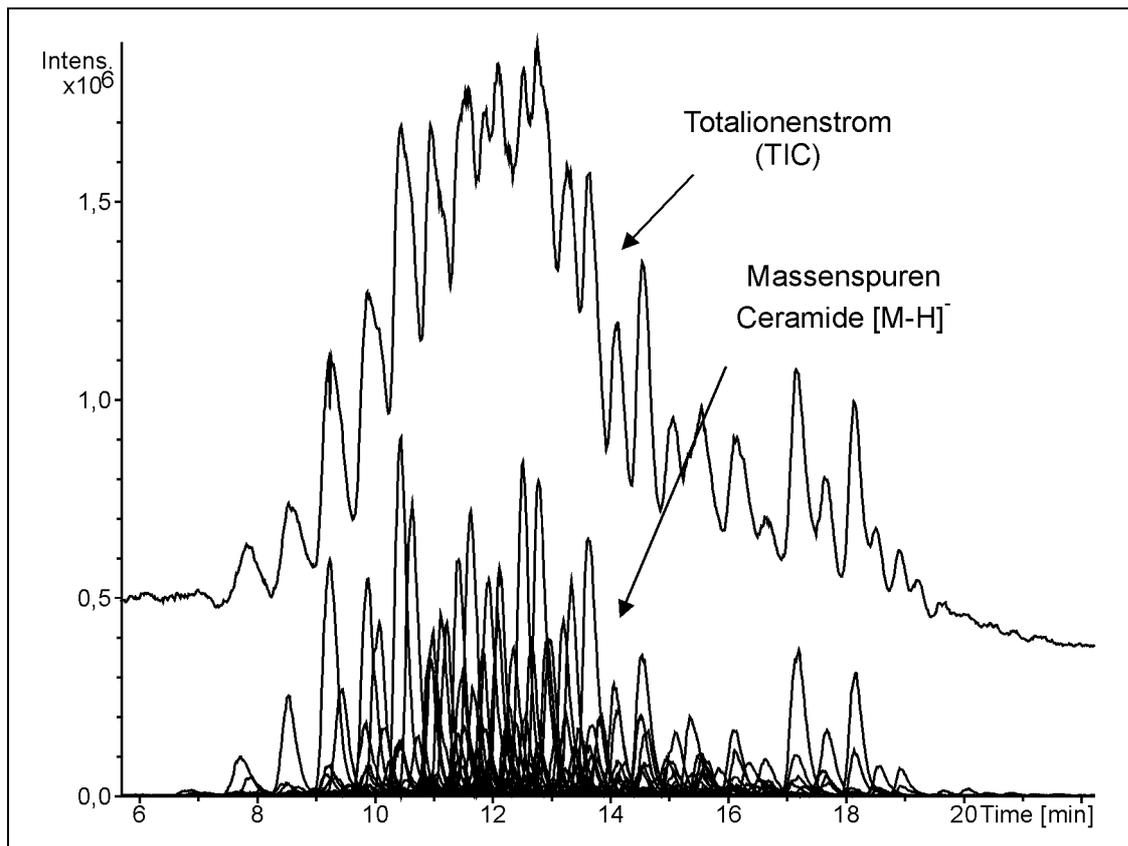


Abbildung 20: HPLC-API-ES-MS (neg. Ionenmodus) Chromatogramm isolierter Stratum corneum-Ceramide. Darstellung des Totalionenstroms (Scan 200-1200 amu) und der Massenspuren einzelner Ceramide [M-H]⁻.

Die Analytik von Ceramiden unter Verwendung von HPLC-Trennsystemen wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Gildenast und Lasch (103) und Norlén et al. (104) beschreiben die Verwendung von Normalphasen-Trennsäulen in Kombination mit der Streulicht-Detektion (*evaporative light scattering detection*, ELSD). Diese Trennungen erlauben eine Abtrennung von Lipidgruppen wie Triglyceride, Fettsäuren oder dem Cholesterin; zur Differenzierung einzelner Ceramidspezies ist der Normalphasen-Trennmechanismus aber weniger geeignet. Andere Arbeitsgruppen verwenden reversed-phase-Trennsysteme zur Untersuchung derivatisierter Ceramide. Do et al. (105) trennten Benzoyl- und p-Nitrobenzoyl-Derivate auf RP-18 Material, als Detektor wurde ebenfalls ein ELSD verwendet. Guey et al. (106) trennten Benzoyl-Derivate ebenfalls mit Hilfe von RP-Material. Die Detektion erfolgte hier durch direkte Kopplung mit einem APCI-Massenspektrometer. Yano et al. (107) wiederum derivatisierten Ceramide mit fluoreszierendem Anthroylcyanid und detektierten die Derivate nach RP-HPLC-Trennung mit einem Fluoreszenzdetektor. Obwohl

diese Systeme über gute Trennleistungen verfügen, sind die jeweilig erforderlichen Derivatisierungen mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden.

Gaudin et al. (108, 109) verwendeten eine nichtwäßrige RP-HPLC-Trennung in Verbindung mit einem Streulichtdetektor. Diese unselektive Detektion erfordert eine sehr gute Trennleistung des chromatographischen Systems. Bei komplex zusammengesetzten Ceramid-Proben biologischen Ursprungs ist dieses mit einer aufwendigen Aufreinigung bzw. Vor-Fraktionierung verbunden. Couch et al. (101) entwickelten zwei RP-HPLC Trennsysteme zur Ceramidanalytik in menschlichen Zellextrakten. Einerseits wurden perbenzoyleierte Ceramide im unteren UV-Bereich bei 230 nm detektiert, andererseits wurde eine Methode unter Verwendung einer direkten Kopplung der HPLC mit einem APCI-Massenspektrometer vorgestellt. Während die erste Methode wieder mit einer aufwendigen und unselektiven Detektion verbunden ist, verbindet die zweite die Trennkraft der RP-HPLC mit der Leistungsfähigkeit massenspektrometrischer Detektion und kommt so der Methode der Wahl sehr nahe. Die in dieser Arbeit verwendete Kopplung einer nichtwäßrigen RP-HPLC mit einem ES-Massenspektrometer bietet darüber hinaus die Möglichkeit zur simultanen Bestimmung anderer Lipide aus dem Hautlipidbereich wie z. B. Fettsäuren, Cholesterylsulfat sowie die Ceramid-Vorstufen der Glucosylceramide. Die Zuordnung der einzelnen chromatographisch getrennten Ceramide der Stratum corneum-Lipide aus Abbildung 20 zu den von Robson et al. (67) beschriebenen Varianten erfolgte über die molekulare Masse, die Retentionszeit und über MS/MS-Fragmentierungsexperimente einzelner Substanzen im Verlauf der chromatographischen Trennung. Unter Berücksichtigung aller erhaltenen Hinweise läßt sich so eine Vielzahl einzelner Ceramidspezies differenzieren, die in Abbildung 21 zusammengefaßt dargestellt sind. Jede Einzelabbildung zeigt im gleichen Chromatogramm einer Hautlipidprobe die unterschiedlichen homologen Spezies einer sphingoiden Base und damit die unterschiedlichen Varianten eines Ceramids.

Da unterschiedliche Ceramidspezies die gleiche molekulare Masse haben können, zeigen viele Massenspuren auch mehrere Peaks. Die jeweilig maßgeblichen Signale sind daher mit senkrechten Balken gekennzeichnet. Die Bezeichnung der einzelnen Spezies bezieht sich vereinfachend auf die Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäure bei einer vorausgesetzten Kettenlänge der sphingoiden Base von C₁₈. Eine

Kettenlänge von C₁₈ kommt bei den meisten sphingoiden Basen als häufigste Variante vor (65, 68).

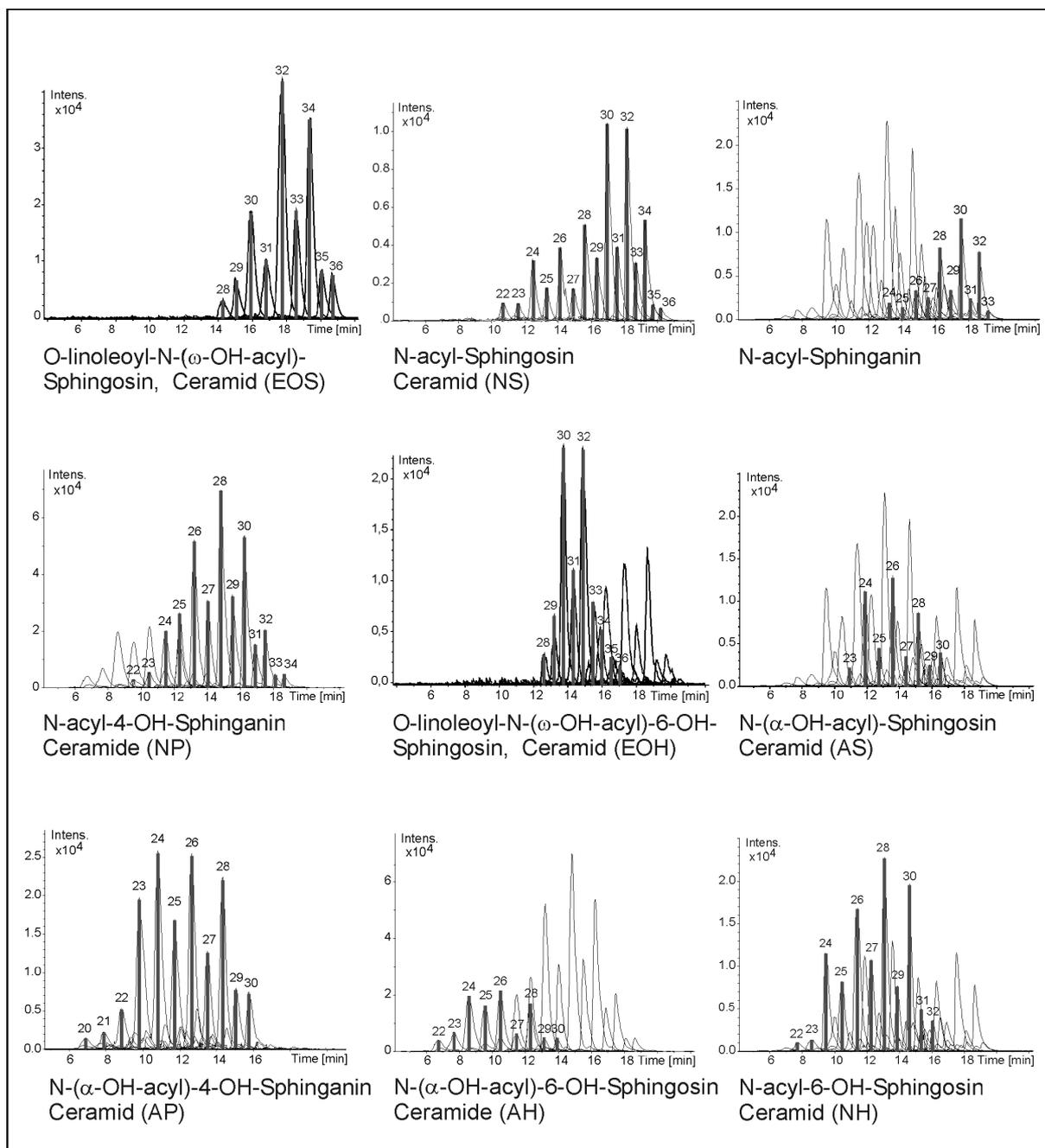


Abbildung 21: Massenspektren einzelner isolierter Stratum corneum-Ceramide [M-H]⁻, HPLC-API-ES-MS (neg. Ionenmodus). In jeder Einzelabbildung sind die homologen Spezies einer sphingoiden Base (Ceramid-Grundstruktur) dargestellt. Die Beschriftung der Peaks kennzeichnet die Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäure (vorausgesetzte Kettenlänge der sphingoiden Base: C₁₈)

Mit Hilfe von MS/MS-Fragmentierungsexperimenten der einzelnen Ceramidvarianten im Verlauf der chromatographischen Trennung zeigt sich aber, daß in jedem Peak zu einem geringen Anteil auch andere Spezies enthalten sind. Daraus folgt, daß Varianten mit einer um eine Methylengruppe verlängerten Alkylkette in der amidgebundenen Fettsäure verbunden mit einer entsprechenden Verkürzung der sphingoiden Base (bzw. umgekehrt) chromatographisch nicht differenziert werden können.

Weiterhin zeigt sich, daß Kettenlängen der amidgebundenen Fettsäuren $> C_{28}$ in den einfach veresterten Ceramiden nur in sehr geringen Umfang enthalten sind. Bei den mit größeren Ziffern beschrifteten Varianten sind demnach sphingoide Basen enthalten, die entsprechend längere Ketten als C_{18} aufweisen. Dieses entspricht auch den Ergebnissen von Wertz et al. (65, 68), die nach dünnschichtchromatographischer Trennung der menschlicher Stratum corneum-Ceramide die Kettenlängenverteilung der amidgebundenen Fettsäuren und sphingoiden Basen nach Hydrolyse mittels gaschromatographischen Analysen untersucht haben.

Zusätzlich zu den von Robson et al. (67) anhand dünnschichtchromatographischer Untersuchungen beschriebenen Ceramide wurden in den menschlichen Stratum corneum Ceramiden durch die HPLC-API-ES-MS Analysen zwei weitere Ceramide differenziert. Bei dem einen handelt es sich um das N-acyl-Sphingarin, bei dem anderen um das N-acyl-6-OH-Sphingosin. N-acyl-Sphingarin wird auch von Wertz et al. (71) erwähnt, die Bezeichnung erfolgt aber zusammen mit dem N-acyl-Sphingosin, Cer(NS) als Ceramid 2.

Zum Nachweis des N-acyl-6-OH-Sphingosins wurden MS/MS-Fragmentierungsexperimente (negativer Ionenmodus) durchgeführt. In Abbildung 22 ist das Fragmentenspektrum von N-lignoceroyl-6-OH-Sphingosin abgebildet. Das Fragmentierungsmuster folgt grundsätzlich dem entsprechenden Schema für Sphingosin-Ceramide. Die Differenzierung zum massengleichen N-(α -OH-lignoceroyl)-Sphingosin, Cer(AS) gelingt durch das fehlende Fragment der molekularen Masse (amidgebundene Fettsäure -46 amu), das für amidgebundene α -OH-Fettsäuren charakteristisch ist (vgl. Abbildung 15).

Die chromatographische Differenzierung des N-acyl-6-OH-Sphingosins mittels LC/MS ist auch Teil einer eigenen Publikation (Vietzke et al., (110)). Die Anwesenheit dieses Ceramids in menschlichen Stratum corneum-Lipiden wurde auch von Guey et al. (106) nach RP-HPLC Trennung perbenzoylierter Ceramide und Detektion mit einem APCI-Massenspektrometer postuliert.

Ein weiterer Nachweis erfolgte durch Stewart und Downing (111) mittels dünn-schichtchromatographischer Trennung und NMR-spektrometrischen Untersuchungen der entsprechenden isolierten Bande.

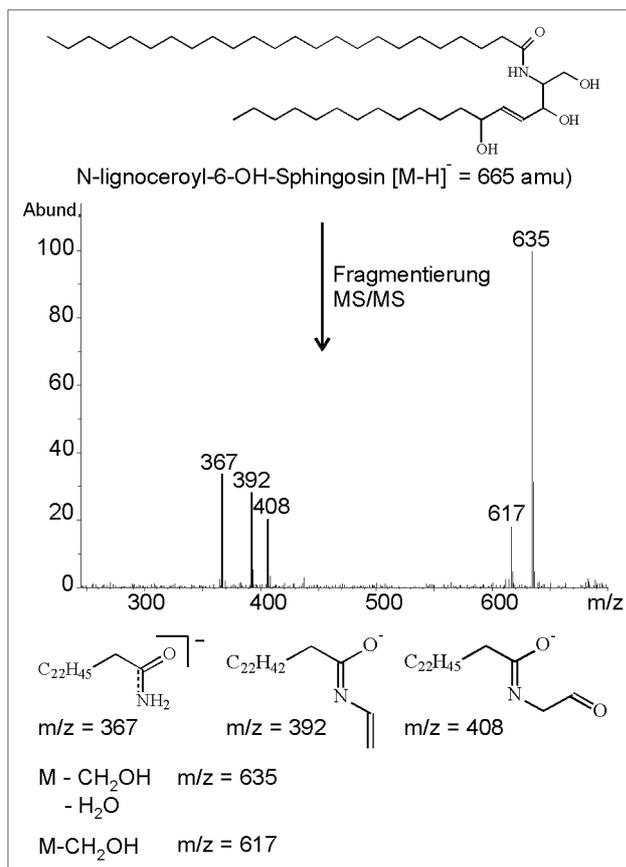


Abbildung 22: API-ES MS/MS Fragmentierungsexperimente von Cer(NH); N-acyl-6-OH-Sphingosin (negativer Ionenmodus).

Die leistungsfähige Differenzierung der einzelnen Ceramidspezies zeigt, daß der Einsatz der direkten Kopplung der HPLC mit einem Electrospray-Ionenfallen-Massenspektrometer die Methode der Wahl zur Untersuchung der Ceramide aus isolierten Stratum corneum-Lipiden darstellt. Neben der Identifizierung einzelner Spezies sind aber auch quantitative Untersuchungen möglich.

Die Quantifizierung über einzelne Signalintensitäten im Spritzenpumpen-Direkteinlaß oder durch *flow-injection* ohne Trennsäule (97, 98) ist allerdings weniger empfehlenswert, da bei matrixbelasteten Proben wie den komplex zusammengesetzten Hautlipidextrakten der Ionisierungsprozeß in der Electrospray-Ionenquelle negativ beeinflußt bzw. unterdrückt werden kann (112, 113). Außerdem ist die Zuordnung der Ceramide wegen der Massengleichheiten verschiedener Varianten nicht eindeutig.

Bessere Ergebnisse werden durch Integration der Peakflächen nach chromatographischer Trennung erzielt. Die Auswertung kann mit Hilfe von Kalibrierfunktionen und Referenzsubstanzen vorgenommen werden bzw. als Summendarstellung aller detektierbaren Peaks erfolgen.

Zur Analytik größerer Probenmengen, wie sie z. B. bei Untersuchungen von Probandenkollektiven anfallen, können verschiedene Techniken zur Automatisierung eingesetzt werden. Das gilt sowohl für die Datenaquisition (automatischer Probengeber für die HPLC) als auch für die Datenauswertung. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten ESQUIRE-LC (Fa. Bruker, Bremen) besteht die Möglichkeit, sog. *procedures* zu editieren, mit denen im Chromatogramm ausgewählte Massenspuren in verschiedenen Zeitfenster integriert werden können.

4.1.6 Vergleichende Untersuchung der Ceramidverteilung menschlicher Stratum corneum-Lipide (LC/MS und dünnschichtchromatogr. Trennungen)

Die Analytik der menschlichen Stratum corneum-Ceramide wird bei Untersuchung verschiedener Hautzustände (gesunde Haut, trockene oder erkrankte Haut) häufig mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Trennungen auf Kieselgelplatten durchgeführt (38, 66). Das Trennprinzip beruht dabei auf den hydrophilen Wechselwirkungen der freien Silanolgruppen des Kieselgels und der polaren Gruppen der Ceramide. Die Ceramide werden so nach ihrer Polarität in einzelne Gruppen aufgetrennt und können mit Hilfe photodensitometrischer Methoden quantifiziert werden. In der reversed-phase HPLC beruht die Trennung auf den hydrophoben Wechselwirkungen des alkylierten Kieselgels der stationären Phase und den unpolaren Alkylketten der amid- / ester gebundenen Fettsäure(n) bzw. der sphingoiden Base.

Der routinemäßige Einsatz der LC/MS in der Ceramidanalytik erfordert zunächst einen direkten Vergleich der beiden Analyseverfahren, da sichergestellt werden muß, daß beide Methoden zum gleichen Ergebnis kommen. Konkret sollte z. B. die Bande Ceramid 2 (Cer(NS)) auf der DC-Platte auch der entsprechenden detektierten und integrierten Homologenverteilung aus der LC/MS Analyse entsprechen. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit wurden isolierte menschliche Stratum corneum-Lipide mit einem dünnschichtchromatographischen System aufgetrennt (Wertz et al. (65), Lampe et al. (48)) und die entsprechenden Banden mit Hilfe der LC/MS untersucht. Die Detektion der dünnschichtchromatographischen Platten wird normalerweise nach einem Kupfersulfat-Säuretauchbad im Trockenschrank durchgeführt (Veraschen organischen Materials). Da dieses eine Zerstörung der Ceramidmoleküle bewirkt, mußte eine andere Detektionstechnik verwendet werden. Die Platten wurden alternativ mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Primulin) besprüht und die aufgetrennten Banden unter UV-Licht detektiert. Das Kieselgel der ausgekratzten Banden wurde anschließend mit n-Hexan/Ethanol (95:5, v:v) extrahiert. Dieses Lösungsmittelgemisch ermöglicht die Elution/Extraktion der Ceramide, verhindert aber gleichzeitig, daß größere Mengen an Kieselgel mitgelöst werden. Gelöstes Kieselgel würde als nichtflüchtiger Bestandteil Probleme bei der Kopplung mit dem Massenspektrometer ergeben.

In Abbildung 23 ist eine dünnschichtchromatographische Trennung menschlicher Stratum corneum-Lipide dargestellt. Zusätzlich zu den bei Ceramiduntersuchungen normalerweise ausgewerteten Banden Cer 1-7 wurden auch weitere Bereiche (Flächen a-d) ausgekratzt, extrahiert und mit der entwickelten LC/MS-Methode auf mögliche Ceramidspezies untersucht.

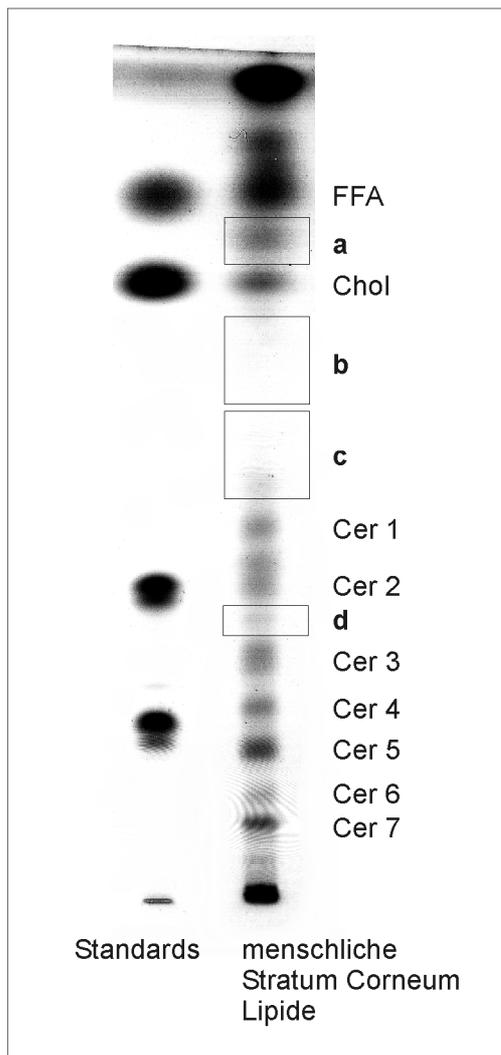


Abbildung 23:

Dünnschichtchromatographische Trennung von menschlichen Stratum corneum-Ceramiden. Bande Cer 1-7: Ceramide; FFA: Fettsäuren; Chol: Cholesterin. Die Flächen a-d kennzeichnen die zusätzlich ausgekratzen und auf Ceramide untersuchten Bereiche

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der schon vorgestellten *procedures*, mit denen in bestimmten Retentionszeitbereichen („Zeitfenstern“) die jeweiligen Massenspuren der Ceramide dargestellt und vorhandene Peaks nach bestimmten Vorgaben integriert werden. Das Ergebnis der untersuchten Ceramidbanden Cer 1-7 ist in Abbildung 24 zusammengefaßt dargestellt.

Durch die automatisierte Auswertung der einzelnen Massenspuren in Abbildung 24 ist die Basislinie der einzelnen Chromatogramme nur innerhalb der jeweilig integrierten Zeitfenster abgebildet.

