



# MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Bestimmung von freiem Carnitin und Carnitinstern im  
Plasma schwangerer Frauen mittels HPLC-MS

Verfasserin

Veronika Weber, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Herr A.o. Univ. Prof. Dr. E. Lorbeer



# *Meinen Eltern*

*Sie brachten mir bei,  
meinen Weg vertrauensvoll zu gehen,  
Herausforderungen anzunehmen und  
an Rückschlägen zu wachsen.*

*Sie gaben mir Wurzeln und Flügel.*

*Danke dafür.*



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. Eberhard Lorbeer bedanken, der als Betreuer immer Zeit und guten Rat für mich gefunden hat. Ohne ihn und seinen unermüdlichen Einsatz, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank geht an Biu, Kerstin und Johanna, für jedes Gespräch, für die unzähligen durchgelernten Tage und Nächte, für euer stets offenes Ohr gegenüber allem, was mich bewegt und beschäftigt, und für jedes Erfolgserlebnis, das ich mit euch teilen durfte.

Ich danke euch für eure Freundschaft, ohne euch wäre ich nicht da wo ich jetzt bin.

Meinem Freund Fabian, der immer an mich geglaubt hat und mir mit Geduld, Liebe und Motivation zur Seite gestanden ist



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
2.1	Carnitin.....	3
2.1.1	Allgemein.....	3
2.1.2	Geschichte und Entdeckung.....	4
2.1.3	Chemische Struktur/Nomenklatur .....	5
2.1.4	Vorkommen im menschlichen Körper .....	6
2.1.5	Vorkommen in Nahrungsmitteln .....	9
2.1.6	Carnitin-Aufnahme mit der Nahrung.....	12
2.1.7	Carnitin-Biosynthese .....	13
2.1.8	Ausscheidung .....	15
2.1.9	Funktion.....	16
2.1.10	Theoretische Gründe für zellulären Carnitin-Mangel oder Beeinträchtigung der Carnitin-Funktion .....	23
2.1.11	Carnitin-Mangel.....	24
2.1.12	Therapeutische Eigenschaften und Supplementierung.....	26
2.2	Schwangerschaftsdiabetes .....	29
2.2.1	Definition .....	29
2.2.2	Häufigkeit .....	29
2.2.3	Entstehung/Ätiologie .....	30
2.2.4	Risikofaktoren .....	34
2.2.5	Auswirkungen der Glukosestoffwechselstörung für Mutter und Kind	35
2.2.6	Diagnose .....	37
2.2.7	Neue Leitlinie GDM .....	40
2.2.8	Therapie .....	40
2.3	Carnitin in der Schwangerschaft.....	43
2.3.1	Allgemein.....	43
2.3.2	Die Rolle der freien Fettsäuren .....	47

---

2.3.3	Supplementierung .....	51
<b>3</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>METHODE.....</b>	<b>55</b>
4.1	Literaturübersicht der bestehenden Methoden.....	55
4.2	Methode Allgemein.....	55
4.2.1	Festphasenextraktion .....	55
4.2.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	57
4.2.3	Massenspektrometrie (MS).....	67
4.2.4	HPLC-MS .....	72
4.3	Methodenbeschreibung.....	73
4.3.1	Übernommene Methode .....	73
4.3.2	Probenbeschreibung: .....	74
4.3.3	Übersicht der untersuchten Acylcarnitine .....	75
4.3.4	Referenzwerte .....	82
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL und RESULTATE .....</b>	<b>85</b>
5.1	Verwendete Reagenzien und Standardverbindungen.....	85
5.2	Verwendete Geräte:.....	86
5.2.1	HPLC.....	86
5.2.2	MS.....	86
5.3	Probenaufbereitung .....	87
5.3.1	Übersicht.....	87
5.3.2	Festphasenextraktion .....	88
5.3.3	Synthese des Derivatisierungsreagenz in 2 Schritten .....	88
5.3.4	Herstellung des Derivatisierungsreagenz und Derivatisierung.....	92
5.3.5	Laufmittel.....	92
5.3.6	HPLC – Einstellungen .....	93
5.3.7	MS- Einstellungen .....	95
5.3.8	Messung.....	96
5.4	Ergebnisse und Diskussion .....	97
5.4.1	Versuche mit Standardverbindungen .....	97
5.4.2	Messung der Proben .....	109

