

Biopharmazeutische Analytik: Neue Aspekte des Einsatzes massenspektrometrischer Methoden in der Analytik von Natur-, Arznei- und Hilfsstoffen

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Klaus Raith

geb. am: 09.03.1971 in: Sömmerda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. Hermann Wätzig
3. Prof. Dr. Gottfried Blaschke

Halle (S.), den 12.01.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000009908

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009908>]

0 Inhaltsverzeichnis

- 1 Einleitung
- 2 Zusammenfassung und Diskussion der Forschungsergebnisse
 - 2.1 Methodische Entwicklungen in der Massenspektrometrie und ihren Kopplungsmethoden
 - 2.2 Massenspektrometrische Analytik von Naturstoffen
 - 2.2.1 Lipide
 - 2.2.2 Kohlenhydrate
 - 2.2.3 Peptide und Proteine
 - 2.2.4 Alkaloide
 - 2.3 Arzneistoffe
 - 2.4 Hilfsstoffe
 - 2.5 Literaturverzeichnis zur Zusammenfassung
- 3 Curriculum Vitae
- 4 Erklärung
- 5 Danksagung
- 6 Publikationsliste
- 7 Anhang: Der Habilitationsschrift zu Grunde liegende Veröffentlichungen (siehe folgende Seite)

- [A1] H. Farwanah, R. Neubert, S. Zellmer und K. Raith: Improved Procedure for the Separation of Major Stratum Corneum Lipids by means of Automated Multiple Development Thin-layer Chromatography. *J. Chromatogr. B* 780 (2002), 443-450.
- [A2] H. Farwanah, P. Nuhn, R. Neubert und K. Raith: Normal Phase LC Separation of Stratum Corneum Ceramides with Detection by Evaporative Light Scattering and APCI Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 492 (2003), 233-239.
- [A3] H. Farwanah, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert und K. Raith: Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase HPLC/APCI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* (2005), im Druck.
- [A4] H. Farwanah, K. Raith, R. Neubert und J. Wohlrab: Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch. Dermatol. Res.* 296 (2005), 514-521.
- [A5] K. Raith, H. Farwanah, S. Wartewig und R.H.H. Neubert: Progress in the analysis of Stratum corneum ceramides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004), 561-571.
- [A6] K. Raith, C. Brenner, H. Farwanah, G. Müller, K. Eder und R.H.H. Neubert: A new LC/APCI-MS method for the analysis of cholesterol oxidation products in food. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005), 207-211.
- [A7] A.V. Kühn, K. Raith, V. Sauerland und R.H.H. Neubert: Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC/ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003), 1531-1537.
- [A8] A.V. Kühn, H.H. Rüttinger, R.H.H. Neubert und K. Raith: Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis / electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003), 576-582.
- [A8a] A.V. Kühn, J.H. Ozegowski und R.H.H. Neubert: Behaviour of 4,5-unsaturated hyaluronic acid oligosaccharides under electrospray ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004), 733-734.
- [A9] M. Oven, K. Raith, R.H.H. Neubert, T.M. Kutchan und M.H. Zenk: Homophytochelatin Are Synthesized in Response to Cadmium in Azuki Beans. *Plant Physiol.* 126 (2001), 1275-1280.
- [A10] M. Getie, K. Raith und R.H.H. Neubert: LC/ESI-MS analysis of two elastin cross-links, desmosine and isodesmosine, and their radiation-induced degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* 1624 (2003), 81-87.
- [A11] C.E.H. Schmelzer, R. Schöps, R. Ulbrich-Hofmann, R.H.H. Neubert und K. Raith: Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *J. Chromatogr. A*, 1055 (2004), 87-92.
- [A12] K. Raith, R. Neubert, C. Poeknapo, C. Boettcher, M.H. Zenk und J. Schmidt: Electrospray Tandem Mass Spectrometric Investigation of Morphinans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003), 1262-1269.
- [A13] J. Schmidt, K. Raith, C. Boettcher und M.H. Zenk: Analysis of benzyloquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. *Eur. J. Mass Spectrom.* (2005), im Druck.
- [A14] H. Trommer, M. Plätzer, K. Raith, W. Wohlrab, H.-P. Podhaisky und R.H.H. Neubert: Examinations of the topically administered drug buprenorphine reveal new insights into its mechanism of action. *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003), 1379-1388.
- [A15] K. Raith, A.V. Kühn, F. Rosche, R. Wolf und R.H.H. Neubert: Characterization of Povidone Products by means of ^{13}C -NMR, MALDI and Electrospray Mass Spectrometry. *Pharm. Res.* 19 (2002), 556-560.
- [A16] K. Raith, C.E.H. Schmelzer und R.H.H. Neubert: Towards a molecular characterization of pharmaceutical excipients: mass spectrometric studies of ethoxylated surfactants. Eingereicht bei *Anal. Chim. Acta* (2005), Manuskript Nr. ACA-05-748.

1 Einleitung

Die Massenspektrometrie hat im zurückliegenden Jahrzehnt eine beeindruckende Entwicklung durchlaufen. Durch neue und verbesserte Ionisationsquellen und Massenanalytoren konnten in Bezug auf Empfindlichkeit, Spezifität, Auflösung, Massengenauigkeit, gezielte Fragmentierung und damit verfügbare Strukturinformation neue Horizonte erschlossen werden, was sich insbesondere auf die Biowissenschaften sehr befruchtend auswirkte. Außerordentlich dynamisch war und ist die Entwicklung bei den Kopplungsmethoden, bei denen eine chromatographische oder elektrophoretische Trennung mit massenspektrometrischer Detektion kombiniert ist. Die Vorteile gegenüber konventionellen Methoden liegen auf der Hand. Zum einen ist hier die hohe, gewissermaßen zweidimensionale Spezifität zu nennen, die sich aus dem Retentions- bzw. Migrationsverhalten einerseits und dem Masse/Ladungs-Verhältnis andererseits ergibt. Häufig kann auch die Trennung verkürzt werden, da oftmals eine Basislinientrennung nicht mehr erforderlich ist. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Empfindlichkeit bzw. die niedrigen erreichbaren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Zwar kann man wegen der unterschiedlich guten Ionisierbarkeit bei verschiedenen Verfahren keine allgemein gültigen Angaben machen, jedoch ist die Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) i.d.R. der HPLC mit UV-Detektion deutlich überlegen und ähnlich empfindlich oder gar empfindlicher als die HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Bezieht man alle verfügbaren Ionisationstechniken in die Überlegungen ein, ist die Massenspektrometrie ein nahezu universelles Detektionsverfahren, welches zudem keine Derivatisierung erfordert. Sie ist jedoch weit mehr als ein Detektor, da auch bei der Online-Kopplung an ein Trennverfahren über die akkurate Massenbestimmung, die Tandem- und Mehrfach-Massenspektrometrie die Möglichkeiten zur Strukturinformation offen stehen.

Der Fokus der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift lag auf der Entwicklung neuer analytischer Methoden, insbesondere der Massenspektrometrie und ihrer Kopplungsmethoden, sowie ihrer Anwendung auf biopharmazeutische, biochemische und medizinische Fragestellungen. Das Spektrum der untersuchten Verbindungen reicht von Naturstoffen, mit einem deutlichen Schwerpunkt bei den Lipiden des Stratum corneum, aber auch Kohlenhydrate, Peptide und Alkaloide, über Arzneistoffe bis hin zu pharmazeutischen Hilfsstoffen. Danach richtet sich auch im Folgenden die Gliederung sowohl der Zusammenfassung als auch der im Anhang aufgeführten Publikationen.

Die Biopharmazie erforscht die Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff, Arzneiform und dem Körper, insbesondere werden die Themenkomplexe Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit und Biotransformation hier eingeordnet. Alle diese Bereiche erfordern leistungsfähige analytische Methoden, beispielsweise die Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) zur Quantifizierung von Arzneistoffen oder ihrer Metaboliten in biologischen Matrices oder massenspektrometrische Methoden zur Strukturidentifizierung.

Wenn man die Entwicklung der letzten Jahre betrachtet, treten biotechnologisch hergestellte Stoffe, also insbesondere Proteine, bei der Auffindung neuer Wirkprinzipien gegenüber den klassischen kleinen Arzneistoffmolekülen immer mehr in den Vordergrund. Der Term

„Biopharmaceuticals“ ist hierfür gebräuchlich geworden, was sicher eine begriffliche Klärung in Bezug auf die Biopharmazie (engl. *biopharmaceutics*) wünschenswert macht. Gerade für solche „Biopharmaceuticals“ sind die Techniken der Massenspektrometrie von überragender Bedeutung. Für zukünftige Forschungen auf diesem Gebiet werden sie daher auch an pharmazeutischen Hochschulinstituten verstärkt Einzug halten müssen.

Viele der zu Grunde liegenden Publikationen wurden in Kooperation mit Wissenschaftlern anderer Disziplinen innerhalb und außerhalb der Pharmazie erarbeitet. Zu nennen sind hier Mediziner (z.B. Dermatologen bei der Erforschung der Stratum-corneum-Lipide), Biochemiker und Ernährungswissenschaftler (z.B. Cholesteroloxydationsprodukte, Peptide aus Nahrungsproteinhydrolysaten). Das Spektrum der Zeitschriften, in denen die Arbeiten publiziert wurden, umfasst daher neben analytischen auch biochemische, pharmazeutische und medizinische Journale.

Die Auswahl der Veröffentlichungen, die dieser kumulativen Habilitationsschrift zu Grunde liegen, wurde nach verschiedenen Kriterien vorgenommen. Erstens wurde auf einen inhaltlichen Zusammenhang geachtet, jedenfalls innerhalb der jeweiligen Hauptkomplexe. Insofern konnte nicht die gesamte Breite des Arbeitsgebietes Berücksichtigung finden. Bei den Lipiden wurde ein Review mit aufgeführt, da dieser das Verständnis und die Einordnung der Arbeiten erleichtert. Zweitens wurde aktuelleren Publikationen der Vorzug gegenüber älteren gegeben. Drittens wurde darauf geachtet, dass bei allen ausgewählten Artikeln der eigene Beitrag deutlich erkennbar ist. Viertens schließlich musste hinsichtlich der Anzahl der Publikationen ein vernünftiger Kompromiss gefunden werden.

Die folgende Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse gliedert sich in einen Abschnitt zur Massenspektrometrie und ihren Kopplungsmethoden, in dem die Methoden kurz erläutert werden und die besonderen bzw. neuen Aspekte der jeweiligen Beiträge genannt und diskutiert werden. Darauf folgen die Abschnitte zu den jeweiligen Substanzklassen, beginnend mit den Naturstoffen, die wiederum in Lipide, Kohlenhydrate, Peptide und Proteine sowie Alkaloide untergliedert werden. Letztere schlagen bereits die Brücke zu den Arzneistoffen. Als letztes Hauptkapitel werden Arbeiten aus dem Bereich der Hilfsstoffe vorgestellt. Es folgt das Literaturverzeichnis zur Zusammenfassung, das relativ kurz gehalten wurde, da die unmittelbar relevante Literatur in den Originalpublikationen angegeben ist, der Lebenslauf, Erklärung und Danksagung sowie eine Publikationsliste des Autors. Im Anhang sind die sechzehn der Habilitation zu Grunde liegenden Veröffentlichungen beigelegt.

2 Zusammenfassung und Diskussion der Forschungsergebnisse

2.1 Methodische Entwicklungen in der Massenspektrometrie und ihren Kopplungsmethoden

Die Massenspektrometrie ist eine Familie von Analysenverfahren, bei denen geladene Teilchen im Vakuum nach ihren Masse/Ladungs-Verhältnissen (m/z) aufgetrennt werden. Jedes Massenspektrometer ist prinzipiell aus drei Komponenten zusammengesetzt: der Ionenquelle, dem Analysator sowie dem Detektor. Die zu analysierenden Proben können direkt zugeführt werden, beispielsweise über eine Spritzenpumpe oder eine Injektionsschleife (bekannt als Flow Injection Analysis, FIA), oder zunächst einer chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung unterworfen werden, wobei die Ionenquelle gleichzeitig als Verbindungsstück (Interface) fungiert. Wenn die Ionisation unter Atmosphärendruck stattfindet, wird häufig auch die Nahtstelle zum Vakuumsystem als Interface bezeichnet, was technisch durch verschiedene reduzierende Sammelöffnungen realisiert wird.

Die derzeit eingesetzten Massenspektrometer lassen sich hinsichtlich der verwendeten Ionenquelle und des Analysators klassifizieren. Die Kombination dieser beiden wichtigsten Elemente bestimmt im Wesentlichen den Einsatzbereich des Gerätes. Eine umfassende und aktuelle Einführung zur Massenspektrometrie findet sich bei [Gross, 2004].

Die Ionenquellen kann man nach dem Aggregatzustand systematisieren, in dem die Probe bei der Ionisation vorliegt. Dies ist mitunter schwer festzulegen, da der genaue zeitliche Ablauf oft nicht bekannt ist. Beispielsweise kann bei der MALDI (s.u.) sowohl eine Desorption bereits vorliegender Ionen als auch eine Ionisation desorbierter Neutralteilchen stattfinden. Pragmatisch gesehen ist es für den Analytiker eher maßgebend, in welchem Zustand die Probenaufgabe erfolgt. Historisch am ältesten sind die Verfahren zur Ionisation in der Gasphase, namentlich die Elektronenstoß- (Electron Impact, EI) und Chemische Ionisation (CI). Hierbei gibt es beim Übergang zum Vakuumsystem die geringsten Probleme, und eine Kopplung an die Gaschromatographie bietet sich an. Bei der Ionisation aus flüssiger Phase muss die Probe entweder zuerst evaporisiert werden (Particle Beam Electron Impact) oder sie wird direkt unter Atmosphärendruck ionisiert (Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck, APCI, Photoionisation unter Atmosphärendruck, APPI, oder Elektrospray-Ionisation, ESI). Elektrospray war die im Rahmen der vorliegenden Arbeit am häufigsten eingesetzte Methode [A7-A16]. APCI wurde in der Lipidanalytik eingesetzt [A2-A4, A6]. APPI kam in [A13] zum Einsatz. Die genannten Verfahren eignen sich zur Kopplung an die Flüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese. Bei der Ionisation aus fester Phase sind die Verfahren der Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS), Fast Atom Bombardment (FAB-MS), Laserdesorption (LDI), Matrix-unterstützte Laserdesorption (engl. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) sowie Ionisation auf Kieselgel (engl.

Direct Ionization on Silica, DIOS) zu nennen. Die MALDI-Massenspektrometrie wurde zur Analytik von Peptiden [A11] und Hilfsstoffen [A15, A16] eingesetzt.

Ein neues, kommerziell noch nicht erhältliches Verfahren ist das Desorptionselektrospray (DESI). Dabei wird ein durch Versprühen von Lösungsmittel generierter Elektrospray-Jet auf eine auf einer Oberfläche befindliche Probe gerichtet, was zur Desorption und Ionisation von Analytmolekülen führt [Takats et al., 2004; Cooks et al. 2005]. Über die Flussrate kann sogar die Eindringtiefe moduliert werden. Untersuchungen an menschlicher Haut *in vivo* sollen möglich sein. Die Perspektiven sind faszinierend. Beispielsweise könnte man in der Zukunft mit einem massenspektrometrischen Schnelltest die Einnahme von Substanzen nachweisen. Weiterhin könnte das Penetrationsverhalten von dermal applizierten Stoffen untersucht werden.

Bei den Massenanalysatoren haben sich zwar einige wenige Prinzipien durchgesetzt, jedoch existieren mittlerweile auch eine Anzahl von Hybriden. Einfachster und preiswertester Analytortyp ist der Quadrupol, der als ein Massensfilter fungiert. Zwei gegenüberliegende Metallstabpaare haben jeweils die gleiche Polarität einer Gleichspannung und die gleiche Phase einer Radiofrequenzwechselfeldspannung (abgekürzt RF-Spannung). Nach den Mathieu-Gleichungen lassen sich die Potentiale nun so einstellen, dass jeweils nur ein m/z in Richtung Detektor passieren kann, die anderen werden abgelenkt und über das Vakuumsystem abgesaugt. Abgeleitet davon wurde die Ionenfalle (engl. *Quadrupole Ion Trap*, QIT) entwickelt (siehe [A2-A4], [A6-A10], [A13-A15]), wobei man sich zwei Quadrupolstäbe als Endkappenelektroden, die anderen verbunden zu einer Ringelektrode vorstellen kann. Im Inneren dieser Falle bzw. des Ionenkäfigs, wie es Wolfgang Paul selbst nannte, können Ionen für längere Zeit gespeichert werden, wobei sie Trajektorien durchlaufen. Um weitere Operationen mit ihnen anstellen zu können, müssen sie mit Hilfe von Dämpfungsgas (Helium) fokussiert werden. QIT-Instrumente eignen sich hervorragend für Tandem-(MS/MS) und Mehrfach-Massenspektrometrie (MS^n). Es handelt sich um *tandem-in-time*, da die einzelnen Schritte zeitlich nacheinander am selben Ort stattfinden. In neuerer Zeit treten lineare Ionenfallen (engl. *Linear Ion Trap*, LIT) mehr und mehr in den Vordergrund. Mit ihnen sind ebenfalls MS/MS und MS^n möglich. Vereinfacht gesagt, bewegen sich die Ionen hier in einem auf RF-Spannung geschalteten Multipol auf einer Achse. Dieser wird vorn und hinten durch Sperrlinsen mit höherem Potential begrenzt. Durch Kollisionskühlung können die Ionen nun eingefangen werden.

Gänzlich anders ist das Arbeitsprinzip der Flugzeitanalysatoren (engl. *time-of-flight*, TOF). Hier wird ein Ionenbündel pulsweise in ein Flugrohr gegeben, wobei die Zeit, die die Ionen zum Zurücklegen einer feldfreien Driftstrecke benötigen, von ihrem Masse/Ladungsverhältnis abhängig ist. Vorzüge von TOF-Instrumenten gegenüber Quadrupolen und QIT's liegen in der besseren Auflösung und Massengenauigkeit und der höheren Messrate. Im Gegensatz zu diesen Instrumenten scannt ein TOF-Instrument nicht sukzessive einen bestimmten Massenbereich, sondern es integriert. Maßgebend ist dabei der sog. *duty cycle*, d.h. das Verhältnis detektierter zu gebildeten Ionen, das bei TOF-Systemen vergleichsweise sehr günstig ist. Ungenauigkeiten, die durch Schwankungen der kinetischen Anfangsenergie verursacht werden, können durch ein Reflektorsystem ausgeglichen werden.