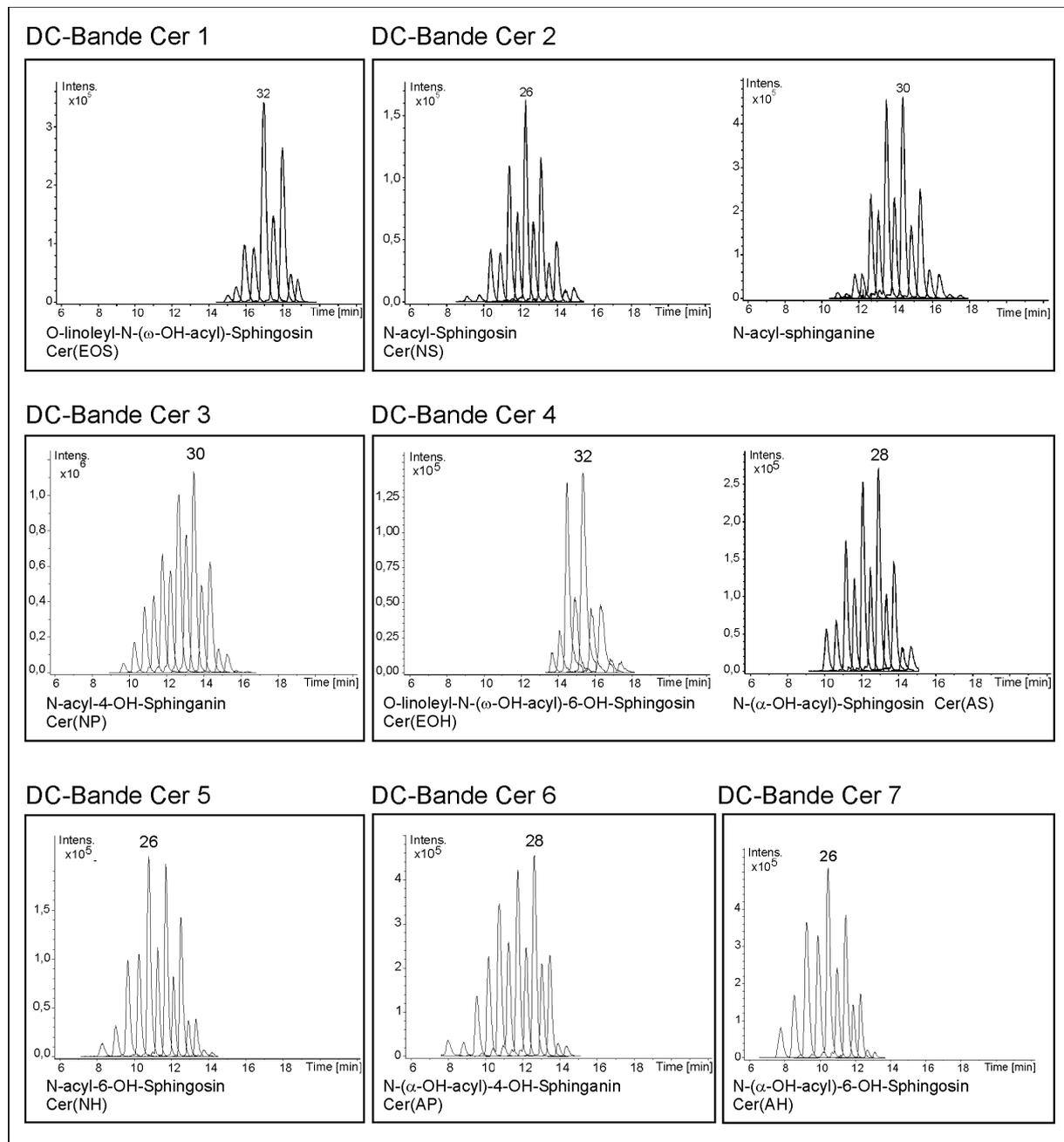


Abbildung 24: Massenspuren einzelner Stratum corneum-Ceramidspezies [M-H]⁻, HPLC-API-ES-MS (neg. Ionenmodus). Jeder Kasten zeigt die detektierten Ceramidspezies der jeweilig ausgekratzten und extrahierten DC-Bande. Die Beschriftung des größten Peaks kennzeichnet die Kettenlänge der amidegebundenen Fettsäure bei einer vorausgesetzten Kettenlänge der sphingoiden Base von C₁₈.

Das Ergebnis der LC/MS Analysen stimmt grundsätzlich mit der dünnschichtchromatographischen Einteilung und Bezeichnung der einzelnen Ceramidbanden überein. In der DC-Bande Cer 4 wurde allerdings neben Ceramid 4 (Cer(EOH)) auch Ceramid 5 (Cer(AS)) nachgewiesen. In der Bande Cer 5 ist kein Ceramid 5 enthalten, sondern ausschließlich das erst seit kurzer Zeit bekannte N-acyl-6-OH-Sphingosin, (Cer(NH)). Die üblicherweise verwendete Bezeichnung der DC-Bande Cer 5 als Cer(AS) ist demnach nicht richtig. Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit den Untersuchungen von Stewart und Downing (111). Das von ihnen beschriebene N-acyl-6-OH-Sphingosin (Cer(NH)) wurde in einer vergleichbaren dünnschichtchromatographischen Trennung der Stratum corneum Lipide ebenfalls aus der Bande des Ceramid 5 isoliert. In einigen der zusätzlich ausgekratzen Bereiche a-d der dünnschichtchromatographischen Platte (vgl. Abbildung 21) wurden ebenfalls Homologenverteilungen von Ceramiden in den LC/MS Chromatogrammen erhalten, obwohl die ausgekratzen Flächen der Platte keine bzw. nur sehr schwache Banden aufwiesen. Die molekularen Massen dieser Signale liegen zwischen 900 und 1300 amu, so daß es sich um ω -veresterte Ceramide handeln könnte.

Zur Identifizierung dieser Ceramide können mehrere Kriterien herangezogen werden. Die molekulare Masse muß zunächst möglichen theoretischen Spezies entsprechen. Dabei ist zu beachten, daß die Signalintensität der Spezies mit gerader Anzahl von Kohlenstoff in der Alkylkette der amidgebundenen Fettsäure in der Homologenverteilung größer sein muß als die mit ungerader Anzahl. Dieses ist auf die größere Häufigkeit geradzahligter Kohlenwasserstoffketten zurückzuführen, was in den Biosynthesemechanismen der Natur begründet ist. Ein weiteres wichtiges Identifizierungskriterium ist das Fragment der ω -veresterten Fettsäure, das bei der Aufnahme von Massenspektren unter CID-Spannungseinstellungen erhalten wird. Weiterhin muß auch die Polarität der Ceramide beachtet werden, die durch Vergleich der Retentionszeiten abgeschätzt und verglichen werden kann. In Tabelle 6 ist eine Übersicht von möglichen ω -veresterten Ceramiden angegeben. Zusätzlich zu den von Robson et al. (67) beschriebenen Ceramiden 1 (Cer(EOS)) und Ceramid 4 (Cer(EOH)), die auf den sphingoiden Basen Sphingosin und 6-OH-Sphingosin beruhen, ist in der Tabelle ein weiteres mögliches Ceramid aufgelistet, das als sphingoid Base Phytosphingosin enthält. Der Nomenklatur nach Motta et al. (70) folgend, kann diese Variante auch als Cer(EOP) bezeichnet werden. Die Existenz dieses

Ceramids wurde als Bestandteil der menschlichen Stratum corneum-Lipide bisher noch nicht beschrieben. Das Vorkommen der glucosylierten Form in der menschlichen Epidermis wurde aber von Hamanaka et al. (114) erwähnt.

Tabelle 6: Molekulare Massen möglicher ω -veresterter Ceramide (Kettenlänge der sphingoiden Base: C₁₈)

amid- gebundene Fettsäure	Ceramid 1, Cer(EOS)			Ceramid 4, Cer(EOH)			Cer(EOP)		
	estergebundene Fettsäure			estergebundene Fettsäure			estergebundene Fettsäure		
	18:2	18:1	18:0	18:2	18:1	18:0	18:2	18:1	18:0
C 20	871	873	875	887	889	891	889	891	893
C 21	885	887	889	901	903	905	903	905	907
C 22	899	901	903	915	917	919	917	919	921
C 23	913	915	917	929	931	933	931	933	935
C 24	927	929	931	943	945	947	945	947	949
C 25	941	943	945	957	959	961	959	961	963
C 26	955	957	959	971	973	975	973	975	977
C 27	969	971	973	985	987	989	987	989	991
C 28	983	985	987	999	1001	1003	1001	1003	1005
C 29	997	999	1001	1013	1015	1017	1015	1017	1019
C 30	1011	1013	1015	1027	1029	1031	1029	1031	1033
C 31	1025	1027	1029	1041	1043	1045	1043	1045	1047
C 32	1039	1041	1043	1055	1057	1059	1057	1059	1061
C 33	1053	1055	1057	1069	1071	1073	1071	1073	1075
C 34	1067	1069	1071	1083	1085	1087	1085	1087	1089
C 35	1081	1083	1085	1097	1099	1101	1099	1101	1103
C 36	1095	1097	1099	1111	1113	1115	1113	1115	1117

Die Auswahl der gebundenen Fettsäure in Tabelle 6 folgt in Anlehnung an die Untersuchungen von Wertz et al. (68), dessen Arbeitsgruppe die Verteilung der gebundenen Fettsäuren der Ceramide 1 und 4 nach Hydrolyse durch gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester untersucht hat.

Linolsäure ist demnach mit 41.3 % die am häufigsten estergebundene Fettsäure. Die Summe an estergebundener Linol-, Öl- und Stearinsäure beträgt 65 %. Der Rest verteilt sich entsprechend auf Fettsäuren anderer Kettenlängen. Da aber nur einfach- oder zweifach ungesättigte bzw. gesättigte Fettsäuren vorkommen, werden von der Tabelle alle möglichen molekularen Massen erfaßt, wenn die Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäure entsprechend verkürzt oder verlängert wird. Die häufig-

ste amidgebundene Fettsäure ist die C₃₀- ω -OH-Fettsäure, deren Anteil im Ceramid 1 (Cer(EOS)) von Wertz et al. (68) mit 63,6 % angegeben wird.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Identifizierungskriterien lassen sich die in den angegebenen Bereichen der dünnenschichtchromatographischen Platte gefundenen Ceramide den in Tabelle 7 aufgeführten ω -veresterten Varianten zuordnen.

Tabelle 7: Identifizierung möglicher ω -veresteter Ceramide in den ausgekratzen Flächen a-d der dünnenschichtchromatographischen Platte

ausgekratze DC- Fläche bzw. Bande	mögliche Ceramide	
	Grundstruktur	ω -veresterte Fettsäure(n)
a Chol	Cer(EOS)	gesättigt (C ₂₀ -C ₂₆)
	Cer(EOP)	gesättigt (C ₁₆ -C ₂₆)
b c Cer 1	Cer(EOH)	gesättigt (C ₁₆ -C ₂₆)
	Cer(EOS)	Linolsäure
Cer 2 d Cer 3	Cer(EOP)	Linolsäure
	Cer(EOH)	Linolsäure
Cer 4	Cer(EOH)	Linolsäure

Mit Hilfe von CID-Fragmentspektren zeigte sich, daß in den Flächen/Banden a, Chol und c nur Ceramide mit ω -veresterten gesättigten Fettsäuren enthalten sind. In jedem Peak der LC/MS-Analyse sind dabei jeweils mehrere Varianten verborgen, die sich in der Kettenlänge unterscheiden. In den Banden bzw. ausgekratzen Flächen Cer 1, d und Cer 4 wurden nur Ceramidspezies mit ω -veresteter Linolsäure gefunden, d. h. die Massenspektren der Peaks zeigen unter CID-Bedingungen ausschließlich ein Fragment mit 279 Masseneinheiten (Linolsäure [M-H]).

Neben den postulierten Grundstrukturen sind aber auch andere Varianten ω -veresteter Ceramide denkbar, die z. B. amidgebundene α -OH-Fettsäuren enthalten. Derartige Varianten wurden allerdings in der Literatur noch nicht beschrieben.

In Abbildung 25 ist exemplarisch ein LC/MS-Chromatogramm der Ceramide aus der DC-Fläche c ausgewählt. Stellt man die CID-Fragmente der ω -veresterten Fettsäuren als Massenspuren dar ($[M-H]^-$), erscheinen unter jedem Ceramid-Peak die entsprechenden Signale der enthaltenen ω -veresterten Fettsäuren.

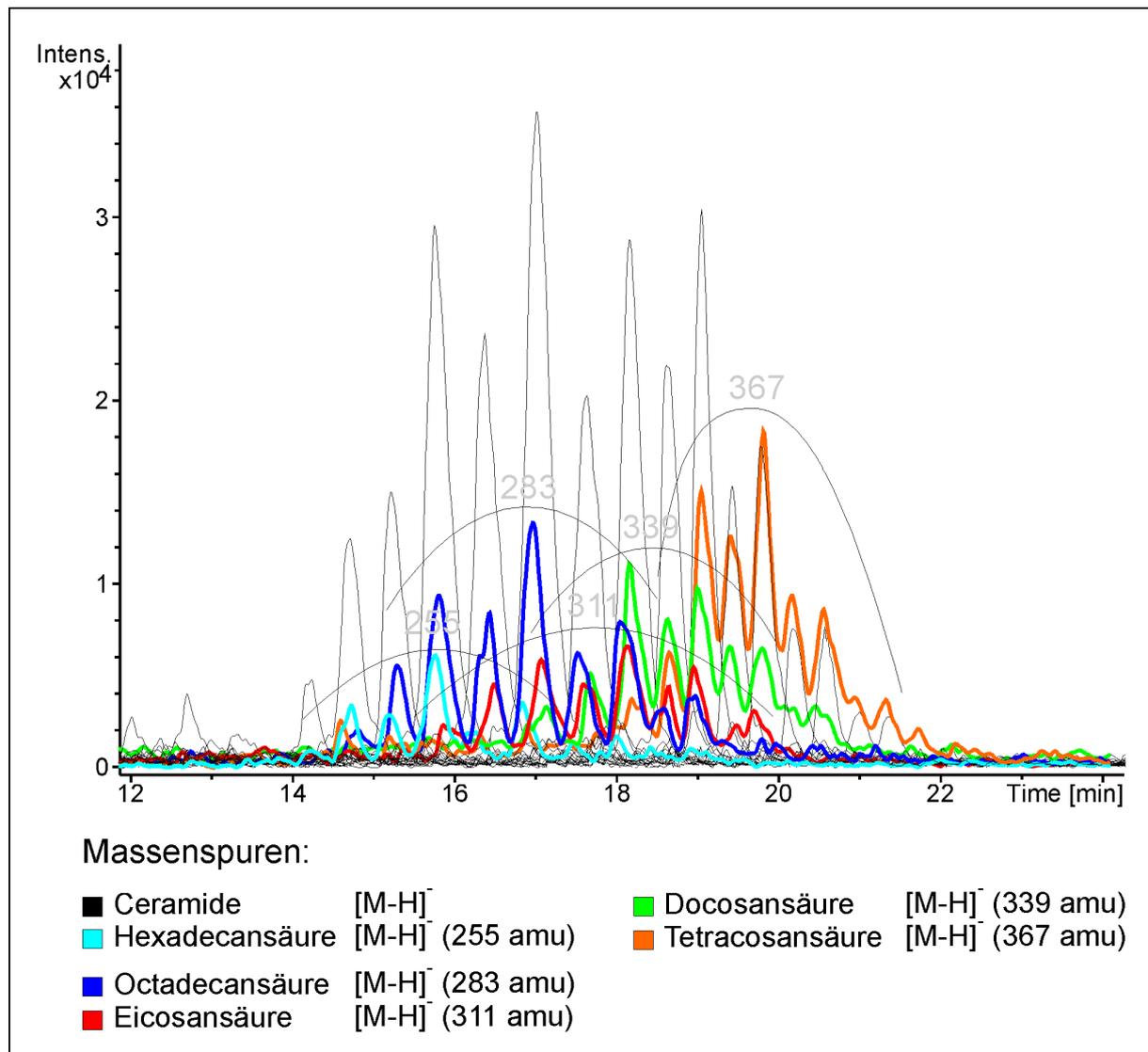


Abbildung 25: Massenspuren ω -veresteter Ceramide aus der ausgekratzen DC-Fläche c (schwarz, $[M-H]^-$), HPLC-API-ES-MS (neg. Ionenmodus). Die Massenspuren der durch CID-Fragmentierung abgespaltenen ω -veresterten Fettsäuren sind farbig dargestellt.

Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, liegen die Massenspuren der ω -veresterten Fettsäuren nicht exakt übereinander. Unter jedem Peak der Ceramid-Massenspur wird eine Abfolge verschiedener Varianten sichtbar, wobei diejenigen mit kürzerkettiger ω -veresteter Fettsäure früher eluieren.

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wurden bei den einzelnen ausgekratzen DC-Flächen bzw. Banden nur Ceramidspezies gefunden, die ω -veresterte Fettsäuren mit der gleichen Anzahl an Doppelbindungen enthalten. Ceramide mit ω -veresterten einfach ungesättigten Fettsäuren wie z. B. Ölsäure wurden nicht gefunden. Neben den in Tabelle 7 beschriebenen Ceramid-Homologenverteilungen waren in Spuren aber noch weitere Homologenverteilungen detektierbar gewesen, von denen aber wegen schlechter Signal-Rauschverhältnisse keine CID-Massenspektren erhalten werden konnten.

Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Beschreibungen von Wertz et al. (65, 68) und Conti et al. (115). Beide Arbeitsgruppen untersuchten die Verteilung der estergebundenen Fettsäuren der dünn-schichtchromatographisch getrennten Ceramide 1 (Cer(EOS)) und 4 (Cer(EOH)). Nach Hydrolyse der Esterbindungen und gaschromatographischer Analyse der Fettsäuremethylester wurde jeweils eine komplexe Verteilung aus geradzahigen und ungeradzahigen, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren verschiedener Kettenlängen erhalten.

Obwohl die in dieser Arbeit verwendete dünn-schichtchromatographische Trennung der Stratum corneum-Lipide eine sehr gute Qualität aufweist, ist es jedoch mit dem Auskratzen der jeweiligen Banden nicht gelungen, die einzelnen Ceramidgruppen vollständig voneinander zu trennen und „sortenreine“ Ceramidgruppen zu erhalten. In den LC/MS Chromatogrammen der einzelnen Extrakte sind häufig zu einem kleinen Anteil kürzerkettige und damit polarere Ceramidspezies aus der höher laufenden Bande bzw. langkettige und damit unpolare Ceramidspezies aus der tiefer laufenden Bande enthalten. Diese unzureichende Trennung wird auch im densitometrischen Profil der dünn-schichtchromatographischen Platte sichtbar, da die einzelnen Peaks nicht grundliniengetrennt sind.

Wenn die ausgekratzen Banden der DC nun mit den Flanken der höher und tieferlaufenden Banden „verunreinigt“ sind, ist es durchaus möglich, daß nach Hydrolyse sämtlicher Esterbindungen ein komplettes Spektrum der unterschiedlichsten Fettsäuren erhalten wird.

Auf der anderen Seite ist aber auch zu beachten, daß in der DC-Bande Cer 2 sowohl N-acyl Sphingosin (Cer(NS)) als auch N-acyl-Sphinganin gefunden wurden. Obwohl sich die beiden Ceramide um eine Doppelbindung in der sphingoiden Base unterscheiden, werden sie vom dünnenschichtchromatographischen System nicht aufgetrennt.

Die Tatsache, daß die ω -veresterten Ceramide aufgetrennt werden, obwohl sie sich von der Polarität auch nur um eine Doppelbindung (in der ω -veresterten Fettsäure) unterscheiden, erscheint zunächst widersprüchlich. Möglicherweise ist dieses unterschiedliche chromatographische Verhalten auf eine veränderte Molekülgeometrie durch die trans-Doppelbindungen der ω -veresterten Fettsäuren zurückzuführen.

Zur Absicherung dieser Ergebnisse sind weitere Untersuchungen notwendig. Zur Bestimmung des chromatographischen Verhaltens der unterschiedlichen ω -veresterten Ceramide ist die chromatographische Trennung von Referenzsubstanzen erforderlich, die entsprechende definierte ω -veresterte Fettsäuren enthalten. Weiterhin wäre es aber auch interessant, mit der entwickelten LC/MS Methode isolierte Stratum corneum Lipide von sogenannten *essential fatty acid deficiency* (EFAD)-Mäusen zu untersuchen, in deren Ceramiden statt Linolsäure ausschließlich Ölsäure eingebaut ist.

4.2 Untersuchung der Ceramidverteilung (LC/MS) im Rahmen von Probandenversuchen

Probengewinnung und Auswertung

Die Untersuchung der Zusammensetzung menschlicher Stratum corneum Ceramide setzt die Anwendung geeigneter Lipidsammeltechniken voraus. Bei Untersuchung des Lipidmaterials von mehreren Personen (Probandenkollektiven) sind zur Auswahl des geeigneten Verfahrens mehrere Kriterien in Erwägung zu ziehen. Die Methode sollte schnell durchzuführen sein, den Erhalt repräsentativer Ceramidprofile ermöglichen, mit einer möglichst geringen Invasivität vorgehen und für die Probanden toxiologisch unbedenklich sein.

Die in dieser Arbeit untersuchten Stratum corneum-Lipide wurden sowohl mit Hilfe von Cyanoacrylat-Strippings nach der Methode von Imokawa et al. (38) als auch durch Lösungsmittel-Extraktionen mit Ethanol/Aceton in Anlehnung an Deffond et al. (36) gewonnen. Diese beiden Techniken entsprechen den oben genannten Anforderungen und werden von vielen Arbeitsgruppen bei Hautforschungsprojekten verwendet. Die jeweilige Durchführung sowie die einzelnen Probenaufarbeitungsschritte sind in Abschnitt 7.1 angegeben.

Da für den Großteil der untersuchten Ceramide keine Referenzsubstanzen verfügbar sind, wurde die Quantifizierung mit der 100 %-Methode (ohne Kalibrierung) vorgenommen. Diese Methode dient zur Bestimmung der relativen Zusammensetzung von Substanzgemischen. Die Ermittlung dieser relativen Zusammensetzung ist dabei nicht von der eingesetzten Substanzmenge abhängig.

Eine gravimetrische Bestimmung der extrahierten Lipide oder das Erfassen anderer Parameter wie der Proteingehalt des Cyanoacrylat-Strippings als Bezugsgröße zur erfaßten Lipidmenge ist demnach nicht erforderlich. Bei vergleichenden Untersuchungen muß aber beachtet werden, daß durch die relative Darstellung die Zunahme von Gehalten stets mit einer entsprechenden Abnahme anderer verbunden ist.

Bei allen untersuchten Hautlipidproben wurden 116 einzelne Ceramidvarianten quantifiziert. Zur Darstellung einzelner Ceramidgruppen wurden jeweils alle Kettenlängen-Varianten eines Ceramid-Grundkörpers zusammengefaßt, die sich in der amidgebundenen Fettsäure unterscheiden. Auf diese Weise ist ein Vergleich der Ergebnisse mit Daten aus dünnenschichtchromatographischen Trennungen anderer Arbeitsgruppen möglich. Beim Ceramid 1 (Cer(EOS)) und 4 (Cer(EOH)) (Robson et al. (67)) wurden diejenigen Varianten ausgewählt, die Linolsäure (C_{18:2}-Fettsäure) als ω -veresterte Fettsäure enthalten.

Beim Vergleich der Ergebnisse der LC/MS-Analytik mit denen anderer Analyseverfahren (z. B. Dünnschichtchromatographie) sind die jeweils unterschiedlichen Responsefaktoren zu berücksichtigen. Bei der LC/MS ist die Signalintensität der einzelnen Ceramide u. a. abhängig von der Ionisierbarkeit der einzelnen Substanzen.

Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des in dieser Arbeit entwickelten LC/MS-Analyseverfahrens und den zur Integration der Peaks editierten Auswertungsroutinen (*procedures*) wurde die Ceramidverteilung einer Hautlipidprobe sechsfach bestimmt. Die Lipide wurde mit Hilfe eines Cyanoacrylat-Abrisses erhalten. Die einzelnen Ceramidvarianten wurden anschließend in Gruppen gleicher sphingoider Base zusammengefaßt.

In Abbildung 26 sind die Mittelwerte dieser Ceramidgruppen zusammen mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgetragen. Der durchschnittliche Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) der einzelnen Meßwerte liegt bei 2,1 %. Der höchste Wert wurde bei der Bestimmung des Cer(EOH) mit 4,1 % erhalten.

Mit Variationskoeffizienten unter 5 % stellt dieses Analyseverfahren eine reproduzierbare Methode dar und ist so zur Untersuchung der Ceramidverteilung bei vergleichenden Untersuchungen geeignet.