---

5.5	Zusätzliche Experimente zur Fehlerermittlung.....	112
5.5.1	Derivatisierungsreagenz.....	112
<b>6</b>	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG.....</b>	<b>123</b>
6.1	Derivatisierungsreagenz .....	123
6.2	Verdünnungsreihe .....	123
6.3	Probenmessung .....	125
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>131</b>
<b>Anhang</b>	..... Fehler! Textmarke nicht definiert.	
<b>Lebenslauf</b>	.....	<b>139</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Strukturformel von Carnitin.....	5
<b>Abbildung 2:</b> Altersabhängige Variationen von freiem Carnitin im Plasma .....	8
<b>Abbildung 3:</b> Carnitin - Biosyntheseweg .....	14
<b>Abbildung 4:</b> Aktivierung der langkettigen Fettsäuren .....	16
<b>Abbildung 5:</b> Carnitin- Carrier als spezifischer Transportmechanismus von Acyl-CoA durch die mitochondriale Innenmembran.....	17
<b>Abbildung 6a:</b> Fettröpfchen im Trizeps eines Patienten mit L-Carnitin Mangel	25
<b>Abbildung 6b:</b> Fettröpfchen nach 6-monatiger Therapie.....	25
<b>Abbildung 7:</b> Risikoerhebung bei Erstvorstellung der Schwangeren .....	38
<b>Abbildung 8:</b> Zusammensetzung ausgeschiedener kurzkettiger Acylcarnitine in der 12. und 20. Schwangerschaftswoche.....	44
<b>Abbildung 9:</b> freie Fettsäuren im Plasma von Schwangeren in der 20. Woche, verglichen mit un-supplementierten (Kontrollgruppe) und supplementierten Schwangeren bei der Geburt .....	46
<b>Abbildung 10:</b> Randle-Mechanismus .....	48
<b>Abbildung 11:</b> Vorrichtung zur Festphasenextraktion .....	56
<b>Abbildung 12:</b> Hochdruckflüssigkeitschromatograph.....	57
<b>Abbildung 13:</b> Bestandteile des Hochdruckflüssigkeitschromatographen.....	58
<b>Abbildung 14:</b> Silica Grundgerüst.....	60
<b>Abbildung 15:</b> Octylsilica .....	61
<b>Abbildung 16:</b> Prinzip der reversed phase Chromatographie mit Gradienten Elution .....	64
<b>Abbildung 17:</b> Massenspektrometer.....	67
<b>Abbildung 18:</b> Bestandteile des Massenspektrometers .....	68
<b>Abbildung 19:</b> Electrospray-Ionisierung .....	69
<b>Abbildung 20:</b> Bestandteile der Ionenfalle.....	71
<b>Abbildung 21:</b> HPLC-MS Kopplung .....	72
<b>Abbildung 22:</b> Vergleichschromatogramme der untersuchten Acylcarnitine .....	82