Noch höhere Auflösungen und Massengenauigkeiten als mit TOF-Systemen sind zum einen mit klassischen doppelfokussierenden Sektorfeldgeräten möglich, wobei elektrische und magnetische Kräfte zur Massentrennung ausgenutzt werden, zum anderen mittels Fourier-Transformations-Ionencyclotron-Resonanz-MS (FT-ICR). Letztere Systeme bieten momentan die höchste Leistung hinsichtlich Auflösung, Massengenauigkeit und auch Empfindlichkeit (Einsatz siehe [A12]-[A13]). Da sie zudem vergleichsweise einfacher zu handhaben sind, haben sie die Sektorfeldgeräte stark in den Hintergrund gedrängt. Ein neues und noch nicht kommerziell erhältliches Analysatorsystem ist die von A. Makarov erfundene sog. Orbitrap [Hu et al., 2005]. Sie vereinigt Elemente einer linearen Ionenfalle mit Elementen der FT-ICR-Technik. Die dargestellten Ergebnisse sind sehr viel versprechend.

Das wohl wichtigste Hybridsystem stellt immer noch der Triple Quadrupol dar ([A12]). Dabei fungieren der erste (Q1) und dritte Quadrupol (Q3) als Analysatoren, der zweite hingegen ist nur auf Wechselspannung geschaltet (RF only) und dient zur Durchleitung durch eine Kollisionskammer, gefüllt mit einem Stoßgas (z.B. Argon). Einfache MS erfolgt, indem Q1 ebenfalls auf RF only geschaltet wird. Es sind verschiedene MS/MS-Experimente nach dem Prinzip *tandem-in-space* möglich: beim Product Ion Scan scannt der erste Quadrupol zunächst und wird anschließend auf das interessierende m/z fest eingestellt. Anschließend erfolgt im zweiten Quadrupol die Fragmentierung des Ausgangsions durch kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. *Collision-induced dissociation*, CID), wobei die Effektivität sowohl von der Beschleunigungsspannung als auch vom Gasdruck abhängt. Der dritte Quadrupol scannt die Fragment-Ionen. Daneben ist Vorgängerionenanalyse (engl. *Precursor Ion Scan*; Q3 ist fest, Q1 scannt) und Neutralverlust-Analyse (engl. *Neutral Loss*, Q1 und Q3 scannen, um Δm versetzt) möglich. Vorteile eines Triple-Quadrupol-Systems sind die hohe Empfindlichkeit und Spezifität sowie relativ geringe Standardabweichung und gute Robustheit, was den Einsatz für Quantifizierungen in einem validierten Umfeld, besonders in der Pharmaindustrie, prädestiniert. Allerdings ist die Empfindlichkeit nur dann wirklich hoch, wenn auf ein bestimmtes m/z fokussiert wird (engl. *Selected Ion Monitoring*, SIM, bzw. *Selected Reaction Monitoring*, SRM). Im Full Scan Modus ist hingegen ein QIT-System überlegen.

Sehr erfolgreich sind Quadrupol-Flugzeit-Hybride (Q-TOF), da zu den Vorteilen des TOF noch die Möglichkeit hinzukommt, MS/MS durchzuführen (Anwendung in [A9], [A12], [A16]). Dabei ist im Grunde Q3 eines Triple-Quadrupol-Systems durch ein TOF ersetzt. Allerdings sind die Möglichkeiten des Precursor Ion Scan und Neutral Loss nicht mehr gegeben bzw. müssen aufwändig über Software simuliert werden.

Ebenso kann Q3 durch einen LIT-Analysator ersetzt werden.

Sehr vorteilhaft ist die Kombination einer Linearen Ionenfalle (LIT) mit einem FT-ICR. Hervorzuheben ist, dass kritische Schritte, die häufig die Nutzung reiner FT-ICR-Systeme erschwert haben, hier ausgelagert wurden, so dass das FT-ICR tatsächlich nur zur akkuraten Massenbestimmung genutzt wird.

Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) kann wie bereits erwähnt sowohl als *tandem-in-space* als auch als *tandem-in-time* konzipiert sein und arbeitet nach dem Prinzip der kollisionsinduzierten Dissoziation (engl. *collision-induced dissociation* oder *decomposition*, CID). Die hohe Spezifität wird durch die vorherige Massenanalyse und gezielte Selektion eines bestimmten Ausgangsions erzielt, so dass alle entstehenden Fragmente auf dieses

zurückgeführt werden können. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum sog. Quellen-CID (engl. *Source CID*), bei dem unspezifisch alle gebildeten Ionen eine Beschleunigungsspannung erhalten und fragmentieren können. MS/MS wurde im Rahmen dieser Arbeit vielfach eingesetzt, um Strukturinformationen zu erhalten, die anderweitig wegen der sanften Ionisierung nicht zu erhalten sind [A7-A16].

Die Detektoren sind normalerweise für den Anwender wenig von Interesse, jedoch sollte bekannt sein, welches Prinzip zum Einsatz kommt, da dies gewisse Kautelen zur schonenden Behandlung impliziert. In Quadrupol-, QIT- und LIT-Systemen kommen Sekundärelektronenvervielfacher zum Einsatz, während bei Flugzeitanalysatoren Channelplate-Detektoren verwendet werden. Beim FT-ICR (und auch bei der Orbitrap) werden hingegen berührungsfrei Induktionsströme gemessen.

Die Massenspektrometrie ist in erster Linie eine qualitative Analysenmethode. Sie eignet sich hervorragend zur Strukturidentifizierung von Substanzen, bei denen die Struktur bekannt ist, eine Vermutung vorliegt oder wenigstens Informationen über die Substanzklasse verfügbar sind. Die Strukturaufklärung einer vollkommen unbekanntem Verbindung erfordert dagegen die Hinzunahme anderer Methoden wie IR- und NMR-Spektroskopie. Auch Stereoisomere sind mit MS naturgemäß nicht zu unterscheiden; hier bietet sich die Kopplung mit chromatographischen oder elektrophoretischen Trennmethoden an. Als quantitative Methode erlaubt die MS nur Relativmessungen. Quantitative Aussagen auf Grund von Peakhöhen im Massenspektrum sind nur eingeschränkt möglich, am besten wenn ein isotonenmarkierter Standard in bekannter Menge vorliegt, einigermaßen zuverlässig auch innerhalb homologer Reihen. Bei relativ reinen Proben bietet sich die Flow Injection Analysis (FIA) an. Ansonsten aber werden zur Quantifizierung fast ausschließlich Kopplungsmethoden herangezogen (s.u.). Besonders erfolgreich haben sich in den letzten 15 Jahren die Kopplungsmethoden der Massenspektrometrie entwickelt (engl. *hyphenated methods*), bei denen ein chromatographisches oder elektrophoretisches Trennverfahren online an ein Massenspektrometer gekoppelt ist. Je nach Standpunkt kann das Massenspektrometer als Detektor für die Chromatographie oder aber die Chromatographie als Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie angesehen werden. In jedem Falle ergibt sich eine sehr hohe, gewissermaßen zweidimensionale Spezifität, nämlich über das Retentions- bzw. Migrationsverhalten einerseits und das Masse/Ladungs-Verhältnis andererseits. Oftmals wird die MS für qualitative Untersuchungen herangezogen, also zur Strukturidentifikation von Substanzen, die einen Peak in der Chromatographie oder Elektrophorese verursachen. Zur Routinequantifizierung wird dann häufig auf billigere und robustere Methoden wie UV- oder Fluoreszenzdetektion zurückgegriffen. Aber auch für die Quantifizierung hat sich die LC/MS und GC/MS bewährt, v.a. im Selected Ion Monitoring (SIM) bzw. Selected Reaction Monitoring (SRM). Die erzielbare Empfindlichkeit und damit Nachweis- und Bestimmungsgrenze hängt v.a. von der Ionisierbarkeit der Substanz ab. Während bei GC/MS die Ionisation entweder über Elektronenstoß (EI) oder Chemische Ionisation (CI) durchgeführt wird, sind für LC/MS die Methoden zur Ionisation unter Atmosphärendruck geeignet. Unter ihnen hat das Elektrospray (ESI) die größte Bedeutung für die LC/MS-Kopplung. Bei der LC/ESI-MS wiederum dominiert die Kopplung mit der Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed Phase, RP). Abgesehen davon, dass dieses Trennprinzip ohnehin

in der HPLC die breiteste Anwendung gefunden hat, ist es auf Grund der polaren Natur des Laufmittels besonders kompatibel zu ESI. LC/ESI-MS wurde eingesetzt zur Analyse von Hyaluronsäurefragmenten [A7], Elastin-Crosslinks [A10] und Nahrungsproteinhydrolysaten [A11]. Eine LC/MS-Kopplung kann auch über ein APCI- oder APPI-Interface erfolgen. Dies ist insbesondere sinnvoll, wenn hierdurch bei wenig polaren Substanzen eine bessere Empfindlichkeit erreicht werden kann (siehe z.B. [A6] für die Analytik von Cholesteroolxidationsprodukten). Da diese Ionisationsmethoden geringere Ansprüche an die Polarität des Lösungsmittels stellen, ist auch Normalphasen-HPLC koppelbar. Dies wurde in [A2-A4] für die Analytik von Stratum-corneum-Ceramiden gezeigt.

Die Kopplung der Kapillarelektrophorese an die Massenspektrometrie (CE/MS) verspricht die Kopplung eines schnellen und effektiven Trennverfahrens mit einer hochempfindlichen, spezifischen und dennoch vielseitigen Detektionsmethode (vgl. [Raith, 2003]). Am besten eignet sich ESI für diese Kopplung. Jedoch treten auch eine Reihe von Kompatibilitätsproblemen auf, die die Routineanwendung dieser Technik nach wie vor erschweren. Dieses hängt mit der geringen Flussrate bei der CE zusammen, der Verwendung von Pufferelektrolyten sowie der elektrischen Kopplung, da beide Systeme Hochspannung verwenden. Am einfachsten zu installieren und daher am verbreitetsten ist das Sheath-Liquid-Interface, das auch in [A8] eingesetzt wurde. In Bezug auf die Kompatibilität zu den üblichen CE-Puffersystemen soll die APPI günstiger sein [Mc Intyre und Miller, 2005]. Ob sie ESI als wichtigstes CE/MS-Interface verdrängen kann, bleibt abzuwarten.

2.2 Massenspektrometrische Analytik von Naturstoffen

2.2.1 Lipide

Anknüpfend an frühere Arbeiten [Neubert et al., 1997; Raith und Neubert, 1998; Neubert et al., 1998; Raith und Neubert, 2000; Raith et al., 2000a; Raith et al., 2000b], galt das Interesse weiterhin der Entwicklung und Anwendung analytischer Methoden zur Untersuchung der Stratum-corneum-Lipide.

Das Stratum corneum ist die äußerste Schicht der Epidermis. Seine einzigartige Struktur bestehend aus Corneocyten und interzellulären Lipiden ermöglicht die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut gegenüber transepidermalem Wasserverlust (*transepidermal water loss*, TEWL) und dem Eindringen potentiell schädlicher Substanzen aus der Umwelt. Die Struktur wird illustriert durch das prinzipiell noch heute gültige „Ziegelstein-Mörtel-Modell“, bei dem die „Ziegelsteine“, die Corneocyten, abgeflachte, tote, Protein-angereicherte Keratinocyten sind. Der „Mörtel“ wiederum besteht aus einer einzigartigen Lipidmischung, etwa äquimolaren Mengen von Ceramiden, freien Fettsäuren, Cholesterol und Cholesterolestern. Ganz im Gegensatz zu Membranlipiden fehlen die Phospholipide. Die Verbindung zwischen „Ziegelsteinen“ und „Mörtel“ wird durch Ceramide vermittelt, die kovalent an der Oberfläche der Corneocyten gebunden sind.

Die Ceramide spielen eine Schlüsselrolle für die Barrierefunktion. Ihr chemischer Aufbau, die Nomenklatur und die Organisation der Moleküle im Stratum corneum sind in [A5] bzw. der darin angegebenen Literatur beschrieben. Dieser Übersichtsartikel kann sowohl als Einleitung als auch als Zusammenfassung des Abschnitts zur Lipidanalytik dienen und wurde daher mit aufgenommen.

Der Hintergrund für das dermatologische und pharmazeutische Interesse an den Stratum-corneum-Lipiden ist die Tatsache, dass eine Vielzahl von Hauterkrankungen, darunter so weit verbreitete Leiden wie Psoriasis (Schuppenflechte) und Atopische Dermatitis (Neurodermitis), mit einer Verschlechterung der Barrierefunktion einhergehen. Es liegt nahe, dies mit einer möglichen Veränderung des Lipidmusters im Stratum corneum in Verbindung zu bringen. Diese Verbindung ist allerdings schwer zu beweisen, da dieses Muster vielfältigen Einflüssen unterliegt, darunter die anatomische Stelle, das Alter, die Rasse, der Hauttyp des Patienten usw. Ein weiteres Schlüsselproblem ist die Analytik der Stratum-corneum-Lipide, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Zur Trennung der Stratum-corneum-Lipide im Allgemeinen und der Ceramide im Besonderen hat sich die Dünnschichtchromatographie (engl. *High Performance Thin-layer Chromatography*, HPTLC) als Standardmethode etabliert. Dies ist umso erstaunlicher, da die Methode auf den meisten Gebieten durch die Säulenchromatographie zurückgedrängt wurde. In diesem Falle können jedoch eine Reihe von Vorteilen ausgespielt werden, v.a. die Robustheit gegenüber Matrixbestandteilen, die bei Lipidextrakten zu erwarten sind, die für polare Lipide günstige Normalphasenselektivität und nicht zuletzt die Verbindung mit unspezifischen und daher nahezu universellen Detektionsmethoden.

Das Ziel der Arbeit [A1] bestand darin, eine verbesserte Trennmethode für die Stratum-corneum-Lipide zu entwickeln, die sowohl hohen analytischen Anforderungen genügt, als auch ökonomisch vertretbar ist, so dass sie in größerem Umfange für medizinische Studien eingesetzt werden kann. Dies begann bereits mit dem ersten Schritt, der Gewinnung der Lipidproben. Hierbei entschieden wir uns prinzipiell für eine In-vivo-Extraktionsmethode mit Lösungsmittel, die für klinische Studien geeignet ist. Bei der Optimierung der Prozedur stellte sich heraus, dass die meisten in der Literatur beschriebenen Methoden entweder eine sehr schlechte Ausbeute liefern (Ethanol), wegen Schmerzauslösung ethisch nicht vertretbar sind (Chloroform-haltige Mischungen) oder schlicht unpraktikabel sind (Diethylether; der hohe Dampfdruck führt immer wieder zu unkontrolliertem Entweichen). Das Gemisch n-Hexan/Ethanol 2:1 stellte einen guten Kompromiss dar, in Verbindung mit einer genau standardisierten Extraktionsapparatur, die eigens für das Anlegen am Unterarm konstruiert wurde. Im Vergleich zur herkömmlichen manuellen Ausführung der HPTLC bietet die automatische Mehrfachentwicklung (engl. *Automated Multiple Development*, AMD) eine Reihe von Vorteilen. Nahezu alle wichtigen Teilschritte, von der Auftragung über Eluentenmischung, Kammerkonditionierung, bis hin zu den Entwicklungs- und Trocknungsschritten sind automatisiert, wodurch der individuelle Fehler wesentlich reduziert und die Reproduzierbarkeit erhöht wird. Zeit und Lösungsmittel können eingespart werden, und es werden scharfe Banden erhalten.

Im konkreten Falle wurde ein 17-stufiger Gradient gefahren, wobei die ersten 11 Schritte einen Gradienten mit Dreikomponentenmischungen aus Chloroform, Aceton und Ethanol darstellten. Dann folgten drei isokratische Entwicklungsschritte mit Chloroform, um Cholesterolsulfat, die Ceramidklassen und Cholesterol zu trennen. 2 Schritte mit n-Hexan/Ethylacetat sowie ein letzter mit reinem n-Hexan ermöglichten die Trennung von Cholesterol, Fettsäuren, Triglyceriden, Cholesterolestern und Squalen. Die entwickelten Platten wurden mit einem am Hause konstruierten Tauchgerät 20 s in eine Kupfersulfathaltige Lösung getaucht und anschließend im Trockenschrank bei 150 °C 20 min behandelt. Die Platten wurden zur quantitativen Auswertung densitometrisch gescannt, wobei für jede Platte Standards als interne Referenz aufgetragen wurden. Wenngleich aus methodischen Gründen keine Linearität vorliegt, konnte sehr zuverlässig mit einer Michaelis-Menten-Gleichung als Kalibrierfunktion gearbeitet werden.

Lipidstandards wurden mit Basislinientrennung separiert, aber auch Hautlipidproben konnten mit dieser Methode zuverlässig analysiert werden, wobei die Zuordnung der Banden durch Vergleich der R_f -Werte mit Lipidstandards (soweit diese verfügbar sind) bzw. durch Vergleich mit den Ergebnissen früherer Studien eindeutig erfolgen konnte. Die erhaltenen Konzentrationen der einzelnen Lipidklassen waren im Prinzip mit vorherigen Berichten vergleichbar, wobei sich gewisse Abweichungen durch die Mitextraktion der Sebumlipide und die relativ sanften Extraktionsbedingungen erklären lassen. Während die Zusammensetzung der Lipidklassen recht große interindividuelle Schwankungen zeigte, war die Zusammensetzung der Ceramidklassen relativ konstant.

Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten mit AMD konnte erstmals eine Trennung sowohl der wichtigsten Lipidklassen (Ceramide, Fettsäuren, Cholesterol, Cholesterolester) als auch der Ceramidklassen im selben Lauf erreicht werden.

Die Methode wurde in der Folgezeit bei verschiedenen Studien in Zusammenarbeit mit Dermatologen und der pharmazeutischen Industrie erfolgreich angewandt (siehe z.B. [Heinemann et al., 2005]).