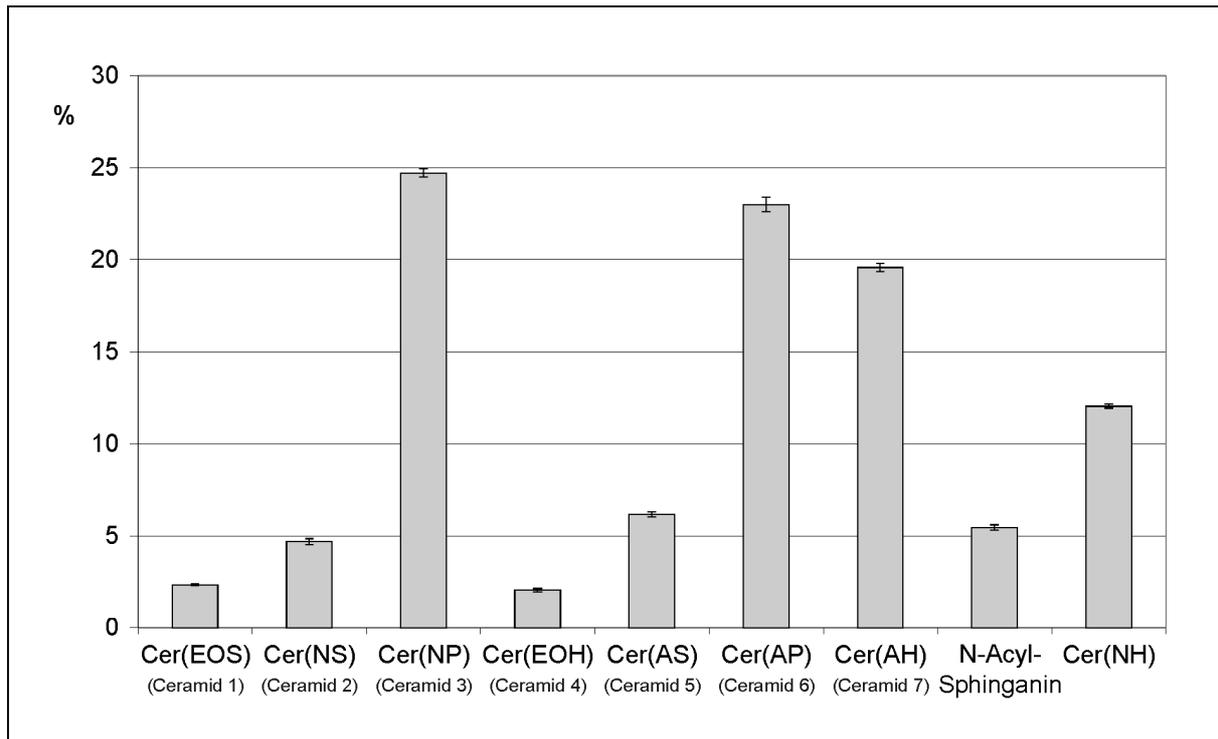


Abbildung 26: Untersuchung der Reproduzierbarkeit bei der Bestimmung der Ceramidverteilung menschlicher Stratum corneum-Lipide mittels LC/MS: Mittelwerte und Standardabweichungen

4.2.1 Gewinnung von Stratum corneum-Lipiden: Vergleich der oberflächlichen Lipidextraktion und der Lipidgewinnung durch Cyanoacrylat-Abrisse

Bei der Isolierung der menschlichen Stratum corneum-Lipide werden im allgemeinen Cyanoacrylat-Abrisse und Lösungsmittel-Extraktionen verwendet. Um eine Vergleichbarkeit der aus unterschiedlich gewonnenen Hautlipidproben bestimmten Ceramidprofile sicherzustellen, ist ein direkter Vergleich der beiden Lipidsammeltechniken erforderlich.

Für diesen Vergleich wurden mit jeweils beiden Techniken von einer Person Stratum corneum-Lipide gewonnen und die Ceramidverteilung mit der in dieser Arbeit entwickelten LC/MS-Analytik bestimmt.

Die Untersuchung wurde insgesamt an sechs hautgesunden Probanden jeweils an der Innenseite der beiden Unterarme etwa zehn Zentimeter unterhalb der Ellenbeuge durchgeführt.

Die bestimmten Ceramide aus den Lipid-Extrakten der beiden Sammeltechniken wurden jeweils zu Gruppen gleicher sphingoider Base zusammengefaßt. Die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen sind in Abbildung 27 dargestellt.

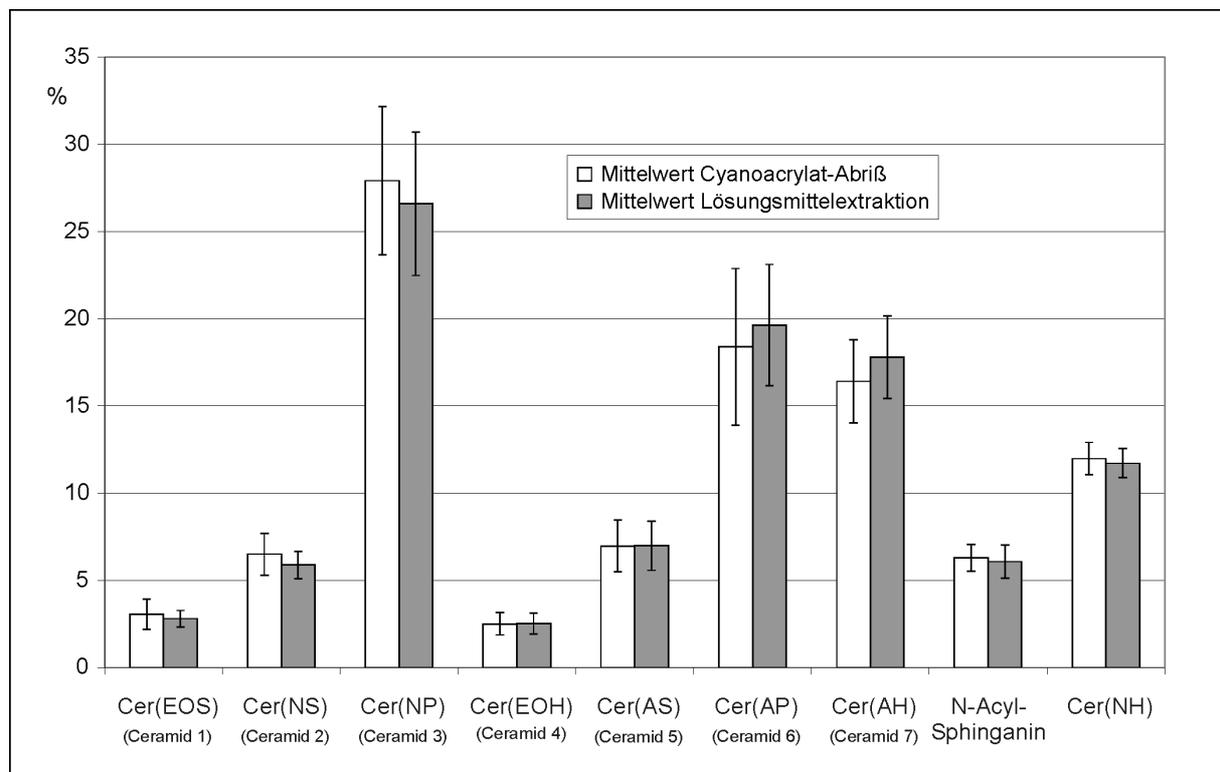


Abbildung 27: Vergleich der Ceramidverteilungen aus Stratum corneum-Lipiden von Cyanoacrylat-Abrissen und Lösungsmittlextrakten: Mittelwerte und Standardabweichungen.

Beim Vergleich der Ceramidverteilungen der einzelnen Probanden ergeben sich relativ große interindividuelle Unterschiede. Der durchschnittliche Variationskoeffizient der einzelnen Meßwerte liegt bei der Lipidgewinnung durch Cyanoacrylat-Abrisse bei 18,6 % und bei den Lösungsmittlextraktionen bei 16,0 %. Der höchste Variationskoeffizient wurde bei der Bestimmung der Cer(EOS)-Gehalte in den durch Cyanoacrylat-Abrisse gewonnenen Lipiden mit 28,2 % erhalten.

Beim Vergleich der Mittelwerte von Cer(NS), Cer(AP) und Cer(AH) beider Lipidge-
winnungstechniken wurden als Ergebnis des Student'schen t-Testes Unterschiede
erhalten, die als signifikant einzustufen sind.

In der Ceramidverteilung der Stratum corneum-Ceramide, die durch Cyanoacrylat-
Abrisse gewonnen wurden, ist demnach signifikant weniger Cer(NS) und signifikant
mehr Cer(AP) und Cer(AH) enthalten ($p < 0,05$).

Um eine übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse zu erhalten, wurden die Cera-
midgehalte aus den Lipiden der Cyanoacrylat-Abrisse jeweils auf die Gehalte aus
den Lösungsmittelextraktionen bezogen und die Unterschiede in Prozent in Form
einer sog. „Gewinn- und Verlustrechnung“ dargestellt. Gleiche Mittelwerte entspre-
chen so einem Unterschied von 0 %. Die graphische Auswertung dieser Berechnun-
gen (Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen) ist in Abbildung 28
dargestellt.

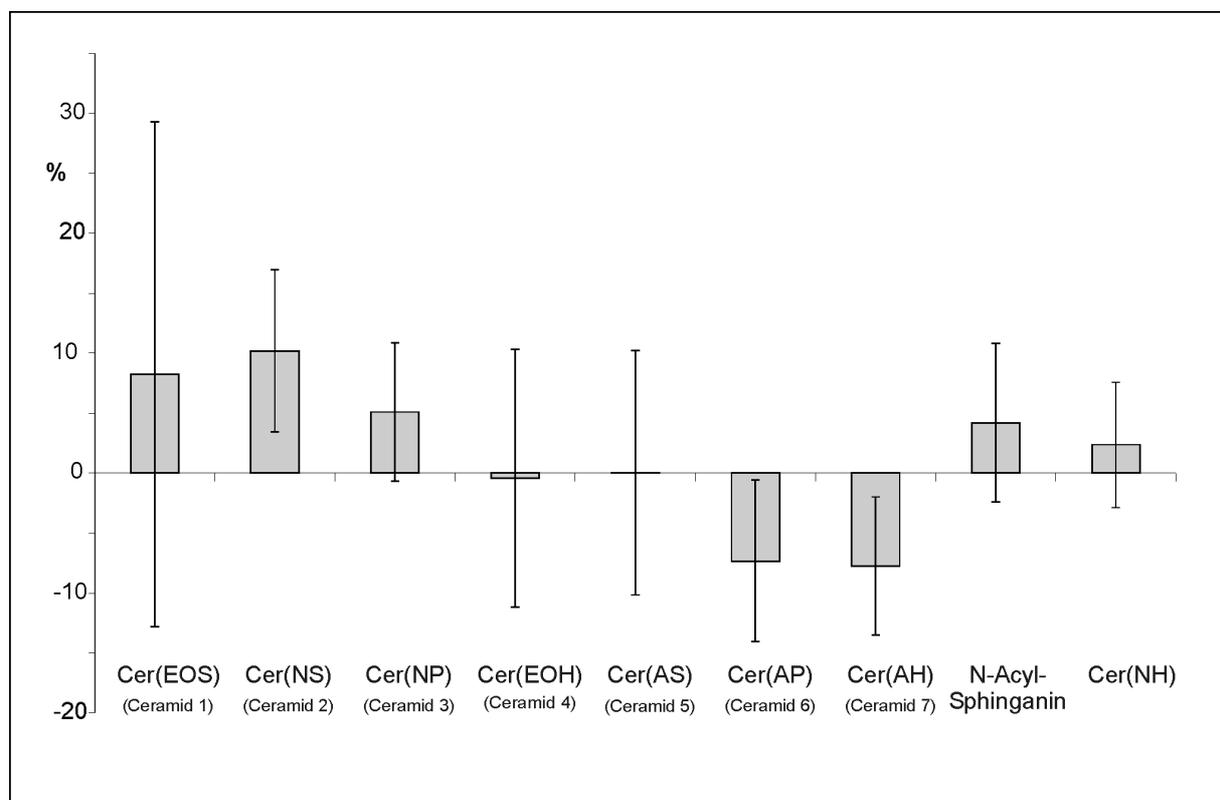


Abbildung 28: Änderungen der Ceramidgehalte: Cyanoacrylat-Abriß bezogen auf Lösungsmittel-Extraktion.

Betrachtet man die jeweiligen Unterschiede der Ceramide 1-7, die eine Abfolge steigender Polarität darstellen, wird ein Trend sichtbar. Die Lipidextrakte, die mit Hilfe von Cyanoacrylat-Abrissen gewonnen wurden, scheinen vergleichsweise mehr unpolare Ceramide zu enthalten. Bezogen auf die Lösungsmittel-Extrakte bedeutet dies, daß durch Anwendung dieser Technik vergleichsweise mehr polare Ceramide erfaßt werden.

Ordnet man jedoch die Ceramide N-acyl-Sphingarin und Cer(NH) aufgrund ihrer Gehalte an Hydroxygruppen und Doppelbindungen in die Polaritätsreihe von Ceramid 1-7 ein, befindet sich N-acyl-Sphingarin zwischen Cer(EOS) und Cer(NS) und Cer(NH) auf gleicher Höhe mit dem Cer(AS). Diese Einordnung folgt nicht dem scheinbaren Trend.

Im Vergleich der beiden Techniken zeigen drei von neun Ceramiden rechnerisch signifikante Unterschiede. Da mit dem Lipidmaterial von sechs Probanden aber nur eine sehr geringe Probenanzahl vermessen wurde und ein systematischer Trend der Ergebnisse nicht beweisbar ist, können die erhaltenen Ceramidverteilungen grundsätzlich als vergleichbar angesehen werden.

Dieses Ergebnis ist mit den Untersuchungen von Lavrijsen et al. (37) vereinbar, die ebenfalls eine vergleichende Untersuchung unterschiedlicher Methoden zur Lipidextraktion von Stratum corneum-Lipiden durchgeführt haben. Sie verglichen eine oberflächliche Lipidextraktion mit einer Biopsie-Extraktion und kamen zu dem Ergebnis, daß das erhaltene Ceramidprofil nicht von der Invasivität des Verfahrens abhängt.

Das für die Lösungsmittelextraktion verwendete Lösungsmittelgemisch Ethanol/Aceton (1:1, v:v) wurde erstmalig von Bleck et al. (116) verwendet. Der Einsatz dieses Gemisches für in vivo Extraktionen vermeidet im Gegensatz zu dem von Bligh und Dyer (35) benutzten Lösungsmittelgemisch Methanol/Chloroform (2:1, v:v) hautreizende und zellschädigende Wirkungen.

4.2.2 Vergleich der Ceramidverteilung von Probanden mit gesunder Haut und Probanden mit atopischem Ekzem vor und nach einer Bestrahlungstherapie

Im Rahmen dieses Vergleiches wurden die isolierten Stratum corneum Lipide von insgesamt 14 Personen untersucht. Acht der untersuchten Probanden leiden an einem atopischen Ekzem, die restlichen sechs dienten als hautgesunde Kontrollgruppe. Die Diagnose „atopisches Ekzem“ wurde von ärztlicher Seite nach den Kriterien von Hanifin und Rajka (117) vorgenommen.

Zur Gewährleistung vergleichbarer Ergebnisse war zum Zeitpunkt der Lipidextraktion sowie der letzten acht Wochen zuvor keiner der Probanden mit Glucokortikoiden behandelt worden bzw. einer Sonnenexposition ausgesetzt. Alle Probanden hatten ferner 24 Stunden vor Beginn der Untersuchung keine kosmetischen oder pharmazeutisch wirksamen Produkte angewendet. Um eine ausreichende Akklimatisierung sicherzustellen, hielten sich alle Probanden vor Gewinnung des Untersuchungsmaterials 20 Minuten in Ruhe bei Raumtemperatur auf. Die Lipidgewinnung wurde mit Hilfe von Cyanoacrylat-Abrissen an der Innenseite der Unterarme durchgeführt. Bei den Probanden mit atopischem Ekzem wurden ausschließlich nicht-entzündete Hautareale ausgewählt. Aus den hautgesunden und hautkranken Probanden wurde jeweils eine Gruppe gebildet. Die analysierten Ceramide aus den jeweiligen Lipidextrakten wurden wiederum zu Gruppen gleicher sphingoider Base zusammengefaßt. Die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen der beiden Ceramidverteilungen sind in Abbildung 29 dargestellt.

Wie bei den vergleichenden Untersuchungen der Lipidsammeltechniken ist auch das Ergebnis dieses Vergleiches von starken interindividuellen Unterschieden zwischen den einzelnen Probanden einer Gruppe geprägt. Der durchschnittliche Variationskoeffizient der einzelnen Meßwerte liegt bei den hautgesunden Probanden bei 21,9 % und bei den Probanden mit atopischem Ekzem bei 23,1 %. Der höchste Variationskoeffizient wurde bei der Bestimmung der Cer(EOS)-Gehalte bei den Probanden mit atopischem Ekzem mit 42,9 % erhalten.

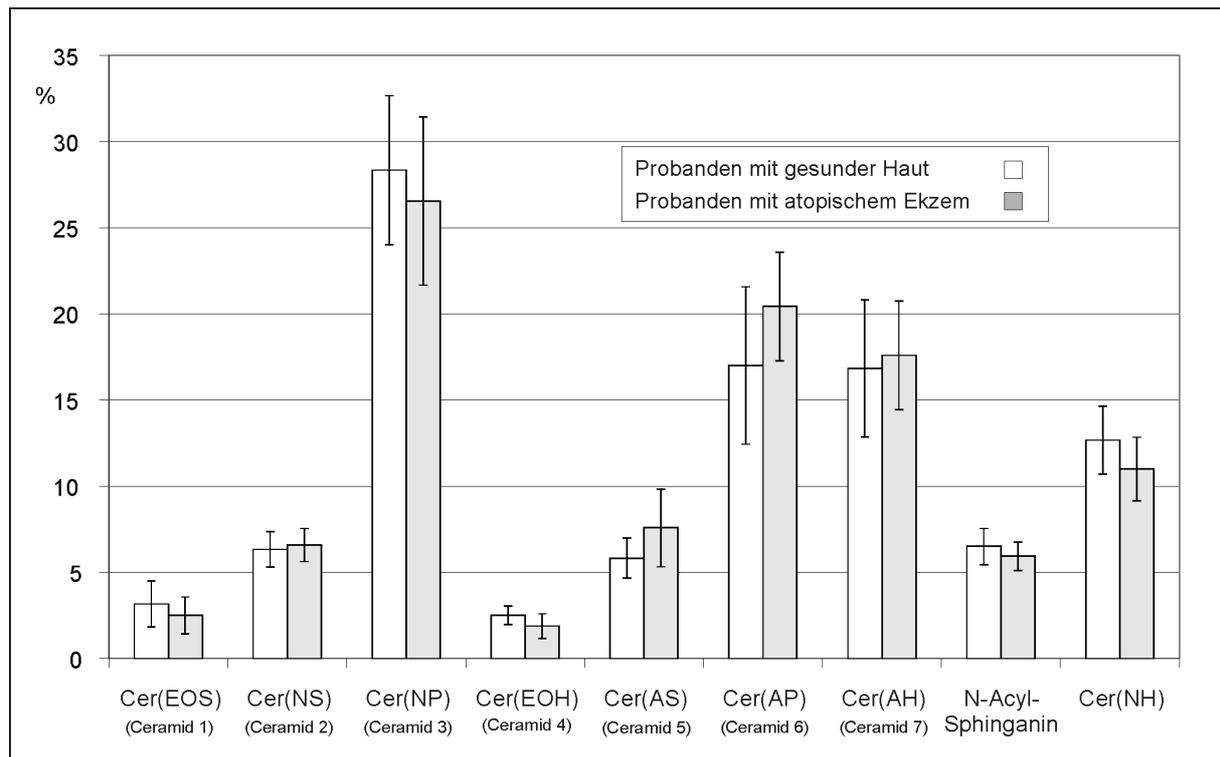


Abbildung 29: Vergleich der Ceramidverteilungen bei Probanden mit gesunder Haut bzw. atopischem Ekzem

Im direkten Vergleich der beiden Verteilungen in Abbildung 29 zeigen sich zwar einige tendenzielle Unterschiede, die aber mit Hilfe des durchgeführten Student'schen t-Testes als nicht-signifikant einzustufen sind. Eine Ausnahme bildet hier nur das Cer(EOH), dessen Mittelwerte sich signifikant unterscheiden ($p < 0,05$).

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob sich die einzelnen Ceramide bei Probanden mit gesunder bzw. erkrankter Haut in der Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäure unterscheiden, wurde die Varianz der gebundenen Fettsäuren in den Ceramiden beider Probandengruppen miteinander verglichen.

Eine Unterscheidung bezüglich einer möglichen Verlagerung der Kettenlängenverteilung der amidgebundenen Fettsäuren in Richtung kürzer- oder längererkettiger Fettsäuren wurde aber nicht festgestellt.

In Abbildung 30 sind exemplarisch die Ceramide von zwei hautgesunden und zwei hautkranken Probanden mit der Varianz der gebundenen Fettsäuren gegenübergestellt.

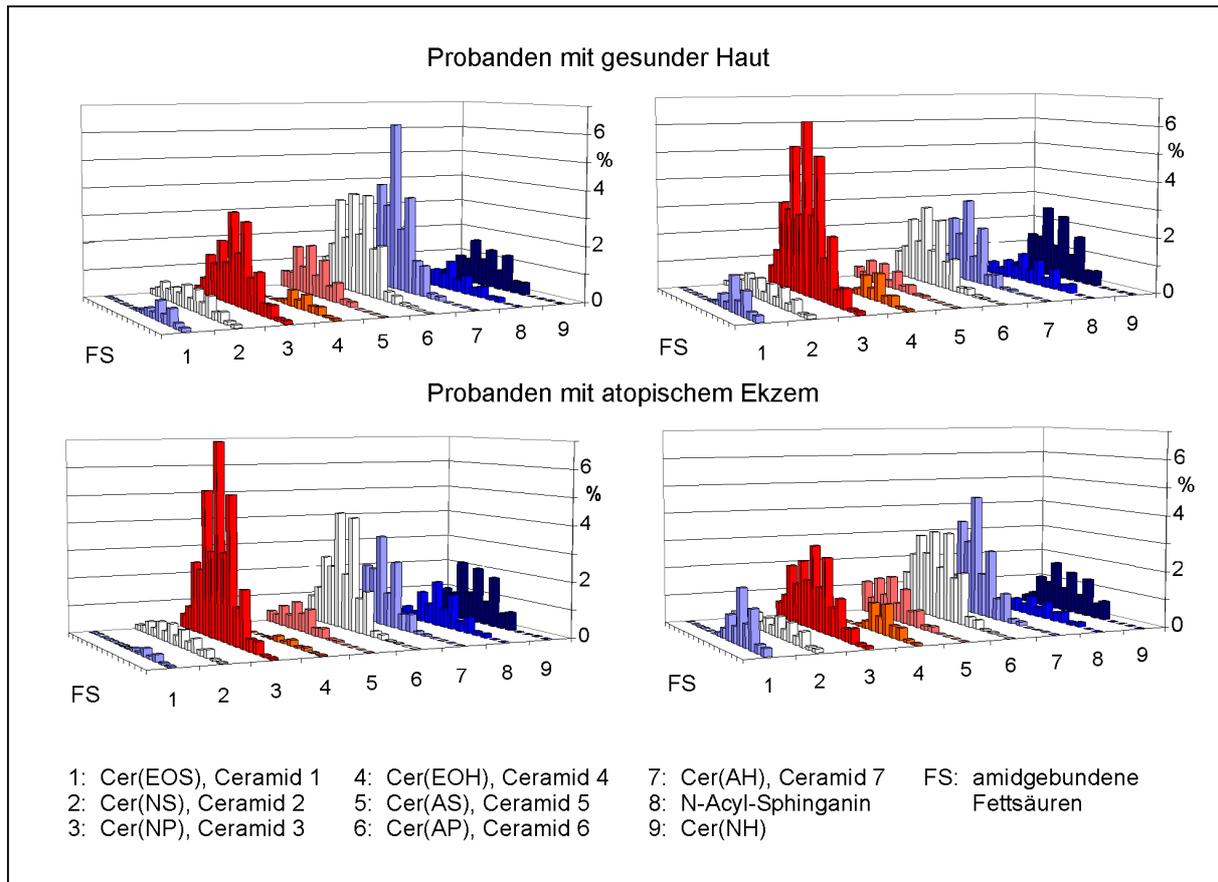


Abbildung 30: Ceramidverteilungen mit der Varianz amidgebundener Fettsäuren bei hautgesunden Probanden und Probanden mit atopischem Ekzem.

Die einzelnen Ceramidgruppen nehmen jeweils mit der ganzen Verteilung amidgebundener Fettsäuren größere oder kleinere Niveaus an. Gleichzeitig werden in Abbildung 30 auch die starken interindividuellen Unterschiede innerhalb der beiden Probandengruppen deutlich.

Zur Untersuchung des Effektes von Bestrahlungstherapien auf die Ceramidverteilung bei Probanden mit atopischem Ekzem wurden an zehn aufeinanderfolgenden Tagen Probanden an beiden Unterarmen bestrahlt, wobei unterschiedliche Lichtquellen eingesetzt wurden.

Eine Übersicht des Zeitablaufes der Untersuchungen und der entsprechenden Probenbezeichnungen ist in Abbildung 31 dargestellt.

Der rechte Unterarm wurde mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge von 340 bis 400 nm (UV-A) bestrahlt, wobei bei jeder Bestrahlung eine Dosis von 50 Joule/cm² appliziert wurde. Der linke Unterarm wurde mit einem Sonnensimulator (UV-B Anteil: 7,6 %) bestrahlt. Die Einzeldosis betrug jeweils 15 Joule/cm².

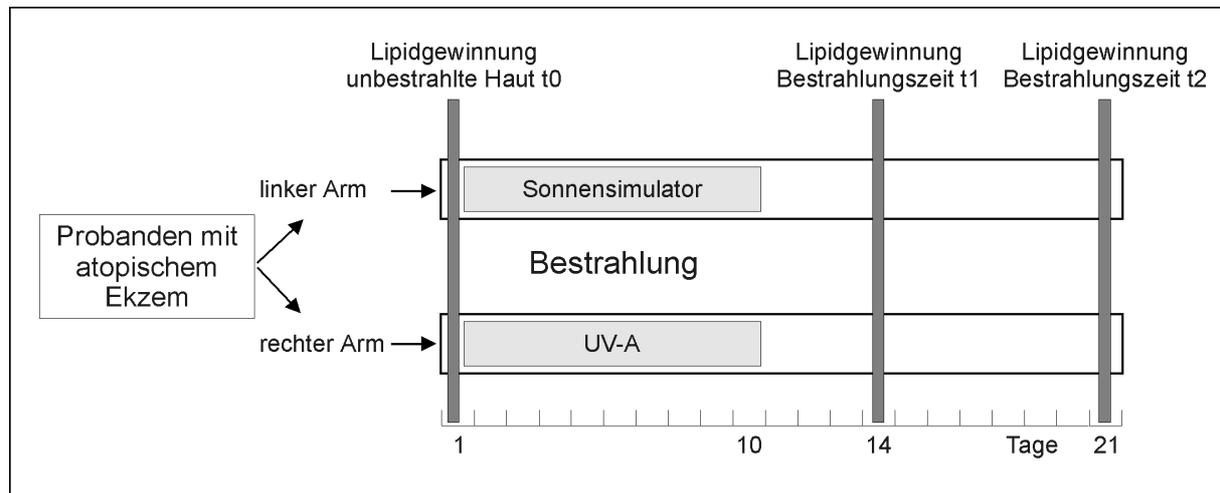


Abbildung 31: Durchführung und Probennahme beim Bestrahlungsversuch

Die Lipidgewinnungen wurden vor Beginn (Zeitpunkt **t0**) sowie 14 (Zeitpunkt **t1**) und 21 Tage (Zeitpunkt **t2**) nach Beginn der Bestrahlungstherapie durchgeführt. Die Lipide wurden jeweils an der Innenseite beider Unterarme etwa zehn Zentimeter unterhalb der Ellenbeuge gewonnen.