---

<b>Abbildung 23a:</b> gemessene Carnitinkonzentrationen bei einem gesunden Erwachsenen in einem Blutstropfen in $\mu\text{mol/L}$ .....	83
<b>Abbildung 23b:</b> gemessene Carnitinkonzentration im Gesamtblut in $\mu\text{mol/L}$	83
<b>Abbildung 24:</b> graphische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der Probenvorbereitung .....	87
<b>Abbildung 25:</b> Pentafluoro-2-diazoacetophenon .....	88
<b>Abbildung 26</b> Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat .....	90
<b>Abbildung 27:</b> Acetylcarnitin ( $c = 0.2 \text{ mg/ml}$ ) .....	98
<b>Abbildung 28:</b> Octanoylcarnitin ( $c = 0.2 \text{ mg/ml}$ ); Intensität $7.91 e4$ .....	100
<b>Abbildung 29:</b> Octanoylcarnitin ( $c = 0.02 \text{ mg/ml}$ ) Intensität $1.35 e4$ .....	100
<b>Abbildung 30:</b> Octanoylcarnitin ( $c = 0.002 \text{ mg/ml}$ ) Intensität $1.50 e3$ .....	101
<b>Abbildung 31:</b> Octanoylcarnitin ( $c = 0.0002 \text{ mg/ml}$ ) Intensität $8.97 e2$ .....	101
<b>Abbildung 32:</b> Freies Carnitin ( $c = 0.2 \text{ mg/ml}$ ) Intensität $4.29e4$ .....	103
<b>Abbildung 33:</b> Freies Carnitin ( $c = 0.0002$ ) $\text{mg/ml}$ Intensität $2.36e2$ .....	103
<b>Abbildung 34a:</b> UV-Spektrum FC ( $c = 0.2 \text{ mg/ml}$ ) Intensität $2.68 e4$	104
<b>Abbildung 34b:</b> UV-Spektrum FC ( $c = 0.0002 \text{ mg/ml}$ ) Intensität $5.4 e3$ .....	104
<b>Abbildung 35:</b> Octanoylcarnitin und Acetylcarnitin, Mischung gleicher Verhältnisse .....	105
<b>Abbildung 36:</b> Octanoylcarnitin und Acetylcarnitin mit Festphasenextraktion ....	107
<b>Abbildung 37:</b> Freies Carnitin mit Festphasenextraktion, Intensität FC: $8.17 e 2$ .	108
<b>Abbildung 38:</b> Probe + freies Carnitin als Standard, Intensität $2.97 e 2$ .....	110
<b>Abbildung 39:</b> Probe + Acylcarnitine als Standard, Intensität Acetylcarnitin $3.60 e 2$ ; .....	111
<b>Abbildung 40:</b> FC im Plasma, derivatisiert mit $200 \mu\text{l}$ N,N- Diisopropylethylamin und $100 \mu\text{l}$ Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat.....	115
<b>Abbildung 41:</b> Muskelgewebeprobe .....	120
<b>Abbildung 42:</b> Standardgerade der Verdünnungsreihe von Octanoylcarnitin.....	124
<b>Abbildung 43:</b> Standardgerade der Verdünnungsreihe von Carnitin .....	124

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Carnitinverteilung im menschlichen Körper .....	6
<b>Tabelle 2:</b> L-Carnitin-Gehalt in Lebensmitteln in mg/kg geordnet nach Produktgruppen.....	10
<b>Tabelle 3:</b> Risikofaktoren für Gestationsdiabetes.....	34
<b>Tabelle 4:</b> Grenzwerte für die Messung von Gelegenheits- und Nüchternblutglucose.....	39
<b>Tabelle 5:</b> Diagnosegrenzwerte für Gestationsdiabetes nach IADPSG-Konsensus- Empfehlungen im venösen Plasma.....	39
<b>Tabelle 6:</b> Codierung der Plasmaproben.....	74
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht der untersuchten Acylcarnitine.....	75
<b>Tabelle 8:</b> Laufmittel Verhältnisse.....	92
<b>Tabelle 9:</b> Multistep Gradient - Methode für die Messung der Acylcarnitine.....	94
<b>Tabelle 10:</b> Verkürzte Version für die Analyse von Gesamtcarnitin und freiem Carnitin.....	94
<b>Tabelle 11:</b> Konzentrationen der verdünnten C8 -Lösungen und dazugehörige Intensitäten im Spektrum .....	102
<b>Tabelle 12:</b> Konzentrationen der verdünnten FC - Lösungen und dazugehörige Intensitäten im Spektrum .....	104
<b>Tabelle 13:</b> Ergebnisse der Kernspinresonanz Spektroskopie .....	112