Sollen die dünnschichtchromatographisch getrennten Ceramidklassen mit Hilfe der Massenspektrometrie strukturell weiter untersucht werden, so müssen sie beispielsweise durch Abkratzen der Banden und Reextraktion zurück gewonnen werden. Dieses kann durchgeführt werden, indem nur ein Teil der Platte der destruktiven Detektion unterworfen und dann auf den unbehandelten Teil extrapoliert wird [Raith et al., 2000a]. Im Anschluss daran können ESI-MS/MS [Raith und Neubert, 1998] bzw. LC/ESI-MS Untersuchungen [Raith et al., 2000a] durchgeführt werden, die Aufschluss über die molekulare Zusammensetzung der Ceramidklassen geben. Alternativ kann eine reversible Detektion gewählt werden, indem mit Primulin behandelt wird und unter UV die Banden ausgekratzt werden. Dennoch bleibt es eine mühsame und fehlerbehaftete Handarbeit, die niemals quantitativ sein kann. Das Ziel der Arbeit [A2] bestand also darin, die Dünnschichtchromatographie durch Säulenchromatographie zu ersetzen. Prämisse war dabei, die Normalphasenselektivität zu erhalten, so dass eine Auftrennung der Ceramidklassen erfolgt, die sich insbesondere in Anzahl und Stellung der Hydroxygruppen unterscheiden. Würde man Umkehrphasen-HPLC einsetzen, erhielte man eine Trennung, bei der sich die

Effekte der polaren Kopfgruppen und der Länge der Kohlenwasserstoffketten überlagern, was die Interpretation nahezu unmöglich macht. Jede einzelne Spezies aufzutrennen erschien wegen der Vielzahl kombinatorischer Möglichkeiten ohnehin aussichtslos. Daher wurde eine Normalphasen-HPLC entwickelt mit einer Kieselgelsäule 125 x 4 mm. Die Optimierung der mobilen Phase ging von Erfahrungen in der Dünnschichtchromatographie aus [A1] und resultierte in einem bewusst einfach gehaltenen Gradienten, beginnend mit 100% Chloroform (Laufmittel A) und anschließend Erhöhung des Anteils an Laufmittel B (Chloroform/n-Propanol/Essigsäure) von 0-100% innerhalb von 15 min. Am Ende wurde noch 7 min isokratisch Laufmittel B gefahren.

Von Anfang an stand die Frage im Raum, welche Detektionsmethode anwendbar ist. Da die Lipide keine brauchbare UV-Absorption zeigen, schied die Standard-UV-Detektion aus. Während der Methodenoptimierung wurde die Lichtstreuung (engl. *Evaporative Light Scattering Detection*, ELSD) erfolgreich eingesetzt. Die Evaporation wurde bei 80 °C und 1,9 bar Stickstoff durchgeführt. Nachteile der Methode sind die relativ schlechte Empfindlichkeit (Nachweisgrenze 500 ng/ml) und die mangelnde Strukturinformation. Diese wäre nur indirekt über Fraktionssammlung und massenspektrometrische Untersuchung der Fraktionen zugänglich. Daher wurde nunmehr eine Online LC/MS-Kopplung angestrebt. Die hierfür gängigste Methode der Elektrospray-Ionisation ist jedoch für Normalphasen-HPLC ungeeignet, da die wenig polaren organischen Lösungsmittel der Ionisation nicht förderlich sind. Daher wurde auf die vorhandene, jedoch bis dato in der Arbeitsgruppe nicht etablierte Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) zurückgegriffen. Nach Überwindung einer Reihe von Schwierigkeiten (Verschmutzungen durch Russrückstände, Kurzschlüsse nach Reinigung, Inkompatibilitäten des Laufmittels mit Kunststoffbauteilen im HPLC-System) gelang es schließlich, eine leistungsfähige Methode zu entwickeln. Da das verwendete APCI-Interface für eine optimale Flussrate von ca. 1ml/min konzipiert ist, wurden die in der LC/MS ansonsten eher unüblich gewordenen 4 mm-Säulen beibehalten, die auch eine hohe Toleranz gegenüber Matrixbestandteilen zeigen, wie sie in Lipidextrakten auftreten. Es wurde eine Nachweisgrenze von 50 ng/ml erreicht. Nachdem die Methodenentwicklung mit Ceramid-Standards durchgeführt wurde, konnten auch Stratum-corneum-Lipide erfolgreich analysiert werden. Eine Überkreuz-Validierung mit der Dünnschichtchromatographie [A1] ergab, dass die Substanzen im Wesentlichen die gleiche Elutionsreihenfolge zeigen.

Der große Fortschritt, der mit dieser Methode erzielt werden konnte, war die erstmalige erfolgreiche Überführung der dünn-schichtchromatographischen Normalphasentrennung auf die HPLC und damit die Möglichkeit zur Online-Kopplung an die Massenspektrometrie. Somit konnte von jedem chromatographischen Peak ein Massenspektrum erhalten werden, das Informationen zur Kettenlänge der Kohlenwasserstoffketten enthält. Mit dem verwendeten Ionenfallen-Massenspektrometer konnte zudem MS/MS zur weiteren Strukturaufklärung einzelner Spezies durchgeführt werden nach den zuvor beschriebenen Prinzipien [Raith und Neubert, 1998].

In [A3] wird die in [A2] vorgestellte Methode eingesetzt, um die 9 bisher bekannten Ceramidklassen näher zu untersuchen. Dazu wurden die Lipidextrakte mittels Normalphasen-

HPLC aufgetrennt. Weitere extrahierte Lipide wurden auf Grund Ihres Laufverhaltens mit Hilfe einer Ventilschaltung abgetrennt. Es wurde der gesamte für Ceramide in Frage kommende Massenbereich zwischen m/z 450 und 1500 im Full Scan Modus aufgenommen. Dadurch war es möglich, Spektren zu erhalten und im Nachhinein jede beliebige Masse extrahiert darzustellen. Es sei vermerkt, dass hierin ein großer Vorteil des verwendeten Ionenfallen-Analysators liegt, der sich durch eine im Full Scan praktisch gleich hohe Empfindlichkeit wie im Selected Ion Monitoring (SIM) auszeichnet. Im Gegensatz dazu erreichen Triple Quad Geräte ihre bekannt hohe Empfindlichkeit nur im SIM-Modus. Man kann daraus allgemein ableiten, dass Ionenfallen eher geeignet sind für Screening-Untersuchungen, wie sich im Bereich der Naturstoffanalytik typisch sind, während Triple Quad Systeme ihre Stärken in der spezifischen, hochempfindlichen, quantitativen Analytik einzelner, definierter Verbindungen haben, was typisch ist für die Arzneistoffanalytik.

Die bekannten Ceramidklassen Cer [EOS], Cer [NS], Cer [NP], Cer [EOH], Cer [NP] und Cer [AH] konnten bei der Trennung identifiziert werden. Auch das kürzlich beschriebene Cer [EOP] wurde gefunden. Die Überlappung von Cer [NH] und Cer [AS] ist angesichts der Strukturen nicht überraschend.

Die Variabilität der Kettenlängen liegt vorwiegend im Fettsäureanteil begründet, während bei den Sphingoidbasen C-18 am häufigsten ist. Bei der Angabe der Fettsäurekettenlängen wurde daher eine C-18 Base zu Grunde gelegt.

Die Ionisationsbedingungen beim APCI sind etwas „härter“ im Vergleich zum Elektrospray, wodurch einerseits auch weniger polare Verbindungen ionisiert werden können, andererseits die Tendenz zur Abspaltung von Fragmenten stärker ist. Wenn dies auch nicht völlig verhindert werden kann, so konnten doch die Geräteparameter so eingestellt werden, dass bei ausreichender Empfindlichkeit die Fragmentierung reproduzierbar und limitiert erfolgt. Im konkreten Falle wurde bei den Sphingosinbasen stets ein Molekül Wasser abgespalten, wohingegen Phytosphingosin unverändert blieb.

Von größtem Interesse waren in dieser Arbeit die veresterten Ceramide, da für diese besonders lipophilen und daher durch Elektrospray nicht mehr ausreichend ionisierbaren Verbindungen bislang keine Daten über massenspektrometrische Profile vorlagen, abgesehen von älteren GC/MS-Untersuchungen nach Hydrolyse. Diesen veresterten Ceramidspezies wird eine wichtige Rolle beim Aufbau geordneter Strukturen der interzellulären Lipide des Stratum corneum zugeschrieben. Eine sog. molekulare „Niet-Funktion“ (engl. *molecular rivet*) wurde postuliert. Es wurde keine andere Fettsäure als Linolsäure in der ω -veresterten Position gefunden. Dies bleibt festzuhalten, da in der Literatur diskutiert wurde, inwiefern ein Mangel an ungesättigten Fettsäuren zum Ersatz der Linolsäure durch andere Fettsäuren führen kann und dadurch die Funktionalität gestört ist. Die Kettenlängen der amidartig gebundenen ω -Hydroxyfettsäure lagen zwischen C-30 und C-36. Für die Ceramidklassen Cer [NS], Cer [NP], Cer [NH], Cer [AP] und Cer [AH] wurden Kettenlängen von C-24 bis C-36 gefunden. Für Cer [AS] wurden hingegen Kettenlängen von C-15 bis C-18 gefunden. Hierzu sind die Ergebnisse in der Literatur widersprüchlich. Zusätzlich zu den o.g. Ceramiden wurde ein bislang nicht etabliertes Ceramid Cer [NdS] gefunden mit Dihydrosphingosin (Sphinganin) als Sphingoidbase. Der endgültige Strukturbeweis mittels NMR-Spektroskopie steht noch aus.

Bei der Diskussion unterschiedlicher Literaturberichte zur Kettenlängenverteilung sollte ein möglicher Einfluss der Extraktionsstelle und der verwendeten Prozedur bedacht werden.

Die in [A4] aufgeführte Arbeit baut unmittelbar auf [A1] und [A2] auf. Die entwickelten Methoden wurden hier im Rahmen einer klinischen Studie in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venereologie der Martin-Luther-Universität Halle eingesetzt. Es galt dabei die Frage zu klären, ob die Stratum-corneum-Lipide und insbesondere die Ceramide bei Patienten mit Psoriasis bzw. Atopischer Dermatitis (sog. Neurodermitis) auch in aktuell nicht betroffenen, also nicht-involvierten (nicht-läsionierten) Hautarealen eine abweichende Zusammensetzung zeigen. Wenn dies so wäre, spräche das für die These, dass eine Veränderung des Lipidmusters einen ätiologischen Faktor für diese außerordentlich weit verbreiteten Hautkrankheiten darstellt. Weiterhin könnte man versuchen, solche Unterschiede für eine frühzeitige Differentialdiagnostik nutzbar zu machen. Die Berichte in der Literatur waren zuvor widersprüchlich. Einerseits wurde eine Verringerung der Gesamtceramidmenge beschrieben, andererseits eine Verringerung bestimmter Ceramidklassen wie etwa Cer [EOS] und Cer [EOH], denen eine besonders wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Stratum corneum zugeschrieben wird. Eine andere Arbeit postulierte eine „Zwischenpopulation“ von Patienten mit intermediären Lipidkonzentrationen. Eine dritte Arbeit beschrieb normale Lipidmuster für symptomfreie Areale. Biochemische Arbeiten beschäftigten sich mit Enzymen als mögliche Ursache eines Ceramidmangels.

Für die Studie wurden 7 Gesunde, 7 Patienten mit Atopischer Dermatitis (EASI Score >15) und 6 Patienten mit Psoriasis (PASI Score >20) herangezogen. Mit Hilfe der AMD-HPTLC-Methode zeigte sich eine Tendenz zur Verringerung des Ceramidgehaltes (bei den Psoriatikern ausgeprägter), jedoch war diese nicht statistisch signifikant. Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Ceramidklassen gefunden. Mit Hilfe der LC/APCI-MS wurden die einzelnen Ceramidklassen weiter untersucht auf mögliche Veränderungen der molekularen Zusammensetzung (Veränderung der Kettenlängen o.ä.), doch auch hier zeigten die Massenspektren keine relevanten Unterschiede.

Wenngleich einschränkend gesagt werden muss, dass eine Reihe von Fragen offen bleiben, etwa in Bezug auf die kovalent gebundenen Ceramide, Einflüsse der Extraktionsstelle (regionale Variabilität) und der Extraktionsprozedur, der Lipidorganisation etc., so bleibt doch festzuhalten, dass gesund erscheinende Hautareale in Bezug auf die Lipidzusammensetzung offenbar im Wesentlichen auch gesund sind. Für eine ausführlichere Diskussion der Ergebnisse mit Bezug auf die Literatur sei auf [A4] bzw. die entsprechende Promotionsarbeit [Farwanah, 2005] verwiesen. Die Untersuchung der läsionierten Hautstellen (z.B. psoriatische Plaques) wäre zum Vergleich zwar wissenschaftlich interessant gewesen, ist aber ethisch nicht vertretbar. Die durchgeführte In-vivo-Oberflächenextraktion mit n-Hexan/Ethanol 2:1 hätte nicht nur Schmerzen hervorgerufen sondern auch die Barrierefunktion weiter geschädigt und das Entzündungsgeschehen befördert.

Es spricht vieles dafür, dass sowohl bei der Psoriasis als auch bei der Atopischen Dermatitis in erster Linie ein genetisch-immunologisches Geschehen vorherrscht und die in den betroffenen Hautarealen beobachteten Veränderungen der Lipidzusammensetzung eher

sekundärer Natur sind. Gute Zusammenfassungen des gegenwärtigen, noch immer sehr unvollständigen Kenntnisstandes zur Atopischen Dermatitis finden sich bei [Rudikoff und Lebwohl, 1998] bzw. [Leung und Bieber, 2003], zur Psoriasis bei [Lebwohl, 2003].

Nichtsdestotrotz ist die Untersuchung der Lipidzusammensetzung von großer Wichtigkeit für das Verständnis der Vorgänge [Elias, 2004]. Auch bleibt perspektivisch zu hoffen, dass es einmal gelingen kann, das Lipidmuster günstig zu beeinflussen mit dem Ziel, die Barrierefunktion zu stärken, gewissermaßen zu „reparieren“ (vgl. u.a. [Mao-Qiang et al., 1996] und [Vavrova et al., 2004]). Es gab bereits Versuche seitens der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie, Ceramide oder ihre biosynthetischen Vorstufen ins Stratum corneum zu bringen. Damit könnten zwar nicht die Ursachen der Krankheiten behoben werden, aber Symptome gelindert werden.

In [A5] werden die verschiedenen Methoden, die zur Analytik der Stratum-corneum-Lipide eingesetzt wurden und werden, noch einmal beleuchtet. Dadurch können die Arbeiten [A1-A4] im Zusammenhang eingeordnet werden. Hingewiesen sei beispielsweise auf die Abbildung (Flussschema), die das Zusammenspiel von Dünnschichtchromatographie, HPLC und Massenspektrometrie darstellt. Diskutiert wird auch die Thematik der Lipidextraktion, die für das Ergebnis der nachfolgenden Analysen von großer Wichtigkeit ist. Bei den hier aufgeführten Arbeiten wurde die In-vivo-Oberflächenextraktion mit Lösungsmittel eingesetzt. Die Methoden [A1-A2] sind jedoch auch auf Gesamtlipidextrakte (Hornhaut, exzidierte Haut, Biopsien) sowie u.U. Tape Strips oder Cyanoacrylatabriss anwendbar. Auch die Lipidanalyse von entsprechenden Keratinocyten-Kulturen ist prinzipiell durchführbar.

Die Dünnschichtchromatographie, insbesondere in Form der AMD-HPTLC, ist als Methode der ersten Wahl anzusehen für die Analytik der Lipidklassen des Stratum corneum. Auch die Analytik der einzelnen Ceramidklassen im selben Lauf ist möglich [A1]. Deren Auftrennung konnte auch auf die HPLC übertragen werden [A2]. LC/MS kann durchgeführt werden mit Umkehrphasen und Elektrospray oder mit Normalphasen und APCI. Es wird dann möglich, Massenspektren der einzelnen Ceramidfraktionen zu erhalten und einzelne Substanzen über Tandem- (MS/MS) bzw. Mehrfach-Massenspektrometrie (MS^n) zu identifizieren. Auf diese Weise ist ein semiquantitatives Profiling möglich, dass vergleichende Untersuchungen im Rahmen klinischer Studien ermöglicht.

Als Ausblick zeichnet sich ab, dass die Lipidanalytik in Zukunft noch deutlich an Bedeutung gewinnen wird [Lagarde et al., 2003]. In Anlehnung an jene Felder der Life Sciences, denen in den letzten Jahren das Hauptaugenmerk galt (Genomics, Proteomics, Metabolomics), wurde nunmehr auch der Begriff Lipidomics (gelegentlich auch Lipodomics) etabliert (vgl. [Raith et al., 2004]). Darunter versteht man die möglichst vollständige Charakterisierung der Lipide auf molekularer Ebene und das Studium ihrer biologischen Effekte in Bezug auf die Exprimierung von Proteinen, die am Lipidstoffwechsel und der Lipidfunktion beteiligt sind, einschließlich der Genregulation. Eine Schlüsselrolle dabei wird das sog. Mapping der Lipidmolekülspezies spielen, insbesondere mit Hilfe massenspektrometrischer Techniken.

Die Motivation zum Einsatz von APCI anstelle von ESI kann verschiedenartig sein. Um den Einsatzbereich (engl. *problem solving domain*) der Methoden zu charakterisieren, wird häufig

eine Diagrammdarstellung gewählt, bei der das Molekulargewicht auf der x-Achse und die Polarität auf der y-Achse aufgetragen werden [Willoughby et al., 2002]. Während ESI in der Molekülmasse nahezu uneingeschränkt ist (bis zu 10^6 Da), erfordert es doch eine ausreichende Polarität der Moleküle. APCI wiederum eignet sich auch für weniger polare Moleküle, ist jedoch hinsichtlich der Molekülmasse stärker beschränkt (bis ca. 1500 Da). Während die Arbeit [A2] vornehmlich die Toleranz von APCI gegenüber wenig polaren Lösungsmitteln ausnutzt, ging es in der Arbeit [A6] in erster Linie um Substanzen geringer Polarität, die mit APCI häufig eine bessere Ionisierbarkeit zeigen. Allerdings wird dieser Aspekt auch in [A2] tangiert, wenn es um den Nachweis der lipophilsten Ceramidklassen geht, deren Ionisierbarkeit mit ESI bereits so schlecht ist, dass die Nachweisgrenzen für biologische Proben nicht mehr ausreichend wären.