Die bestimmten Ceramidvarianten wurden wiederum zu Gruppen gleicher sphingoider Base zusammengefaßt und die Ergebnisse der unbestrahlten Haut mit denen der bestrahlten Haut (Zeitpunkt **t1** und **t2**) verglichen. Die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen nach Bestrahlung mit dem Sonnensimulator bzw. ultraviolettem Licht sind in Abbildung 32 angegeben.

Um eine übersichtlichere Darstellung der jeweiligen Veränderungen zu erreichen, wurden in Abbildung 32 weiterhin die Ceramidgehalte der mit den beiden Strahlenquellen bestrahlten Haut (Zeitpunkt **t1** und **t2**) jeweils auf den Gehalt der unbestrahlten Haut (**t0**) bezogen. Die Unterschiede sind in Prozent in Form einer „Gewinn- und Verlustrechnung“ angegeben. Gleiche Mittelwerte entsprechen einer Veränderung von 0 %.

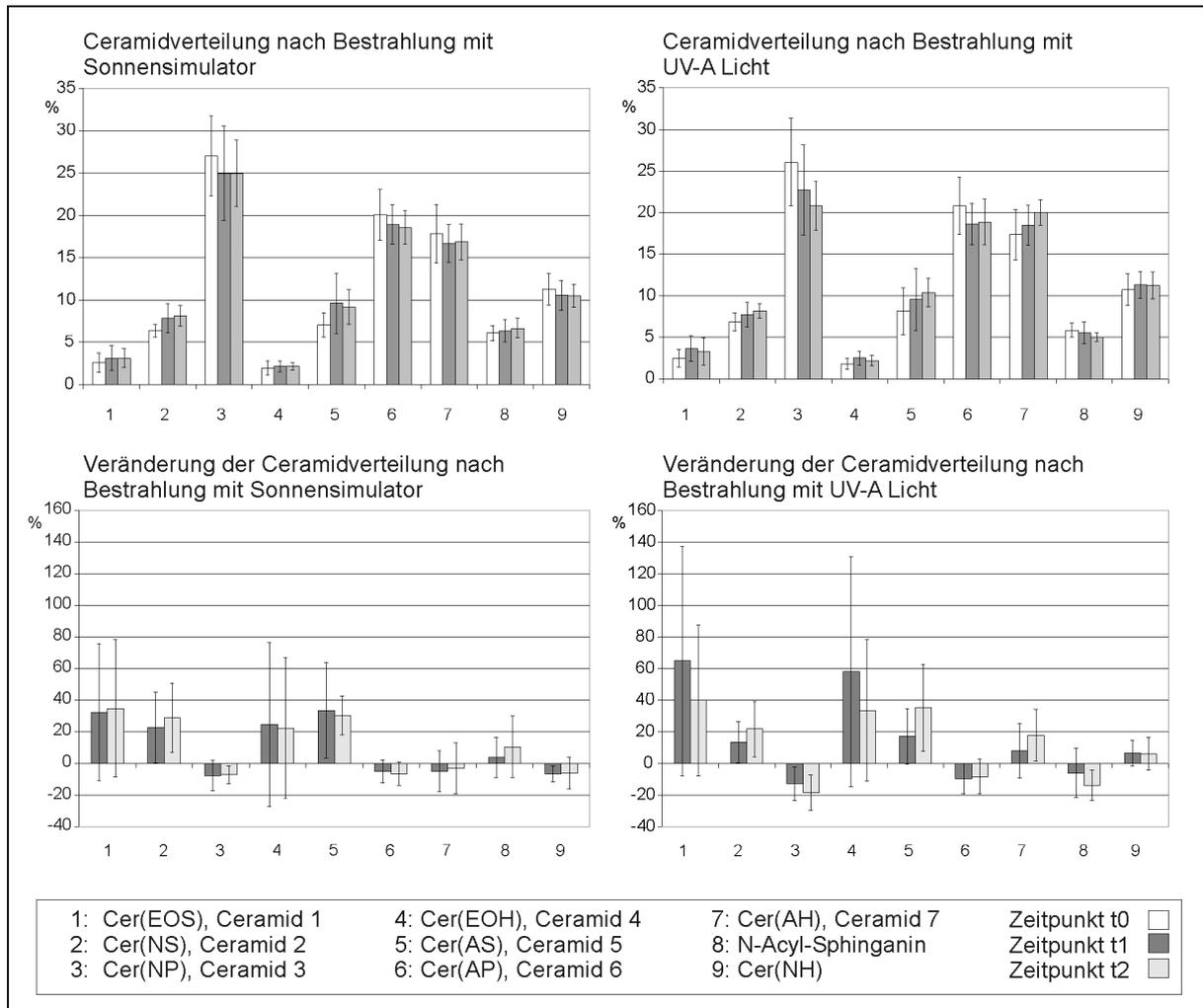


Abbildung 32: Ceramidverteilungen der Probanden mit atopischem Ekzem vor und nach Bestrahlung mit einem Sonnensimulator bzw. UV-A Licht

Das Ergebnis dieses Vergleiches wird wiederum von starken interindividuellen Unterschieden zwischen den Probanden einer Gruppe bestimmt. Die durchschnittlichen Variationskoeffizienten (relative Standardabweichung) der einzelnen Bestimmungen liegen bei 18,1 – 24,7 %. Die höchsten Variationskoeffizienten von 35,0 - 50,5 % wurden bei den Bestimmungen der Cer(EOS)-Gehalte erhalten.

Die Gegenüberstellung der Ceramidverteilungen bestrahlte Haut – unbestrahlte Haut in Abbildung 32 läßt einige tendenzielle Unterschiede erkennen. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde jeweils ein Student'scher t-Test zur statistischen Absicherung durchgeführt.

Im Vergleich der unbestrahlten Haut (t0) mit dem Zeitpunkt t1 nach Bestrahlung mit dem Sonnensimulator unterscheiden sich die Ceramide Cer(NS), Cer(AS) und Cer(NH) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,05\%$, die Unterscheidung der Mittelwerte ist demnach als signifikant einzustufen. Dieses bedeutet, daß durch die Bestrahlung mit einem Sonnensimulator die relative Menge an Cer(NS) und Cer(AS) zugenommen und die von Cer(NH) abgenommen hat. Im Vergleich der Zeitpunkte t1 und t2 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Im Vergleich der unbestrahlten Haut (t0) mit dem Zeitpunkt t1 nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht unterscheiden sich die Ceramide Cer(EOS), Cer(NS), Cer(NP), Cer(EOH) und Cer(AP) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,05\%$, was eine signifikante Unterscheidung der Mittelwerte bedeutet.

Durch die Bestrahlung mit UV-A Licht hat demnach die relative Menge an Cer(EOS), Cer(NS) und Cer(EOH) zugenommen und die von Cer(NP) und Cer(AP) abgenommen. Im Vergleich der Mittelwerte der Zeitpunkte t1 und t2 ergeben sich beim Cer(AH) signifikante Unterschiede, der relative Gehalt nimmt zu.

Aufgrund der Anzahl der signifikanten Unterschiede in den Ceramidverteilungen der unbestrahlten und bestrahlten Haut zeigt sich, daß die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht größere Veränderung in der Ceramidverteilung bewirkt als die Bestrahlung mit dem Sonnensimulator.

Dieses Ergebnis wird als Tendenz auch in Abbildung 33 deutlich, wo die Veränderungen der Ceramidverteilungen nach Strahlenquellen getrennt dargestellt sind. Als Ursache ist die im Vergleich zu Sonnenlicht größere Eindringtiefe des ultravioletten Lichtes denkbar, da hierdurch eine größere Beeinflussungsmöglichkeit der Ceramidbildungsmechanismen erreicht wird.

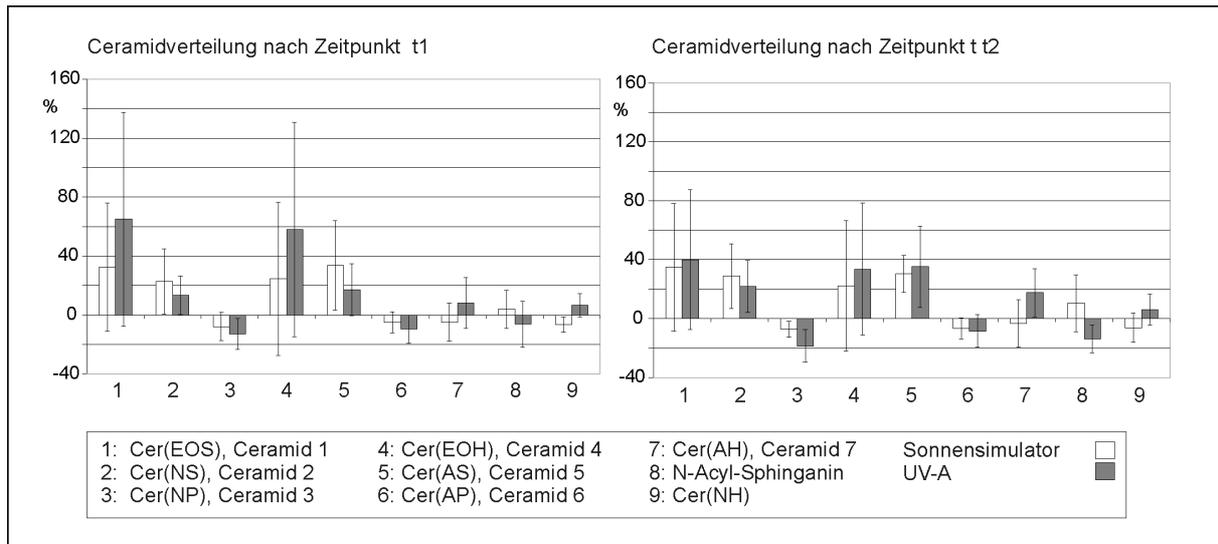


Abbildung 33: Vergleich der Bestrahlungsquellen zum Zeitpunkt t1 und t2

Von neun signifikanten Unterschieden in den relativen Ceramidgehalten vor und nach Bestrahlung werden acht beim Vergleich der unbestrahlten Haut – Zeitpunkt t1 erhalten. Dieses Ergebnis zeigt, daß Änderungen der Ceramidverteilungen nur direkt nach den Bestrahlungen nachweisbar sind (Vergleich unbestrahlt (t0) mit Zeitpunkt t1). Nach Beendigung der Bestrahlung finden so gut wie keine signifikanten Veränderungen mehr statt (Vergleich Zeitpunkt t1 mit t2). Der Ablauf lichtinduzierter Ceramidveränderungen, die nach Beenden der Bestrahlung andauern, sind demnach nicht erkennbar.

Der Vergleich der Ceramidverteilungen von Probanden mit gesunder Haut bzw. atopischem Ekzem zeigt einige tendenzielle Unterschiede. Aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede in den Ceramidverteilungen der Probandengruppen und den damit verbundenen hohen Standardabweichungen der Mittelwerte ist es aber mit der Anzahl der untersuchten Personen nicht möglich, eine typische „hautgesunde“ von einer typischen „hautkranken“ Ceramidverteilung zu unterscheiden.

Aus dem gleichen Grund ist auch der Nachweis einer Annäherung der Ceramidverteilung „hautkrank“ in Richtung „hautgesund“ durch Bestrahlungen nicht möglich, obwohl gewisse Veränderungen in den jeweiligen Ceramidverteilungen nachweisbar sind.

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, daß neben der Einteilung „gesunde“ und „kranke“ Haut auch andere Faktoren für die variierenden Ceramidverteilungen verantwortlich sind. Für eine genauere Untersuchung dieser Faktoren wäre die Bestimmung der Ceramidverteilungen innerhalb eines relativ großen Probandenkollektives denkbar, das aufgrund der Ergebnisse dann in Untergruppen gleicher Ceramidverteilungen aufgeteilt wird. Durch weitergehende Untersuchung dieser Untergruppen könnten dann Hinweise auf mögliche Faktoren erhalten werden.

Veränderungen in der Lipidzusammensetzung beim atopischem Ekzem wurden auch von anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung dünnenschichtchromatographischer Trenntechniken untersucht. Imokawa et al. (38) und Yamamoto et al. (76) konnten durch Analyse von Lipidextrakten unter anderem eine Reduktion des Ceramidanteils im Gesamtlipidprofil bei Atopikern gegenüber hautgesunden Probanden nachweisen. Hierbei war insbesondere das Cer(EOS) betroffen, wobei statistisch signifikante Reduktionen beim atopischen Ekzem gezeigt wurden.

Di Nardo et al. (118) beschrieben bei Probanden mit atopischem Ekzem signifikant niedrigere Gehalte an Cer(NP) und Cer(EOS) in Bezug auf hautgesunde Probanden. Matsumoto et al. (119) unterschieden bei den Probanden mit atopischen Ekzem zwischen „trockener“ und „normaler“ Haut. Während die trockenen Hautstellen im Vergleich zu den hautgesunden Probanden signifikant weniger Cer(EOS) und einige weitere tendenzielle Unterschiede zeigten, waren bei der „normalen“ Haut im Vergleich zu den hautgesunden Probanden keine signifikanten Unterschiede in der Ceramidverteilung nachweisbar. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß der Auswahl der untersuchten Hautareale eine wichtige Rolle zukommt, um eventuell bestehende Unterschiede in der Ceramidverteilung aufzeigen zu können.

Das weiterhin bestehende Problem der großen interindividuellen Unterschiede in der Lipidzusammensetzung des Stratum corneums wurde auch von Norlen et al. (120) beschrieben. Als Ergebnis einer Studie wurden in Einzelfällen interindividuelle Abweichungen von über 100 % erhalten.

Verringerte Gehalte an Cer(EOS) und Cer(NP) wurden von Motta et al. (70) auch für an Schuppenflechte erkrankte Haut beschrieben. Bleck et al. (121) beschreiben bei der dünn-schichtchromatographischen Untersuchung der Ceramidverteilung von Probanden mit atopischem Ekzem eine Aufspaltung der Bande Cer(AS) (Ceramid 5) in einen Doppelpeak.

Durch die vergleichende Untersuchung der von Bleck et al. verwendeten dünn-schichtchromatographischen Ceramidtrennung mit der LC/MS in dieser Arbeit ist aber bekannt, daß es sich bei der Bande Ceramid 5 eigentlich um Cer(NH) handelt, das eigentliche Cer(AS) aber in der Bande Cer(EOH) enthalten ist (vgl. Abschnitt 4.1.6). Die Kombination der tendenziell verringerten Gehalte an Cer(NH) und der entsprechenden Erhöhung der Cer(AS)-Gehalte in den Ceramidverteilungen der Probanden mit atopischem Ekzem nach Abbildung 29 könnte eine entsprechende Veränderung des densitometrischen Profils der DC und damit die Ausbildung des Doppelpeaks erklären.

4.3 Analytik topisch applizierter Lipide (Acylglycerine) mit der LC/MS

4.3.1 Massenspektrometrische Charakterisierung

Die Entwicklung einer LC/MS-Methode zur empfindlichen Bestimmung von Acylglycerinen erfordert zunächst eine Optimierung der Spannungseinstellungen in der Ionenquelle bzw. Ionenoptik des Massenspektrometers. Zur Untersuchung der massenspektrometrischen Darstellbarkeit wurden jeweils Lösungen von Mono-, Di- und Triglycerid-Referenzsubstanzen (ca. 5 µg/ml) kontinuierlich mit einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer injiziert (80 µl/h). Mit einem Sprühgasdruck von 7 psi und einem Trockengasstrom von 4 l/min wurden für diese Experimente wiederum kleine Stickstoff-Gasströme gewählt und so dem geringen Volumenstrom angepaßt. Eine maximale Signalintensität der Acylglycerine wurde im positiven Ionenmodus mit einer Spannung von -120 V für den Ausgang der Transferkapillare und einer Spannung von -40 V für den Skimmer 1 erhalten.

Mono- und Diglyceride lassen sich im positiven Ionenmodus als $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ - Quasimolekülionen darstellen. Bei Triglyceriden ist für eine empfindliche Ionisierung die Anwesenheit von Ammoniumacetat (2 mMol) als Ionisierungshilfe im Lösungsmittel bzw. Eluenten erforderlich, wobei $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ und $[M+NH_4]^+$ - Addukte gebildet werden. Triglyceride mit gesättigten Fettsäuren ab der Kettenlänge C₁₆ (Tripalmitat) aufwärts werden ohne den Zusatz von Ammoniumacetat mit der Electrospray-Ionenquelle nicht mehr ionisiert, da die Moleküle zu unpolar sind. Ein Vergleich der Signalintensitäten der einzelnen Acylglycerine in den Spritzenpumpen-Experimenten zeigt, daß diese massenspektrometrisch verschieden empfindlich dargestellt werden. Die Responsefaktoren korrelieren dabei mit der Polarität der jeweiligen Acylglycerine. Die eher polaren Monoglyceride zeigen eine größere massenspektrometrische Empfindlichkeit als Diglyceride, die wiederum empfindlicher dargestellt werden als die unpolaren Triglyceride. Bei den Triglyceriden spielt die Anzahl der Doppelbindungen für das Ionisierungsvermögen eine große Rolle. Ungesättigte Triglyceride lassen sich wesentlich empfindlicher darstellen als gesättigte.

4.3.2 MS/MS-Fragmentierungsexperimente von Di- und Triglyceriden

Bei Di- und Triglyceriden ist die Kettenverlängerung einer veresterten Fettsäure verbunden mit der entsprechenden Kettenverkürzung einer anderen mit keiner Änderung der molekularen Masse des Moleküls verbunden. Zur Identifizierung unbekannter Di- und Triglyceride ist daher die alleinige Kenntnis der molekularen Masse nicht ausreichend.

Die eindeutige Zuordnung der jeweils veresterten Fettsäuren kann mit Hilfe von MS/MS-Fragmentierungsexperimenten im positiven Ionenmodus erfolgen. Die Durchführung kann wie bei der Untersuchung der Ceramide durch kontinuierliche Injektion der Lipidlösungen mit Hilfe einer Spritzenpumpe in das Massenspektrometer oder auch während einer chromatographischen Trennung „online“ erfolgen. Die interessierenden Ionen werden jeweils in der Ionenfalle des Massenspektrometers isoliert und anschließend selektiv fragmentiert.

Zur Ionenisolation können je nach gebildeten Addukten Natrium oder Ammoniumaddukte ausgewählt werden, da das erhaltene Fragmentspektrum nicht durch das Addukt bzw. –molekül beeinflusst wird. In Abbildung 34 ist das Fragmentspektrum eines Diglycerides (Dipalmitin) und eines Triglycerides (Tripalmitin) dargestellt.

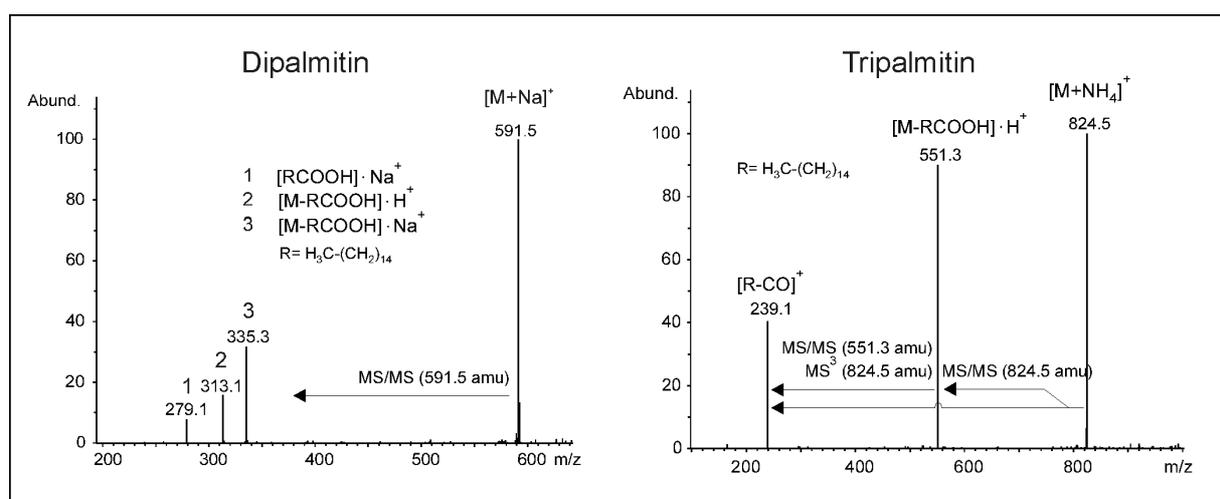


Abbildung 34: MS/MS-Fragmentspektrum (positiver Ionenmodus) von Dipalmitin und Tripalmitin

Bei der Fragmentierung eines Diglycerides wird aus dem Gesamtmolekül eine ganze Fettsäure abgespalten (RCOOH), als Fragmente werden die entsprechenden [M-RCOOH] - Ionen als Natrium- (335,3 amu) und Protonenaddukt (313,1 amu) erhalten ($R = \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}$). Desweiteren ist auch die abgespaltene Fettsäure als Natriumaddukt sichtbar ([RCOOH] Na^+ , 279,1 amu). Da im Dipalmitin zwei Fettsäuren gleicher Kettenlänge enthalten sind, ist im Fragmentspektrum nur diese eine Art von [RCOOH] Na^+ -Ionen enthalten. Bei Fragmentierung eines Triglycerides wird im ersten Schritt der Fragmentierung wie bei der Fragmentierung der Diglyceride eine ganze Fettsäure abgespalten (RCOOH, $R = \text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{14}$), als Fragment wird entsprechend [M-RCOOH] H^+ (551,3 amu) gebildet. Als weiteres Fragment wird [R-CO] $^+$ (239,1 amu) erhalten, das durch Wasserabspaltung aus den [M-RCOOH] H^+ -Ionen entsteht. [R-CO] $^+$ -Ionen entstehen auch, wenn [M-RCOOH] H^+ -Ionen in einer zweiten Fragmentierungsstufe (MS^3) direkt fragmentiert werden. Da im Tripalmitin nur Fettsäuren gleicher Kettenlänge gebunden sind, ist im Fragmentspektrum mit 239,1 amu nur eine Art von [R-CO] $^+$ - Ionen enthalten. Die Bildung von [RCOOH] Na^+ -Ionen wie bei der Fragmentierung des Dipalmitats wurde nicht beobachtet.

Bei Triglyceriden mit unterschiedlich veresterten Fettsäuren kann mit Hilfe der Fragmentspektren auch die Stellung der Fettsäuren im Molekül ermittelt werden. Nach Mottram und Evershed (122) lassen sich durch die Signalintensitäten der [M-RCOOH] H^+ - Fragmente Fettsäuren der *sn*-2 Position von denen der *sn*-1 und *sn*-3 Position unterscheiden. Die Bildung von [M-RCOOH] H^+ - Fragmenten, die durch Verlust der Fettsäure aus *sn*-2 Position entstehen, ist energetisch weniger bevorzugt. Die entsprechenden Signale sind daher mit einer wesentlich geringeren Intensität im Fragmentspektrum vorhanden. Diese Fragmentierungen können auch zur selektiven Detektion bei chromatographischen Trennungen verwendet werden. Bei der Differenzierung von Varianten gleicher molekularer Masse, die unterschiedlich veresterte Fettsäuren enthalten, können die jeweiligen Molekülionen in vorher definierten Zeitfenstern fragmentiert werden. Im Chromatogramm werden anschließend zur Auswertung die Massenspuren derjenigen Fettsäure-Fragmente dargestellt, die in den anderen Varianten gleicher molekularer Masse nicht enthalten sind.

4.3.3 Flüssigchromatographische Trennung von Mono-, Di- und Triglyceriden

Die chromatographische Trennung wurde wie bei der Analytik der Ceramide auf einem reversed-phase (RP) Trennsystem durchgeführt. Die Verwendung einer RP-18 Säule ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung von Mono-, Di- und Triglyceriden, wobei jeweils eine Auftrennung nach Kettenlängen und Anzahl der Doppelbindungen der veresterten Fettsäuren erfolgt. In Abbildung 35 ist die chromatographische Trennung (LC/MS) eines Gemisches an Mono-, Di- und Triglycerid-Standardsubstanzen (je ca. 5–10 µg/ml) dargestellt.