---

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>FFS</b>	freie Fettsäuren
<b>FS</b>	Fettsäure
<b>GDM</b>	Gestations - Diabetes mellitus
<b>HPLC</b>	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>ICD 10</b>	International Classification of Diseases
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>NP</b>	Normal Phase
<b>oGTT</b>	Oraler Glucose Toleranztest
<b>PGDM</b>	Prägestationaler Diabetes mellitus
<b>RP</b>	Reversed Phase
<b>Rt</b>	Retention time
<b>SIC</b>	Single ion current
<b>SPE</b>	Solid phase extraction
<b>SSW</b>	Schwangerschaftswoche
<b>TG</b>	Triglyceride
<b>TIC</b>	Total ion current



## 1 EINLEITUNG

Immer mehr Frauen entwickeln während ihrer Schwangerschaft eine Kohlenhydratstoffwechselstörung, welche meist mit erheblichen Risiken für Mutter und Kind einhergeht. Die Ursache dieser Erkrankung liegt im schwangerschaftsbedingten, erhöhten Bedarf an Insulin - kann dieser durch die Bauchspeicheldrüse nicht ausgleichen werden, entwickelt sich bei den Schwangeren der sogenannte Schwangerschafts- bzw. Gestationsdiabetes (GDM). Diese Stoffwechselstörung zählt mittlerweile zu den häufigsten Schwangerschaftserkrankungen mit steigender Prävalenz.

Da die Erkrankung meist symptomlos verläuft und viel zu selten erkannt wird, ist es von höchster Notwendigkeit, in diesem Bereich extensive Forschung zu betreiben.

Als Mittel der Wahl in der GDM – Diagnostik gilt derzeit der orale Glucosetoleranztest (oGTT), welcher in Österreich seit 2010 in der 2. Schwangerschaftshälfte bei allen Schwangeren verpflichtend durchgeführt wird. Allerdings sind die Grenzwerte dafür sehr unterschiedlich und oftmals nicht evidenzbasiert.

Daher laufen die Forschungen für neue Methoden zur Bestimmung bzw. Risikoabschätzung für GDM auf Hochtouren. Besonders eine Substanz rückt dabei immer weiter in den Fokus der Wissenschaft und wird in letzter Zeit immer häufiger mit dem Krankheitsbild des Schwangerschaftsdiabetes in Verbindung gebracht und als dessen Risikofaktor (bzw. Biomarker) diskutiert: das Carnitin.



## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Carnitin

#### 2.1.1 Allgemein

Bei Carnitin handelt es sich um eine teils vom Körper selbst synthetisierte, teils mit der Nahrung aufgenommene, vitaminähnliche Substanz (Vitaminoid), welche nahezu in allen Zellen vorkommt und einen wichtigen Bestandteil unserer täglichen Ernährung darstellt. Zusammen mit der Glykolyse bilden Carnitin-abhängige Stoffwechselwege die ältesten in der Evolution und spielen eine essentielle Rolle für den Fettstoffwechsel. [LOHNINGER et al., 2005a; BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

Im „Handbook of Vitamines“, dem amerikanischen Handbuch der Vitamine, wird Carnitin als vitaminähnlicher Nährstoff mit physiologischer Bedeutung klassifiziert. [BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

Bereits in *Archaea* (Einzellern) konnte das Vorkommen von Carnitin festgestellt werden, wobei es für einige Organismen die alleinige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle darstellt. Für andere Bakterien gilt es als essentieller sauerstoffprotektiver Wirkstoff. In allen Eukaryoten stellt Carnitin einen wesentlichen und essentiellen Bestandteil im intermediären Metabolismus dar. [LOHNINGER et al., 2005a]

Carnitin wird im Körper selbst synthetisiert, aber auch aus rotem Fleisch, Fisch und Milchprodukten bezogen und wird nur in seltenen Situationen zu einem Mangelnährstoff.