Im Rahmen eines vom Kultusministerium Sachsen-Anhalt geförderten Projekts in Zusammenarbeit mit dem Institut für Ernährungswissenschaften der Landwirtschaftlichen Fakultät galt es zu erforschen, unter welchen Bedingungen und in welchen Mengen Cholesteroolxidationsprodukte gebildet werden. Diese potentiell atherogenen, zytotoxischen, mutagenen und möglicherweise kanzerogenen Substanzen können in Gegenwart von Licht, Sauerstoff und erhöhter Temperatur bei der Lagerung und Zubereitung von Nahrungsmitteln entstehen. Da gaschromatographische Methoden hier zur Artefaktbildung neigen und vorhandene flüssigchromatographische Methoden den Ansprüchen in Bezug auf Spezifität, Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit nicht genügten, war es das Ziel der in [A6] aufgeführten Arbeit, eine neue LC/MS-Methode für Cholesteroolxidationsprodukte zu entwickeln. Im Zuge der Methodenentwicklung waren sowohl UV-, ELS- als auch ESI-MS-Detektion getestet worden, die prinzipiell anwendbar sind, jedoch eine unbefriedigende Empfindlichkeit zeigen. Als stationäre Phase wurde eine RP-18 Säule eingesetzt, wobei sich das verwendete Fabrikat gegenüber anderen als überlegen erwies. (Die Erkenntnis, dass sich verschiedene RP-18 Säulen in ihrer Selektivität sehr stark unterscheiden können, ist nicht neu.) Auch hier war es sowohl für die Robustheit als auch für die APCI-Ionisation selbst günstig, eine 4 mm-Säule einzusetzen mit entsprechender Flussrate (1 ml/min). Die Optimierung ergab, dass eine isokratische Methode vollkommen ausreichend ist, wenn auch mit einem relativ ungewöhnlichen Laufmittelgemisch (Methanol/Acetonitril/Wasser 86:6:7). Zunächst wurde ein Gemisch von Standards eingesetzt, namentlich 25-Hydroxycholesterol, Cholestan-3 β -5 α -6 β -triol, 7 β -Hydroxycholesterol, 7-Ketocholesterol, 5,6 α -Epoxycholesterol und Cholesterool selbst. Diese Substanzen, die die wichtigsten in der Literatur beschriebenen Oxidationsprodukte umfassen, konnten innerhalb von 20 min basisliniengetrennt werden. Besonders vorteilhaft für die Anwendung und ein Fortschritt gegenüber früheren Methoden ist die Tatsache, dass Cholesterool selbst im gleichen Lauf mit erfasst werden kann. Die Basislinientrennung war notwendig, weil mehrere der genannten Substanzen isobar sind und daher auch durch die Massenspektrometrie nicht spezifisch zu detektieren sind. Anzumerken ist, dass auch Tandem-MS hier wenig Erfolg verheißt, da die Moleküle nur 1-3 Moleküle Wasser abspalten können, jedoch nicht zu klären ist, aus welchen Positionen dieses stammt. Die Energie, die bei der kollisionsinduzierten Dissoziation zur Fragmentierung eingesetzt wird, ist zumindest am eingesetzten Ionenfallensystem nicht groß genug, um stabile

Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zu spalten und dadurch Informationen über das Steroidgerüst zu erhalten.

Die Methode wurde erfolgreich eingesetzt zur Untersuchung biologischer Proben. Das Ausgangsmaterial, u.a. Schweinefleisch, Geflügelfleisch und Ei, wurde einer etablierten Lipidextraktionsmethode unterzogen. Die Cholesterolfraktion wurde mittels präparativer Normalphasenchromatographie gewonnen, wobei mit ELS-Detektion gearbeitet wurde. Die Wiederfindungsrate war >90%. Die Nachweisgrenzen für die Cholesteroolxidationsprodukte lagen bei 15-30 ng/ml. Quantifiziert wurde im Bereich von 100 ng/ml bis 10 µg/ml mit einer relativen Standardabweichung von <2%. Cholesteroolxidationsprodukte wurden in allen untersuchten Proben gefunden. Wie erwartet, war die Konzentration besonders hoch in erhitzten Eiprobe, während bei Fleischproben nicht immer ein Anstieg durch thermische Behandlung nachzuweisen war.

2.2.2 Kohlenhydrate

Hyaluronsäure ist ein lineares Polysaccharid (Molekulargewicht ca. 200.000-400.000) bestehend aus β -1,4-verknüpften Glucuronsäure- und N-Acetylglucosamin-Einheiten, die wiederum untereinander β -1,3-glykosidisch verknüpft sind. Sie kommt u.a. in der Synovialflüssigkeit, im Glaskörper des Auges, in der Nabelschnur, in Haut und Knochen vor; sie dient als Kittsubstanz der extrazellulären Matrix. Hyaluronsäure wird jedoch auch als pharmazeutischer Hilfsstoff (u.a. Hydrogelbildner) und Arzneistoff (Förderung der Wundheilung, Antiphlogistikum) eingesetzt.

Hyaluronsäure wird von verschiedenen Enzymen, den Hyaluronidasen, gespalten. Bei den hier angeführten Untersuchungen [A7, A8] wurde die bakterielle Hyaluronidase (E.C. 4.2.2.1) eingesetzt, eine Endo-Hexosaminidase, die sich von anderen Hyaluronidasen (z.B. der lysosomalen Hyaluronidase des Menschen) dadurch unterscheidet, dass die glykosidische Bindung unter β -Eliminierung und Bildung geradzahligiger Oligosaccharide mit Doppelbindung gespalten wird.

Hintergrund für die Arbeiten [A7, A8] sind Forschungen zum Einsatz von Hyaluronsäure-Fragmenten (HAF) in Drug Delivery Systemen. Deren Vorteile gegenüber nativer Hyaluronsäure umfassen die bessere Hautpenetration kleiner Moleküle, die für einen Radikalfängereffekt verantwortlich gemachte Doppelbindung sowie die bessere analytische Charakterisierbarkeit, die für die Qualitätskontrolle pharmazeutischer Produkte unabdingbar ist. Der Einsatz von Hyaluronsäurefragmenten als Radikalfänger in topischen Zubereitungen zur Verhinderung einer UV-Schädigung der Haut wurde erforscht. Hier ist eine Verbindung zu [A10] zu erkennen und mittelbar auch zur Erforschung der Stratum-corneum-Lipide [A1-A5].

In [A7] wurden drei verschiedene Fragmentpräparationen durch Verdau mit der o.g. Hyaluronidase aus *Streptococcus agalactiae* hergestellt: HAF 4 wurde 60 min, HAF 5 90 min und HAF 6 120 min verdaut, ehe durch Aufkochen das Enzym deaktiviert, ultrafiltriert und lyophilisiert wurde. Zur Abschätzung des Polymerisationsgrades der verbleibenden Reste wurden die Präparationen mit MALDI-TOF MS hinsichtlich der Molekulargewichtsverteilung

untersucht. Im Negativmodus wurden ausschließlich einfach geladene $[M-H]^-$ Ionen gefunden. Da bei Polymeren mit hoher Dispersität Diskriminierungseffekte bis hin zur Detektorsättigung auftreten, war es notwendig, den unteren Massenbereich zu unterdrücken, was für das ungleichmäßige Erscheinungsbild der Spektren sorgt. Grundsätzlich lassen sich solche polyanionischen Stoffe relativ schlecht mit MALDI untersuchen, und zwar umso schwieriger, je größer die durchschnittliche Molmasse und je breiter die Verteilung ist. Um ein aussagekräftiges Spektrum zu erhalten, muss auch die Matrix optimiert werden. In diesem Falle wurde ein Gemisch aus DHB und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure im Verhältnis 9:1 verwendet. Es konnte für HAF 4 eine Verteilung zwischen 757 und 14401 Da, für HAF 5 von 757 bis 8337 Da und für HAF 6 von 757 bis 7579 Da ermittelt werden, was den Abbau widerspiegelt. Ein Zoom in das Spektrum offenbart ein Muster, bei dem dem Hauptpeak ein wesentlich kleinerer Nebenpeak im Abstand $\Delta m=176$ u folgt, der auf die Oligomeren mit ungerader Anzahl von Zuckerbausteinen zurückgeht (zusätzliche Glucuronsäure).

Beim Elektrospray, ebenfalls im Negativmodus, erschwert die Prävalenz von Mehrfachladungen die Spektreninterpretation. 4- bis 16-mere wurden gefunden. Im MS/MS kann bei den geradzahligem Oligomeren N-Acetylglucosamin abgespalten werden, während ungeradzahligem Oligomere Glucuronsäure abspalten. MS³ wurde ebenfalls durchgeführt. Zum Teil lagen Natriumsalze vor, die jedoch eine negative Nettoladung trugen.

Weiterhin wurde eine LC/ESI-MS Methode zur Quantifizierung entwickelt. Hierzu wurde eine C-2 Säule als stationäre Phase und Methanol mit 2,5% Tetrahydrofuran als mobile Phase eingesetzt. Diese Methode konnte eingesetzt werden zur Quantifizierung der Hyaluronsäurefragmente, namentlich der 4-, 6-, 8- und 10-mere in zwei halbfesten Modell-Formulierungen, einer O/W-Creme und einem Hydrogel. Die Wiederfindungsraten waren beim Gel wesentlich besser als bei der Creme. Quantifiziert wurde, je nach Fragment, etwa im Bereich von 5-100 µg/ml. Der Linearitätsbereich erstreckte sich nur über eine Zehnerpotenz, z.T. wurden Polynomkurven zur besseren Anpassung verwendet. Mögen diese Fakten auch im Vergleich zu Reinsubstanzen, insbesondere basischen und daher gut protonierbaren Verbindungen, sehr bescheiden erscheinen, ist es doch angesichts der Komplexität der Gemische, der relativ schlechten Ionisierbarkeit und der ungünstigen Matrix ein achtbares Ergebnis.

Die Kopplung der Kapillarelektrophorese (CE) mit der Massenspektrometrie (CE/MS) stellt eine besondere Herausforderung dar. Da die Probe in flüssiger Form kontinuierlich zugeführt wird, bietet sich Elektrospray an. Jedoch sind die Flussraten im Vergleich zur HPLC gering, die meisten Pufferelektrolyte sind wenig geeignet und auch die elektrische Kopplung stellt ein Problem dar (vgl. [Raith, 2003]). Das Sheath Liquid Interface ist momentan die am weitesten verbreitete Lösung.

In [A8] wird eine CE/MS-Methode zur Auftrennung von Hyaluronsäurefragmenten vorgestellt. Analog zu [A7] wurden diese Oligosaccharide durch Verdau von Hyaluronsäure mit Hyaluronidase aus *Streptococcus agalactiae* gewonnen. Hinsichtlich des Mechanismus sei auch auf eine weitere Publikation verwiesen [Kühn et al., 2004].

Wegen der natürlichen Ladung dieser anionischen Spezies bietet sich die Kapillarelektrophorese als Trennprinzip an. Die standardmäßige UV-Detektion erlaubt jedoch

keine zweifelsfreie Strukturidentifizierung der aufgetrennten Peaks, zumal entsprechende Standards nicht erhältlich sind. Die beste Trennung wurde erhalten, wenn am Einlass positive Hochspannung angelegt wurde. Die Analyten wurden mit dem elektroosmotischen Fluss (EOF) zum Detektor bewegt, jedoch auf Grund ihrer anionischen Ladung unterschiedlich stark zurückgehalten. Mit einfachen, unbeschichteten Fused Silica Kapillaren traten unter den verwendeten Bedingungen relativ starke Schwankungen des EOF auf. Daher wurden mit Polyacrylamid beschichtete Kapillaren eingesetzt. Es wurde zunächst erwartet, dass der EOF durch Ausschaltung der Silanolgruppen gegen Null gehen müsste. Um die Probe dennoch zum Auslass zu transportieren, hätte man Druck anlegen können. Jedoch trat das Gegenteil ein: es wurde ein stärkerer und wesentlich besser reproduzierbarer EOF gemessen. Als mögliche Ursache kommt eine teilweise Hydrolyse des Polyacrylamids zu Polyacrylsäure in Betracht. Als Elektrolyt wurde 40 mM Ammoniumacetat pH 9,0 verwendet. Die Optimierung der Zusammensetzung des Sheath Liquid war ebenfalls wichtig. Schließlich wurde 1% Triethylamin in Methanol/Wasser 80:20 mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingesetzt. Der basische Zusatz unterstützt die Ionisierung im Negativmodus.

Bereits ein Full Scan Massenspektrum im Negativ-ESI-Modus ließ erkennen, dass mehrfach geladene Spezies von 4-16 Monomereinheiten enthaltenden Oligomeren vorliegen. Die charakteristischen Abspaltungen im MS/MS und MS³ (siehe [A7]) wurden erneut bestätigt. Wiederum lagen die Oligomere teilweise als Natriumsalze vor. Bei Betrachtung der Ladungszustände ist zu unterscheiden zwischen jenen Ladungszuständen, die während der elektrophoretischen Trennung wirksam sind, und jenen, die beim Elektrospray entstehen. Da die Gleichgewichtseinstellung zwischen den Ladungszuständen während der Elektrophorese wesentlich schneller erfolgt als die Analysenzeit, beruht die Trennung letztlich auf einer durchschnittlichen Ladung. Die unterschiedlichen Ladungszustände bei ESI äußern sich wiederum darin, dass die verschiedenen korrespondierenden m/z -Werte bei der gleichen Migrationszeit auftreten. Negativ geladene Kohlenhydrate sollten in einer Reihenfolge vom kleinsten zum größten Oligomer migrieren, wenn die Anode am Einlass platziert ist. In der Originalpublikation [A8] wurden bezüglich der genauen Elutionsreihenfolge zunächst einige Unstimmigkeiten gefunden. Spätere Messungen und eine genauere Auswertung des Isotopenmusters, was bei einer Quadrupol-Ionenfalle mit Einheits-Massenauflösung nur schwierig möglich ist, ergaben jedoch, dass teilweise im Elektrospray Mehrfach-Cluster gebildet worden waren. Dadurch wurde die Interpretation erschwert. Unter Berücksichtigung dessen wurde schließlich doch die erwartete Migrationsreihenfolge gefunden. Eine entsprechende Richtigstellung wurde in einem Brief an den Herausgeber veröffentlicht und ist als [A8a] ebenfalls beigefügt. Die Konformation solcher Oligomere spielt nichtsdestotrotz eine wichtige Rolle, da sie den Reibungswiderstand während der elektrophoretischen Trennung beeinflusst.

Wie ein Literaturüberblick zeigt, sind CE/MS-Anwendungen auf diesem Gebiet relativ selten, was den methodischen Wert unterstreicht.

2.2.3 Peptide und Proteine

Der Artikel in [A9] resultierte aus einer Kooperation mit der Gruppe von M.H. Zenk am Biozentrum Halle. Dabei wurde die Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) eingesetzt, um ein Problem der Peptidanalytik aus der Pflanzenphysiologie zu lösen. Wie Zenk und Mitarbeiter in früheren Arbeiten gezeigt hatten, können Pflanzen Schwermetalle entgiften, indem sie sie mit kleinen Peptiden (5-23 Aminosäuren), sog. Phytochelatinen, komplexieren. Während Phytochelatine (PC's), die die Sequenz ($[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$) besitzen, aus Glutathion (GSH) synthetisiert werden, wurden später auch Isoformen entdeckt, die sich in der endständigen Aminosäure unterscheiden. Dazu gehören auch die sog. Homo-Phytochelatine mit der Sequenz ($[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-}\beta\text{-Ala}$), die aus Homo-Glutathion (h-GSH) gebildet werden. Dies ist bei einigen Pflanzen der Ordnung *Fabales*, besonders im Stamm *Phaseolae*, beschrieben worden. Zenk und Mitarbeiter postulierten nach einer umfassenden Untersuchung an 200 Pflanzenarten, die von Algen bis zu Orchideen reichte, dass es sich um einen ubiquitären Mechanismus handelt und alle Pflanzen nach Exposition mit Schwermetallen in der Lage sind, Phytochelatine, Iso- oder Homo-Phytochelatine zu bilden. Im Jahre 2000 wurde hingegen von einer japanischen Arbeitsgruppe berichtet, dass Wurzeln und Zellkulturen der Azuki-Bohne (*Vigna angularis*), bei Exposition mit Cadmium keine Phytochelatine bilden und sich als hypersensitiv erwiesen. Auch externer Zusatz von GSH habe keine Phytochelatinsynthese ausgelöst. Somit wäre die Azuki-Bohne die einzige bekannte Ausnahme im Pflanzenreich gewesen, die diesen Entgiftungsmechanismus nicht besitzt. Dies war Anlass genug, diese Befunde noch einmal zu überprüfen. Mittels HPLC konnte gezeigt werden, dass tatsächlich kein GSH vorkommt. Jedoch wurde eine andere SH-haltige Verbindung aufgespürt, die durch ESI-MS als h-GSH identifiziert werden konnte. Die Sequenz wurde durch MS/MS-Fragmentierung und Interpretation der charakteristischen y- und b-Fragmente bestätigt. Diese Untersuchungen wurden einerseits an einem Quadrupol-Flugzeit-Hybridmassenspektrometer (Q-TOF) durchgeführt, andererseits an einer Ionenfalle (Quadrupole Ion Trap). Obwohl das zu Grunde liegende physikalische Prinzip, die kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID) durch Beschleunigung der zu analysierenden Ionen und Zusammenstöße mit inerten Gasmolekülen, in beiden Fällen gleich ist, unterscheidet sich die technische Realisierung wesentlich. Beim Q-TOF handelt es sich um eine *tandem-in-space* Anordnung mit einer Argon-gefüllten Stoßzelle, die somit nur eine Fragmentierungsstufe (MS/MS) erlaubt, diese aber relativ effizient. Durch den Flugzeitanalysator ist eine akkuratere Massenbestimmung möglich. Bei der Ionenfalle hingegen liegt *tandem-in-time* vor, die Kollisionen finden in der Ionenfalle mit dem als Dämpfungsgas eingesetzten Helium statt. Die Fragmentierungsbedingungen sind etwas sanfter, so dass die Tandem-Massenspektren weniger und höhermassige Fragmente zeigen. Vorteilhaft ist bei der Ionenfalle, dass auch Mehrfach-Massenspektrometrie (MS^n) durchgeführt werden kann. Dadurch können aus den Fragmenten des MS/MS weitere Fragmente gebildet werden und so weiter, theoretisch bis zu 10mal. Meist erlauben dies die Substanzen jedoch nicht, da auch bei jedem Schritt ein Intensitätsverlust zu verzeichnen ist;

(der „Rekord“ aus der eigenen Praxis liegt bei immerhin MS⁶). Eine solche schrittweise Abspaltung ist sehr nützlich zur Strukturaufklärung, insbesondere bei kleinen Peptiden.