Als Trennsäule wurde eine RP-18 Säule (*encapsulated*, 125x2 mm) verwendet. Als Eluent kam wie bei der Ceramidanalytik ein wasserfreier Methanol (incl. 2 mMol NH₄Ac) / *tert*-Butylmethylether-Gradient zur Anwendung. Das Methanol unterstützt zusammen mit dem Ammoniumacetat die Ionisierung der unpolaren Triglyceride mit Kettenlängen $\geq C_{16}$.

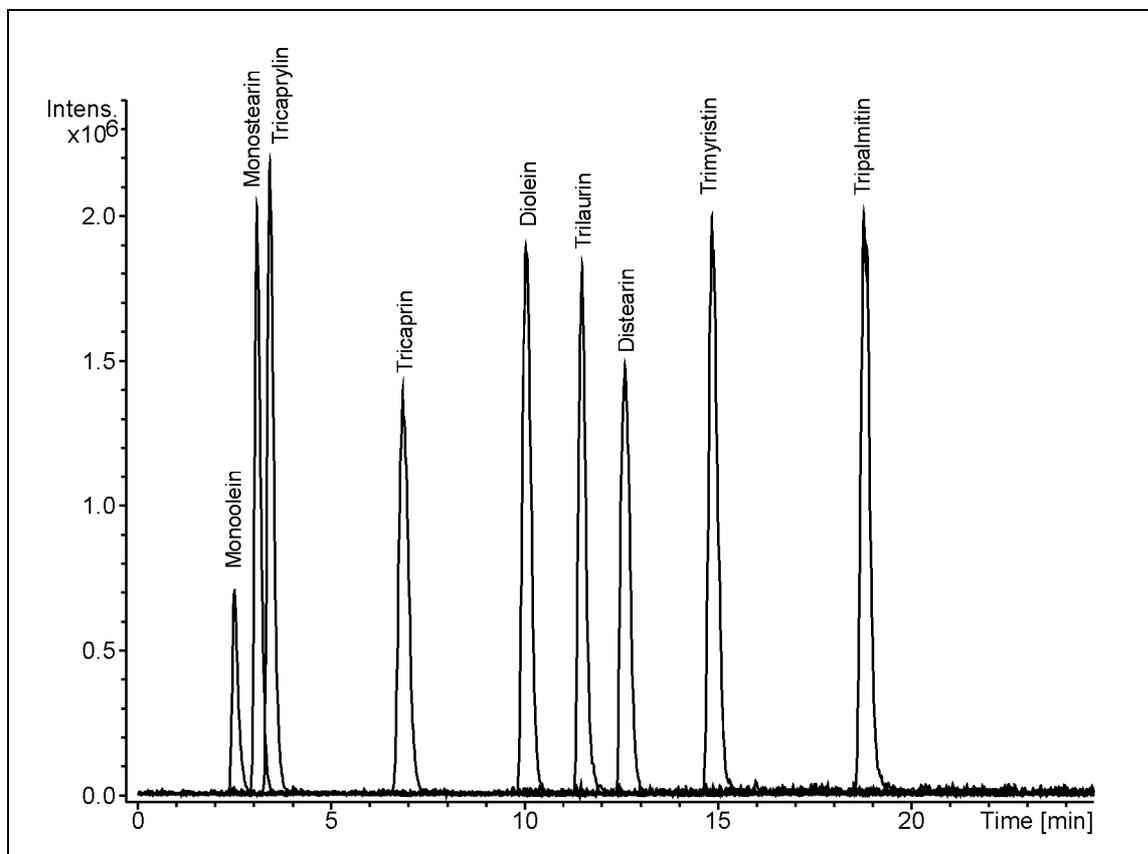


Abbildung 35: Chromatographische Trennung von Mono-, Di- und Triglyceriden (LC/MS)

Durch die gute Trennleistung der RP-18 Säule wird bei der Bestimmung von Acylglycerinen in Hautlipidextrakten eine empfindliche Ionisierung erreicht, da der Electrospray-Ionisierungsprozeß in der Ionenquelle des Massenspektrometers nicht durch die gleichzeitige Elution anderer Hautlipidbestandteile negativ beeinflusst wird.

Zur Abschätzung der Empfindlichkeit dieses Analysenverfahrens wurden exemplarisch Verdünnungsreihen von einem Monoglycerid (Monoolein) und einem Triglycerid (Triolein) angefertigt und mit dieser Methode untersucht. Die Nachweisgrenze der beiden Substanzen (3-faches Signal-Rauschverhältnis) liegt bei 10 ng/ml (Monoolein) und 50 ng/ml (Triolein) bei einer relativen Standardabweichung von < 5 %.

Bei speziellen analytischen Fragestellungen bzw. Trennproblemen können auch andere Varianten an Trennsäulen verwendet werden. Zur Bestimmung von Monoglyceriden in Hautlipidextrakten ist beispielsweise die Verwendung von RP-8 Säulen sinnvoll. Nach Detektion der Monoglyceride können die unpolaren Hautlipidbestandteile durch einen Gradienten der mobilen Phase innerhalb von wenigen Minuten eluiert werden, da sie von der stationären Phase nicht so stark retardiert werden. Auf diese Weise werden kurze Analysenzeiten erreicht.

Die chromatographische Trennung von Mono-, Di- und Triglyceriden wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Zur Detektion werden dabei in der Regel Streulichtdetektoren verwendet. Je nach analytischer Fragestellung kommen hierbei mit RP-18-, (123, 124), RP-8- (125), Cyanopropyl- (126, 127) und Normalphasen-Säulen (128, 129) unterschiedliche Trennsysteme zur Anwendung. Streulichtdetektoren sind allerdings durch ihre unselektive Detektion auf gute chromatographische Trennungen angewiesen. Bei der Bestimmung einzelner Komponenten in komplex zusammengesetzten Proben (z. B. Hautlipidextrakte) ist daher immer eine entsprechende Probenvorbereitung bzw. -aufreinigung erforderlich.

Das gleiche gilt auch für die Verwendung von Brechungsindex-Detektoren (*refractive index*, RI) (130) und bei der photometrischen Detektion im unteren UV-Bereich (131). Hierbei sind Lösungsmittel-Gradienten der mobilen Phase nur sehr eingeschränkt verwendbar. Eine Veränderung der Brechungsindices bzw. Extinktionskoeffizienten im Verlauf der chromatographischen Trennung bewirkt eine starke Veränderung des

Grundlinienniveaus, so daß die Detektion der eluierenden Substanzen erschwert wird.

Bei Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer kommen zum großen Teil Geräte mit APCI-Ionenquellen zum Einsatz (132, 133). Die Verwendung von Electrospray-Ionenquellen wird ebenfalls beschrieben, allerdings wird auch hier auf die Notwendigkeit von Ionisierungshilfen in Form von Alkali- bzw. Ammoniumsalzen oder Ameisensäure hingewiesen (134).

4.4 Substantivität von Acylglycerinen auf Haut (LC/MS)

In kosmetischen Mitteln sind häufig Acylglycerine enthalten, die als rückfettende Substanzen nach Anwendung der Produkte auf die Haut aufziehen und auf diese Weise hautpflegende Eigenschaften vermitteln. Die Bestimmung der Substantivität kann durch die Untersuchung von Hautlipidextrakten mit der in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen LC/MS-Methode erfolgen.

Als Beispiel wurde die Substantivität von Mandelöl auf Haut im Rahmen eines Probandenversuches untersucht. Hierbei wurden definierte Hautareale mit mandelölhaltigen und mandelölfreien Testprodukten in Form einer Hautcreme behandelt. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der LC/MS-Analytik wurde beim mandelölhaltigen Produkt eine Formulierung verwendet, die mit 0,5 % nur eine geringe Menge an Mandelöl enthält.

Die quantitative Analyse des Mandelöls in den Hautlipidextrakten erfolgte durch die Bestimmung der Leitsubstanz Triolein, das als häufigstes Triglycerid in Mandelöl enthalten ist (46 %). Da aber Triolein auch in geringen Mengen in den endogenen Hautlipiden (Sebum) enthalten ist, sollte immer auch eine gleichzeitige Untersuchung der unbehandelten Haut erfolgen, damit der ermittelte Gehalt der behandelten Hautareale entsprechend korrigiert werden kann.

4.4.1 Aufbau und Durchführung des Probandenversuches

Die Untersuchungen der Substantivität von Mandelöl wurde an 10 hautgesunden Probanden durchgeführt. Auf den entsprechenden Hautarealen wurden von den Probanden 24 Stunden vor Beginn des Versuches keine kosmetischen Mittel mehr verwendet. Die Testprodukte wurde an der Innenseite der Unterarme etwa zehn Zentimeter unterhalb der Ellenbeuge aufgetragen und verteilt. Die Applikation der Produkte erfolgte dabei jeweils in gleicher Menge (50 μ l) auf vorher markierte Areale von ca. 25 cm² Fläche.

Hierbei wurde auf einem Areal das kosmetische Mittel mit Mandelöl (0,5 %) und auf einem anderen Areal das gleiche Produkt ohne Mandelöl (Placebo) appliziert. Ein weiteres Areal der gleichen Größe blieb als Kontrolle unbehandelt. Die Lipidextraktion erfolgte zwei Stunden später mit Hilfe einer Lösungsmittlextraktion nach Deffond et al. (36). Die erhaltenen Lipide wurden in 1,5 ml Methanol (incl. 2 mMol NH₄Ac) aufgenommen und davon 5 μ l zur LC/MS-Analyse eingesetzt.

4.4.2 Quantitative Bestimmung von Triolein in Hautlipidextrakten

Zur Kalibrierung wurde als Referenzsubstanz das gleiche Mandelöl verwendet, das auch in dem im Probandenversuch verwendeten Testprodukt eingearbeitet war. Bei der quantitativen Bestimmung von Substanzen in matrixbelasteten Proben, wie z. B. den Hautlipidextrakten, sollte grundsätzlich eine Matrixkalibrierung vorgenommen werden. Hierbei wird eine Probe, die den zu bestimmenden Analyten nicht enthält (Placebo bzw. Hautlipidextrakt) mit jeweils unterschiedlichen Analytmengen versetzt. Auf diese Weise wird sichergestellt, daß die Bestimmung der Kalibrierstandards unter den gleichen Bedingungen abläuft wie die Bestimmung der Proben mit unbekanntem Analytgehalt. In diesem Fall standen keine definierten Hautlipidextrakte ohne Triolein zur Verfügung, so daß die Quantifizierung des Trioleins in den Hautlipidextrakten mit Hilfe einer externen Standardkalibrierung durchgeführt wurde. Um dennoch den Einfluß der Matrix abschätzen zu können, wurden mit Hilfe der Standardadditionsmethode Wiederfindungsraten bestimmt. Die durch Zusatz von Mandelöl zu den Hautlipidextrakten ermittelten Wiederfindungsraten lagen zwischen 90,5

und 96,8 %. Da das zugesetzte Mandelöl nicht quantitativ wiedergefunden wurde, ist eine Störung des Ionisierungsprozesses durch die Lipidmatrix wahrscheinlich. Die Methode der externen Standardkalibrierung kann in diesem Fall aber trotzdem angewendet werden, da beim Vergleich der unbehandelten und behandelten Hautareale alle Meßlösungen die gleiche Matrix enthalten und so jeweils die gleichen Bedingungen bestehen. In Abbildung 36 sind die bestimmten Mandelölstandards (0,13-32,5 µg/ml) in einer Kalibrierfunktion dargestellt. Der untere Bereich folgt keiner linearen Abhängigkeit, so daß die Auswertung der Mandelölbestimmung über die Funktionsgleichung erfolgen muß.

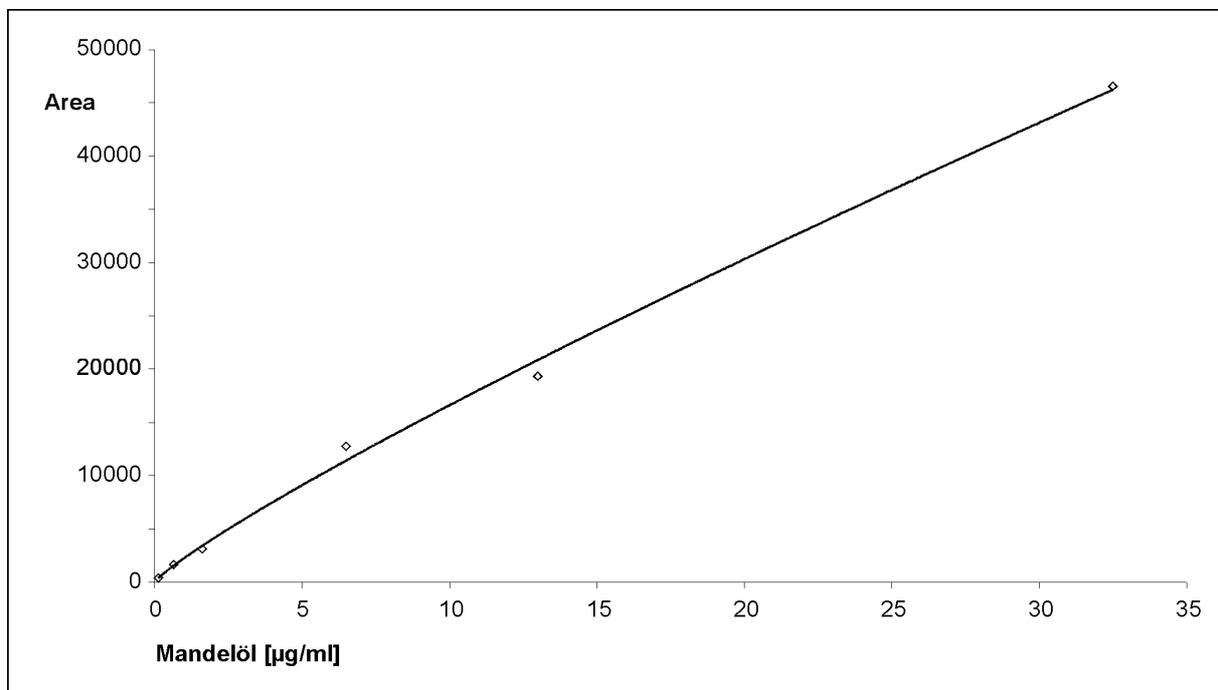


Abbildung 36: Kalibrierfunktion der quantitativen Bestimmung von Triolein in Hautlipidextrakten (LC/MS)

In Abbildung 37 ist das Chromatogramm des Hautlipidextraktes von einem mit mandelöhlhaltigen Testprodukt behandelten Hautareal abgebildet. Im oberen Teil der Abbildung ist der Totalionenstrom (850-950 amu) und die Summe der Massenspuren 903 und 908 amu dargestellt, die dem Ammonium- und Natriumaddukt des Trioleins entsprechen. Diese beiden Addukte stellen die Hauptmassensignale des Trioleins dar, wie auch in dem im unteren Teil abgebildeten Massenspektrum des entsprechenden Peaks zu sehen ist. Die beiden Massenspuren wurden als Summe zusammengefaßt, um eine möglichst große Empfindlichkeit bei der Bestimmung zu errei-

chen. Weiterhin wird auf diese Weise ausgeschlossen, daß möglicherweise unterschiedliche Matrixeigenschaften zu veränderten Verhältnissen der beiden Adduktssignale führen und nicht reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Die weiteren erkennbaren Peaks in der Summen-Massenspur 903+908 amu sind auf die Isotopen anderer im Mandelöl enthaltener Triglyceride zurückzuführen. Das Vorkommen von Isopenpeaks wird auch anhand der Massenverteilung der einzelner Isotope im unteren Massenspektrum deutlich. Die molekulare Masse des Trioelins entspricht demnach z. B. genau derjenigen des Di-oleyl-mono-linoleyl-glycerin-Isotopes mit zwei ^{13}C -Atomen.

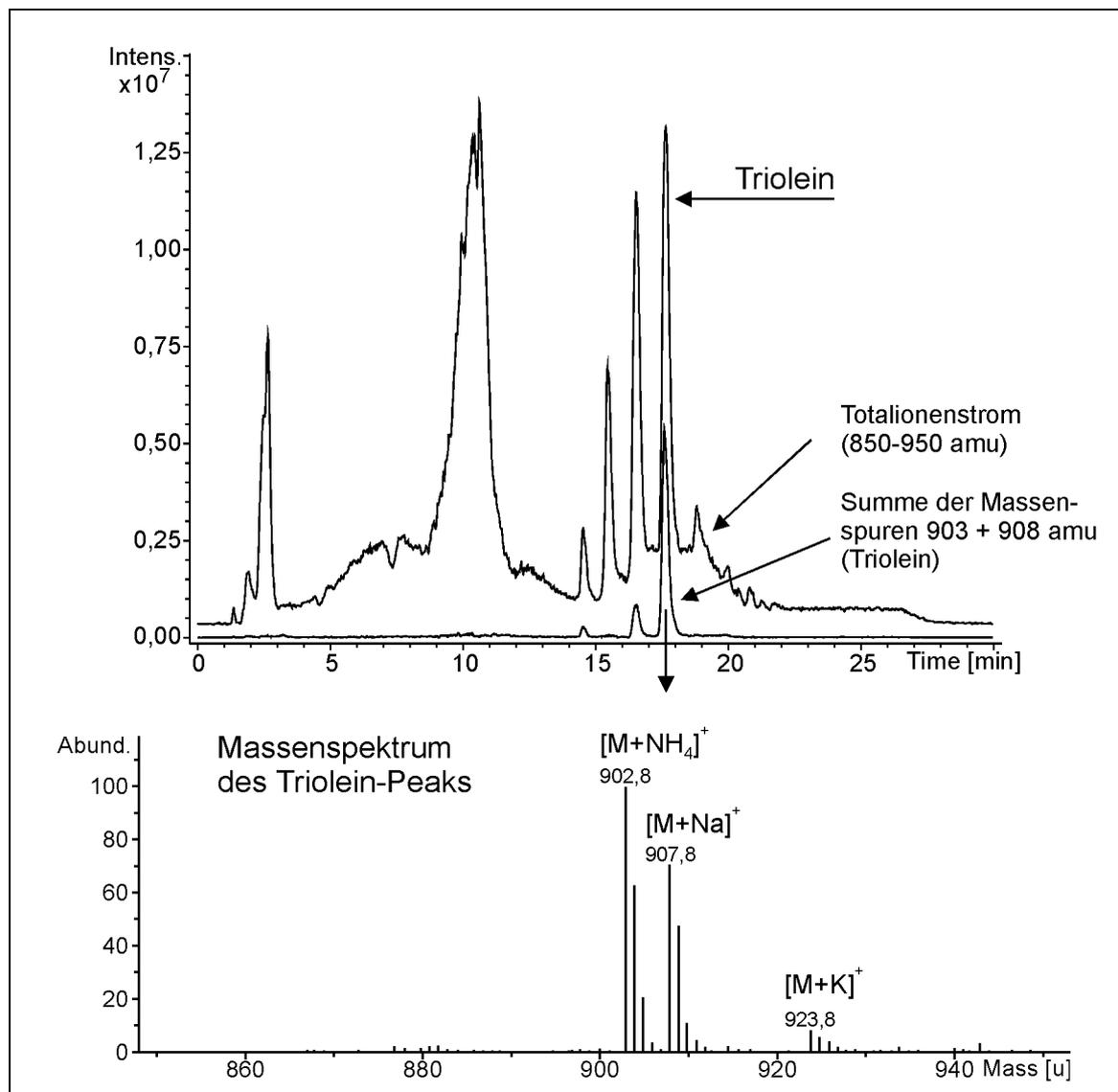


Abbildung 37: Chromatogramm eines Hautextraktes (LC/MS) nach Applikation einer mandelölhaltigen kosmetischen Mittels

Der Massenscanbereich wurde bei der Untersuchung der Hautlipidextrakte mit 850-950 amu auf die Bestimmung des Trioleins abgestimmt. Trotz dieses kleinen Bereiches von 100 amu zeigt der Totalionenstrom des Chromatogrammes viele andere Substanzen aus dem Hautextrakt und verdeutlicht so die Bedeutung einer selektiven Detektionstechnik.

4.4.3 Ergebnis der Untersuchung zur Substantivität von Mandelöl auf Haut

Die bestimmten Gehalte an Triolein bzw. Mandelöl der einzelnen Probanden wurden jeweils in Gruppen gleichbehandelter Hautareale zusammengefaßt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8 angegeben. Die jeweiligen Daten stellen Mittelwerte mit dem Vertrauensbereich des Mittelwertes für 95 % statistische Sicherheit dar. In Abbildung 38 ist ein Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnis der quantitativen Bestimmung von Triolein in Hautlipidextrakten (LC/MS)

unbehandelte Haut	behandelte Haut Testprodukt ohne Mandelöl	behandelte Haut Testprodukt incl. 0,5 % Mandelöl
<u>5,5 ± 0,62 µg/Extrakt</u> (± 1,06; P=95 %; 10)	<u>5,6 ± 0,71 µg/Extrakt</u> (± 1,20; P=95 %; 10)	<u>15,0 ± 1,80 µg/Extrakt</u> (± 2,91; P=95 %; 9)

In den Hautlipid-Extrakten der unbehandelten Haut wurde etwa der gleiche Gehalt an Triolein bestimmt wie in den Extrakten der Placebo-behandelten Haut. Diese Menge an Triolein ist demnach auf die endogenen Triglyceride im Hautsebum zurückzuführen. Nach Behandlung der Haut mit dem mandelölhaltigen Testprodukt wird ein um das dreifache erhöhter Gehalt an Triolein bestimmt. Diese Zunahme kann direkt auf das auf die Haut aufgezogene Mandelöl zurückgeführt werden.

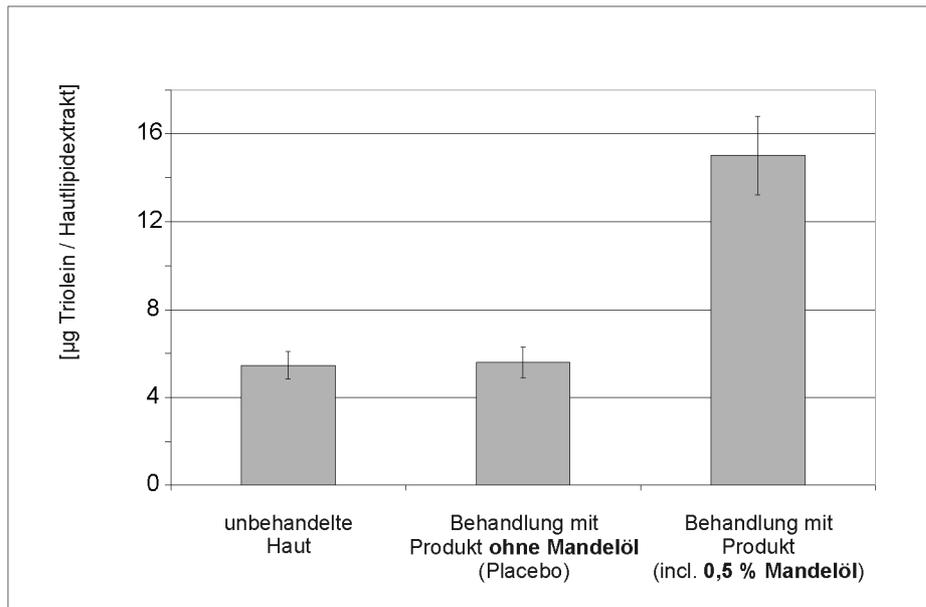


Abbildung 38: Bestimmung von Triolein (LC/MS) nach Applikation von rückfettenden Testprodukten

Durch Applikation von 50 µl Testprodukt (incl. 0,5 % Mandelöl) auf eine Hautfläche von 25 cm² ergibt sich rechnerisch eine Menge von 50 µg Mandelöl / 5 cm² bzw. Hautlipid-Extrakt. In diesen 50 µg Mandelöl sind etwa 23 µg Trioleat enthalten. Von dieser Menge wurden im Mittel 16,2 µg bestimmt, was einer Wiederfindung von rund 65 % entspricht.

Die Möglichkeit zur Bestimmung von rückfettenden Acylglycerinen in komplex zusammengesetzten Hautlipidextrakten belegt die Leistungsfähigkeit des Analyseverfahrens mit der LC/MS, da einzelne Substanzen mit ihren Massenspuren dargestellt und selektiv quantifiziert werden können.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist ein direkter Nachweis der Substantivität (Aufziehvermögen) rückfettender Substanzen auf die Haut. Die Anwendung dieses chemisch-analytischen Verfahrens kann neben den klassischen physikalischen und physiologischen Hautparametern zum Nachweis der Hautpflegeleistung kosmetischer Mittel beitragen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Einsatz der direkten Kopplung der Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit einem Massenspektrometer (LC/MS) neue Methoden in der Hautlipidanalytik erarbeitet. Hierbei wurde zunächst ein empfindliches und selektives Analysenverfahren zur massenspektrometrischen Charakterisierung und Differenzierung menschlicher Stratum corneum-Ceramide entwickelt. Ceramide sind als Komponenten beim Aufbau der als wichtige Hautfunktion geltenden Permeabilitätsbarriere beteiligt.

Die Verwendung eines nichtwäßrigen reversed-phase Trennverfahrens stabilisiert die Electrospray-Ionisierung der Ceramide und ermöglicht eine Empfindlichkeit, die eine direkte Untersuchung von Hautlipidextrakten erlaubt (Nachweisgrenze ca. 1 ppb). Eine aufwendige Probenvorbereitung ist nicht erforderlich. Die Identifizierung von Ceramiden mit gleicher molekularer Masse aber unterschiedlichen Strukturen erfolgt durch MS/MS-Ionenfallen-Fragmentierungsexperimente. Mit Hilfe der charakteristischen Fragmentmuster kann sowohl die in den Ceramiden enthaltene sphingoide Base als auch die Art und Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäure bestimmt werden.

