

Inositol in Säuglingsnahrung

LC-MS/MS-Analyse des Gesamt-Inositol-Gehalts

Jörg Konetzki, Erik Becker und Erhard Kirchhoff

Das Vitaminoid myo-Inositol (*cis-1,2,3,5-trans-4,6-cyclohexanhexol*), ein sechswertiger cyclischer Alkohol, ist ein essenzieller Wachstumsfaktor. Es spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Neubildung von Zellen, bei der Signalübertragung zwischen Zellen, im Fettstoffwechsel und der Entwicklung innerer Organe [1,2].



Jörg Konetzki

>> Zur Person

Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker, seit 2003 bei der Institut Kirchhoff Berlin GmbH beschäftigt; Tätigkeitsschwerpunkt: Methodenentwicklung chromatografischer Verfahren <<

Vom menschlichen Körper kann Inositol aus Glucose synthetisiert werden. Da bei Säuglingen in der ersten Zeit nach der Geburt die Inositol-Synthese noch nicht vollständig ausgebildet ist, müssen Säuglinge über die Nahrung mit Inositol versorgt werden [1].

Hintergrund

Muttermilch enthält mit 22–48 mg/100 kcal, entsprechend ca. 170–380 mg/L, eine deutlich höhere Menge Inositol als Kuhmilch (100–130 mg/L) [2–4]. Aufgrund dieser hohen Konzentration in Muttermilch hat die Supplementierung in Nahrung für Säuglinge, die nicht gestillt werden, eine besondere Bedeutung. Durch sie erfolgt eine Anpassung der Anfangsnahrung an die hohe Inositol-Konzentration in der Muttermilch und damit die Gewährleistung, dass der Inositolbedarf durch die Säuglingsnahrung ohne Stillen gedeckt wird. Das „Scientific Committee on Food“ der EU-Kommission empfiehlt einen Mindestgehalt von 4 mg Inositol/100 kcal und einen Höchstgehalt von 40 mg/100 kcal bei Anfangsnahrung [2]. Diese Empfehlung ist in der Richtlinie 2006/141/EG und in Anlage 10 der deutschen Diätverordnung umgesetzt.

Enthalten ist Inositol in Kuhmilch in freier Form, in Inositolmonophosphaten

und in gebundener Form in Phospholipiden (Phosphatidylinositol) [3,4].

Da die Bioverfügbarkeit sowohl für freies als auch für lipidgebundenes myo-Inositol sehr hoch (99,8 %) ist [5,6], muss zur Beurteilung des gesamten für die Ernährung des Säuglings relevanten Gehalts in einem Produkt der Gesamt-Inositol-Gehalt bestimmt werden.

Entwicklung der LC-MS/MS-Methode

Ziel der vorgestellten Arbeit war daher, eine valide LC-MS/MS-Methode für die Routineanalytik zu etablieren, die den Gesamt-Inositol-Gehalt, also sowohl das freie (supplementierte und natürlich enthaltene) als auch das in Monophosphaten und Lecithin gebundene Inositol in Säuglingsnahrung auf Milchpulverbasis erfasst.

Das Hauptaugenmerk im Rahmen der Methodenentwicklung lag dabei auf der Auswahl eines geeigneten Aufschlussverfahrens und der Auswahl geeigneter chromatografischer Bedingungen.

Aufschlussverfahren

Um freies und gebundenes Inositol vollständig zu erfassen, musste ein geeignetes Aufschlussverfahren etabliert werden. Verschiedene Aufschlussvarianten wurden mit einem Probenmaterial auf Milch-

pulverbasis getestet, das neben freiem auch gebundenes Inositol enthielt. Das effektivste Verfahren war hierbei der zweistufige alkalisch-enzymatische Aufschluss nach *Tagliaferri* et al. [5]. Dieses Verfahren wurde adaptiert. Zunächst wird hierbei alkalisch mit KOH hydrolysiert und anschließend, da die alkalische Hydrolyse alleine nicht zu einer vollständigen Freisetzung des in Form von Phosphorsäureestern vorliegenden Inositols führt, eine enzymatische Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase durchgeführt.

Anmerkung: Bei stärkehaltigen Produkten (z. B. Säuglingsnahrung auf Soja-Basis) wird vor der alkalischen Hydrolyse ein Aufschluss mit Taka-Diastase zum Abbau von Stärke durchgeführt.