Nach Exposition mit Cadmium konnten in der HPLC tatsächlich Peaks gefunden werden, die für die Anwesenheit von Homo-Phytochelatinen sprachen. Die Fraktionen wurden gesammelt und einer eingehenden ESI-MS und MS/MS-Untersuchung unterzogen. Der größte Peak wurde als hPC₂ mit einer Sequenz ([γ -Glu-Cys]₂- β -Ala) identifiziert; weitere Peaks wurden als desGly-PC₂ mit der Sequenz ([γ -Glu-Cys]₂) und hPC₃ identifiziert. Für hPC₂ wurde ein 15facher Anstieg nach Cadmium-Exposition gefunden.

Die Ergebnisse bestätigen eindrucksvoll das Vorkommen von Homo-Phytochelatinen in der Azuki-Bohne und zeigen, dass auch diese Spezies über einen solchen Entgiftungsmechanismus für Schwermetallionen verfügt und somit keine Ausnahme im Pflanzenreich darstellt. Die Massenspektrometrie stellte auf Grund ihrer hohen Spezifität und Empfindlichkeit und der durch Fragmentierungsexperimente zugänglichen Strukturinformation das entscheidende Werkzeug dar, um den durch HPLC-Untersuchungen nahe gelegten Vermutungen Beweiskraft zu verleihen.

Die in [A10] angeführte Arbeit schlägt eine Brücke zwischen der Erforschung der Haut im weitesten Sinne und der Peptidanalytik, ebenso zwischen der Strukturaufklärung von Naturstoffen und biomedizinischen Schlussfolgerungen.

Elastin ist ein stark hydrophobes Strukturprotein, das der Hauptbestandteil elastischer Fasern ist. Es kommt in verschiedenen Geweben von Vertebraten vor, wie z.B. Haut, Lunge und großen Blutgefäßen. Es entsteht aus der wasserlöslichen Vorstufe Tropoelastin durch Quervernetzung. Dabei werden aus 4 Molekülen Lysin spezielle Crosslinks mit einer Pyridin-Ringstruktur gebildet. Diese Aminosäureabkömmlinge, insbesondere Desmosin und Isodesmosin, wurden nur in Elastin gefunden und spielen eine wichtige Rolle bei der elastischen Funktion. Da die Haut als äußeres Schutzorgan gegenüber dem Licht, insbesondere dem UV-Licht exponiert ist, liegt es nahe, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als mögliche Ursache von Hautalterung (und im Extremfall Hautkrebs) näher zu untersuchen. Mit der Hautalterung geht ein Verlust der Elastizität einher, der auf die Verringerung des Elastingehalts und v.a. der Crosslinks zurückgeführt wird. In [A10] ging es darum, im In-vitro-Modellsystem zu untersuchen, inwiefern Desmosin und Isodesmosin, die wichtigsten Elastin-Crosslinks, in Gegenwart von Fe²⁺ und H₂O₂, bei Inkubation bzw. Bestrahlung mit UV-B-Licht oxidiert werden. Zunächst konnte die angenommene Struktur von Desmosin und Isodesmosin durch Aufnahme eines Elektrospray-Massenspektrums mit Elementarzusammensetzung auf der Basis akkurater Massenbestimmung bestätigt werden. Zusätzlich zum Molpeak bei $m/z=526$ wurden sowohl nach Inkubation als auch nach Bestrahlung oxidative Abbauprodukte gefunden bei $m/z=497$ und $m/z=481$. Zur Aufklärung der Strukturen wurden Tandem-MS-Experimente durchgeführt. Aufeinander folgende Abspaltungen von Ammoniak und Kohlenmonoxid belegten die Anwesenheit von 3 unsubstituierten Aminogruppen und 3 unsubstituierten Carboxylgruppen. Anzumerken ist, dass im Falle einer Quarternisierung des Pyridinstickstoffs lediglich [M]⁺ Ionen mit der nominalen Molmasse auftreten, während ansonsten unter Elektrospraybedingungen [M+H]⁺ vorliegt, so dass m/z um 1u größer sein muss als die Molmasse. Für das

Hauptoxidationsprodukt hatte eine japanische Arbeitsgruppe eine Molmasse von 495 u ermittelt, wohingegen diese Untersuchung, abgeleitet von $m/z=497$, auf eine Molmasse von 496 u schließen ließ. Eine solche Abweichung liegt außerhalb der Gerätetoleranz, was dazu Anlass gab, die dort postulierten Strukturen in Frage zu stellen. Eine eigene Strukturhypothese enthielt eine Aldehydstruktur, deren Entstehung im Rahmen einer oxidativen Desaminierung vorstellbar ist. Zur nasschemischen Überprüfung wurde das spezifische Reagens Purpald[®] eingesetzt, das in der Tat eine tiefrote Färbung anzeigte. Somit konnten die in Abb. 1 angegebenen Strukturhypothesen verifiziert werden.

Weiterhin wurde eine quantitative Bestimmungsmethode für Desmosin und Isodesmosin mittels LC/ESI-MS entwickelt. Einerseits sollte eine bessere Trennung als bei älteren Methoden erreicht werden, andererseits musste auf Zusätze wie nichtflüchtige Puffer und Tenside nach Möglichkeit verzichtet werden, da sie nachteilig für die LC/ESI-MS-Kopplung sind. Als mobile Phase wurde 0,2 % Ameisensäure als leichtes Ionenpaarreagens in Wasser/Methanol 60:40 mit einer RP-8 Säule als stationäre Phase verwendet. Die Bestimmungsgrenze lag bei 100 ng/ml. Mit Hilfe dieser Methode wurden die Oxidationsprodukte von Desmosin und Isodesmosin quantitativ bestimmt. Ein starker dosisabhängiger Abbau wurde bei Exposition gegenüber UV-B von 0 bis 3 J/cm² und ein moderater dosisabhängiger Abbau unter UV-A mit 10fach höherer Dosis beobachtet. Exposition gegenüber einer künstlichen Lichtquelle mit einem dem Sonnenlicht ähnlichen Wellenlängenspektrum erbrachte ebenfalls einen zeitabhängigen Abbau, während IR-Strahlung ohne Einfluss blieb.

Die Ergebnisse zeigen, dass Bestrahlung in Gegenwart des ubiquitären Fe²⁺ sowie H₂O₂ einen drastischen oxidativen Effekt auf die Elastin-Crosslinks hat. Ein solcher Abbau hat gravierende Konsequenzen für die Funktionalität von Elastin. Inwiefern diese Oxidationsmechanismen auch in vivo auftreten und für die Hautalterung verantwortlich gemacht werden können, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die in [A11] aufgeführte Arbeit entstand im Rahmen eines Netzwerkprojekts „Molekulare Ernährungsforschung“, in dem das Teilprojekt „Analytik von Peptiden aus Proteinverdauen“ durchgeführt wurde. Zu Grunde liegt die Fragestellung, inwiefern biologisch aktive Peptide beim Verdau von Nahrungsproteinen entstehen können. Für das Teilprojekt bestand die Aufgabe, unter Nutzung der massenspektrometrischen Ausstattung eine leistungsfähige Peptidanalytik zu etablieren.

Um die Vorgänge bei der Digestion von Nahrungsproteinen zu simulieren, wurde das Modellprotein β -Casein einem „gastro-analogen“ Verdau mit Pepsin unterzogen. Die Hydrolysate konnten mit LC/ESI-MS aufgetrennt werden, wobei deren komplexe Zusammensetzung zu Tage trat. Zunächst galt das Hauptaugenmerk kleinen Di- und Tripeptiden, da diese als Substrat des gut charakterisierten PepT1-Carriers gut resorbiert werden können, was sie hinsichtlich möglicher biologischer Aktivität besonders interessant macht. Jedoch entsteht zunächst auch eine Vielzahl größerer Peptide. Um den Verdau möglichst gut zu charakterisieren, sollten auch diese untersucht werden, zumal unter bestimmten Umständen wie etwa entzündlichen Krankheiten auch hier die Resorption

möglich ist. Die Arbeit [A11] stellte die erste systematische Untersuchung eines peptischen β -Casein-Verdaus mit modernen massenspektrometrischen Methoden dar. Nur der komplementäre Einsatz von MALDI-TOF-MS und ESI-MS ermöglicht eine umfassende Charakterisierung mit hoher Sequenzabdeckung. MALDI-TOF eignet sich v.a. für größere Peptide, da im Massenbereich < 500 u Matrixpeaks die Auswertung erschweren. Methodische Untersuchungen wurden durchgeführt zum Vergleich verschiedener Matrices (CHCA, Sinapinsäure, DHB) und Präparationsmethoden (Dried-Droplet und Thin-layer Technik). CHCA und Sinapinsäure waren wiederum komplementär, während DHB für Peptide weniger geeignet war. Die Dried-Droplet Methode war besser reproduzierbar, während Thin-layer etwas bessere Empfindlichkeit erbrachte. Zur Peptidsequenzierung bei MALDI wurde Post Source Decay (PSD) eingesetzt bzw. zur Unterstützung zusätzlich CID in einer luftgefüllten Kollisionszelle. Beim PSD wurden die Ausgangsionen mit Hilfe des Timed Ion Selector isoliert, dessen technisch bedingte relative Unschärfe sich als Hemmnis erwies. PSD-Spektren mussten aus mindestens 10 Einzelspektren zusammengesetzt werden, um durch stufenweise Verstellung der Reflektorspannung den gesamten interessierenden Massenbereich zu erfassen. MALDI konnte offline an die HPLC gekoppelt werden, indem die LC-Fractionen gesammelt und auf das MALDI-Target pipettiert wurden. Bei ESI-MS wurde die Fragmentierung durch Tandem-MS mittels CID erreicht. Die MS-Rohdaten wurden zu Peaklisten aufbereitet, die zusammen mit Angaben zur Protease, zur Taxonomie und zu möglichen posttranslationalen Modifikationen zur Datenbank-gestützten Sequenzierung mit Hilfe von Mascot eingesetzt werden. Die Zusatzsoftware Mascot Distiller wurde eingesetzt, um die Qualität der durch Mascot erstellten Peaklisten für die Datenbanksuche zu verbessern. Dieser Software liegt ein iterativ arbeitender Algorithmus zu Grunde, der bei der Peakdetektion das durchschnittliche Isotopenmuster von Peptiden als zusätzliche Information nutzt, erkannte Peaks vom verbleibenden Spektrum subtrahiert und dadurch auch solche Peaks noch detektieren kann, die anderenfalls vom Rauschen nicht zu unterscheiden wären. Dies war eine der ersten biomedizinischen Anwendungen dieser Software, und es zeigte sich, dass die Geschwindigkeit und Ausbeute der Identifizierung und damit die Sequenzabdeckung deutlich verbessert werden konnten. Insgesamt wurde eine Sequenzabdeckung von 75% erzielt, wobei 41 Peptide mit 2-36 Aminosäuren identifiziert wurden. Interessant ist, dass neben den bereits bekannten Schnittstellen von Pepsin (C-terminal zu Phe, Leu, Trp, Tyr, Ala, Glu und Gln) weitere Schnittstellen gefunden wurden, u.a. C-terminal zu Ser, Thr und Met. Analytische Verdaue nach dem Prinzip des sog. Peptide Mass Fingerprinting (PMF) werden i.d.R. mit dem hochspezifischen Trypsin durchgeführt. Nachteilig ist hier jedoch, dass eine Reihe von Proteinen, z.B. Strukturproteine wie Kollagen oder Elastin, damit nicht oder nur sehr ungenügend verdaut werden. Daher entstand die Idee, in Zukunft das unspezifischere Pepsin auch als analytisches Verdauenzym einzusetzen. Zwar ist die Interpretation dann durch die geringere Spezifität erschwert, jedoch kann dieser Nachteil durch die größere Anzahl an Peptidfragmenten und den somit höheren Informationsgehalt oft mehr als ausgeglichen werden. Dies wurde in neueren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe bereits genutzt. In späteren, noch nicht publizierten Arbeiten konnte durch den Einsatz von Nano-ESI anstelle des konventionellen ESI eine höhere Ionisationsausbeute bei Verringerung der Signalunterdrückung erreicht werden. Dadurch war auch bei komplexen Gemischen oft keine

HPLC-Trennung mehr erforderlich. Weiterhin konnte die de-novo-Sequenzierung mit Hilfe der Software PEAKS etabliert werden. Wenn Auflösung und Massengenauigkeit hoch genug sind, was insbesondere am Q-TOF der Fall ist, kann die Sequenz eines Peptids auch ohne Abgleich mit Datenbanken, ausschließlich auf der Basis der Tandem-MS-Fragmentierung, ermittelt werden. Dadurch sind auch Peptide zugänglich, deren übergeordnete Proteinsequenzen nicht in Datenbanken erfasst sind, z.B. von Pflanzen oder noch wenig untersuchten Tierarten. Eine Verifizierung der Ergebnisse der Datenbankrecherche ist ebenfalls sinnvoll.

2.2.4 Alkaloide

Alkaloide sind meist basische Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die mindestens einen heterocyclisch gebundenen Stickstoff enthalten (bekannteste Ausnahme von dieser Definition: Colchicin). Sie zeichnen sich häufig durch starke pharmakodynamische Wirkungen aus. Die Benzylisochinolin-Alkaloide werden biosynthetisch aus Dopamin und 4-Hydroxyphenylacetaldehyd gebildet, die beide wiederum vom L-Tyrosin abstammen. Durch Cyclisierung entstehen daraus wiederum die Morphinane. Im Opium, dem eingetrockneten Milchsaft der angeschnittenen, unreifen Früchte des Schlafmohns *Papaver somniferum*, finden sich eine große Zahl von Alkaloiden, darunter solche vom Morphinan-Typ (Morphin, Codein, Thebain usw.) und solche vom Benzyltetrahydroisochinolin-Typ (u.a. Papaverin). Morphin ist als starkes Analgetikum von überragender Bedeutung, Codein wird als Antitussivum breit eingesetzt.

Hintergrund der in [A12] und [A13] aufgeführten Arbeiten ist eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von M.H. Zenk am Biozentrum Halle. Umfassende frühere Forschungen hatten zur Aufklärung der Biosynthese von Morphin in Pflanzen geführt. Jedoch konnte inzwischen schlüssig nachgewiesen werden, dass Morphin auch in menschlichen Zellen gebildet werden kann [Poeaknapo et al., 2004]. Um die Studien zur Biosynthese durchführen zu können, bedurfte es leistungsfähiger massenspektrometrischer Methoden. Es erschien daher notwendig, sämtliche Alkaloide, die als Zwischen- oder Seitenprodukte an der Morphinsynthese beteiligt sind, systematisch massenspektrometrisch zu charakterisieren. Wegen ihrer basischen Natur sind sie für die Elektrospray-Ionisation sehr gut geeignet und liefern im Positiv-Modus durchweg $[M+H]^+$ Ionen. Im Gegensatz zum Elektronenstoß-Verfahren, bei dem bereits bei der Ionisation eine intensive, aber sehr reproduzierbare Fragmentierung auftritt, ist Elektrospray eine sanfte Ionisationsmethode, bei der eine Fragmentierung, soweit sie zum Zwecke der Strukturaufklärung erwünscht ist, gezielt durch Kollisionen mit Gasteilchen (CID) erfolgen muss. Die Vielfalt der technischen Lösungen hat die Etablierung von Datenbanken für ESI-MS/MS deutlich erschwert. In [A12] werden anhand der Morphinan-Alkaloide die derzeit wichtigsten Prinzipien der ESI-Tandem-MS verglichen. Eine Quadrupol-Ionenfalle (Paul-Trap) repräsentiert dabei das *tandem-in-time* Prinzip, ein Triple Quadrupol System steht für das *tandem-in-space* Prinzip. Zusätzlich wurden insbesondere für akkurate Massenbestimmungen ein Quadrupol-Flugzeit-Hybrid-MS

sowie ein FT-ICR-MS mit Fragmentierung durch IR-Multiphotonendissoziation (IRMPD) herangezogen.

Die untersuchten Morphinan-Alkaloide konnten anhand ihres Fragmentierungsverhaltens in 4 Gruppen eingeteilt werden: 1) Morphin und Codein, 2) Morphinon, Codeinon und Neopinon, 3) Thebain und Oripavin, 4) Salutaridin und Salutaridinol. Morphin und Codein zeigen sehr ähnliche Spektren mit der typischen Differenz $\Delta m=14$, die auf die zusätzliche Methylgruppe bei letzterem zurückgeht. Die MS/MS-Bedingungen an der Ionenfalle sind allgemein sanfter als beim Triple Quad, so dass tendenziell höhermassige Fragmente auftreten. Das $[M+H-H_2O]^+$ Ion, im Übrigen das einzige noch stickstoffhaltige Fragment (ableitbar aus dem geradzahligen m/z -Wert nach der sog. Stickstoffregel), findet sich nur im Ionenfallenspektrum. Die wichtigsten Fragmente, deren Entstehung aus dem Schema 1 hervorgeht, finden sich sowohl bei der Ionenfalle als auch beim Triple Quad, wenn auch mit sehr unterschiedlicher Intensität. Interessanterweise wird zuerst der Ring D unter Verlust eines Alkylamin-Bausteins aufgespalten. Im weiteren Verlauf werden in unterschiedlicher Reihenfolge Wasser und Kohlenmonoxid abgespalten. Der intensivste Peak (Basispeak) im Triple Quad Spektrum (und auch am Q-TOF und FT-ICR) ist $m/z=165$, ein Ion, das weder Stickstoff noch Sauerstoff enthält (Bestimmung der Elementarzusammensetzung anhand der akkuraten Masse). Dieses wird an der Ionenfalle erst im MS^3 gebildet. Auf Grund physikalischer Restriktionen ist an der Ionenfalle im MS/MS der Massenbereich nach unten begrenzt, so dass kleine Fragmente nicht detektiert werden können. Zwei Amine, die aus Bruchstücken des Piperidinrings D hervorgegangen sind, können dagegen am Triple Quad aufgefunden werden.