Bei der Untersuchung isolierter menschlicher Stratum corneum-Lipide mit der LC/MS wurden neun unterschiedliche Ceramidgrundkörper identifiziert, die sich wiederum mit einer Varianz an amidgebundenen Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge darstellen lassen. Mit dem N-acyl-Sphingarin und dem N-acyl-6-OH-Sphingosin bzw. Cer(NH) wurden zwei Ceramidgrundkörper differenziert, die mit den in der Literatur angegebenen üblicherweise in der Hautlipidanalytik verwendeten dünn-schichtchromatographischen Analysenverfahren (DC) nicht erfaßt werden.

Im direkten Vergleich der Analysenverfahren der LC/MS und der DC wurden bei der Untersuchung isolierter Stratum corneum-Lipide grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse erhalten. Allerdings enthalten die DC-Banden 1 und 4 nur doppeltveresterte Ceramide mit ω -veresteter Linolsäure. In den Banden 4 und 5 wurden weiterhin jeweils andere Ceramide gefunden, als nach der DC-Ceramidnomenklatur erwartet wurde.

Im Rahmen von Probandenversuchen wurde die entwickelte LC/MS-Methode zur Bestimmung von Ceramidverteilungen in Hautlipidextrakten verwendet. Eine vergleichende Untersuchung der Lipidgewinnungstechniken der Lösungsmittlextraktion und der Cyanoacrylat (Sekundenkleber)-Abrisse zeigte, daß mit beiden Methoden vergleichbare Ceramidprofile erhalten werden. Bei einem Vergleich der Ceramidverteilungen von gesunder und erkrankter Haut (atopisches Ekzem) konnten mit der Anzahl der untersuchten Proben keine Unterschiede bezüglich einer „gesunden“ und „hautkranken“ Ceramidverteilung aufgezeigt werden. Nach Bestrahlung der Haut von Probanden mit atopischem Ekzem sind Veränderungen in der Ceramidverteilung nachweisbar. Die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht hatte dabei einen größeren Einfluß auf die Veränderung der Ceramidverteilung als die Bestrahlung mit einem Sonnensimulator.

Die Analytik von auf die Haut aufgezogenen topisch applizierten Lipiden kann ebenfalls mit Hilfe der LC/MS erfolgen. Zur Bestimmung der häufig in rückfettenden kosmetischen Mitteln enthaltenen Acylglycerine wurde ein Analysenverfahren zur selektiven und empfindlichen Quantifizierung von Mono-, Di- und Triglyceriden in Hautlipidextrakten entwickelt. Die verwendete reversed-phase Chromatographie ermöglicht die Trennung einzelner Acylglycerine nach Kettenlänge bzw. Anzahl der Doppelbindungen in den veresterten Fettsäuren. Die Identifizierung von Di- und Triglyceriden gleicher molekularer Masse aber unterschiedlich veresterter Fettsäuren kann durch MS/MS-Fragmentierungsexperimente erfolgen. Durch die massenspektrometrische Detektion können die zu bestimmenden Substanzen im Chromatogramm mit ihren Massenspuren dargestellt und selektiv quantifiziert werden. Im Rahmen eines Probandenversuches wurde die Substantivität von Mandelöl auf Haut untersucht. Die Bestimmung erfolgte über die Quantifizierung des Trioleins, das als häufigstes Triglycerid in Mandelöl enthalten ist. Als Ergebnis wurde bei den mit einer mandelölmhaltigen kosmetischen Testformulierung behandelten Hautarealen ein ca. dreifach höherer Gehalt an Triolein bestimmt als auf den unbehandelten/placebobehandelten Arealen. Diese Zunahme kann direkt auf das auf die Haut aufgezugene Mandelöl zurückgeführt werden.

6 Summary

In the present study the use of direct coupling of high-performance liquid chromatography and atmospheric-pressure electrospray-ionization mass spectrometry (API-ES-MS or LC/MS) in skin lipid analysis was investigated. First, a selective and sensitive method for separation and identification of human stratum corneum ceramides by mass spectrometry was developed. Ceramides are important constituents of the intercellular lipid matrix of the stratum corneum. These lipids are structural components of the skin barrier, which is one of the most important skin functions.

Non-aqueous reversed-phase chromatography stabilizes the electrospray ionization, resulting in a sensitivity that enables direct measurement of skin lipid extracts with no special sample preparation (limit of detection: approx. 1 ppb). Identification of ceramides having the same molecular mass but different structures was carried out by means of MS/MS-ion trap fragmentation experiments. Interpretation of the characteristic fragmentation pattern obtained by these experiments allows identification of the respective sphingoid base as the ceramide-backbone and the chain length of the amide bonded fatty acid.

Investigation of ceramides of isolated human stratum corneum lipids by means of this LC/MS method reveals nine different ceramide structures which can be distinguished further into molecular species containing amide bond fatty acids of different chain length. In addition to the ceramides known from separations by thin-layer chromatography (TLC) methods that are commonly used in skin research, two other ceramides can be detected. From the results the presence of N-acyl-sphinganine and N-acyl-6-OH-sphingosine can be derived.

A comparative investigation of human stratum corneum lipids shows that analysis by means of LC/MS as well as TLC reveals mainly comparable results. However, Cer(EOS) and Cer(EOH) species of band 1 and 4, respectively, only contained linoleic acid (or homologues) esters. Furthermore, band 4 and 5 contained ceramides different from those expected according to the common TLC-nomenclature of ceramides.

The developed LC/MS method was further used to determine the distribution of ceramides in human skin lipid extracts in several skin studies. A comparative investigation of skin lipid collection-methods shows that both solvent extractions of the skin as well as stripping with cyanoacrylate resin revealed similar ceramide profiles. However, when comparing the ceramide distribution of healthy skin and the skin of persons with atopic eczema, no significant differences were observed with the number of determined skin lipid samples. In this way, a differentiation of a „healthy“ and „atopic eczema“ ceramide distribution was not possible. After radiation therapy of persons with atopic eczema, changes in the ceramide distribution were detectable. Radiation therapy using ultraviolet wavelength revealed a greater change in the ceramide distribution than the use of a sun simulator.

The determination of topically applied lipids is also possible by means of LC/MS analysis. To investigate the amount of acylglycerols, which are often used as refatting emollients in replenishing cosmetic formulations, a selective and sensitive method for the determination of mono-, di- and triglycerols in human skin lipid extracts was developed. The use of reversed-phase chromatography enables separation of acylglycerines according to chain length and number of double bonds in the esterified fatty acids. Identification of di- and triacylglycerols with the same molecular mass but different esterified fatty acids can be realized by means of MS/MS-fragmentation experiments. Due to mass spectrometric detection, selective quantification of acylglycerols can be carried out by selective recording of their respective ion extraction chromatograms. Using this method in a skin study, the substantivity of almond oil on skin was investigated. The determination was carried out by a quantification of the triacylglycerol, triolein, which is the most abundant in almond oil. The result revealed that the lipid extracts from the skin areas treated with the cosmetic test formulation (almond oil) contained approx. three times more triolein than the lipid extracts of the non-treated and placebo-treated skin areas, respectively.

7 Experimenteller Teil

7.1 Gewinnung von Stratum corneum Lipiden

Die Gewinnung der Stratum corneum-Lipide wurde mit Hilfe von Lösungsmittel-Extraktionen bzw. Cyanoacrylat-Abrissen vorgenommen.

7.1.1 Lösungsmittel-Extraktion

Die Lösungsmittel-Extraktion erfolgt in Anlehnung an Deffond et al. (36) mit Hilfe einer Teflon-Spülkammer mit ca. 5 cm² Fläche, die auf das betreffende Hautareal aufgedrückt wird. Nach Einfüllen von 3 ml Extraktionslösungsmittel (Ethanol/Aceton 1:1, v:v) wird ein Rührmotor eingeschaltet, der über eine Welle mit einem Teflonspatel im Inneren der Spülkammer verbunden ist. Durch die Rotation des Spatels wird die Flüssigkeitssäule über der Haut bewegt, ohne daß es zu einem mechanischen Kontakt des Spatels mit der Haut kommt.

Nach drei Minuten Extraktionsdauer wird das Lösungsmittelgemisch mit einer Glasspritze abgesaugt, in zentrifugengeeignete Kulturröhrchen überführt und mit der SpeedVac zur Trockne eingeeengt.

7.1.2 Cyanoacrylat-Abrisse

Die Anfertigung der Cyanoacrylat-Abrisse erfolgte in Anlehnung an Imokawa et al. (38). Hierbei wird ein Tropfen Sekundenkleber auf einen Objektträger (Glas) gegeben und auf das betreffende Hautareal aufgedrückt. Nach Aushärtung des Klebers (ca. eine Minute) wird der Objektträger ruckartig von der Haut abgezogen. Die Abrisse werden in ein Wägegläschen überführt, jeweils zweimal 15 Minuten lang mit 3 ml n-Hexan/Ethanol (95:5, v:v) im Ultraschallbad extrahiert und anschließend zweimal mit ca. 1 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches abgespült.

Die gesammelten Lösungsmittelextrakte werden quantitativ in zentrifugengeeignete Kulturröhrchen überführt und mit der SpeedVac zur Trockne eingengt. Die mit beiden Techniken erhaltenen Lipidrückstände werden je nach weitergehender Verwendung mit unterschiedlichen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelmengen aufgenommen, 5 Minuten im Ultraschallbad gelöst und membranfiltriert (0,2 µm). Die einzelnen Lösungsmittel und -mengen sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Verdünnungsschema der Lipidrückstände aus Lösungsmittelextraktionen und Cyanoacrylat-Abrissen

Lösungsmittel	HPLC-Trennung	Direkteinlaß in das Massenspektrometer (Spritzenpumpe)	DC-Trennung
Methanol incl. 2 mMol NH ₄ Ac Chloroform/Methanol (2:1, v:v)	1,5 ml	3 ml	200 µl

7.2 Dünnschichtchromatographie

nach Wertz et al. (65)

Auftragegerät:	Camag Linomat IV, Camag
Auftragsvolumen:	10 µl
Auftragegeschwindigkeit:	15 sec/µl
mobile Phase:	1. Entwicklung: Chloroform/Methanol/Eisessig (190:9:1; v:v:v) Kammersättigung 2. Entwicklung: n-Hexan/Diethylether/Essigsäure (80:20:1,5; v:v:v), Kammersättigung
stationäre Phase	Kieselgel G 60, Merck
Laufstrecke:	ca. 7 cm
Detektion:	- tauchen in Entwicklungslösung (10 % CuSO ₄ · 5 H ₂ O in 8 % wässr. Phosphorsäure) (20 sec) - veraschen im Trockenschrank (180 °C, 30 min)

Bei den Auskratzungsexperimenten wurde die DC-Platte zur Detektion mit 5 %iger ethanolischen Primulinlösung besprüht und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Detektion der Platte erfolgt mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (TL-900, Camag).

7.3 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

7.3.1 Trennung der Ceramide

Pumpe: quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent
 Entgaser Serie 1100, Agilent
 Flow: 200 µl/min
 Injektor: automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent
 Injektionsvolumen: 5 µl

Säule: GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 3 µm, 125x2 mm, Grom Analytik
 Detektion: massenspektrometrisch, vgl. Abschnitt 7.3.3
 Auswertung: Data Analysis Version 1.6g, Bruker

Eluent: A: Methanol incl. 2 mMol Ammoniumacetat
 B: t-Butylmethylether

Gradient:

Min.	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
0,5	95	5
6	70	30
11	70	30
13	60	40
20	60	40
20,5	95	5
30	95	5

7.3.1.1 Auswertung

Die Auswertung der getrennten Ceramide erfolgt mit Hilfe der Funktion *procedures* der verwendeten Software Data Analysis. Die zu bestimmenden Ceramidvarianten werden hier bei ihrer jeweiligen Retentionszeit innerhalb eines Zeitfensters als Massenspur $[M-H]^-$ dargestellt und als Peak integriert.

Eine Übersicht der auf diese Weise bestimmten Ceramidvarianten befindet sich in Tabelle 10. Für jedes Ceramid sind die Retentionszeit RT [min] und die molekularen Masseneinheiten [amu] der Massenspur angegeben.

Tabelle 10: Auswertungsschema für die Ceramid-Analytik mit der LC/MS (Teil 1).

Ceramid amidge- bundene Fettsäure	1		2		3		4		5	
	Cer (EOH)		Cer (NS)		Cer (NP)		Cer (EOH)		Cer (AS)	
	amu	RT	amu	RT	amu	RT	amu	RT	amu	RT
C 20			593	9,1						
C 21			607	9,7						
C 22			621	10,8	639	9,7			637	10,5
C 23			635	11,3	653	10,3			651	10,6
C 24			649	11,8	667	10,8			665	11,1
C 25			663	12,2	681	11,3			679	11,6
C 26			677	12,6	695	11,8			693	12,1
C 27			691	13,0	709	12,2			707	12,5
C 28	983	15,2	705	13,5	723	12,6	999	13,7	721	12,9
C 29	997	15,7	719	14,0	737	13,0	1013	14,1	735	13,4
C 30	1011	16,1	733	14,4	751	13,5	1027	14,5	749	13,7
C 31	1025	16,7	747	14,9	765	13,9	1041	14,9	763	14,2
C 32	1039	17,2	761	15,5	779	14,3	1055	15,4	777	14,7
C 33	1053	17,7	775	16,0	793	14,8	1069	15,8		
C 34	1067	18,2	789	16,9	807	15,3	1083	16,3		
C 35	1081	18,6	803	17,6	821	15,7	1097	16,8		
C 36	1095	19,0	817	18,3	835	16,4	1111	17,4		

Tabelle 10: Auswertungsschema für die Ceramid-Analytik mit der LC/MS (Teil 2).

Ceramid amide- bundene Fettsäure	6 Cer (AP)		7 Cer (AH)		N-acyl- Sphingarin		Cer (NH)	
	amu	RT	amu	RT	amu	RT	amu	RT
C 20	627	7,9			595	9,7		
C 21	641	8,8			609	10,3		
C 22	655	9,9	653	8,3	623	11,4	637	8,4
C 23	669	10,5	667	9,1	637	11,9	651	9,1
C 24	683	11,1	681	9,7	651	12,3	665	9,7
C 25	697	11,5	695	10,4	665	12,7	679	10,4
C 26	711	12,0	709	10,9	679	13,1	693	10,9
C 27	725	12,5	723	11,4	693	13,6	707	11,4
C 28	739	13,0	737	11,8	707	14,1	721	12,0
C 29	753	13,4	751	12,2	721	14,6	735	12,4
C 30	767	13,8	765	12,6	735	15,1	749	12,8
C 31	781	14,1	779	12,9	749	15,5	763	13,2
C 32	795	14,6	793	13,4	763	15,9	777	13,7
C 33	809	15,1			777	16,2	791	14,1
C 34	823	15,6			791	16,6	805	14,5
C 35					805	17,2		
C 36					819	18,0		

7.3.1.2 Berechnung der Ceramidverteilung

Bei Berechnung der relativen Ceramidverteilung wird die Fläche eines Peaks auf die Summe aller integrierten Peakflächen, bezogen in Prozent, angegeben.

$$Re s_i = \frac{Pks_i}{\sum_{i=1}^n Pks_i} \times 100\%$$

Res_i = Anteil für Peak i in %

Pks_i = Peakfläche des i-ten Peaks

n = Anzahl der ausgewerteten Peaks

Für die Darstellung einzelner Ceramidgruppen werden jeweils die Ceramidvarianten mit gleicher sphingoider Base zusammengefaßt.

Beim Vergleich zweier Mittelwerte berechnet sich die prozentuale Veränderung wie folgt:

$$\text{Veränderung [\%]} = \frac{\text{Mittelwert Ceramidverteilung A}}{\text{Mittelwert Ceramidverteilung B}} \cdot 100$$

7.3.2 Trennung der Acylglycerine

Pumpe: quarternäre Pumpe, Serie 1100, Agilent

Entgaser Serie 1100, Agilent

Flow: 200 µl/min

Injektor: automatischer Probengeber, Serie 1100, Agilent

Injektion: 5 µl

Säule: GROM-SIL 120 ODS-3 CP, 3 µm, 125x2 mm, Grom Analytik

Detektion: massenspektrometrisch, vgl. Abschnitt 7.3.3

Eluent: A: Methanol incl. 2 mMol Ammoniumacetat

B: t-Butylmethylether

Gradient:

Min.	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
0,5	95	5
6	70	30
11	70	30
13	60	40
20	60	40
20,5	95	5
30	95	5

7.3.2.1 Auswertung der Triolein-Bestimmung

Mandelöl-Standards: 0,314; 0,627; 3,14; 8,96; 17,92 und 31,36 µg/ml

Kalibrierfunktion:

$$y = 2245,1 x^{0,8689}$$

y = Peakfläche
x = Triolein [µg/ml]

Korrelationskoeffizient: r = 0,9990

7.3.2.2 Berechnung der Trioleingehalte

Die Berechnung der Trioleingehalte erfolgt über die Kalibrierfunktion:

$$\text{Triolein } [\mu\text{g} / \text{Hautextrakt}] = \mu\text{g} / \text{ml Triolein (aus Kalibrierfunktion)} \cdot 1,5$$

1,5 = Verdünnungsfaktor Lipidextrakt

7.3.2.3 Überprüfung des Analysenverfahrens

Tabelle 11: Bestimmung von Triolein in Hautlipidextrakten (externe Standardkalibrierung: Wiederfindungsraten)

Triolein [µg/ml]		Wiederfindungsrate [%]
ist	soll	
24,31	26,86	90,5
22,44	23,18	96,8
24,51	26,47	92,6

7.3.3 Massenspektrometrie

Gerät: API-ES ion trap Massenspektrometer, Bruker
(API-ES Ionenquelle der Fa. Agilent)

Spritzenpumpe: 74900, Cole-Parmer

Die massenspektrometrischen Untersuchungen werden mit den in Tabelle 12 angegebenen Geräteparametern durchgeführt. Bei Kopplung mit der HPLC wird der gesamte Eluent in die Ionenquelle eingelassen (0,2 ml/min). Der direkte Einlaß erfolgte mit Hilfe einer Spritzenpumpe bei einer Förderrate von 80 µl/h.

Bei den MS/MS-Fragmentierungsexperimenten wurde mit einer Akkumulationszeit von 400 ms isoliert und mit einer Amplitude von 1,8 V (Ceramide) bzw. 1,0-1,5 V (Acylglycerine) fragmentiert.

Tabelle 12: Geräteparameter ESQUIRE-LC

Geräteparameter	Ceramide HPLC- Trennung	Ceramide Direkteinlaß	ω -verest. Ceramide CID-Spannung	Acylglycerine HPLC- Trennung	Acylglycerine Direkteinlaß
Capillary [V]	+4000	+3800	+4000	-4000	-3800
End Plate [V]	+3500	+3200	+3500	-3500	-3200
Nebulizer [psi]	18	7	18/7	18	7
Dry Gas [°C]	7,00	4,00	7,00/4,00	7,00	4,00
Dry Temp. [°C]	300	300	300	300	300
Cap. Exit [V]	-190	-195	-200	+120	+120
Skim. 1 [V]	-45	-45	-60	+40	+40
Skim. 2 [V]	-7	-7	-7	+7	+7
Oct. Off 1 [V]	-3,5	-3,5	-3,5	+3,5	+3,5
Oct. Off 2 [V]	-2,2	-2,2	-2,2	+2,2	+2,2
Oct RF [Vpp]	120,0	120,0	120,0	120,0	120,0
Lens 1 [V]	5,0	5,0	5,0	-5,0	-5,0
Lens 2 [V]	60,0	60,0	60,0	-60,0	-60,0
Cut Off [m/z]	60	60	60	60	60
Scan [m/z]	200-1200	200-1200	200-1200	500-1200	200-1200
Averages	6	6	6	6	6
Max. Acc. Time [ms]	200	200	200	200	200
ICC Target [Skt.]	3000	3000	3000	2500	3000

7.3.4 Statistik

Zur Auswertung der erhaltenen Meßdaten und berechneten Werte wurden folgende statistischen Parameter verwendet:

Bei den Bestimmungen der Ceramidverteilung erfolgte die Angabe der Einzelmeßwerte jeweils mit den Standardkennwerten Mittelwert, Standardabweichung und der Anzahl der Einzelmessungen. Zusätzlich wurde mit dem Minimum und Maximum der jeweils kleinste und größte Wert der Datenreihe angegeben. Der ebenfalls berechnete Medianwert gibt diejenige Zahl an, die in der Mitte der Zahlenreihe liegt, d. h. eine Hälfte der Zahlen ist größer als der Median und die andere Hälfte der Zahlenreihe ist kleiner. Der Medianwert ist gegenüber Extremwerten unempfindlicher als der Mittelwert. Zur Charakterisierung der Streuung der Einzelwerte wurde der Variationskoeffizient berechnet, der die Standardabweichung als Prozentsatz vom Mittelwert angibt. Die Prüfung auf Ausreißer erfolgte nach Grubbs. Der Vergleich der Mittelwerte wurde mit Hilfe eines Student'schen t-Testes vorgenommen. Mit dem t-Test kann festgestellt werden, ob es wahrscheinlich ist, daß zwei Stichproben, die aus zwei Grundgesamtheiten stammen, denselben Mittelwert haben. Die Schärfe des Testes wird durch sein Signifikanzniveau festgelegt: ($p < 0,01$ hochsignifikant, $p < 0,05$ signifikant, $p < 0,1$ wahrscheinlich). Eine Normalverteilung der Einzelmeßwerte wurde vorausgesetzt, auf eine Überprüfung wurde wegen der geringen Anzahl der Meßdaten ($n = 6$ bzw. 8) verzichtet. Bei der Bestimmung des Trioleins erfolgte die Angabe des Ergebnisses in der Standardform mit dem Vertrauensbereich des Mittelwertes. Die Prüfung auf Ausreißer erfolgte wiederum nach Grubbs.

$$\text{Resultat} = \bar{x} \pm T \text{ (Dimension)}; (\pm s; P\%; n)$$

\bar{x} = Mittelwert

T = Streubereich der Einzelmeßwerte

S = Näherungsstandardabweichung

P = statistische Sicherheit [%]

n = Zahl der zu dem Mittelwert verwendeten Einzelmessungen

8 Tabellenanhang

8.1 Bestimmung der Ceramidverteilung in menschlichen Stratum corneum Lipiden: Untersuchung der Reproduzierbarkeit

Tabelle 13: Bestimmung der Ceramidverteilung menschlicher Stratum corneum Lipide (LC/MS): Meßdaten [%]

Messung Nr.	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
1	2,4	4,8	24,5	2,1	6,2	22,8	19,4	5,6	12,1
2	2,4	4,4	24,9	2,1	6,1	22,7	20,0	5,4	12,1
3	2,3	4,8	24,6	2,0	6,2	23,0	19,5	5,6	12,0
4	2,3	4,8	24,8	2,1	6,0	23,2	19,4	5,4	12,0
5	2,3	4,7	25,0	2,1	6,4	22,6	19,5	5,5	11,9
6	2,3	4,6	24,5	1,9	6,1	23,7	19,6	5,2	12,2

Tabelle 14: Bestimmung der Ceramidverteilung menschlicher Stratum corneum Lipide (LC/MS): statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelw.	2,3	4,7	24,7	2,1	6,2	23,0	19,6	5,5	12,1
St.-abw.	0,05	0,16	0,21	0,08	0,14	0,40	0,23	0,15	0,10
Var.-koeff.	2,21	3,42	0,86	4,08	2,22	1,76	1,15	2,78	0,87
Min	2,3	4,4	24,5	1,9	6,0	22,6	19,4	5,2	11,9
Max	2,4	4,8	25,0	2,1	6,4	23,7	20,0	5,6	12,2
Medianw.	2,3	4,8	24,7	2,1	6,2	22,9	19,5	5,5	12,1

8.2 Vergleich der Lipidgewinnungstechniken

8.2.1 Lipidgewinnung durch Lösungsmittlextraktion

Tabelle 15: Ceramidverteilung nach Lösungsmittlextraktion: Meßdaten [%].

Proband	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
1	2,5	6,5	26,8	2,3	7,3	15,9	18,6	7,5	12,5
2	3,4	6,2	34,3	3,5	4,7	15,2	13,4	6,7	12,5
3	3,3	6,4	23,4	3,0	8,9	19,4	19,1	6,0	10,4
4	2,3	4,9	23,4	1,9	7,2	23,5	19,4	5,9	11,5
5	2,4	4,8	24,5	2,1	6,2	22,8	19,4	5,6	12,1
6	2,9	6,4	27,1	2,3	7,6	21,0	16,8	4,7	11,2

Tabelle 16: Ceramidverteilung nach Lösungsmittlextraktion: statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelw.	2,8	5,9	26,6	2,5	7,0	19,6	17,8	6,1	11,7
St.-abw.	0,47	0,79	4,11	0,61	1,42	3,48	2,36	0,96	0,83
Var.-koeff.	16,90	13,54	15,46	24,16	20,28	17,72	13,26	15,76	7,07
Min	2,3	4,8	23,4	1,9	4,7	15,2	13,4	4,7	10,4
Max	3,4	6,5	34,3	3,5	8,9	23,5	19,4	7,5	12,5
Medianw.	2,7	6,3	25,7	2,3	7,3	20,2	18,9	6,0	11,8

8.2.2 Lipidgewinnung durch Cyanoacrylat-Abrisse

Tabelle 17: Ceramidverteilung nach Cyanoacrylat-Abriss: Meßdaten [%].