Auswahl geeigneter chromatografischer Bedingungen

Eine überzeugende Chromatografie wurde mit einer polymerbasierten Kohlenhydrat-Spezialsäule und einer isokratischen Elution mit einer Flussrate von 0,3 mL/min, einer Säulentemperatur von 45 °C sowie der Eluentenzusammensetzung 5 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Wasser 70/30 erzielt (s. Abb. 1).

Inositol eluiert in Form eines symmetrischen scharfen Peaks. Die Retentionszeit von ca. 4 min ist gut für die Routineanalytik mit hohem Probendurchsatz geeignet. Matrixbedingte Interferenzen sind im Elutionsbereich des Analytpeaks nicht feststellbar. Zu beachten ist, dass es in den MRM-Spuren des Inositols nach längerer Laufzeit zu Interferenzen durch Matrixbestandteile kommt, die nachfolgende Probenläufe stören. Die Ursache dieser In-

terferenzen sind, wie von uns mithilfe von Modellmischungen nachgewiesen, höhermolekulare Kohlenhydrate.

Die eingesetzte Stabilisotopen-Technik schafft hier keine Abhilfe, da es sich nicht um Effekte der Matrix auf die Signalintensität, sondern um koeluiierende Störsubstanzen in den zur Quantifizierung verwendeten MRM-Spuren handelt.

Nach 10 Injektionen matrixhaltiger Extrakte wird daher ein Spüllauf mit einem Wasseranteil von 95 % durchgeführt. Hierbei werden die auf der Säule retardierten höhermolekularen Kohlenhydrate eluiert. Das Eluat des Spüllaufs wird über ein Schaltventil in ein Abfallgefäß geleitet.

Analysenmethode

Die Einwaage des Probenmaterials wird aufgeschlämmt und mit dem isotopenmarkierten internen Standard myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-d6 (*Dr. Ehrenstorfer*, Augsburg) versetzt. Aufgeschlossen wird zunächst alkalisch mit KOH und anschließend mit alkalischer Phosphatase.

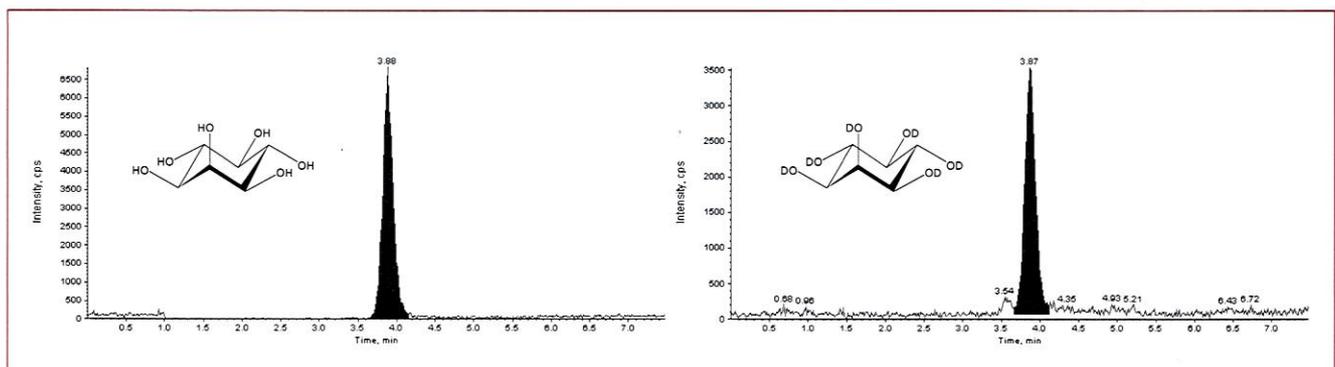
Die LC-MS/MS-Analyse erfolgt mit einem HPLC-System der Fa. *Agilent*, Waldbronn (1100 oder 1200 Series) und einem Triple Quad-System der Fa. *AB Sciex*, Darmstadt (API 3200) im ESI(-)-Modus.

