

LC-MS/MS-Analyse von freiem und gebundenem L-Carnitin in Säuglingsnahrung

Konetzki, J., Boernecke, M., Becker, E., Kirchhoff, E.

Institut Kirchhoff Berlin GmbH, Albestr. 3-4, 12159 Berlin, email: IKB@institut-kirchhoff.de



Einleitung

L-Carnitin kommt natürlicherweise in vielen tierischen Lebensmitteln, insbesondere in Fleisch und Fleischerzeugnissen, aber auch in Milchprodukten, vor.

Es findet Verwendung in Lebensmitteln für spezielle Ernährungszwecke, einschließlich Säuglingsnahrung, sowie in Nahrungsergänzungsmitteln.

Vorgestellt wird eine auf der Matrix Säuglingsnahrung (auf Milchpulverbasis) validierte Methode zur Bestimmung des **freien und gebundenen L-Carnitins** und damit auch des Gesamt-L-Carnitins mittels LC-MS/MS.

Analysenmethode

Probenaufarbeitung zur Bestimmung mittels LC-MS/MS

Probeneinwaage im Messkolben mit Extraktionsmittel
Acetonitril / Wasser (1/1) versetzen

zur Bestimmung des Gesamt-Carnitins:
+ KOH-Lösung (alkalischer Aufschluss)

Extraktion unter Erwärmen und Rühren,
danach auf 20°C temperieren

zur Bestimmung des Gesamt-Carnitins:
+ HCl-Lösung zur Neutralisation

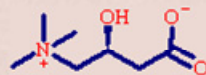
Zentrifugieren und Verdünnen

LC-Parameter

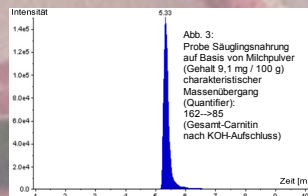
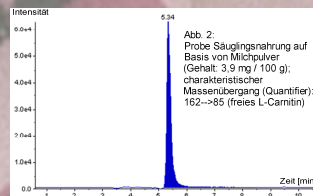
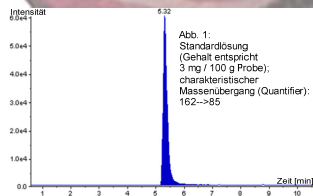
Trennsäule: Phenomenex Synergi Polar-RP
80 Å, 250 x 4.60 mm, 4 µm
Flussrate: 0.4 ml/min
Eluent: Acetonitril / Wasser (60/40); isokratisch
Laufzeit: 15 min
Injektionsvolumen: 5 µl

MS/MS-Parameter

Gerät QTRAP 3200 von Applied Biosystems / MDS SCIEX
Ionenquelle: Turbo Spray, ESI (+) - Modus
MRM-Übergänge:
L-Carnitin: 162 → 85 (Quantifier); 162 → 103; 162 → 102
L-Carnitin-D3: 165 → 85 (Quantifier); 165 → 103; 165 → 105



Beispielchromatogramme



Validierungsdaten

Linearität

Die Überprüfung der Linearität erfolgte durch Dotierung einer Matrix auf 3 Konzentrationsniveaus (3, 6 und 10 mg / 100 g) jeweils in Dreifachbestimmung. Zur Überprüfung des alkalischen Aufschlusses wurde als gebundenes L-Carnitin Acetylcarnitin dotiert.

	externe Kalibration auf Matrix	Kalibration auf Matrix normiert über den internen Standard L-Carnitin-D3
Carnitin		
relative Verfahrensstandardabweichung	3.3%	2.6%
Korrelationskoeffizient	0.9991	0.9995
Acetylcarnitin (gebundenes Carnitin)		
relative Verfahrensstandardabweichung	7.0%	0.3%
Korrelationskoeffizient	0.9981	0.9999

Der Mandel-Test ergibt sowohl für freies als auch für gebundenes L-Carnitin keine signifikant bessere Anpassung durch quadratische Regression.

Im Konzentrationsbereich 3-10 mg / 100 g liegt somit sowohl für freies als auch für gebundenes L-Carnitin ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Messsignal vor.