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1	3,5	7,8	26,0	2,7	7,3	14,0	18,5	7,5	12,7
2	4,4	7,1	35,4	3,6	4,6	12,7	12,5	6,4	13,5
3	3,2	7,2	24,3	2,6	9,2	17,5	18,7	6,0	11,3
4	2,1	5,0	26,0	1,9	6,7	23,6	16,4	6,6	11,7
5	2,2	5,0	25,2	1,9	7,3	22,8	17,5	6,0	11,5
6	2,9	6,9	30,5	2,3	6,7	19,7	14,8	5,2	11,1

Tabelle 18: Ceramidverteilung nach Cyanoacrylat-Abriss: statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelw.	3,1	6,5	27,9	2,5	7,0	18,4	16,4	6,3	12,0
St.-abw.	0,86	1,20	4,25	0,64	1,48	4,49	2,39	0,77	0,94
Var.-koeff.	28,19	18,46	15,25	25,42	21,25	24,42	14,60	12,18	7,82
Min	2,1	5,0	24,3	1,9	4,6	12,7	12,5	5,2	11,1
Max	4,4	7,8	35,4	3,6	9,2	23,6	18,7	7,5	13,5
Medianw.	3,1	7,0	26,0	2,5	7,0	18,6	17,0	6,2	11,6

Tabelle 19: Vergleich der Mittelwerte Lipidgewinnung Lösungsmittlextraktion / Cyanoacrylat-Abrisse (Teststatistik des Student'schen t-Testes)

Ceramid	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
p=	0,34	0,02	0,08	0,89	0,95	0,04	0,03	0,22	0,33

8.2.3 Berechnung von Veränderungen der relativen Ceramidgehalte Cyanoacrylat-Abriß / Lösungsmittlextraktion

Tabelle 20: Änderungen der Ceramidgehalte: Cyanoacrylat-Abriß bezogen auf Lösungsmittel-Extraktion: Einzeldaten [%].

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-Sphingan.	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)		
1	40,0	20,0	-3,0	17,4	0,0	-11,9	-0,5	0,0	1,6
2	29,4	14,5	3,2	2,9	-2,1	-16,4	-6,7	-4,5	8,0
3	-3,0	12,5	3,8	-13,3	3,4	-9,8	-2,1	0,0	8,7
4	-8,7	2,0	11,1	0,0	-6,9	0,4	-15,5	11,9	1,7
5	-8,3	4,2	2,9	-9,5	17,7	0,0	-9,8	7,1	-5,0
6	0,0	7,8	12,5	0,0	-11,8	-6,2	-11,9	10,6	-0,9

Tabelle 21: Änderungen der Ceramidgehalte: Cyanoacrylat-Abriß bezogen auf Lösungsmittel-Extraktion: statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-Sphingan.	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)		
Mittelw.	8,2	10,2	5,1	-0,4	0,0	-7,3	-7,8	4,2	2,4
St.-abw.	21	6,76	5,78	10,8	10,2	6,72	5,76	6,62	5,23
Min	-8,7	2,0	-3,0	-13,3	-11,8	-16,4	-15,5	-4,5	-5,0
Max	40,0	20,0	12,5	17,4	17,7	0,4	-0,5	11,9	8,7
Medianw.	-1,5	10,2	3,5	0,0	-1,1	-8,0	-8,3	3,6	1,7

8.3 Vergleich Ceramidverteilung gesunde Haut-atopisches Ekzem

8.3.1 Probanden mit gesunder Haut

Tabelle 22: Ceramidverteilung hautgesunder Probanden: Meßdaten [%].

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1	2,2	5,0	26,0	2,1	5,7	27,4	16,9	6,0	9,7
2	3,9	6,5	35,6	3,2	4,1	15,0	12,1	6,3	13,3
3	4,0	7,4	28,6	3,3	5,7	13,2	16,4	8,5	12,8
4	4,6	7,4	28,5	3,3	5,0	13,2	14,8	7,1	16,1
5	2,2	5,4	22,7	1,9	7,3	19,0	23,7	5,5	12,2
6	2,5	7,4	28,1	2,0	6,9	17,5	17,0	6,8	11,8

Tabelle 23: Ceramidverteilung hautgesunder Probanden: statistische Daten

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelw.	3,2	6,5	28,3	2,6	5,8	17,6	16,8	6,7	12,7
St.-abw.	1,06	1,09	4,24	0,70	1,18	5,36	3,84	1,05	2,1
Var.-koeff.	32,65	16,65	15,03	26,49	20,47	30,52	22,86	15,65	16,57
Min	2,2	5,0	22,7	1,9	4,1	13,2	12,1	5,5	9,7
Max	4,6	7,4	35,6	3,3	7,3	27,4	23,7	8,5	16,1
Medianw.	3,2	7,0	28,3	2,7	5,7	16,3	16,7	6,6	12,5

8.3.2 Probanden mit atopischem Ekzem (unbestrahlte Areale)

Tabelle 24: Ceramidverteilung Probanden mit atopischem Ekzem: Meßdaten [%]

Proband	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
1, li	1,9	8,6	21,7	1,3	13,6	25,2	15,1	5,4	7,2
1, re	1,6	6,7	28,0	1,3	7,8	23,7	16,2	6,2	8,7
2, li	2,6	6,6	19,0	2,3	9,3	21,7	23,7	5,3	9,5
2, re	2,5	7,6	17,9	2,0	11,1	22,0	22,8	4,6	9,5
3, li	3,8	7,5	31,9	2,6	5,6	15,6	13,9	6,1	13,1
3, re	3,8	7,8	31,3	2,8	5,7	15,8	13,6	6,5	12,7
4, li	4,4	6,1	22,9	2,8	8,0	24,2	17,1	5,4	9,2
4, re	4,0	5,7	22,1	2,6	7,9	25,2	18,0	5,2	9,4
5, li	1,8	6,0	25,1	1,5	7,7	17,9	20,5	5,9	13,6
5, re	2,0	7,5	24,2	1,6	7,9	17,4	20,9	6,0	12,5
6, li	2,7	6,3	31,5	2,0	5,4	19,1	15,5	5,9	11,6
6, re	3,0	6,5	28,2	2,8	5,4	17,9	18,5	5,2	12,6
7, li	0,7	5,6	29,0	0,6	6,9	21,9	16,8	7,4	11,0
7, re	1,0	5,2	34,2	0,8	5,3	20,6	13,6	7,9	11,7
8, li	2,1	5,8	30,3	1,6	6,7	20,2	15,9	6,0	11,4
8, re	2,1	5,9	27,5	1,4	7,0	18,4	19,3	6,1	12,2

li: linker Arm, re: rechter Arm

Tabelle 25: Ceramidverteilung Probanden mit atopischen Ekzem: statistische Daten

Parameter	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	2,5	6,6	26,6	1,9	7,6	20,4	17,6	5,9	11,0
St.-abw.	1,07	0,95	4,87	0,72	2,25	3,16	3,16	0,83	1,85
Var.-koeff.	42,91	14,50	18,35	38,43	29,64	15,45	17,95	13,94	16,83
Min	0,7	5,2	17,9	0,6	5,3	15,6	13,6	4,6	7,2
Max	4,4	8,6	34,2	2,8	13,6	25,2	23,7	7,9	13,6
Medianw.	2,3	6,4	27,8	1,8	7,4	20,4	17,0	6,0	11,5

Tabelle 26: Vergleich der Mittelwerte Ceramidverteilung hautgesunde Probanden / Probanden mit atopischem Ekzem (Teststatistik des Student'schen t-Testes)

Ceramid	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
p=	0,17	0,88	0,46	0,04	0,08	0,13	0,64	0,09	0,09

8.4 Bestrahlungen von Probanden mit atopischem Ekzem

8.4.1 Zeitpunkt t1 Sonnensimulator

Tabelle 27: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit Sonnensimulator (Zeitpunkt t1), Probanden mit atopischem Ekzem: Meßdaten [%]

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1, li	2,8	7,2	22,0	2,1	10,9	22,5	19,4	4,9	8,2
2, li	2,0	10,6	17,9	1,5	16,3	19,1	17,8	5,9	9,0
3, li	3,3	9,5	28,0	1,9	9,0	15,4	14,0	7,2	11,6
4, li	6,5	7,0	20,8	3,6	10,4	21,5	16,6	4,8	8,7
5, li	3,0	7,9	25,0	2,1	8,3	16,8	17,8	6,6	12,5
6, li	2,5	6,3	28,8	1,9	6,0	19,6	16,9	5,8	12,3
7, li	1,8	5,3	35,3	1,6	4,6	18,1	12,7	8,9	11,7
8, li	3,0	8,6	21,8	2,3	11,2	18,2	18,5	6,4	10,1

li: linker Arm

Tabelle 28: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit Sonnensimulator (Zeitpunkt t1), Probanden mit atopischem Ekzem: statistische Daten

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	3,1	7,8	25,0	2,1	9,6	18,9	16,7	6,3	10,5
St.-abw.	1,46	1,73	5,57	0,65	3,58	2,33	2,25	1,32	1,72
Var.-koeff.	46,98	22,14	22,31	30,68	37,36	12,33	13,47	20,99	16,41
Min	1,8	5,3	17,9	1,5	4,6	15,4	12,7	4,8	8,2
Max	6,5	10,6	35,3	3,6	16,3	22,5	19,4	8,9	12,5
Medianw.	2,9	7,6	23,5	2,0	9,7	18,7	17,4	6,2	10,9

8.4.2 Zeitpunkt t1 UV-A

Tabelle 29: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit UV-A Licht (Zeitpunkt t1), Probanden mit atopischem Ekzem: Meßdaten

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1, re	2,3	8,5	17,2	1,7	14,7	22,8	20,7	3,9	8,3
2, re	2,7	10,6	14,9	2,0	16,3	16,9	21,5	4,8	10,3
3, re	3,6	8,3	28,9	2,1	7,1	16,3	14,6	7,1	12,0
4, re	6,7	6,0	19,6	4,0	8,8	21,9	18,5	4,3	10,1
5, re	4,0	7,8	23,8	2,8	7,5	16,5	19,1	6,1	12,4
6, re	2,8	6,9	25,3	2,1	7,0	18,9	19,0	5,8	12,3
7, re	2,1	6,9	30,3	1,8	6,7	17,0	15,1	7,4	12,7
8, re	4,7	6,7	21,9	3,5	8,2	18,8	19,3	4,5	12,4

re: rechter Arm

Tabelle 30: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit UV-A Licht (Zeitpunkt t1), Probanden mit atopischem Ekzem: statistische Daten

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	3,6	7,7	22,7	2,5	9,5	18,6	18,5	5,5	11,3
St.-abw.	1,53	1,44	5,42	0,85	3,77	2,50	2,45	1,32	1,57
Var.-koeff.	42,33	18,72	23,83	33,94	39,49	13,42	13,24	23,97	13,90
Min	2,1	6,0	14,9	1,7	6,7	16,3	14,6	3,9	8,3
Max	6,7	10,6	30,3	4,0	16,3	22,8	21,5	7,4	12,7
Medianw.	3,2	7,4	22,9	2,1	7,9	17,9	19,1	5,3	12,2

8.4.3 Zeitpunkt t2 Sonnensimulator

Tabelle 31: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit Sonnensimulator (Zeitpunkt t2), Probanden mit atopischem Ekzem: Meßdaten

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1, li	2,5	7,4	26,2	1,9	8,8	21,5	17,5	5,7	8,5
2, li	2,3	8,5	18,7	1,8	12,6	19,7	19,5	6,9	9,8
3, li	3,0	8,8	26,9	1,9	8,5	16,7	16,9	6,1	11,2
4, li	5,1	8,3	20,9	2,6	10,8	20,4	17,1	5,7	9,0
5, li	3,5	10,6	24,0	2,2	10,6	15,5	15,2	8,6	9,9
6, li	4,2	7,2	28,7	2,9	6,3	17,6	15,5	6,1	11,5
7, li	1,9	7,0	30,4	1,6	7,2	18,6	13,5	8,2	11,5
8, li	2,4	7,1	23,9	2,0	8,4	18,4	19,7	5,8	12,4

li: linker Arm

Tabelle 32: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit Sonnensimulator (Zeitpunkt t2), Probanden mit atopischem Ekzem: statistische Daten

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	3,1	8,1	25,0	2,1	9,2	18,6	16,9	6,6	10,5
St.-abw.	1,09	1,22	3,90	0,44	2,06	1,97	2,12	1,16	1,37
Var.-koeff.	35,00	15,06	15,63	20,62	22,53	10,61	12,56	17,46	13,11
Min	1,9	7,0	18,7	1,6	6,3	15,5	13,5	5,7	8,5
Max	5,1	10,6	30,4	2,9	12,6	21,5	19,7	8,6	12,4
Medianw.	2,8	7,9	25,1	2,0	8,7	18,5	17,0	6,1	10,6

8.4.4 Zeitpunkt t2 UV-A

Tabelle 33: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit UV-A Licht (Zeitpunkt t2), Probanden mit atopischem Ekzem: Meßdaten

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1, re	1,8	7,3	20,7	1,4	10,6	24,1	20,8	4,8	8,6
2, re	2,4	8,9	17,5	1,9	13,6	20,5	20,7	4,7	9,6
3, re	4,3	9,0	22,7	2,6	9,1	16,2	18,4	5,0	12,8
4, re	6,7	8,3	17,9	3,2	11,1	17,4	20,0	4,6	10,7
5, re	3,6	9,2	18,1	2,4	11,3	15,2	22,5	5,5	12,2
6, re	3,0	8,5	22,7	2,3	8,9	19,5	19,3	5,2	10,6
7, re	1,6	7,1	25,9	1,4	8,6	18,9	17,7	5,8	12,9
8, re	2,7	7,1	21,3	2,3	9,6	19,2	20,9	4,2	12,6

re: rechter Arm

Tabelle 34: Ceramidverteilung nach Bestrahlung mit UV-A Licht (Zeitpunkt t2), Probanden mit atopischem Ekzem: statistische Daten

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	3,3	8,2	20,9	2,2	10,4	18,9	20,0	5,0	11,3
St.-abw.	1,65	0,88	2,93	0,61	1,75	2,76	1,54	0,51	1,62
Var.-koeff.	50,55	10,80	14,05	27,8	16,84	14,62	7,67	10,35	14,38
Min	1,6	7,1	17,5	1,4	8,6	15,2	17,7	4,2	8,6
Max	6,7	9,2	25,9	3,2	13,9	24,1	22,5	5,8	12,9
Medianw.	2,9	8,4	21,0	2,3	10,1	19,1	20,4	4,9	11,5

8.4.5 Berechnung von Veränderungen der Ceramide t0/t1 Sonnensimulator

Tabelle 35: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t1 bezogen auf Zeitpunkt t0 (Sonnensimulator): Meßdaten.

Proband	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
1, li	75,0	7,5	-21,4	61,5	39,7	-5,1	19,8	-21,0	-5,7
2, li	-23,1	60,6	-5,8	-34,8	75,3	-12,0	-24,9	11,3	-5,3
3, li	-13,2	21,8	-10,5	-32,1	57,9	-2,5	2,9	10,8	-8,7
4, li	47,7	14,8	-9,2	28,6	30,0	-11,2	-2,9	-11,1	-5,4
5, li	66,7	31,7	-0,4	40,0	7,8	-6,1	-13,2	11,9	-8,1
6, li	-16,7	-3,1	2,1	-32,1	11,1	9,5	-8,6	11,5	-2,4
7, li	80,0	1,9	3,2	100,0	-13,2	-12,1	-6,6	12,7	0,0
8, li	42,9	45,8	-20,7	64,3	60,0	-1,1	-5,7	4,9	-17,2

li: linker Arm

Tabelle 36: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t1 bezogen auf Zeitpunkt t0 (Sonnensimulator): statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	32,4	22,6	-7,8	24,4	33,6	-5,1	-4,9	3,9	-6,6
St.-abw.	43,36	22,17	9,57	51,88	30,32	7,27	12,87	12,79	5,13
Min	-23,1	-3,1	-21,4	-34,8	-13,2	-12,1	-24,9	-21,0	-17,2
Max	80,0	60,6	3,2	100,0	75,3	9,5	19,8	12,7	0,0
Medianw.	45,3	18,3	-7,5	34,3	34,9	-5,6	-6,2	11,0	-5,6

8.4.6 Berechnung von Veränderungen der Ceramide t0/t1 UV-A

Tabelle 37: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t1 bezogen auf Zeitpunkt t0 (UV-A): Meßdaten.

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1, re	21,1	-1,2	-20,7	30,8	8,1	-9,5	37,1	-27,8	15,3
2, re	8,0	39,5	-16,8	0,0	46,8	-23,2	-5,7	4,3	8,4
3, re	-5,3	10,7	-9,4	-19,2	26,8	4,5	5,0	16,4	-8,4
4, re	67,5	5,3	-11,3	53,8	11,4	-13,1	2,8	-17,3	7,4
5, re	100,0	4,0	-1,7	75,0	-5,1	-5,2	-8,6	1,7	-0,8
6, re	3,7	9,5	-19,7	5,0	29,6	-1,0	22,6	-1,7	6,0
7, re	200,0	23,2	4,5	200,0	-2,9	-22,4	-10,1	0,0	15,5
8, re	123,8	15,5	-27,7	118,8	22,4	-6,9	21,4	-25,0	8,8

re: rechter Arm

Tabelle 38: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t1 bezogen auf Zeitpunkt t0 (UV-A): statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	64,9	13,3	-12,8	58,0	17,1	-9,6	8,1	-6,2	6,5
St.-abw.	72,50	12,93	10,59	72,74	17,60	9,70	17,18	15,51	7,95
Min	-5,3	-1,2	-27,7	-19,2	-5,1	-23,2	-10,1	-27,8	-8,4
Max	200,0	39,5	4,5	200,0	46,8	4,5	37,1	16,4	15,5
Medianw.	44,3	10,1	-14,0	42,3	16,9	-8,2	3,9	-0,8	7,9

8.4.7 Berechnung von Veränderungen der Ceramide t2/t0 Sonnensimulator

Tabelle 39: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t2 bezogen auf Zeitpunkt t0 (Sonnensimulator): Meßdaten.

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1, li	56,3	10,4	-6,4	46,2	12,8	-9,3	8,0	-8,1	-2,3
2, li	-11,5	28,8	-1,6	-21,7	35,5	-9,2	-17,7	30,2	3,2
3, li	-21,1	12,8	-14,1	-32,1	49,1	5,7	24,3	-6,2	-11,8
4, li	15,9	36,1	-8,7	-7,1	35,0	-15,7	0,0	5,6	-2,2
5, li	94,4	76,7	-4,4	46,7	37,7	-13,4	-25,9	45,8	-27,2
6, li	40,0	10,8	1,8	3,6	16,7	-1,7	-16,2	17,3	-8,7
7, li	90,0	34,6	-11,1	100,0	35,8	-9,7	-0,7	3,8	-1,7
8, li	14,3	20,3	-13,1	42,9	20,0	0,0	2,1	-4,9	1,6

li: linker Arm

Tabelle 40: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t2 bezogen auf Zeitpunkt t0 (Sonnensimulator): statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	34,8	28,8	-7,2	22,3	30,3	-6,7	-3,3	10,4	-6,1
St.-abw.	43,32	21,93	5,61	44,31	12,45	7,29	16,12	19,30	9,85
Min	-21,1	10,4	-14,1	-32,1	12,8	-15,7	-25,9	-8,1	-27,2
Max	94,4	76,7	1,8	100,0	49,1	5,7	24,3	45,8	3,2
Medianw.	28,0	24,6	-7,6	23,2	35,2	-9,2	-0,4	4,7	-2,2

8.4.8 Berechnung von Veränderungen der Ceramide t2/t1 UV-A

Tabelle 41: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t2 bezogen auf Zeitpunkt t0 (UV-A): Meßdaten.

Proband	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
1, re	-5,3	-15,1	-4,6	7,7	-22,1	-4,4	37,7	-11,1	19,4
2, re	-4,0	17,1	-2,2	-5,0	25,2	-6,8	-9,2	2,2	1,1
3, re	13,2	20,0	-28,8	0,0	62,5	3,8	32,4	-18,0	-2,3
4, re	67,5	45,6	-19,0	23,1	40,5	-31,0	11,1	-11,5	13,8
5, re	80,0	22,7	-25,2	50,0	43,0	-12,6	7,7	-8,3	-2,4
6, re	11,1	34,9	-27,9	15,0	64,8	2,1	24,5	-11,9	-8,6
7, re	128,6	26,8	-10,7	133,3	24,6	-13,7	5,4	-21,6	17,3
8, re	28,6	22,4	-29,7	43,8	43,3	-5,0	31,4	-30,0	10,5

re: rechter Arm

Tabelle 42: Änderungen der Ceramidgehalte: Zeitpunkt t2 bezogen auf Zeitpunkt t0 (UV-A): statistische Daten.

Parameter	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Mittelw.	40,0	21,8	-18,5	33,5	35,2	-8,4	17,6	-13,8	6,1
St.-abw.	47,62	17,54	11,25	44,83	27,43	10,99	16,36	9,58	10,47
Min	-5,3	-15,1	-29,7	-5,0	-22,1	-31,0	-9,2	-30,0	-8,6
Max	128,6	45,6	-2,2	133,3	46,8	3,8	37,7	2,2	19,4
Medianw.	20,9	22,5	-22,1	19,0	41,8	-5,9	17,8	-11,7	5,8

Tabelle 43: Ceramidverteilung Probanden mit atopischem Ekzem: Vergleich der Mittelwerte (Sonnensimulator) der Zeitpunkte t0 und t1 (Teststatistik des Student'schen t-Testes)

Ceramid	Ceramid 1	Ceramid 2	Ceramid 3	Ceramid 4	Ceramid 5	Ceramid 6	Ceramid 7	N-Acyl-	Cer(NH)
	Cer(EOS)	Cer(NS)	Cer(NP)	Cer(EOH)	Cer(AS)	Cer(AP)	Cer(AH)	Sphingan.	
p=	0,15	0,02	0,07	0,61	0,02	0,07	0,25	0,40	0,01

Tabelle 44: Ceramidverteilung Probanden mit atopischem Ekzem: Vergleich der Mittelwerte (Sonnensimulator) der Zeitpunkte t1 und t2 (Teststatistik des Student'schen t-Testes)

Ceramid	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
p=	1,00	0,61	0,99	0,95	0,61	0,41	0,79	0,41	0,94

Tabelle 45: Ceramidverteilung Probanden mit atopischem Ekzem: Vergleich der Mittelwerte (UV-A) der Zeitpunkte t0 und t1 (Teststatistik des Student'schen t-Testes)

Ceramid	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
p=	0,03	0,03	0,02	0,04	0,06	0,02	0,29	0,32	0,09

Tabelle 46: Ceramidverteilung Probanden mit atopischem Ekzem: Vergleich der Mittelwerte (UV-A) der Zeitpunkte t1 und t2 (Teststatistik des Student'schen t-Testes)

Ceramid	Ceramid 1 Cer(EOS)	Ceramid 2 Cer(NS)	Ceramid 3 Cer(NP)	Ceramid 4 Cer(EOH)	Ceramid 5 Cer(AS)	Ceramid 6 Cer(AP)	Ceramid 7 Cer(AH)	N-Acyl- Sphingan.	Cer(NH)
p=	0,25	0,37	0,18	0,14	0,40	0,79	0,03	0,18	0,83

8.5 Bestimmung von Triolein

Tabelle 47: Quantitative Bestimmung von Triolein in Hautlipidextrakten [$\mu\text{g}/\text{Hautlipidextrakt}$]

Proband	unbehandelte Haut	behandelte Haut Testprodukt ohne Mandelöl	behandelte Haut Testprodukt incl. 0,5 % Mandelöl
1	5,02	4,78	9,24
2	7,95	6,44	16,09
3	6,07	8,39	*26,76*
4	5,19	6,50	15,96
5	4,68	4,56	15,05
6	4,59	4,68	14,47
7	4,96	5,19	17,02
8	6,26	5,02	19,94
9	4,47	5,46	13,20
10	5,39	4,91	14,18

* Meßwert ist Ausreißer (Test nach Grubbs: hochsignifikant)

8.6 Chemikalien und Geräte

8.6.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	R- und S-Sätze	MAK-Wert [ml/m ³]	Gefahren- symbol
Aceton	Merck	R 11 S 9-16-23.2-33	500	F
Ammoniumacetat	Merck			
t-Butylmethyl-ether	Merck	R 11 S 9-16-29-43.3		F
Chloroform	Merck	R 47-20/22-38-40-48 S 35-36/37	10	Xn
Essigsäure	Merck		10	
Ethanol	Merck	R 11 S 7-16	1000	F
n-Hexan	Merck	R 11-48/20 S 9-16-24/25-29-51	50	F, Xn
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	Merck	R 22-36/38 S 22		Xn
Methanol	Merck	R 11-23/25 S 2-7-16-24	200	T, F
Lipidstandard Monoglyceride (C ₁₆ , C ₁₈ , C _{18:1})	Sigma			
Lipidstandard Diglyceride (C ₁₆ , C ₁₈ , C _{18:1})	Sigma			
Lipidstandard Triglyceride (C ₈ , C ₁₀ , C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₆)	Sigma			
α-Phosphorsäure 85 %ig	Merck	R 34 S 26-36/37/39-45		C
Primulin	Sigma			
2-Propanol	Merck	R 11 S 7-16		F
N-(α-OH-acyl)-Sphingosin	Sigma			
N-acyl-Sphingosin	Sigma			
N-stearoyl-4-OH-Sphingosin Triolein	Cosmoferm Sigma			