Morphinon, Codeinon und Neopinon haben eine Ketogruppe in Position 6, wodurch die Fragmentierung völlig anders verläuft. Thebain und Oripavin besitzen zwei Doppelbindungen in Ring C. Das Fragmentmuster ist wesentlich einfacher als bei den zuvor genannten Alkaloiden. Dominierend ist die Aufspaltung von Ring D, was einerseits in der Abspaltung von Methylamin mit Verbleib der Ladung am Rest resultiert (Ionenfalle), andererseits in der Abspaltung eines Alkylamins, das dann selbst als Basispeak in Erscheinung tritt (Triple Quad). Salutaridin und Salutaridinol unterscheiden sich v.a. dahingehend, dass die 4,5-Epoxybrücke geöffnet ist, außerdem ist eine zusätzliche Sauerstofffunktion in Position 7 vorhanden. Die Spektren sind außerordentlich komplex. Der Verlust von Methylamin fällt zuerst ins Auge. Weitere Mechanismen gehen aus Schema 3 sowie dem Text hervor [A12]. Interessant ist das Auftreten des Ions $m/z=192$, das den Isochinolin-Teil repräsentiert. Dieses kann bei Morphinanen mit 4,5-Epoxyverbrückung nicht entstehen. Salutaridinol-7-O-acetat ist zwar dem Salutaridinol nahe verwandt, jedoch gerät die Fragmentierung durch den primären Verlust von Essigsäure in eine ganz andere Richtung. Das Fragmentmuster erinnert an Thebain.

Die Untersuchungen zeigten das Potential von ESI-MS/MS zur Strukturanalyse solcher Alkaloide. Sowohl die Ergebnisse an der Ionenfalle als auch am Triple Quad erbrachten Informationen über die Substitution am Morphinangerüst und die Position der Doppelbindung(en) im Ring C. Letzteres beeinflusst das Fragmentierungsverhalten stark. Wenngleich es offensichtliche Unterschiede im Fragmentierungsverhalten bei den unterschiedlichen Systemen gab, wurden doch die wichtigsten Fragmente bei beiden

Prinzipien gefunden. Vergleichende Untersuchungen wie diese, bei der immerhin vier verschiedene Geräte zum Einsatz kamen, sind wertvoll zum Aufbau entsprechender Datenbanken.

In [A13] werden Benzylisochinolin-Alkaloide, die als Zwischenstufen an der Morphin-Biosynthese beteiligt sind, mittels Elektrospray-Tandem-MS untersucht. Diese umfassten Norlaudanosolin, Laudanosolin, 4'-O-Methyl-norlaudanosolin, 6-O-Methyl-norlaudanosolin, N-Methyl-3'-hydroxycocclaurin, N-Methyl-3'-O-methyl-norlaudanosolin, Norreticulin, Reticulin, Norcocclaurin, Cocclaurin und N-Methylcocclaurin. Wiederum werden Daten von einem Ionenfallen-System (*tandem-in-time*) mit solchen von einem Triple-Quad MS (*tandem-in-space*) verglichen. Verglichen mit den Morphinanen zeigen diese Substanzen ein relativ einfaches Fragmentierungsmuster. Im Wesentlichen treten 5 Schlüsselfragmente auf. Erster Schritt ist die Abspaltung des Stickstoffs in Form von Ammoniak oder Methylamin, wodurch ein Diphenylethylenderivat (Typ a) zurückbleibt. Eine Art McLafferty-Umlagerung führt wiederum zu Ionen vom Typ b, die den Isochinolin-Molekülteil repräsentieren. Ionen vom Typ e, die den Benzylrest darstellen, werden v.a. sekundär aus a gebildet, wie sich durch MS³-Untersuchungen an der Ionenfalle zeigen lässt. Das Isochinolinium-Ion b zeigt sowohl an der Ionenfalle als auch am Triple Quad die höchste Intensität (Basispeak). Eine Ausnahme von dieser Regel sind jene Alkaloide, die in 3'-Position keine Sauerstofffunktion besitzen, also Norcocclaurin, Cocclaurin und N-Methylcocclaurin. In diesen Fällen wurde das den Benzylteil darstellende Ion zum Hauptfragment. Durch Umlagerung können aus dem Fragment vom Typ a auch Naphthalinderivate vom Typ c und d entstehen. Insbesondere d ist geradezu ein Marker für diese Klasse von Alkaloiden, der in allen Spektren gefunden wurde (Elementarzusammensetzung durch FT-ICR-MS mit akkurater Massenbestimmung bestätigt). Typ c ist in Ionenfallen-Tandem-Spektren wenn überhaupt nur sehr schwach zu erkennen (jedoch durch MS³ über a zugänglich), hingegen ausgeprägter am Triple Quad. Die postulierten Fragmentierungsmechanismen werden gestützt durch Untersuchungen mit isotopenmarkiertem Reticulin, in dem 3 ¹²C durch ¹³C ersetzt waren, und zwar in den Positionen 1 und 3 des Tetrahydroisochinolinrings sowie in der N-Methylgruppe.

Die Photoionisation unter Atmosphärendruck (APPI) gewinnt in letzter Zeit als Alternative zu ESI und insbesondere zu APCI verstärkt an Bedeutung. Erste kommerzielle Lösungen sind erhältlich, wobei zwei grundsätzliche Prinzipien, nämlich mit bzw. ohne den Einsatz eines sog. Dopants als Ladungsüberträger, eingesetzt werden. In [A13] wurde Toluol als Dopant eingesetzt. Die methodischen Forschungen sind längst nicht abgeschlossen; die Zahl der Anwendungen ist noch relativ gering, so dass die Breite des Einsatzgebiets derzeit schwer zu beurteilen ist. APPI-Spektren, die mit LC/MS an einem Single Quad aufgenommen wurden, zeigen meist hauptsächlich [M+H]⁺ Ionen. In einigen Fällen treten jedoch auch [M-H]⁺ Ionen auf. Eine solche Deprotonierung tritt bei ESI grundsätzlich nicht auf. Die Schlüsselionen vom Typ a, b und e entstehen bei APPI auch durch Quellenfragmentierung. Negativ-APPI erbrachte neben [M-H]⁻ Ionen auch ungewöhnliche [b-2H]⁻ Ionen.

Die Arbeit zeigt, dass die Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie sehr wertvolle Informationen zur Strukturidentifizierung von Benzylisochinolin liefert. Die Prinzipien sind im Wesentlichen übertragbar auf andere, hier nicht untersuchte Substanzen dieser Klasse wie

z.B. Papaverin. Methodisch ist wiederum der Vergleich von Ionenfalle und Triple Quad interessant. Der intensiveren Fragmentierung am Triple Quad steht die Möglichkeit des MSⁿ an der Ionenfalle gegenüber, wodurch schrittweise Abspaltungen nachvollzogen werden können. Methodisch interessant ist auch die Anwendung der noch nicht sehr verbreiteten APPI. An der Fragmentbildung während der Ionisation zeigt sich die „härtere“ (energiereichere) Natur dieses Verfahrens, wobei die gebildeten Fragmente i.d.R. dieselben sind, die auch bei ESI-MS/MS auftreten. Die Mechanismen der Ionisation bei APPI mit bzw. ohne Dopant sind im Detail noch nicht bekannt, so dass z.T. überraschende Ionen auftreten (wie z.B. [M-H]⁺).

2.3 Arzneistoffe

Die Analytik von Arzneistoffen mit Hilfe massenspektrometrischer Techniken ist seit Jahren in der Arbeitsgruppe fest etabliert. Bereits während der Promotion wurden Arbeiten auf diesem Gebiet durchgeführt und publiziert (siehe Gesamtpublikationsliste).

In der Arbeit [A14] wurde der antioxidative Effekt von topisch appliziertem Bufexamac untersucht. ESI-MS/MS im Positiv- und Negativmodus wurde eingesetzt, um die Substanz selbst und ihre Abbauprodukte strukturell zu charakterisieren. In Fragmentierungsschemata konnten für die detektierten Fragmente Strukturen vorgeschlagen werden. Interessanterweise traten bei der Degradation unter Bestrahlung ähnliche Zerfallsprodukte auf wie bei der CID-Fragmentierung. Phenolische Degradationsprodukte sind möglicherweise verantwortlich für die ekzemauslösende Wirkung von Bufexamac.

Unter 2.2 wurden bereits Stoffe behandelt, die sich auch unter 2.3 einordnen ließen. Der diskutierte Einsatz von Hyaluronsäure als Arzneistoff sei hier angeführt. Auch unter den Alkaloiden, die in [A12] und [A13] behandelt werden, sind solche, die als Arzneistoffe eingesetzt wurden und werden, v.a. natürlich Morphin und Codein.

Generell lässt sich unter analytischen Gesichtspunkten feststellen, dass es angesichts der strukturellen Vielfalt keine allgemeingültigen Grundsätze für Arzneistoffe gibt. Klassische Arzneistoffe, die im typischen Falle definierte Substanzen mit relativ kleiner Molmasse (ca. 150-1500 u) darstellen, sind meist hinsichtlich Identität, Reinheit und Gehalt massenspektrometrisch gut zu untersuchen. Oft handelt es sich um polare Substanzen, wobei basische Stoffe gegenüber sauren in der Überzahl sind. Erstere lassen sich mit ESI und APCI im Positivmodus, letztere im Negativmodus gut ionisieren. Eine Strukturidentifizierung ist i.d.R. mit Hilfe von Tandem-Massenspektren, bei akkurater Masse häufig auch nur anhand dessen möglich. Eine Strukturaufklärung der Arzneistoffe ist nicht notwendig, jedoch kann dies bei Verunreinigungen, Abbauprodukten und Metaboliten der Fall sein. Dann sind NMR- und IR-Spektroskopie selbstverständlich hinzuzuziehen. Die Isomerentrennung optisch aktiver Arzneistoffe erfordert den Einsatz chiraler Trennmethode (HPLC, CE), die dann wiederum an die MS gekoppelt werden können.

Ein besonders wichtiges Anwendungsgebiet stellt die Quantifizierung dar. Hier liegt ein Idealfall vor: eine ganz bestimmtes m/z -Verhältnis, das meist schon theoretisch ableitbar bzw. durch einfache Aufnahme eines Spektrums zu ermitteln ist, wird spezifisch und quantitativ

erfasst, alle anderen Begleitstoffe werden praktisch ausgeblendet. Für ein solches Selected Ion Monitoring (SIM) werden insbesondere in der pharmazeutischen Industrie Quadrupolsysteme vorteilhaft eingesetzt. Das Signal/Rausch-Verhältnis und damit die Empfindlichkeit lässt sich im LC/MS/MS noch weiter verbessern (Selected Reaction Monitoring, SRM, Triple Quad Systeme). Massenspektrometrisch ist dies relativ anspruchslos, das MS dient gewissermaßen lediglich als massenselektiver Detektor eines chromatographischen Systems. Veröffentlichungen, die die erstmalige LC/MS-Analyse eines bestimmten Arzneistoffs beschreiben, waren in den 90er Jahren üblich, werden jedoch in neuerer Zeit, zumindest in hochrangigen Journalen, immer seltener. Die erzielbaren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind abhängig von der Probenvorbereitung, der HPLC-Trennung und nicht zuletzt den Leistungsparametern des verwendeten Massenspektrometers. Letztere kann der Anwender relativ wenig beeinflussen. Mit modernen Geräten sind ohne weiteres Nachweisgrenzen im ng/ml-Bereich zu erzielen (Anm.: insbesondere bei Substanzen mit großer Molmasse wird bevorzugt nmol/l, fmol/l usw. angegeben, was die Werte günstiger erscheinen lässt.). Die großen Herausforderungen liegen eher im Bereich der Validierung, was sich als Gegenstand der universitären Grundlagenforschung aber aus verschiedenen Gründen nur bedingt eignet.

Hingewiesen sei auch nochmals auf die in der Einleitung diskutierte steigende Bedeutung der sog. Biopharmaceuticals unter den Arzneistoffen der Zukunft. Hierfür lassen sich die in 2.2.3 aufgeführten Arbeiten, insbesondere die in [A11] beschriebenen Methoden, vorteilhaft einsetzen.

2.4 Hilfsstoffe

Die molekulare Charakterisierung pharmazeutischer Hilfsstoffe ist ein bislang relativ vernachlässigtes Gebiet der galenischen Forschung. Dabei hat sich die Erkenntnis, dass Hilfsstoffe die Qualität pharmazeutischer Formulierungen ganz entscheidend beeinflussen, längst durchgesetzt. Die Einführung neuer Hilfsstoffe wird durch strengste Zulassungsanforderungen außerordentlich erschwert. Nur in den seltensten Fällen werden die Kosten u.a. für Toxizitätsprüfungen und klinische Studien ökonomisch zu rechtfertigen sein. Jedoch auch das Portfolio der bereits eingeführten Hilfsstoffe ist längst nicht umfassend charakterisiert. So kann es zu unliebsamen Überraschungen kommen, wenn der Zulieferer für ein Produkt gewechselt wird oder die Chargen nicht konstant ausfallen. Um das zeit- und kostenintensive Prinzip des „Trial and Error“ zu reduzieren, müssen daher die Hilfsstoffe mit Hilfe moderner analytischer Methoden auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

Der Einsatz der Massenspektrometrie ist besonders Erfolg versprechend für Polymere, soweit sie einer Ionisation zugänglich sind, sowie Stoffe mit polymeren Seitenketten. Hier liegen Substanzgemische vor, die mit herkömmlichen Methoden oft nur grob charakterisiert werden können. Einige Methoden (z.B. Lichtstreuung, GPC, Viskositätsmessungen) bilden die mittlere Molmasse und/oder Molekulargewichtsverteilung zwar indirekt ab, jedoch ist die MS der einzige direkte Zugang.

In der Arbeit [A15] wurden einige kommerziell erhältliche Polyvinylpyrrolidon-Produkte (PVP, Povidon) näher untersucht. Solche linearen Polyvinylpyrrolidone werden als Hilfsstoffe in peroralen Darreichungsformen wie Tabletten je nach Produkteigenschaften als Bindemittel, Sprengmittel, Füllmittel oder als Bestandteil von Coatings eingesetzt. Auch in flüssigen Zubereitungen werden sie zur Suspendierung, Stabilisierung, zur Viskositätssteigerung oder als Arzneistoffträger verwendet. Meist werden die Produkte anhand des K-Wertes charakterisiert, der auf Grund von Viskositätsmessungen berechnet wird.

^{13}C -NMR-Messungen wurden durchgeführt zur Untersuchung der Endgruppen, wobei nach Kohlenstoffatomen am endständigen Sauerstoff gesucht wurde. Sie ergaben für Kollidon 12PF und Kollidon 17PF einen tieffeldverschobenen Singulett-Peak, der ein ternäres C anzeigt. Dagegen war bei Plasdon C15 ein Triplett zu sehen, das auf einen primären Kohlenstoff am Sauerstoff hinweist. MALDI-TOF MS erwies sich als gut geeignet um die Molekularmassenverteilung zu untersuchen. Alle Ionen waren einfach geladen. Ein typisches Muster mit Peaks einer Hauptserie im Abstand $\Delta m = 111$ u (entsprechend einer Monomereinheit) wurde erhalten. Bei den Kollidon-Proben war der Hauptpeak jeweils von einem wesentlich kleineren Nebenpeak begleitet, der im Abstand $\Delta m = 58$ u folgte. Die Spektren von Plasdon ergaben ein völlig anderes Bild. Innerhalb der 111 u waren jeweils 5 Peaks im Abstand von $\Delta m = 14$ u zu sehen. Dies weist auf zusätzliche Methylengruppen hin. ESI-Massenspektren von Kollidon zeigen ebenfalls die klassischen Abstände von 111 u. Im Positivmodus wurden hauptsächlich $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Addukte gefunden, selbst wenn durch Säurezusatz versucht wurde, diese zurückzudrängen. Interessanterweise wurden nur einfach geladene Spezies gefunden, was bei ESI recht ungewöhnlich ist. Man kann daher annehmen, dass die Ladung nur an der Endgruppe lokalisiert ist und nicht an den Pyrrolidonringen, was auch die mit zunehmender Kettenlänge deutlich verschlechterte Ionisation erklärt. Plasdon ionisiert noch schlechter, was wiederum auf eine unterschiedliche Endgruppe hinweist. MS/MS ergibt die Abspaltung von Wasser sowie eines Pyrrolidonringes ($\Delta m = 85$ u). In MS^3 wurde wieder ein Molekül Wasser und ein Pyrrolidonring abgespalten sowie eine Allen-Abgangsgruppe ($\Delta m = 40$ u). Zur weiteren Untersuchung von Unterschieden zwischen Kollidon- und Plasdon-Produkten wurden Iod-Bindungsversuche durchgeführt, die trotz gleichem K-Wert deutlich verschieden ausfielen.