Säuglinge sind im besonderen Maße auf eine Zufuhr von Carnitin angewiesen, da sie Carnitin zunächst noch nicht selbst synthetisieren können. Aber auch bei vielen verschiedenen Krankheitszuständen, angefangen bei reiner Unterernährung,

parenteraler Ernährung, Dialysepatienten sowie einigen chronischen Erkrankungen sinkt die Carnitinkonzentration im Plasma auf subnormale Werte. Gleiche Tendenzen kann man bei starker körperlicher Belastung und bei Schwangeren feststellen. [LOHNINGER et al., 2005b]

Ein niedriger Carnitinspiegel (sowie ein damit in Zusammenhang stehender hoher Gehalt an freien Fettsäuren) wurde bei schwangeren Frauen als Risikofaktor für Gestationsdiabetes identifiziert.

Da die Prävalenz für Schwangerschaftsdiabetes stetig ansteigt und GDM eine der häufigsten Komplikationen in der Schwangerschaft darstellt [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003], beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Zusammenspiel von Carnitin und Diabetes und dessen Bedeutung in der Schwangerschaft.

### 2.1.2 **Geschichte und Entdeckung**

[LOHNINGER et al., 2005; BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

Carnitin gehört mitunter zu den meist diskutierten Nährstoffen des 21. Jahrhunderts.

Seine Geschichte geht zurück auf das Jahr 1905, als es von zwei Arbeitsgruppen (Gulewitsch und Krimberg, Moskau 1905 und Kutscher, Marburg 1905) fast zeitgleich als Bestandteil der Muskulatur im Liebig'schen Fleischextrakt entdeckt und isoliert und nach „*carnis*“ (= lat. Fleisch) benannt wurde. Für eine sehr lange Zeit wusste man nichts über die Struktur und die Funktion dieses Moleküls. Schließlich gelang es im Jahr 1927 den beiden Wissenschaftlern Tomita und Senju die Struktur des L-Carnitins aufzuklären.

1948 studierte Fraenkel die Vitamine am Modell des weißen Mehlwurms (*Tenebrio molitor*) und entdeckte, dass diese Larven ohne das sog. Vit. BT (T für *Tenebrio*) an einer hochgradigen Verfettung verstarben.

Vier Jahre später wurde dieses Vitamin als Carnitin identifiziert und der Grundstein für die Carnitinforschung war somit gelegt. Bis heute wurden bereits viele Entdeckungen über die physiologischen Hauptfunktionen dieses Stoffes gemacht, dennoch liegt Carnitin auch noch im 21. Jahrhundert im Fadenkreuz der Wissenschaft und die Zahl der Daten explodiert nahezu mit ca. 360 Publikationen im Jahr, also fast einer Publikation täglich.

### 2.1.3 Chemische Struktur/Nomenklatur

Chemisch gesehen handelt es sich bei Carnitin (Abb. 1) um ein Aminosäurederivat, genauer gesagt um eine  $\beta$ -Hydroxy- $\gamma$ -Trimethyl-Aminobuttersäure, ein relativ einfaches und kleines Molekül mit einem Molekulargewicht von 161 g/mol.

