

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 mandelölsaltigen 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.