Es zeigte sich, dass sich Produkte verschiedener Hersteller trotz Erfüllung von Arzneibuchanforderungen unterscheiden können. Die Kollidon- und die Plasdon-Produkte wurden offensichtlich in unterschiedlichen Lösungsmitteln synthetisiert. Die Synthese in Isopropanol (Kollidon) ergab Hydroxyisopropyl-Endgruppen. Die Synthese in Wasser ergab Wasserstoff bzw. Hydroxygruppen als Endgruppen. Diese Hypothese wurde mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Ergebnisse untermauert. Die Interpretation der Molekularmassenverteilung anhand der MALDI-TOF-Ergebnisse sollte mit Vorsicht erfolgen. MALDI-TOF basiert auf dem Zahlenmittel anstelle dem Gewichtsmittel, was den Durchschnitt zu kleineren Massen verschiebt. Auch Diskriminierungseffekte spielen eine Rolle. Andererseits können auch Viskositätsmessungen oder Lichtstreuungsmessungen durch zahlenmäßig wenige, sehr große Moleküle bestimmt werden, was ebenfalls kein repräsentatives Bild ergibt. ESI ist für die Molekulargewichtsbestimmung ungeeignet, da größere Massen nicht mehr ionisierbar sind. ESI-MS/MS könnte jedoch anhand typischer Fragmente zur schnellen Identitätsprüfung

eingesetzt werden. Die Iod-Bindungsversuche zeigen, dass sich molekulare Unterschiede auch in den Eigenschaften widerspiegeln können, was die pharmazeutische Relevanz solcher Untersuchungen unterstreicht. Es zeigt sich, dass Produkte verschiedener Hersteller nicht ohne weiteres austauschbar sind.

In der Arbeit [A16] wurden polyethoxylierte Tenside massenspektrometrisch untersucht. Verbindungen mit Polyethylenglykol-Seitenketten sind ein gutes Beispiel für Hilfsstoffe, die als häufig komplexe Gemische vorliegen, jedoch oft nur ungenügend charakterisiert sind. Zwar sind für die Gebrauchseigenschaften der HLB-Wert, die Viskosität und mittlere Molmasse von größter Bedeutung, jedoch können auch bei Erfüllung diesbezüglicher Kriterien Probleme beim Austausch von Produkten, der Erstellung und Veränderung von Rezepturen auftreten. Eine Charakterisierung auf molekularer Ebene ist daher wünschenswert. Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist besonders geeignet, Molekularmassenverteilungen zu untersuchen. Anstelle der Pseudomolekülonen $[M+H]^+$ wurden Addukte von Natrium $[M+Na]^+$ und Kalium $[M+K]^+$ gefunden. Da durchweg einfach geladene Ionen vorliegen, stellen die beobachteten m/z -Werte jeweils die Summe aus der Masse der Endgruppe, der Masse der PEG-Einheiten ($n \times 44$ u) und der Masse des Alkali-Ions dar, welches das Addukt bildet.

Aus der Familie der PEG-Fettalkoholether wurden verschiedene Brij[®]-Produkte untersucht. Brij 35 ist beispielsweise als PEG(20)-laurylether deklariert, jedoch zeigen die Untersuchungen, dass nicht nur eine breite Verteilung der PEG-Kettenlängen vorliegt, sondern auch ein homologer Fettalkohol vorkommt. Dies gilt auch für andere Vertreter.

Aus der Familie der PEG-Fettsäureester wurden verschiedene Myrj[®] und Cremophor[®] Produkte untersucht. Auch hier zeigen die Spektren verschiedene, sich überlagernde glockenförmige Verteilungen mit breiter Variabilität der Kettenlänge und teilweisem Vorkommen mehrerer Fettsäuren.

Die Polysorbate (Tween[®]) sind von großer wirtschaftlicher Bedeutung, daher wunderte es nicht, dass zu Tween 20, 40, 60 und 80 schon eine Untersuchung vorlag. Die dort gefundene, vom Lehrbuchwissen abweichende strukturelle Vielfalt aus Sorbitan-polyethoxylaten, Isosorbid-polyethoxylaten, Polyethylenglykol, Polysorbat-mono-, di- und triestern konnte bestätigt werden. Für Tween 61 und 85 wurden erstmals Daten veröffentlicht, die sich von den zuvor genannten Spezies deutlich unterscheiden. Die starke Intensität der Polysorbat-fettsäureester im Spektrum von Tween 61 zeigt auch, dass diese Spezies durchaus ionisierbar sind, d.h. schwache Intensitäten in anderen Spektren können nicht mit unzulänglicher Ionisierung begründet werden.

Verschiedene ethoxylierte Glyceride aus der Produktfamilie Tagat[®] sowie der polyethoxylierte Alkylphenylether Triton[®] X-100 wurden ebenfalls untersucht.

Die genannten Substanzen wurden auch erstmals mit Nano-ESI-Massenspektrometrie an einem Quadrupol-Flugzeit-Hybridmassenspektrometer untersucht. Nano-ESI hat gegenüber dem konventionellen Elektrospray den Vorteil einer effizienteren Ionisation und sehr stark reduzierter Signalunterdrückungseffekte. Insbesondere bei größeren Molekülmassen liegen im Gegensatz zu MALDI oft mehrfach geladene Ionen vor. Die hohe Auflösung am Q-TOF erlaubte die Erkennung der Isotopencluster. Da das Vorliegen von Mehrfachladungen die

Interpretation der Spektren erschwert, was als Nachteil gegenüber MALDI angesehen wird, wurde erstmals für diese Stoffklasse der aus der Peptidanalytik bekannte Algorithmus MaxEnt[®] 3 eingesetzt, um monoisotopische, einfach geladene Signalpeaks zu erzeugen. Ähnlich wie in der Peptidanalytik, liefern MALDI-MS und Nano-ESI-MS komplementäre Informationen. Die Daten zeigen, dass Tensidprodukte oft wesentlich komplexer zusammengesetzt sind als es die Deklaration vermuten ließe. Von einem unkritischen Austausch ist abzuraten. Die Erhebung exakter quantitativer Daten ist schwierig, da Standards fehlen. In Einzelfällen, wenn ein solcher Aufwand gerechtfertigt ist, sollte dazu eine chromatographische bzw. elektrophoretische Vortrennung erfolgen. In den meisten Fällen dürfte es ausreichend sein, mit Hilfe von MALDI-TOF und/oder Nano-ESI-MS semiquantitative Fingerprint-Spektren aufzunehmen und auszuwerten. Wenn solche Techniken im Forschungs- oder Qualitätskontrolllabor etabliert sind, können die Entwicklung oder Veränderung von Rezepturen wissenschaftsbasiert optimiert werden und unliebsame Überraschungen vermieden werden.

Viele polymere Hilfsstoffe, wie z.B. Cellulosederivate, sind der massenspektrometrischen Analyse wegen schlechter Löslichkeit und/oder schlechter Ionisierbarkeit zunächst nicht zugänglich. In solchen Fällen kann eine enzymatische Hydrolyse zu Oligomeren oder Monomeren Abhilfe schaffen und Aussagen über das Substitutionsmuster ermöglichen. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

2.5 Literaturverzeichnis zur Zusammenfassung

Cooks, R.G., Takats, Z., Gologan, B., Wiseman, J., Talaty, N., Chen, H., Cotte, I. (2005) Desorption Electrospray Ionization (DESI): A New Method of Ionization. Vortrag bei der 53. ASMS Conference, San Antonio, TX, USA.

Elias, P.M. (2004) The epidermal barrier: from the early days at Harvard to emerging concepts. *J. Invest. Dermatol.* 122, 909-922.

Farwanah, H. (2005) Untersuchung der Ceramidprofile in gesunden sowie in nicht involvierten Hautarealen bei Neurodermitis und Psoriasis mittels AMD-HPTLC und HPLC/APCI-MS. Promotionsarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Gross, J.H. (2004) Mass Spectrometry – A Textbook. Springer-Verlag Berlin.

Heinemann, C., Paschold, C., Fluhr, J., Wigger-Alberti, W., Schliemann-Willers, S., Farwanah, H., Raith, K., Neubert, R. und Elsner, P. (2005) Induction of a Hardening Phenomenon by Repeated Application of SLS: Analysis of Lipid Changes in the Stratum Corneum. *Acta Derm Venereol* 85, 1–6.

Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Cooks, R.G. (2005) The Orbitrap: A New mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40, 430-443.

Kühn, A.V. (2004) Analysenmethoden zur Charakterisierung komplexer Kohlenhydrate: Hyaluronsäurefragmente und Alkylpolyglykoside. Promotionsarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Kühn, A.V., Ozegowski, J.H., Peschel, G. und Neubert, R.H.H. (2004) Complementary exploration of the action pattern of hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* using capillary electrophoresis, gel-permeation chromatography and viscosimetric measurements. *Carbohydr. Res.* 339, 2541-2547.

Lagarde, M., Geloën, A., Record, M., Vance, D. und Spener, F. (2003) Lipidomics is emerging. *Biochim. Biophys. Acta* 1634, 61.

Lebwohl, M. (2003) Psoriasis. *Lancet* 361, 1197-1204.

Leung, D.Y. und Bieber, T. (2003) Atopic Dermatitis. *Lancet* 351, 151-160.

Mao-Qiang, M., Feingold, K.R. Thornfeldt, C.R. und Elias, P.M. (1996) Optimization of Physiological Lipid Mixtures for Barrier Repair. *J. Invest. Dermatol.* 106, 1096-1101.

Mc Intyre, D. und Miller, C.A. (2005) Accurate Mass Measurement of Pharmaceutical Products Coupling Capillary Electrophoresis to an API-TOF using Atmospheric Pressure Photoionization. Vortrag bei der 53. ASMS Conference, San Antonio, TX, USA.

- Neubert, R., Raith, K. und Schiewe, J. (1997) Capillary Zone Electrophoresis in Skin Fatty Acid Analysis. *Pharmazie* 52, 212-215.
- Neubert, R., Raith, K., Raudenkolb, S. und Wartewig, S. (1998) Thermal Degradation of Ceramides as studied by Mass Spectrometry and Vibrational Spectroscopy. *Anal. Commun.* 35, 161-164.
- Poeaknapo, C., Schmidt, J., Brandsch, M., Dräger, B. und Zenk, M.H. (2004) Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14091-14096.
- Raith, K. und Neubert, R. (1998) Structural Studies on Ceramides by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 935-938.
- Raith K. und Neubert R. (2000) Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Ceramides. *Anal. Chim. Acta* 403, 295-303.
- Raith, K., Zellmer, S., Lasch, J. und Neubert, R. (2000a) Profiling of Human Stratum Corneum Ceramides by Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 418, 167-173.
- Raith, K., Darius, J. und Neubert, R. (2000b) Ceramide Analysis utilizing Gas Chromatography / Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 876, 229-233.
- Raith, K. (2003) Hyphenation of ACE with Mass Spectrometry. In: R. Neubert, H.H. Rüttinger (Hrsg.): Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceuticals and Biopharmaceutics. Marcel Dekker, New York, S. 329-349.
- Raith, K., Farwanah, H. und Neubert, R. (2004) Lipidomics of Human Stratum Corneum Ceramides: Online LC/APCI-MS versus Offline HPTLC/ESI-MS/MS. Proceedings of the 52nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN.
- Rudikoff, D. und Lebowitz, M. (1998) Atopic Dermatitis. *Lancet* 351, 1715-1721.
- Takats, Z., Wiseman, J.M., Gologan, B., Cooks, R.G. (2004) Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306, 471-473.
- Vavrova, K., Zbytovska, J., Palat, K., Holas, T., Klimentova, J., Hrabalek, A. und Dolezal, P. (2004) Ceramide analogue 14S24 ((S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionic acid tetradecyl ester) is effective in skin barrier repair in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 581-587.
- Willoughby, R., Sheehan, E., Mitrovich, S. (2002) A Global View of LC/MS. Global View Publishing, Pittsburgh, PA, 2. Aufl.

3 Curriculum Vitae

09.03.1971 geboren in Sömmerda (Thüringen)

Persönliches: Eltern: Dr. Ludwig Raith, geb. 29.08.1943, Hautarzt, und
Dr. Sigrid Raith, geb. Thiem, 12.04.1945, Internistin
verheiratet seit 16.08.1997 mit Silke Raith, geb. Adomeit, 16.07.1970, Apothekerin
2 Kinder (Charlotte, geb. 13.03.2000 und Victoria, geb. 29.06.2002)

1977-1989 Grundschule/Gymnasium in Sömmerda, Abitur 1989

09/1989-
08/1990 Wehrdienst / Zivildienst

1990-1994 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/1994-
03/1995 Anfertigung einer Diplomarbeit am Institut für Pharmazeutische Technologie und
Biopharmazie zum Thema „Trennung von Fettsäuren des Stratum Corneum durch
Kapillarzonenelektrophorese“

04/1995-
09/1995 Pharmaziepraktikum in der Neuen Apotheke Sömmerda

12.10.1995 Abschluß Staatsexamen, Gesamtnote "sehr gut"

30.10.1995 Approbation als Apotheker

10/1995-
04/1999 Promotion am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie bei
Prof. Dr. R. Neubert, davon 10/1995-03/1998 als Stipendiat der Landesgraduierten-
förderung des Landes Sachsen-Anhalt, danach Wiss. Mitarb. der MLU

05.05.1999 Verteidigung der Arbeit „Beiträge zur Anwendung der Massenspektrometrie in der
Lipidanalytik“ mit der Note „Summa cum laude“, Promotion zum Dr. rer.nat.

seit
01.01.2000 Wissenschaftlicher Assistent (C1) am Institut für Pharmazeutische Technologie
und Biopharmazie

03/2003-
08/2003 Forschungsaufenthalt in Gainesville, FL (USA) an der University of Florida,
School of Pharmacy, bei Prof. G. Hochhaus und Prof. H. Derendorf
(Reisestipendium für Habilitanden der Dr. August-und-Dr. Anni-Lesmüller-
Stiftung)

4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Textstellen, die wortwörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), August 2005

Dr. Klaus Raith

5 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h.c. Reinhard H. H. Neubert, der mich auf meinem Weg vom Diplom über die Promotion bis hin zur Habilitation stets nach Kräften unterstützt hat. Ohne sein Engagement wären die gute Ausstattung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen nicht möglich gewesen, die die Voraussetzung für die vorliegende Arbeit bildeten. Offenheit, ständige Diskussionsbereitschaft, aber auch Freiheit zur Entfaltung und die Möglichkeit, vielfältige Erfahrungen in Forschung, Lehre und Organisation zu sammeln, verdanke ich ihm.

Ich danke allen Doktoranden und Diplomanden, die mit ihrem Einsatz und Forscherdrang zur vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Namentlich gilt dies für Dr. Hany Farwanah, der mit seiner Kreativität und seinem Fleiß die Lipidanalytik sehr vorangebracht hat, für Dr. Andrea Kühn mit ihren Beiträgen zur Analytik von Hyaluronsäure und Polyvinylpyrrolidon, für Christian Schmelzer, der innerhalb kürzester Zeit zum Experten für MALDI-TOF und Nanoelektrospray-MS wurde und die Arbeitsgruppe mit seinem Wissen zur Technik und Informatik bereichert hat, für Melkamu Getie, Dr. Hagen Trommer und Christian Brenner.

Herzlich danke ich meiner Laborantin Manuela Woigk für ihre hervorragende Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk bin ich dankbar ich für die sehr gute Kooperation, aber auch für wertvolle Ratschläge und Unterstützung auf meinem Weg. Meinen Kollegen Dr. Jürgen Schmidt und Dr. Raik Wolf danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, wertvolle Diskussionen und ständige Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biopharmazie und all jenen, mit denen ich in Forschung und Lehre zusammenarbeiten durfte, danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Nicht vergessen möchte ich, die Geldgeber zu erwähnen, die in Form von Projekten meine Forschung finanziell unterstützt haben, insbesondere die DFG, das BMBF und das Kultusministerium von Sachsen-Anhalt.

Zum Abschluss gilt mein Dank meiner Familie, die mich stets unterstützt und an mich geglaubt hat.

6 Publikationsliste

6.1 Fachzeitschriften mit Gutachtersystem

1. R. Neubert, K. Raith und J. Schiewe : Capillary Zone Electrophoresis in Skin Fatty Acid Analysis. *Pharmazie* 52 (3/1997) 212-215.
2. R. Wolf, K. Raith und R. Neubert : Separation and quantitation of glycolipids as penetration modifiers in human skin using HPLC-MS with electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* 766 (1997), 71-75.
3. M.A. Schwarz, K. Raith, H.-H. Rüttinger, G. Dongowski und R. Neubert : Investigation of the interactions between drugs and mixed bile salt/ lecithin micelles. A characterization by micellar affinity capillary electrophoresis (MACE), Part III. *J. Chromatogr. A* 781 (1997), 377-389.
4. R. Wolf, C. Huschka, K. Raith, W. Wohlrab und R. Neubert: Rapid Quantification of Biotin in human skin extracts after dermal application using HPLC-ESI-MS. *Anal. Commun.* 11 (1997), 335-337.
5. K. Raith, R. Wolf, J. Wagner und R. Neubert : Separation of phospholipids by nonaqueous capillary electrophoresis with electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 802 (1998), 185-188.
6. M. A.Schwarz, K. Raith, G. Dongowski und R. Neubert: Effect on the partition equilibrium of various drugs by the formation of mixed bile salt/phosphatidylcholine/fatty acid micelles. A characterization by micellar affinity capillary electrophoresis (MACE); Part IV. *J. Chromatogr. A* 809 (1998), 219-229.
7. K. Raith und R. Neubert: Structural Studies on Ceramides by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (14/1998), 935-938.
8. R. Neubert, K. Raith, S. Raudenkolb und S. Wartewig: Thermal Degradation of Ceramides as studied by Mass Spectrometry and Vibrational Spectroscopy. *Anal. Commun.* 35 (1998), 161-164.
9. M.A. Schwarz, K. Raith und R. Neubert: Characterization of Micelles by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis* 19 (1998), 2145-2150.
10. K. Raith, E. Althoff, J. Banse, H. Neidhardt und R. Neubert: Two examples for rapid and simple drug analysis in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis: naphazoline, dexamethasone and benzalkonium in nose drops and nystatin in an oily suspension. *Electrophoresis* 19 (1998), 2907-2911.
11. R. Wolf, C. Huschka, K. Raith, W. Wohlrab und R. Neubert: Rapid Quantification of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Human Skin Extracts after Dermal Administration using HPLC-ESI-MS. *J. Liq. Chromatogr.* 22 (1999), 531-539.