8.6.2 Geräte und Zubehör

Material	Bezeichnung	Hersteller
DC Fertigplatten	Kieselgel G 60, 10x20 cm, 0,25 mm Schichtdicke	Merck
DC Trennkammern	20x10 cm, mit Stahldeckel	Desaga
DC-Auftragegerät	Camag Linomat IV	Camag
HPLC-Anlage	Entgaser 1100 Quarternäre Pumpe 1100 Probengeber 1100 Säulenthmostat 1100	Hewlett-Packard
HPLC-Säulen	Grom-Sil 120ODS-3 CP, 3 µm 125x2 mm LiChrospher 100 RP 8, 5 µm 125x2 mm	Grom
Massenspektrometer	ESQUIRE-LC	Bruker
Membranfilter	Acrodisk 13 CR PTFE	Gelman
Mikroliterspritze	Gastight 1725	Hamilton
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H	Bandelin
Rührmotor		Heidolph
SpeedVac	RC 10.22	Jouan
Spritzenpumpe	74900	Cole-Parmer
Trockenschrank	TK/L 4028	Ehret
UV-Lampe	TL-900	Camag
Vials, Schraubkappen Septen (Teflon)	N 8	Macherey & Nagel

9 Literatur und Anmerkungen

1. Schaefer, H., Redelmeier, T. E. (1996) Skin barrier, principles of percutaneous absorption. Verlag Karger, Basel, Freiburg, Paris.
2. Schaich, B., Korting, H. C. (1992) Einfluß von Kosmetika und Dermatika auf die Hautlipide. *Hautarzt* 43: 403-408
3. Brooks, G., Idson, B. (1991) Skin lipids. *Int. J. Cosm. Sci.* 13: 103-113
4. Elias, P. M. (1981) Epidermal lipids, membranes, and keratinisation. *Int. J. Dermatol.* 20: 1-19
5. Elias, P. M. (1981) Lipids and the epidermal permeability barrier. *Arch. Dermatol. Res.* 270: 95-117
6. Friberg, S. G., Kayali, I., Beckerman, W., Rhein, L. D., Simion, A. (1990) Water permeation of reaggregated stratum corneum with model lipids. *J. Invest. Dermatol.* 94 (3): 377-380
7. Downing, D. T. (1992) Lipid and protein structures in the permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Lipid Res.* 33: 301-313
8. Imokawa, G., Akasaki, S., Hattori, M., Yoshizuka, M. (1986) Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 87 (6): 758-761
9. Imokawa, G., Akasaki, S., Minematsu, Y., Kawai, M. Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch Dermatol. Res.* 281: 45-51

-
10. Landmann, L. (1988) The epidermal permeability barrier. *Anatomy and Embryology* 178: 1-13
 11. Gloor, M. (1975) Effekt von Ölbadezusätzen. *Hautarzt* 26: 589-591
 12. Yang, L., Man, M.-Q., Taljebini, M., Elias, P. M., Feingold, K. R. (1995) Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment. *Br. J. Dermatol.* 133: 679-685
 13. Man, M.-Q., Feingold, K. R., Thornfeldt, C. R., Elias, P. M. (1996) Optimization of physiological lipid mixtures for barrier repair. *J. Invest. Dermatol.* 106 (5): 1096-1101
 14. Lebensmittelrecht. 1998. In: C. H. Beck'sche Verlagsbuchhaltung, München.
 15. Faller, A. (1978) Der Körper des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 8. Auflage
 16. Möller, H., Matthies, W. Die Haut. In: Umbach, W. (Hrsg.). (1995) Kosmetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 2. Auflage
 17. Elias, P. M., Friend, D. S. (1975) The permeability barrier. *J. Cell Biol.* 65: 180-191
 18. Landmann, L. (1991). Die Permeabilitätsbarriere der Haut. *Pharmazie in unserer Zeit* 20 (4): 155-163
 19. Forslind, B. (1995) The skin: upholder of physiological homeostasis. A physiological and (bio)physical study program. *Thrombosis Research* 80 (1): 1-22
 20. Eucerin Hautatlas (07.1998) Die Haut und ihre Zellen, Beiersdorf AG, Hamburg

21. King, P. J. (1962) *Evaporation. Chem. Proc. Engng.* 43: 69-73
22. Landmann, L. (1985) *Permeabilitätsbarriere der Epidermis.* Grosse Verlag, Berlin
23. Blank, I. H. (1952) Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 18: 433-440
24. Downing; D. T., Stewart, M. E., Wertz; P. W.; Colton, S. W.; Abraham, W.; Strauss, J. S. (1987). Skin Lipids: An Update. *J. Invest. Dermatol.* 88 (3): 2s-6s
25. Blank, I. H. (1953) Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 21: 259-269
26. Landmann, L. (1986) Epidermal permeability barrier: Transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J. Invest. Dermatol.* 87 (2): 202-209
27. Elias, P. M. (1983) Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80S: 44-49
28. Elias, P. M. (1988) Structure and function of the stratum corneum permeability barrier. *Drug. Dev. Res.* 13: 97-105
29. Beiersdorf AG, Analytische Forschung, Fkt. 4234, Mikroskopische Analytik
30. Fartasch, M., Bassukas, I. D., Diepgen, T. L. (1992) Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *Br. J. Dermatol.* 127: 221-227
31. Fartasch, M., Bassukas, I. D., Diepgen, T. L. (1993) Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study. *Br. J. Dermatol.* 128: 1-9

-
32. Fartasch, M., Diepgen, T. L., Bassukas, I. D. (1991) Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Funktion der Hornschichtbarriere an der nicht-ekzematöse Haut von Atopikern. *Allergologie* 8: 315-321
 33. Forslind, B. (1994) Domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm. Venerol. (Stockh.)* 74: 1-6
 34. Forslind, B., Engström, S., Engblom, J., Norlén, L. (1997) A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *Journal of Dermatology Science* 14: 115-125
 35. Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. and Biophys.* 37: 911-947
 36. Deffond, D., Saint-Leger, D., Leveque, J. L., Agache, P. (1986) In vivo measurement of epidermal lipids in man. *Bioeng. Skin* 2: 71-85
 37. Lavrijsen, A. P. M., Higounenc, I. M., Weerheim, A., Oestmann, E., Tuinenburg, E. E., Boddé, H. E., Ponc, M. (1994) Validation of an in vivo extraction method for human stratum corneum ceramides. *Arch. Dermatol. Res.* 286: 495-503
 38. Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M., Hidano, A. (1991) Decreased level of ceramides in human stratum corneum in atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J. Invest. Dermatol.* 96: 523-26
 39. Rogers, J., Harding, C., Mayo, A., Banks, J., Rawlings, A. (1996) Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch. Dermatol. Res.* 288: 765-770
 40. Clarys, P., Barel, A. (1995) Quantitative evaluation of skin surface lipids. *Clinics in Dermatology* 13: 307-321

41. Keßeler, T., Enderer, K., Steigleder, G. K. (1985) Die quantitative Analyse der Hautoberflächenlipide mit Hilfe der Sebumetermethode. *Z. Hautkr.* 60:857-865
42. Downing, D. T., Wertz, P. W., Stewart, M. E. (1986) The role of sebum and epidermal lipids in the cosmetic properties of skin. *Int. J. Cosm. Sci.* 8: 115-123
43. Piérard, G. E. (1987) What does dry skin mean? *Int. J. Dermatol.* 26: 167-168
44. Gloor, M. (1991) Sebaceous gland activity in atopic eczema. In: Ruzicka, T., Ring, J., Przybilla, B. (Hrsg.) Handbook of atopic eczema. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 287-295
45. Proksch, E. (1989) Die Permeabilitätsbarriere der Epidermis und ihre Beeinflussung durch Detergentien und Lokalthérapeutica. *Ärztl. Kosmetol.* 19: 424-443
46. Gloor, M., Munsch, K., Friederich, C. (1972) Über die Beeinflussung der Hautoberflächenlipide durch Körperreinigungsmittel. *Dermatol. Monatsschr.* 158: 576-581
47. Kligman, A. M. (1963) The use of sebum. *Br. J. Dermatol.* 75: 307-319
48. Lampe, M. A., Burlingame, A. L., Whitney, J., Williams, M. L., Brown, B. E., Roitman, E., Elias, P. M. (1983) Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid Res.* 24: 120-130
49. Bonté, F., Saunois, A., Pinguet, P., Meybeck, A. (1997) Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch. Dermatol. Res.* 289: 78-82
50. Saint-Léger, D., Francois, A. M., Léveque, J. L., Stoudemayer, T. J., Grove, G. L., Kligman, A. M. (1988) Age-associated changes in stratum corneum lipids and their relation to dryness. *Dermatologica* 177: 159-164

-
51. Abe, T., Mayuzumi, J., Kikuchi, N., Arai, S. (1980) Seasonal variations in skin temperature, skin pH, evaporative water loss and skin surface lipid values on human skin. *Chem. Pharm. Bull.* 28: 387-92
 52. Yoshikawa, N., Imokawa, G., Akimoto, K., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M. (1994) Regional analysis of ceramides within the stratum corneum in relation to seasonal changes. *Dermatology* 188: 207-214
 53. Wertz, P. W., Downing, D. T. Epidermal Lipids. In: Goldsmith, L. A. (Hrsg.): *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the skin*. 2. Auflage, Oxford, Oxford University Press, 1991, 205-235
 54. Grubauer, G., Feingold, K. R., Harris, R. M., Elias, P. M. (1989) Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J. Lipid. Res.* 30: 89-96
 55. Holleran, W. M., Gao, W. N., Feingold, K. R., Elias, P. M. (1995) Localization of epidermal sphingolipid synthesis and serine palmitoyl transferase activity: alterations imposed by permeability barrier requirements. *Arch. Dermatol. Res.* 287: 254-258
 56. Elias, P. M., Williams, M. L., Rehfeld, S. J. (1990) N-alkanes in the skin: function or fancy? *Arch. Dermatol.* 126: 868-870
 57. Küster, W., Melnik, B., Plewig, G. (1991) N-Alkanes in the skin. *Arch Dermatol.* 127: 1727-1728
 58. Gloor, M., Josephs, H., Friederich, H. C. (1974) The influence of air pollution on the paraffin content of the skin surface lipid. *Arch. Dermatol. Forsch.* 250: 277-284
 59. Wertz, P. W. (1996) The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 18: 283-294

-
60. Holleran, W. M., Takagi, Q., Imokawa, G., Jackson, S., Lee, J. M., Elias, P. M. (1992) β -Glucocerebrosidase activity in murine epidermis: characterization and localization in relation to differentiation. *J. Lipid Res.* 33: 1201-1209
 61. Holleran, W. M., Ginns, E. I., Menon, G. K., Grundmann, J. U., Fartasch, M., McKinney, C. E., Elias, P. M., Sidransky, E. (1994) Consequences of β -Glucocerebrosidase deficiency in epidermis. *J. Clin. Invest.* 93: 1756-1764
 62. Long, S. A., Wertz, P. W., Strauss, J. S., Downing, D. T. (1985) Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* 277: 284-287
 63. Yardley, H. J. (1987) Epidermal lipids. *Int. J. Cosm. Sci.* 9: 13-19
 64. Melnik, B. C., Hollmann, J., Hofmann, U., Yuh, M. S., Plewig, G. (1990) Lipid composition of outer stratum corneum and nails in atopic and control subjects. *Arch Dermatol. Res.* 282: 549-551
 65. Wertz, P. W., Miethke, M. C., Long, S. A., Strauss, J. S., Downing, D. T. (1985) The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J. Invest. Dermatol.* 84: 410-412
 66. Wertz, P. W., Downing, D. T. (1983) Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid. Res.* 24: 759-765
 67. Robson, K. J., Stewart, M. E., Michelsen, S., Lazo, N. D., Downing, D. T. (1994) 6-OH-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J. Lipid Res.* 35: 2060-2068
 68. Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Madison, K. C., Downing, D. T. (1987) Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J. Invest. Dermatol.* 4: 419-425

-
69. Gaver, R. C., Sweeley, C. C. (1965) Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42: 294-298
 70. Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., Ghidoni, R. (1993) Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta.* 1182: 147-151
 71. Wertz, P. W., van den Bergh, B. (1998) The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem. Phys. Lip.* 91: 85-96
 72. Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E. R., Weerheim, A. M., Ijzerman, A. P., Ponc, M. (1998) Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J. Lipid Res.* 39: 186-196
 73. Oldroyd, J. A., Critchley, P., Tiddy, G. J. T., Turner, J. E., Rawlings, A. V. (1994) Specialized role for ceramide one in the stratum corneum water barrier. *J. Invest. Dermatol.* 102 (4): 525
 74. Bowser, P. A., Nugteren, D. H., White, R. J., Houtsmuller, U. M. T., Pottrey, C. (1985) Identification, isolation and characterization of epidermal lipids containing linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 834: 419-428
 75. Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Abraham, W., Madison, K. C., Downing, D. T. (1987) Essential fatty acids and epidermal integrity. *Arch. Dermatol.* 123: 1381-1384
 76. Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M., Sato, Y. (1991) Stratum corneum abnormalities in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 283: 219-223
 77. Schäfer, L., Kragballe, K. (1991) Abnormalities in epidermal lipid metabolism in patients with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 96: 10-10

-
78. Hollmann, J., Melnik, B. C., Lee, M.-S., Hofmann, U., Plewig, G. (1991) Stratum corneum- und Nagellipide bei Patienten mit atopischer Dermatitis. *Hautarzt* 42: 302-306
 79. Prof. Dr. Abeck, Klinikum und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Am Biederstein, TU München
 80. Trainor, J. R., Derrick, P. J. (1991) Biological mass spectrometry. *Spectroscopy World* 3/4: 12-19
 81. Linscheid, M. (1994) Mass spectrometrie. In: Ullmans Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. B5, VCH Verlagsgesellschaft
 82. Budzikiewicz, H. (1992) Massenspektrometrie. Verlag VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 3. Auflage
 83. Seibl, J. (1970) Massenspektrometrie. Walter, W. (Hrsg.). Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main
 84. Maier, H. G. (1990) Lebensmittel- und Umweltanalytik. Steinkopff Verlag, Stuttgart
 85. Knewstubb, P. F., Sugden, T. M. (1958) Mass spectrometric observations of ions in flames. *Nature* 181: 474
 86. Knewstubb, P. F., Sugden, T. M. (1958) Mass spectrometric observations of ions in hydrocarbon flames. *Nature* 181: 1261
 87. Meng, C. K., Mann, M., Fenn, J. B. Vortrag auf der 36. ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 5-10. Juni 1988, San Francisco, CA, S. 771

-
88. Voyksner, R. D., Lee, H. (1999) Improvements in LC/electrospray ion trap mass spectrometry performance using an off-axis nebulizer. *Anal. Chem.* 71: 1441-1447
 89. Fa. Agilent, Waldbronn
 90. Schmelzeisen-Redecker, G., Battering, L., Röllgen, F. W. (1989) Desolvation of ions and molecules in thermospray mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 90: 139-150
 91. Iribarne, J. V., Thomson, B. A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.* 64: 2237-2294
 92. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry for large biomolecules. *Science* 246: 64-71
 93. Paul, W. (1990) Electromagnetic traps for charged and neutral particles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19: 739-748
 94. Stafford, G. C., Kelley, P. E., Syka, J. E. P., Reynolds, W. E., Todd, J. F. J. (1984) Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 60: 85-98
 95. Esquire-LC, Operations Manual Version 1.4, April 1999, Fa. Bruker Daltonik, Bremen
 96. Bruins, A. P. (1994) Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. 1. Instrumentation and ionization techniques. *Trends Anal. Chem.* 13 (1): 37-43
 97. Gu, M., Kerwin, J. L., Watts, J. D., Aebersold, R. (1997) Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 244: 347-356

-
98. Liebisch, G., Drobnik, W., Reil, M., Trümbach, B., Arnecke, R., Olgemöller, B., Roscher, A., Schmitz, G. (1999) Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *J. Lipid Res.* 40 (8): 1539
 99. Neubert, R., Raith, K., Raudenkolb, S., Wartewig, S. (1998) Thermal degradation of ceramides as studied by mass spectrometry and vibrational spectroscopy. *Anal. Commun.* 35: 161-164
 100. Kerwin, J. L., Tuininga, A. R., Ericsson, L. H. (1994) Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 35: 1102-1114
 101. Couch, L. H., Churchwell, M. I., Doerge, D. R., Tolleson, W. H., Howard, P. C. (1997) Identification of ceramides in human cells using liquid chromatography with detection by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11: 504-512
 102. Raith, K., Neubert, R. H. (1998) Structural studies on ceramides by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12: 935-938
 103. Gildenast, T., Lasch, J. (1997) Isolation of ceramide fractions from human stratum corneum extracts by high-performance liquid chromatography. *Biochim. et Biophys. Acta* 1346: 69-74
 104. Norlén, L., Nicander, I., Lundsjö, A., Cronholm, T., Forslind, B. (1998) A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch. Dermatol. Res.* 290: 508-516
 105. Do, U. H., Pei, P. T., Minard, R. D. (1981) Separation of molecular species of ceramides as benzoyl and p-nitrobenzoyl derivatives by high performance liquid chromatography. *Lipids* 16(11): 855-862

-
106. Guey, C., Arbey, E., Gaetani, Q. Nonhydroxylated long-chain fatty acid / 6-OH 4-sphingenine ceramides or Cer[NLH]: A novel class of ceramides in human stratum corneum between classes 5 and 6 of Downing classification. POSTER: Stratum corneum II, An International Symposium, Cardiff, 10.-12. Sept. 1998.
107. Yano, M., Kishida, E., Muneyuki, Y., Masuzawa, Y. (1998) Quantitative analysis of ceramide molecular species by high performance liquid chromatography *J. Lipid Res.* 39(10): 2091-8
108. Gaudin, K., Chaminade, P., Ferrier, D., Baillet, A., Tchaplà, A. (1999) Analysis of commercial ceramides by non-aqueous reversed-phase liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Chromatographia* 49(5/6): 241-248
109. Gaudin, K., Chaminade, P., Baillet, A., Ferrier, D., Bleton, J., Goursaud, S., Tchaplà, A. (1999) Contribution to liquid chromatographic analysis of cutaneous ceramides. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22(3): 379-400
110. Vietzke, J.-P., Strassner, M., Hintze, U. (1999) Separation and identification of ceramides in the human stratum corneum by high-performance liquid-chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry and electrospray multiple-stage mass spectrometry profiling. *Chromatographia* 50 (1/2): 15-20
111. Stewart, M. E., Downing, D. T. (1999) A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J. Lipid. Res.* 40: 1434-1439
112. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng. (1998) Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analysis of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal. Chem.* 70: 882-889

-
113. Henion, J. D., Brewer, E., Rule, G. (1998) Sample preparation for LC/MS/MS. *Anal. Chem. News & Feat.* 10: 650A-656A.
114. Hamanaka, S., Asagami, C., Suzuki, M., Inagaki, F., Suzuki, A. (1989) Structure determination of glucosyl- β 1-N-(ω -O-linoleoyl)-acylsphingosines of human epidermis. *J. Biochem.* 105: 684-690
115. Conti, A. Rogers, J., Verdejo, P., Harding, C. R., Rawlings, A. V. (1992) Seasonal influences on stratum corneum fatty acids and the influence of topical essential fatty acids. *Int. J. Cosm. Sci.* 18: 1-12
116. Bleck, O. (1996) Lipidverteilung im Stratum corneum bei atopischem Ekzem. Methodische Untersuchungen zur Verbesserung von Verfahren der Hochleistungsdünnenschichtchromatographie. *Dissertation*, Fachbereich Medizin, Hamburg
117. Hanifin, J. M., Rajka, G. (1980) Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venerol. (Stockh.)* S92: 44-47
118. Di Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A., Seidenari, S. (1998) Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venerol. (Stockh.)* 78: 27-30
119. Matsumoto, M., Umemoto, N., Sugiura, H., Uehara, M. (1999) Difference in ceramide composition between „dry“ and „normal“ skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm. Venerol. (Stockh.)* 79: 246-247
120. Norlen, L., Nicander, I., Lundh Rozell, B., Ollmar, S., Forslind, B. (1999) Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 112(1) 72-77
121. Bleck, O., Abeck, D., Ring, J., Hoppe, U., Vietzke, J.-P., Wolber, R., Brandt, O., Schreiner, V. (1999) *J. Invest. Dermatol.* 113(6): 894-900

-
122. Mottram, H. R., Evershed, R. P. (1996) Structure analysis of triacylglycerol positional isomers using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Tetrahedron Letters* 37(47) 8593-8596
 123. Aitzetmüller, K., Grönheim, M. (1993) Gradient elution HPLC of fats and oils with laser light scattering detection. *Fat. Sci. Technol.* 95(5): 164-168
 124. Lin, J. T., Woodruff, C. L., McKeon, T. A. (1997) Non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography of synthetic triacylglycerols and diacylglycerols. *J. Chromatogr. A.* 782: 41-48
 125. Marcato, B., Cecchin, G. (1996) Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono-, di- and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector. *J. Chromatogr. A.* 730: 83-90
 126. Christie, W. W., Urwin, R. A. (1995) Separation of lipid classes by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases. *J. High Resol. Chromatogr.* 18:97-100
 127. Foglia, T. A., Jones, K. C. (1997) Quantitation of neutral lipid mixtures using high performance liquid chromatography with light scattering detection. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 20(12): 1829-1838
 128. Redden, P. R., Huang, Y.-S. (1991) Automated separation and quantitation of lipid fractions by high-performance liquid chromatography and mass detection. *J. Chromatogr. B* 567: 21-27
 129. Christie, W. W. (1985) Rapid separation of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. *J. Lipid Res.* 26: 507-512

130. Salivaras, E., McCurdy, A. R. (1992) Detection of olive oil adulteration with canola oil from triacylglycerol analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *JAOCS* 69(9): 935-938

131. Robinson, J. L., Tsimidou, M., Macrae, R. (1985) *J. Chromatogr.* 324: 35-51

132. Byrdwell, W. C., Emken, E. A., Neff, W. E., Adlof, R. O. (1996) Quantitative analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Lipids* 31(9): 919-935

133. Laakso, P. (1997) Characterization of α - and γ -linolenic acid oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *JAOCS* 74(10): 1291-1300

134. Duffin, K. L., Henion, J. D. (1991) Electrospray and tandem mass spectrometric characterization of acylglycerol mixtures that are dissolved in nonpolar solvents. *Anal. Chem.* 63: 1781-1788

Danksagungen

Ich danke Herrn Dr. K.-P. Wittern für die Möglichkeit, daß die vorliegende Arbeit im Bereich der Analytischen Forschung der Beiersdorf AG, Hamburg, durchgeführt werden konnte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Hintze, Herrn Dr. C. Rapp und Herrn M. Straßner für die guten Arbeitsbedingungen, die hervorragende wissenschaftliche und technische Betreuung sowie die stetige Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt weiterhin:

Herrn Dr. R. Wepf und Herrn S. Pfeiffer für die technische Unterstützung und die in dieser Arbeit verwendeten elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Herrn Dr. D. Abeck für die photographischen Aufnahmen erkrankter Hautbilder

Herrn Dr. V. Schreiner für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft bei allen Hautbarriere-relevanten Fragestellungen

Herrn O. Brandt für die Auswahl und Bestrahlung der Probanden mit atopischen Ekzem sowie für die Probennahmen

Frau Dr. M. Hintze und Herrn I. Harris für das Korrekturlesen von Texten in englischer Sprache sowie Frau Dr. S. Wessel und Herrn M. Frauen für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die konstruktiven Kommentare

Herrn Dr. D. Hochmuth für die technische Unterstützung bei der elektronischen Publikation dieser Arbeit im Internet sowie allen Mitarbeitern des AK König für die angenehme Arbeitskreisatmosphäre

Herrn Dr. A. Ingendoh der Fa. Bruker Daltonik, Bremen, für die technischen Schemazeichnungen des ESQUIRE-LC Massenspektrometers

Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	27.08.1970
Geburtsort	Hamburg

Schulbildung

1977 - 1981	Grundschule Harksheide-Nord, Norderstedt
1981 - 1990	Gymnasium Harksheide, Norderstedt
Mai 1990	allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

August 1990 – Oktober 1991	Verein für Behindertenhilfe, Hamburg
----------------------------	--------------------------------------

Studium

Oktober 1991 - März 1996	Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
März 1995 – Dezember 1995	Diplomarbeit
März 1996	Erstes Staatsexamen
Januar 1996 – Oktober 1996	1. Teil des Praktischen Jahres Institut für Qualitätssicherung und –kontrolle im Lebensmittelhandel (IQS), Hamburg
November 1996 – April 1997	2. Teil des Praktischen Jahres Hygiene Institut, Hamburg
Juli 1997	Zweites Staatsexamen

Promotion

ab Juli 1997	Universität Hamburg, Fachbereich Organische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. W. A. König in Kooperation mit der Beiersdorf AG, Hamburg
--------------	--

Thema:	Hautlipidanalytik mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS) – Untersuchung von endogenen und topisch applizierten Lipiden
--------	--