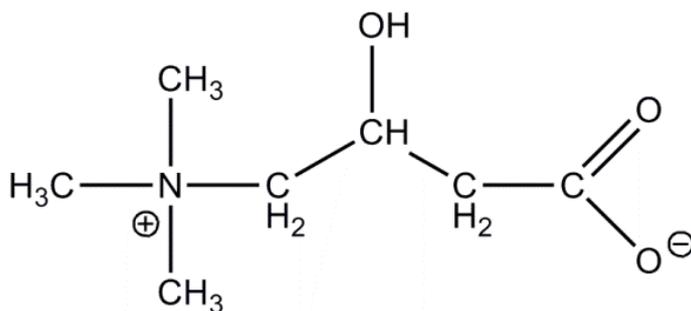


Abbildung 1: Strukturformel von Carnitin

Durch die Carboxylgruppe und quartäre Ammoniumgruppe besitzt Carnitin eine große Polarität, ist daher gut wasserlöslich und besitzt hygroskopische Eigenschaften. Am C3 befindet sich ein optisch aktives C-Atom, welches bewirkt, dass Carnitin zwei Enantiomere hat, wobei in der Natur jedoch nur das L- Carnitin vorkommt.

### 2.1.4 Vorkommen im menschlichen Körper

L-Carnitin kommt im Körper in Gramm-Mengen vor. Tierisches Gewebe enthält meistens zwischen 0.2 und 6  $\mu\text{mol}$  Carnitin pro Gramm. Beim Menschen befinden sich etwa 95-98% davon im Muskelgewebe der Skelettmuskulatur und des Herzens und nur etwa 0.4% zirkulieren im Blut. Dieser Pool wird entweder durch die endogene körpereigene Synthese oder durch die exogene Aufnahme aus Nahrungsmitteln garantiert. Endogenes Carnitin agiert jedoch nicht als Regelmechanismus für die Carnitinbiosynthese. [LOHNINGER et al., 2005a; BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

**Tabelle 1: Carnitinverteilung im menschlichen Körper nach [BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004; LÖSTER, 2007]**

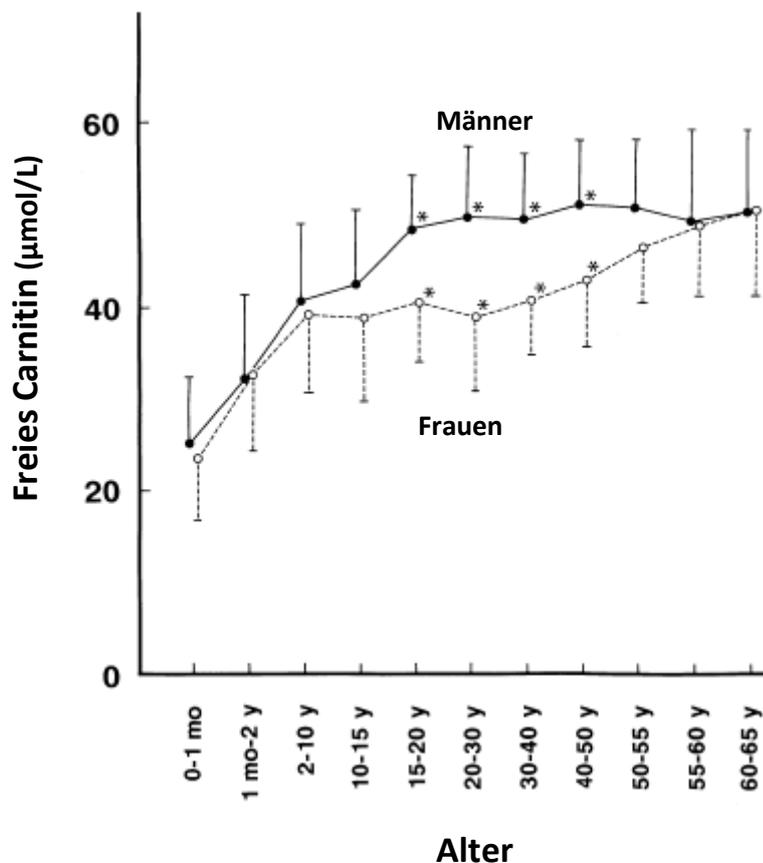
	mg Carnitin pro kg  [mg/kg]	$\mu\text{mol}$ Carnitin pro g bzw. ml  Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	Durchschnittliches Gewebsvolumen  [g bzw. ml]	Gesamt- carnitingehalt im Gewebe  [ $\mu\text{mol}$ ]
<b>Herz</b>	770	4,80 $\pm$ 0,4	280	1340
<b>Skelettmuskel</b>	640	3,96 $\pm$ 0,09	30.000	119.000
<b>Leber</b>	470	2,80 – 2,9 $\pm$ 0,2	1.400	4060
<b>Niere</b>	160	1,00 $\pm$ 0,1	350	350
<b>Gehirn</b>	50	0,30 $\pm$ 0,0	1.610	480
<b>Blutplasma</b>	8	0,0507 $\pm$ 0,0017	2.940	149
<b>Spermien</b>	9.600	65,00		
<b>Immunzellen</b>	160			
<b>Erythrozyten</b>	38			
<b>Muttermilch</b>	12			