Wiederholpräzision und Richtigkeit

Die Ermittlung dieser Verfahrenskennzahlen erfolgte durch Dotierung einer Matrix auf 3 Konzentrationsniveaus jeweils in Dreifachbestimmung. Zur Überprüfung des alkalischen Aufschlusses wurde als gebundenes L-Carnitin Acetylcarnitin dotiert.



Im Konzentrationsbereich 3-10 mg / 100 g werden sowohl für die Richtigkeit als auch für die Wiederholpräzision gute Ergebnisse erzielt.

Bestimmungsgrenze

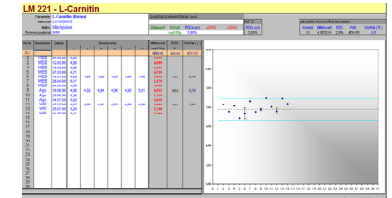
Die Bestimmungsgrenze wurde zunächst nach DIN 32545 aus einer 10-Punkt-Kalibrierung im Bereich 0.1-1 mg/100 g abgeschätzt. Diese Abschätzung ergab 0.1 mg/100 g. Außerdem wurde eine Abschätzung über das "Signal to noise"-Verhältnis anhand einer Probe mit einem Gehalt von 0.3 mg/100 g vorgenommen:



Robustheit

Laborinterne Vergleichspräzision

internes Referenzmaterial Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis
freies L-Carnitin



relative Verfahrensstandardabweichung über 13 Arbeitstage 2,9% (entspricht bei einer nach Horwitz erwarteten relativen Verfahrensstandardabweichung von 5,9% einem Horrat-Wert von 0,5)

Gesamt-L-Carnitin

relative Verfahrensstandardabweichung über 4 Arbeitstage 4,4% (entspricht bei einer nach Horwitz erwarteten relativen Verfahrensstandardabweichung von 5,5% einem Horrat-Wert von 0,8)

Sowohl für freies als auch für Gesamt-L-Carnitin liegt der Horrat-Wert der laborinternen Vergleichspräzision deutlich unter 1,5 (internes Akzeptanzkriterium).

Verschleppung bei Injektion

Zur Untersuchung der Verschleppung des Analyten bei der HPLC-Injektion wurde mehrfach nach einer hoch konzentrierten Standardlösung (entsprechend 1 g / 100 g Probe) HPLC-Eluent injiziert.
Weniger als 0,1% des Analyten werden verschleppt.

Stabilität der Standardlösungen

Zur Untersuchung der Analytstabilität wurde eine Standardlösung mit einer L-Carnitin-Konzentration von 0,05 µg/ml hergestellt, auf 10 Vials aufgeteilt und diese im Kühlschrank gelagert. Die Quotienten aus den Peakflächen des L-Carnitins und des deuterierten Standards wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen mehrfach verglichen. Es ist über einen Zeitraum von 10 Tagen keine signifikante Änderung der Flächenquotienten festzustellen.

Matrixsuppression

Der Vergleich der Peakflächen des internen Standards in Standardlösungen und Probenextrakten zeigt, dass Matrixsuppressionseffekte vernachlässigbar sind.

Messunsicherheit

Freies Carnitin
6%

Gesamt-Carnitin
17%

Die Messunsicherheit ist ausgedrückt als erweiterte Unsicherheit ($k=2$, t-Faktor der Student-Verteilung), was einem Vertrauensbereich von etwa 95% entspricht. Die angegebene Messunsicherheit bezieht sich auf die Matrix Säuglingsnahrung. In die Abschätzung der Messunsicherheit fließt sowohl die laborinterne Vergleichspräzision als auch die Richtigkeit ein (vgl. Nordtest, T2 53A, 2003).

Fazit

Die vorgestellte Methode ist **sehr gut für die Routineanalytik geeignet**. Mittels **weniger einfacher Arbeitsschritte** lassen sich mit **sehr guter Präzision und Richtigkeit** freies, gebundenes und Gesamt-L-Carnitin parallel bestimmen. Die durch die MS/MS-Technologie **sehr hohe Selektivität und Empfindlichkeit** ist ein entscheidender Vorteil gegenüber alternativen Analysenprinzipien wie z. B. Enzymatik oder HPLC mit Fluoreszenzdetektion. Insbesondere im Vergleich zur enzymatischen Analytik ist die deutlich größere **Robustheit** dieser Methode hervorzuheben, die sich u. a. in der guten laborinternen Vergleichspräzision ausdrückt.