

# LC-MS/MS-Methodenentwicklung: ungeradzahlige Acylcarnitine im Plasma

**Behringer, Sidney**

Bachelor-Thesis, Lifescience Technologies, Pharmatechnologie

Auftraggeber: Prof. Dr. Henk Blom, Universitätsklinikum Freiburg  
Begleitdozent: Prof. Dr. Götz Schlotterbeck, FHNW  
Experte: Dr. Markus Ehrat

## ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Untersuchung von Plasma Proben von gesicherten Medium-Chain-Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase-Mangel (MCAD)-Patienten mit einer dafür entwickelten LC-MS/MS-Methode, konnten neben einer bereits bekannten Akkumulation der geradzahligen mittelkettigen Acylcarnitine (C6, C8, C10 und C10:1) auch eine Akkumulation der ungeradzahligen mittelkettigen Acylcarnitine C7 und C9 nachgewiesen werden.

## EINLEITUNG

Acylcarnitine dienen als Transporter von als Acyl-CoA aktivierten Fettsäuren in Mitochondrien, in denen die Acyl-CoA durch  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt werden. Beim Medium-Chain Acyl-Coenzym-A-Dehydrogenase-Mangel (MCAD-Mangel) ist der erste Schritt der  $\beta$ -Oxidation von mittelkettigen Fettsäuren nicht, oder nur eingeschränkt möglich (siehe Abb. 1). Dadurch akkumulieren geradzahlige mittelkettige Acylcarnitine (C6, C8, C10 und C10:1), die im Plasma und Trockenblut nachweisbar sind [1,2].

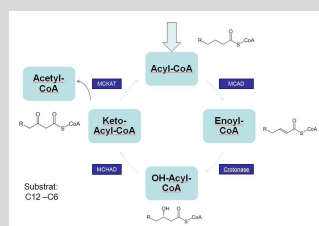


Abb. 1: Schema der  $\beta$ -Oxidation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine LC-MS/MS-Methode entwickelt und validiert, die neben geradzahlige auch ungeradzahlige mittelkettige Acylcarnitine (C7, C9 und C11) nach Probenaufarbeitung mittels Butylierung in Plasma erfassen kann. Da ungeradzahlige mittelkettige Acylcarnitine nicht zu kaufen sind, wurden C7, C9 und C11-Acylcarnitine aus Carnitinhydrochlorid und ungeradzahligen Fettsäuren synthetisiert [3].

## RESULTATE

Bei der Synthese von ungeradzahligen Acylcarnitinen konnten Ausbeuten bis zu 75.08 % bei einer Reinheit bis zu 96.40 % erzielt werden.

Ein Methodenvergleich zwischen der Bestimmung von undervatisierten und derivatisierten Acylcarnitinen zeigte höhere Empfindlichkeit nach Derivatisierung, so dass eine LC-MS/MS-Methode für die Bestimmung von derivatisierten Acylcarnitinen entwickelt wurde.

Die entwickelte Chromatographie-Methode benötigt 15 Minuten um Acylcarnitine voneinander zu trennen (siehe Abb. 2), während die entwickelte MS/MS-Methode 62 Massenübergänge auf 13 Zeitsegmente verteilt misst.

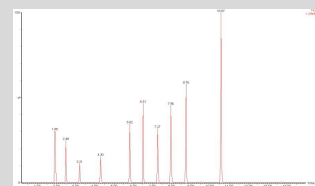


Abb. 2: Typisches Chromatogramm.

Dabei wurden die Analyten von 0.01  $\mu\text{mol/l}$  bis 5  $\mu\text{mol/l}$  in mit Standard aufgestocktem Plasma kalibriert. Es wurde Linearität bis 20  $\mu\text{mol/l}$  für die Analyten nachgewiesen und Wiederfindungen von 89 % (C6) bis 104 % (C10) konnten ermittelt werden.

Ein Vergleich der entwickelten Methode mit der in der Routine eingesetzten FIA-MS/MS-Methode zeigte die Überlegenheit der entwickelten Methode hinsichtlich Nachweisgrenzen, Variation und vor allem der Selektivität (vgl. Tabelle 1).