Im Vergleich zu Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen ist die Menge an L-Carnitin im menschlichen Körper sehr groß, womit seine Bedeutung für den Körper unterstrichen wird. L-Carnitin kommt in den Organen des Menschen in sehr unterschiedlichen Mengen vor, wobei -wie in Tabelle 1 dargestellt- besonders Muskeln, Herz, Leber, Nebenhoden, Spermien, Immunzellen und die roten Blutkörperchen den größten Teil enthalten. [BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

Generell kann man sagen, dass überall dort, wo viel Energie gebraucht bzw. erzeugt wird, auch viel Carnitin vorkommt. Der Grund für den hohen Carnitingehalt der Muttermilch beispielsweise liegt in seiner Lebensnotwendigkeit für den Säugling, da er Carnitin noch nicht selbst synthetisieren kann.

Die Normalwerte für L-Carnitin im Blut schwanken zwischen 40-60  $\mu\text{mol/l}$ . [KAISER und LOHNINGER, 1987] Im Muskel befindet sich mit ca. 3000 bis 5000  $\mu\text{mol/kg}$  Feuchtgewicht etwa 50- bis 100-mal so viel. Es handelt sich also um einen Konzentrationsunterschied zwischen Blutplasma und Muskelgewebe von etwa 1:100. [REBOUCHE, 1992; STEIBER et al., 2004]

Das Carnitinlevel im Blut wird größtenteils durch die Nieren reguliert und ist alters- und geschlechtsabhängig: Wie in Abb. 2 dargestellt, verfügen Männer über signifikant höhere Carnitinspiegel als Frauen und dies sowohl im Blut, als auch in der Muskulatur. Ebenfalls verändert sich der Carnitingehalt im Muskel mit zunehmendem Alter: der Carnitinspiegel steigt im Kindesalter an, erreicht im Erwachsenenalter seinen Höhepunkt und sinkt im Alter wieder ab. [LOHNINGER et al., 2005; BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]



**Abbildung 2: Altersabhängige Variationen von freiem Carnitin im Plasma; \* signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) zwischen Männer und Frauen [TAKIYAMA und MATSUMOTO, 1998]**

Tierisches Gewebe enthält zwischen 0.2 und 0.6  $\mu\text{mol/g}$  Carnitin mit den höchsten Konzentrationen im Herz und im Skelettmuskel. [LOHNINGER et al., 2005a]

Die Ausscheidung von Carnitin und Carnitinderivaten erfolgt über den Urin und die Gallenflüssigkeit. [LOHNINGER et al., 2005a]

### 2.1.5 Vorkommen in Nahrungsmitteln

Carnitin wird meistens aus rotem Fleisch, Geflügel, Fisch und Milchprodukten bezogen und wird in seltenen Situationen zu einem Mangelnährstoff wie etwa bei einer rein veganen Ernährung, Frühchen, Schwangerschaft, Hämodialysepatienten und bei einigen chronischen Erkrankungen. [LOHNINGER et al., 2005a; REBOUCHE, 1992]