12. R. Neubert, M.A. Schwarz, Y. Mrestani, M. Plätzer und K. Raith: Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceutics. *Pharm. Res.* 16 (1999), 1663-1673.
13. J. Jacob, G. Brezesinski, K. Raith, R. Wolf, B. Dobner und P. Nuhn: Synthese optisch reiner (R)- und (S)-1-Alkyl-2-acyl-glycerophosphocholine. *Pharmazie* 54 (1999) 545-546.
14. K. Raith und R. Neubert: Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Ceramides. *Anal. Chim. Acta* 403 (2000) 295-303.
15. K. Raith, S. Zellmer, J. Lasch und R. Neubert: Profiling of Human Stratum Corneum Ceramides by Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 418 (2) (2000) 167-173.
16. K. Raith, J. Darius und R. Neubert: Ceramide Analysis utilizing Gas Chromatography / Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 876 (1-2) (2000), 229-233.
17. M. Oven, K. Raith, R. Neubert, T.M. Kutchan und M.H. Zenk: Homo-Phytochelatin Are Synthesized in response to cadmium in Azuki Beans. *Plant Physiol.* 126 (2001), 1275-1280.
18. K. Raith, A.V. Kühn, F. Rosche, R. Wolf und R.H.H. Neubert: Characterization of Povidone Products by means of ¹³C-NMR, MALDI and Electrospray Mass Spectrometry. *Pharm. Res.* 19 (2002), 556-560.
19. P. Fuchs, C. Tschierske, K. Raith, K. Das und S. Diele: A Thermotropic Mesophase Comprised of Closed Micellar Aggregates of the normal Type. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002), 628-631.
20. H. Farwanah, R. Neubert, S. Zellmer und K. Raith: An Improved Procedure for the Separation of Major Stratum Corneum Lipids by means of Automated Multiple Development Thin-layer Chromatography. *J. Chromatogr. B* 780 (2002), 443-450.
21. A.V. Kühn, K. Raith, V. Sauerland und R.H.H. Neubert: Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC/ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003), 1531-1537.
22. A.V. Kühn, H.H. Rüttinger, R.H.H. Neubert und K. Raith: Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis / electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003), 1-7.
23. H. Farwanah, P. Nuhn, R. Neubert und K. Raith: Normal Phase LC Separation of Stratum Corneum Ceramides with Detection by Evaporative Light Scattering and APCI Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) , 233-239.
24. K. Raith, R. Neubert, C. Poeknapo, C. Boettcher, M.H. Zenk und J. Schmidt: Electrospray Tandem Mass Spectrometric Investigation of Morphinans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003), 1262-1269.
25. H. Trommer, M. Plätzer, K. Raith, H.-P. Podhaisky, W. Wohlrab und R. Neubert: Examinations of the Antioxidative Properties of the Topically Administered Drug Bufexamac Reveal New Insights into its Mechanism of Action. *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (10/2003), 1379-1388.

26. M. Getie, K. Raith und R. Neubert: LC/ESI-MS analysis of two elastin cross-links, desmosine and isodesmosine, and their radiation-induced degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* 1624 (1-3)(2003), 81-87.
27. K. Raith und G. Hochhaus: Drugs used in the treatment of opioid tolerance and physical dependence. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 42 (4/2004), 191-203.
28. C. Schmelzer, R. Schöps, R. Ulbrich-Hofmann, R.H.H. Neubert und K. Raith: Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *J. Chromatogr. A*, 1055 (2004), 87-92.
29. K. Raith, H. Farwanah, S. Wartewig und R.H.H. Neubert: Progress in the analysis of Stratum corneum ceramides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004), 561-571.
30. K. Raith, C. Brenner, H. Farwanah, G. Müller, K. Eder und Reinhard H.H. Neubert: A new LC/APCI-MS method for the analysis of cholesterol oxidation products in food. *J. Chromatogr. A*, 1067 (2005), 207-211.
31. H. Farwanah, K. Raith, R. Neubert und J. Wohlrab: Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch. Dermatol. Res.*, 296 (2005), 514-521.
32. C. Heinemann, C. Paschold, J. Fluhr, W.-Wigger-Alberti, S. Schliemann-Willers, H. Farwanah, K. Raith, R. Neubert und P. Elsner: Induction of a Hardening Phenomenon by Repeated Application of SLS: Analysis of Lipid Changes in the Stratum Corneum. *Acta Dermatol. Venereol.*, im Druck.
33. H. Farwanah, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert und K. Raith: Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, im Druck.
33. J. Schmidt, K. Raith, C. Boettcher und M.H. Zenk: Analysis of benzyloquinolines-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. *Eur. J. Mass Spectrom.*, im Druck.
34. K. Raith, B. Brugos und G. Hochhaus: A modified dynorphin for the treatment of morphine tolerance in rats: comparison of intravenous vs. pulmonary administration of a liposome formulation. *J. Pharm. Pharmacol.*, eingereicht.
35. K. Raith, C. Schmelzer und R. Neubert: Towards a molecular characterization of pharmaceutical excipients: mass spectrometric investigation of ethoxylated surfactants. *Anal. Chim. Acta*, eingereicht.

6.2 Weitere Publikationen und Buchbeiträge

1. K. Raith: Trennung von Fettsäuren des Stratum Corneum durch Kapillaronenelektrophorese. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle 1995.
2. K. Raith: Beiträge zur Anwendung der Massenspektrometrie in der Lipidanalytik. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle 1999. <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/aut.htm>
3. R. Neubert und K. Raith: Moderne Analytik in der Pharmazie – Neue Möglichkeiten der Forschung. Universitätszeitung der Martin-Luther-Univ. Halle, 7/2000, 5.
4. K. Raith, H. Farwanah: Analytik von Lipiden der menschlichen Haut mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie. In: R.H.H. Neubert: Dermatopharmazeutisch orientierte Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Biopharmazie am Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität. *Swiss Pharma* 24 (5a/2002), 4-5.
5. K. Raith, K.M. Picker, R. Neubert und P. Kleinebudde: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie. Von Analytik bis Tablettierung: Anwendungsorientierte Forschung in Mitteldeutschland. *Swiss Pharma* 25 (3a/2003), 1-5.
6. K. Raith: Hyphenation of ACE with Mass Spectrometry. In: R. Neubert, H.H. Rüttinger (Hrsg.): *Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Marcel Dekker, New York, 2003, S. 329-349.
7. H. Farwanah, R. Neubert, S. Zellmer und K. Raith: Verbesserte Analytik von Hautlipiden mittels AMD-HPTLC. *CBS 90* (2003), 2-4.
8. K. Raith, H. Farwanah und R. Neubert: HPTLC and LC/MS in ceramide analysis. In: J. Wohlrab, R. Neubert, W. Ch. Marsch (Hrsg.): *Trends in Dermatopharmacy*. Shaker Verlag Aachen 2003, S.106-117.
9. C. Huschka, R. Wolf, K. Raith, R. Neubert und W. Wohlrab: Relevance of Topical Application of Biotin Containing Formulations. In: B. Bonnekoh, H. Gollnick (Hrsg.): *Clinico-Experimental Advances in Dermatological Diagnostics and Treatment*. Bibliomed Melsungen 2003, S. 147-156.
10. K. Raith: Stichworte Biopharmazie/Pharmakokinetik. In: H.P.T. Ammon (Hrsg.): *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. 9. Auflage 2004, Walter de Gruyter, Berlin/New York.

6.3 Abstracts

1. K. Raith, R. Neubert und J. Schiewe : Separation and Quantification of Fatty Acids by Capillary Zone Electrophoresis after Isolation from a Stratum corneum Lipid Mixture. *Skin Pharmacol.* 9 (1996) 87.
2. R. Wolf, K. Raith und R. Neubert: Determination of glycolipids as penetration modifiers in human skin using HPLC-MS. *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (S1) (1996) S168.
3. K. Raith, R. Wolf, J. Wagner und R. Neubert: Separation of Phospholipids by Nonaqueous CE with ESI-MS. Proceedings of the 10th International Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis, Kyoto, Japan, 8.-11.7.1997, 75-76.
4. R. Wolf, C. Huschka, K. Raith, W. Wohlrab und R. Neubert: Rapid Quantification of Biotin in Human Skin Extracts after Dermal Administration using HPLC Electrospray Mass Spectrometry. *Perspectives in Percutaneous Penetration*, Vol. 6A (1998) 119.
5. K. Raith und R. Neubert: Structural Studies on Ceramides using Electrospray MS/MS. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 331, Suppl. 2 (1998), 41.
6. K. Raith und R. Neubert: ESI-MS/MS und MSⁿ von Phospholipiden an einem Ionenfallen-Massenspektrometer. Tagungsband zur 32. Diskussionstagung der DGMS, Oldenburg 1999, 45.
7. D. Glanz, J.-U. Lechler, K. Lennarz, K. Raith, M. Trimborn und D. Gläßer: On the influence of linoleic acid on the phospholipid species in bovine lens epithelial cells. *Biochimie* 81, Suppl. (1999), 137.
8. K. Raith und R. Neubert: Specific Analysis of Ceramides using Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry and its Application to Human Skin Ceramides. Proceedings of the 47th Conference of the American Society for Mass Spectrometry, 13.-17.06.1999, Dallas, TX, USA.
9. M. Plätzer, K. Raith, R. Neubert, K. Laaß und M. Gaestel: Analysis of Regulatory Intramolecular Interactions in MAPKAP Kinase 2 by means of Affinity Capillary Electrophoresis. Proceedings of the 13th International Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis and Related Microscale Techniques, Saarbrücken, 20.-24.2.2000, 48.
10. K. Raith und R. Neubert: Novel Aspects of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Biopharmaceutics. Proc. 3rd World Meeting APV/APGI, Berlin 3/6 April 2000, 585-586.
11. K. Raith, K. Jahn und R. Neubert: Improvement of Drug Penetration and Permeation for Dermal Administration. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333, Suppl. 2 (2000), 34.
12. K. Raith, M. Oven, T. M. Kutchan, R. H.H. Neubert und M. H. Zenk: Detection and Characterization of Homo-Phytochelatin in Azuki Beans using ESI-MS/MS. Proceedings of the 49th Conference of the American Society for Mass Spectrometry, 26.-31.05.2001, Chicago, IL, USA.

13. C. Huschka und K. Raith: Analyse eines Henna-Pulvers mittels HPLC-MS. *Z. Hautkr.* 76 (2001), S77.
14. K. Raith: Application of Mass Spectrometry in Pharmaceutical Technology: Recent Developments. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334, Suppl. 2 (2001), 24.
15. A.V. Kühn, K. Raith und R.H.H. Neubert: Characterization of Povidone Products by ¹³C-NMR and Mass Spectrometry. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334, Suppl. 2 (2001), 67.
16. H. Farwanah, K. Raith, C. Huschka, W. Wohlrab und R. Neubert: Isolation of ceramides from skin samples by means of the aminopropyl solid phase extraction. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334, Suppl. 2 (2001), 66.
17. K. Raith und R. Neubert: Affinity capillary electrophoresis and its hyphenation with mass spectrometry: Experimental considerations and pharmaceutical applications. Proc. 4th World Meeting APV/APGI, Florenz 8/11 April 2002, 305.
18. H. Farwanah, K. Raith, S. Zellmer und R. Neubert: Analysis of the major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. Proc. 4th World Meeting APV/APGI, Florenz 8/11 April 2002, 411.
19. A.V. Kühn, K. Raith, D. Gerlach, V. Sauerland und R.H.H. Neubert: Qualitative and quantitative determination of hyaluronic acid fragments by mass spectrometry. Proc. 4th World Meeting APV/APGI, Florenz 8/11 April 2002, 319.
20. K. Raith, H. Farwanah und R. Neubert: Analysis of Human Stratum Corneum Ceramides using Automated Multiple Development Thin-layer Chromatography as well as HPLC with Evaporative Light Scattering Detection. Proc. 26th Int. Symp. on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Montréal, Kanada, 2.-7.6.2002, 50.
21. K. Raith, A.V. Kühn und R. Neubert: Characterization of Polymeric Pharmaceutical Excipients by means of Mass Spectrometry. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 335, Suppl. 1 (2002), 61.
22. K. Raith, C. Schmelzer, R. Schöps, R. Neubert: Hydrolysate von Nahrungsproteinen mit Proteasen unterschiedlicher Spezifität: Kombiniertes Einsatz von MALDI-PSD und ESI-MS/MS zur Identifizierung von Casein-Fragmenten. Vortrag bei der 37. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Leipzig 2004. Tagungsband S. 55.
23. C. Schmelzer, K. Raith, R. Schöps, R. Neubert: Einsatz neuer Tools zur Optimierung der Peakdetektion in MALDI-PSD- und ESI-Tandem-Massenspektren zur Erhöhung der Aufklärungsrate von Peptiden aus Nahrungsproteinhydrolysaten. Poster bei der 37. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Leipzig 2004. Tagungsband S. 87.
24. K. Raith, H. Farwanah, and R. Neubert: Lipidomics of Human Stratum Corneum Ceramides: Online LC/APCI-MS versus Offline HPTLC/ESI-MS/MS. Proceedings of the 52nd Conference of The American Society for Mass Spectrometry, Nashville, TN, USA, 2004.
25. K. Raith: Mass spectrometry in complex matrices: the potential of ESI, APCI, and MALDI. Vortrag bei der Gemeinsamen Fachgruppentagung Pharmazeutische

Analytik/Klinische Pharmazie bei der Jahrestagung der DPhG, Regensburg, 07.10.2004, Tagungsband S. 52.

26. K. Raith, H. Farwanah, C. Brenner, C. Schmelzer, R. Neubert: LC/APCI-MS in Lipid Analysis. Abstract zur 38. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Rostock 2005.

27. C. Schmelzer, A. Hünnerbein, K. Raith, R. Neubert: MALDI Imaging of Proteins and their Interaction Partners on Surfaces. Abstract zur 38. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Rostock 2005.

28. K. Raith, H. Farwanah, C. Schmelzer, R. Neubert: Tandem Mass Spectrometric Investigation of Esterified Stratum Corneum Ceramides. Abstract zur 53rd Conference of The American Society for Mass Spectrometry, San Antonio, TX, USA, 2005.

29. K. Raith, C. Schmelzer, A. Hünnerbein, R. Neubert: MALDI Imaging: New Perspectives in Pharmaceutical Research. Angenommen als Vortrag zur Jahrestagung der DPhG in Mainz, Oktober 2005.

30. K. Raith, C. Schmelzer, R. Neubert: Towards a molecular characterization of pharmaceutical excipients: mass spectrometric studies of ethoxylated surfactants. Angenommen als Vortrag zum 1st European Congress on Life Science Process Technology, Nürnberg, Oktober 2005.

7 Anhang: Der Habilitationsschrift zu Grunde liegende Veröffentlichungen

- [A1] H. Farwanah, R. Neubert, S. Zellmer und K. Raith: Improved Procedure for the Separation of Major Stratum Corneum Lipids by means of Automated Multiple Development Thin-layer Chromatography. *J. Chromatogr. B* 780 (2002), 443-450.
- [A2] H. Farwanah, P. Nuhn, R. Neubert und K. Raith: Normal Phase LC Separation of Stratum Corneum Ceramides with Detection by Evaporative Light Scattering and APCI Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 492 (2003), 233-239.
- [A3] H. Farwanah, J. Wohlrab, R.H.H. Neubert und K. Raith: Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase HPLC/APCI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* (2005), im Druck.
- [A4] H. Farwanah, K. Raith, R. Neubert und J. Wohlrab: Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch. Dermatol. Res.* 296 (2005), 514-521.
- [A5] K. Raith, H. Farwanah, S. Wartewig und R.H.H. Neubert: Progress in the analysis of Stratum corneum ceramides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004), 561-571.
- [A6] K. Raith, C. Brenner, H. Farwanah, G. Müller, K. Eder und R.H.H. Neubert: A new LC/APCI-MS method for the analysis of cholesterol oxidation products in food. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005), 207-211.
- [A7] A.V. Kühn, K. Raith, V. Sauerland und R.H.H. Neubert: Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC/ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003), 1531-1537.
- [A8] A.V. Kühn, H.H. Rüttinger, R.H.H. Neubert und K. Raith: Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis / electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003), 576-582.
- [A8a] A.V. Kühn, J.H. Ozegowski und R.H.H. Neubert: Behaviour of 4,5-unsaturated hyaluronic acid oligosaccharides under electrospray ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004), 733-734.
- [A9] M. Oven, K. Raith, R.H.H. Neubert, T.M. Kutchan und M.H. Zenk: Homophytochelatin Are Synthesized in Response to Cadmium in Azuki Beans. *Plant Physiol.* 126 (2001), 1275-1280.
- [A10] M. Getie, K. Raith und R.H.H. Neubert: LC/ESI-MS analysis of two elastin cross-links, desmosine and isodesmosine, and their radiation-induced degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* 1624 (2003), 81-87.
- [A11] C.E.H. Schmelzer, R. Schöps, R. Ulbrich-Hofmann, R.H.H. Neubert und K. Raith: Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine β -casein. *J. Chromatogr. A*, 1055 (2004), 87-92.
- [A12] K. Raith, R. Neubert, C. Poeknapo, C. Boettcher, M.H. Zenk und J. Schmidt: Electrospray Tandem Mass Spectrometric Investigation of Morphinans. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003), 1262-1269.
- [A13] J. Schmidt, K. Raith, C. Boettcher und M.H. Zenk: Analysis of benzyloquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. *Eur. J. Mass Spectrom.* (2005), im Druck.
- [A14] H. Trommer, M. Plätzer, K. Raith, W. Wohlrab, H.-P. Podhaisky und R.H.H. Neubert: Examinations of the topically administered drug buprenorphine reveal new insights into its mechanism of action. *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003), 1379-1388.
- [A15] K. Raith, A.V. Kühn, F. Rosche, R. Wolf und R.H.H. Neubert: Characterization of Povidone Products by means of ^{13}C -NMR, MALDI and Electrospray Mass Spectrometry. *Pharm. Res.* 19 (2002), 556-560.
- [A16] K. Raith, C.E.H. Schmelzer und R.H.H. Neubert: Towards a molecular characterization of pharmaceutical excipients: mass spectrometric studies of ethoxylated surfactants. Eingereicht bei *Anal. Chim. Acta* (2005), Manuskript Nr. ACA-05-748.