Analyt	FIA-MS/MS-Methode Variationskoeffizient [%]	LC-MS/MS Methode Variationskoeffizient [%]
<b>C6</b>	30.71	10.56
<b>C8</b>	20.82	13.09
<b>C10</b>	16.52	12.27

Tab. 1: Vergleich der Inter-Day-Variationen von FIA-MS/MS- und LC-MS/MS-Methode.

Eine Untersuchung bezüglich der Stabilität der Acylcarnitine in Plasma zeigte eine Abnahme der Acylcarnitin-Konzentration innerhalb 24 Stunden bis zu 10 %.

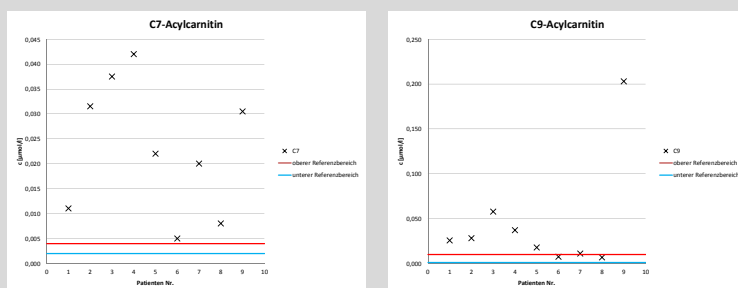


Abb. 2 und 3: Acylcarnitin-Konzentrationen in Plasma-Proben von MCAD-Patienten.

Anhand von Plasma-Proben von 25 unauffälligen Probanden in einem Alter unter 3 Monaten wurden Referenzbereiche ermittelt. Es wurde beobachtet, dass ungeradzahlige Acylcarnitine in niedrigeren Konzentrationen als die geradzahligen vorlagen, was auf einer Ernährung mit Muttermilch zurück zu führen ist, die arm an ungeradzahligen Fettsäuren ist.

Ein Vergleich von Plasma-Proben von 9 gesicherten MCAD-Patienten mit der Referenz-Kohorte zeigt neben der Akkumulation der geradzahligen mittelkettigen Acylcarnitine C6, C8, C10 und C10:1 auch eine signifikante Erhöhung der Konzentrationen der ungeradzahligen mittelkettigen Acylcarnitine C7 und C9 (siehe Abb. 2 und 3).

## SCHLUSSFOLGERUNG

Es konnte gezeigt werden, dass beim MCAD-Defekt neben den geradzahligen auch die ungeradzahligen mittelkettigen Acylcarnitine C7 und C9 akkumulieren. Dass C11 nicht akkumuliert, kann daran liegen, dass sich das MCAD-Enzym in dem Bereich von C11 und C12 und das VLCAD-Enzym (Very-Long-Chain-CoA-Dehydrogenase) hinsichtlich der Substrat-Spezifität konkurrieren. Die entwickelte Methode kann nun unter anderem genutzt werden um z.B. die Auswirkungen einer bei Fettsäureoxidationsstörungen üblichen Gabe von Triheptanoin, einem ungeradzahligen C7-Triglycerid, auf die  $\beta$ -Oxidation zu untersuchen. Zudem könnte im Anschluss an Enzymaktivitäts-Assays Aussagen über die Substrat-Spezifität der beiden Enzyme (VLCAD und MCAD) getroffen werden.

## REFERENZEN

- [1] Spiekerkoetter U, Duran M – Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders. In: Blau et al. – Physician's guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Inherited Metabolic Diseases. Berlin (2014): Springer-Verlag
- [2] Gucciardi et al. - A rapid UPLC-MS/MS method for simultaneous separation of 48 acylcarnitines in dried blood spots and plasma useful as a second-tier test for expanded newborn screening. Anal Bioanal Chem. 2012;404(3):741-51
- [3] Christophersen BO, Bremer J - Carnitine esters of unsaturated fatty acids. Preparation and some aspects of their metabolism. Biochim Biophys Acta. 1972;18;260(4):515-26