Die HPLC-Trennung wird auf einer polymerbasierten Kohlenhydrat-Spezialsäule mittels isokratischer Elution (mobile Phase: 5 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Wasser 70/30) bei einer Flussrate von 0,3 mL/min und einer Säulen-Temperatur von 45 °C vorgenommen.

Die Messung erfolgt im MRM (Multiple Reaction Monitoring)-Modus. Als Vorläu-

» Koeluiierende Substanzen stören die Quantifizierung. «

Abb. 1 links: MRM ESI(-) m/z 179 → m/z 87, rechts: interner Standard Inositol-d6: MRM ESI(-) m/z 185 → m/z 89 (Milchpulver mit 50 mg Inositol/100 g Probe)



Tab. 1 Verfahrenskenndaten

Validierungsparameter		
Wiederholpräzision aus Dotierungen auf 10, 50 und 100 mg/100 g (jeweils 3-fach)	mittlere relative Wiederholstandardabweichung RSD_r	2,2 %
	mittlerer Horrat-Wert (RSD_r ermittelt / RSD_r erwartet)	0,6
Richtigkeit aus Dotierungen auf 10, 50 und 100 mg/100 g (jeweils 3-fach)	mittlere Wiederfindung	104 %
Linearität aus Dotierungen auf 10, 50 und 100 mg/100 g (jeweils 3-fach)	relative Verfahrensstandardabweichung	3,2 %
	Korrelationskoeffizient r	0,9991
Bestimmungsgrenze		1 mg/100 g
	relative Wiederholstandardabweichung RSD_r	9,3 %
	Signal-Rausch-Verhältnis an Bestimmungsgrenze	10:1
laborinterne Vergleichspräzision aus 20 Einzelwerten	relative Verfahrensstandardabweichung RSD_r	3,2 %
		10 %
erweiterte Messunsicherheit nach Nordtest Report TR 537 [7], Präzisionskomponente aus Kontrollkarte (laborinterne Vergleichspräzision), Richtigkeit aus Basisvalidierung, Erweiterungsfaktor $k = 2$		

fer-Ion wird für Inositol $[M-H]^-$ (m/z 179) ausgewählt. Der intensivste Massenübergang m/z 179 \rightarrow m/z 87 dient als Quantifier, der Massenübergang m/z 179 \rightarrow m/z 99 als Qualifier. Der isotoopenmarkierte Inositol-D6-Standard wird über m/z 185 \rightarrow m/z 89 sowie m/z 185 \rightarrow 102 quantifiziert.

Methodenvalidierung

Zur Methodenvalidierung wurden zunächst die Basis-Verfahrenskenndaten Spezifität, Wiederholpräzision, Richtigkeit, Linearität und Bestimmungsgrenze ermittelt (s. Tab. 1). Die Anwendbarkeit und Performance der Methode über einen längeren Zeitraum im Routinealltag wurde im Rahmen der Untersuchungen zur Robustheit mithilfe der Regelkartentechnik bewertet. Hierzu wurden interne Referenzmaterialien aus Realproben generiert und arbeitstäglich mitgeführt.

Abgerundet wurde die Methodenvalidierung durch die Abschätzung der Messunsicherheit aus Daten der Routine-Qualitätskontrolle und der erfolgten Basisvalidierung.

Fazit

Mit der vorgestellten Analysenmethode, die ein zweistufiges alkalisch-enzyma-

tisches Aufschlussverfahren und eine Bestimmung mittels LC-MS/MS umfasst, lässt sich die Summe aus supplementiertem freiem Inositol und gebundenem Inositol präzise und richtig erfassen.

Die Robustheit, die sich in der guten laborinternen Vergleichspräzision widerspiegelt, ist ein entscheidender Vorteil dieser Methode. Optimal für die Routine mit hohem Probendurchsatz ist die kurze chromatografische Laufzeit von 5 min. ■

Anschrift der Autoren

Jörg Konetzki

jk@institut-kirchhoff.de

Erik Becker

Dr. Erhard Kirchhoff

Institut Kirchhoff Berlin GmbH

Albstraße 3–4

12159 Berlin

Tel.: +49-3085/1028-0

Literaturverweise finden Sie unter
www.dlr-online.de \rightarrow DLR Plus
Passwort: Fenchelgemüse

>> Methode ist für die Routineanwendung mit hohem Probendurchsatz geeignet. <<