Pflanzliche Produkte enthalten wenig bis gar kein Carnitin. [REBOUCHE, 1992]

Rotes Fleisch enthält generell 200 bis 800  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ , Geflügel und Fisch enthält hingegen nur ca. 20 bis 40  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . Der Carnitingehalt der Vollmilch beträgt 20  $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$  und Obst und Gemüse enthalten weniger als 0.1  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ . [REBOUCHE, 1992] Gemüse, Cerealien und Früchte enthalten demnach wenig bis gar kein Carnitin. Veganer haben daher neben dem fermentierten Sojabohnenprodukt Tempeh nur geringfügige Quellen für diesen Nährstoff. [FELLER und RUDMAN, 1988]

In einer 2 Jahre andauernden Studie von Gustavsen wurden hunderte Lebensmittel auf ihren Carnitingehalt analysiert und eine Referenzliste für die Carnitingehalte unserer Nahrungsmittel konnte erstellt werden (Tabelle 2). Daraus ist ersichtlich, dass eine Reihe von Fleischsorten einen Carnitingehalt von über 1000 mg/kg (entspricht 620  $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ ), also einen sehr hohen Carnitingehalt, aufweisen – betroffen sind vor allem Wildtiere, die ständig in Bewegung und auf der Flucht sind. Pflanzliche Produkte sind im Gegensatz dazu, wie schon vorher angeführt relativ Carnitin-arm. [BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

**Tabelle 2: L-Carnitin-Gehalt in Lebensmitteln in mg/kg geordnet nach Produktgruppen nach [GUSTAVSEN, 2000]**

Tierische Produkte					
	mg/kg		mg/kg		mg/kg
Fleischextrakt	36.860	Ziegenrücken	1.120	Flugentenkeule	189
Ziegenkeule	2.210	Kalbsschnitzel	1.050	Wiener Wurst	176
Hirschkalbssteak	1.930	Kalbsrücken	1.020	Weißwurst	170
Lammkeule	1.900	Roastbeef	1.010	Wachtelbrust	166
Känguruhsteak	1.660	Hase	860	Putenkeule/Filet	133
Rehkeule	1.640	Rinderhackfleisch	470	Hinterschinken (Schwein)	121
Lammfilet	1.610	Wildschweinerücken	420	Bierschinken	120
Elchbraten	1.600	Bratwurst	386	Kalbsleberwurst	92
Hirsch	1.500	Corned Beef	320	Mortadella	92
Rinderbraten	1.430	Entenbrust	288	Hähnchenkeule	80
Rinderhüft-steak	1.350	Schweineschnitzel	274	Hähnchenbrust	78
Strauß	1.280	Schweinegulasch	264	Hähnchenfilet	62
Rindsgulasch	1.270	Schweinefleisch	244	Fasanenbrust	60
Rentiersteak	1.210	Kaninchenkeule	232	Entenleber	43
Hasenkeule	1.200	Mettwurst	220	Schweineleber	36
Rinderbeinflfleisch	1.180	Taubenbrust	211	Fleischwurst	30
Pferdefleisch	1.170	Lachsschinken (Schwein)	205	Blutwurst	12
Rehrücken	1.160	Schweinefilet	190	Hühnereier	8

Pflanzliche Produkte					
	mg/kg		mg/kg		mg/kg
Steinpilze getrocknet	388	Möhren	4,0	Mais	1,6
Spitzmorcheln getrocknet	208	Blumenkohl	3,6	Pflaumen	1,6
Pfifferlinge getrocknet	126	Weizen-brötchen	3,5	Erbsen	1,4
Austernpilze	50	Papaya	3,5	Paprika	1,4
Steinpilze frisch	28	Zucchini	3,4	Pfirsich	1,4
Champignons	26	Auberginen	3,0	Bohnen	1,2
Pfifferlinge	13	Paranüsse	3,0	Tomaten	1,1

Nudeln	7,0	Reis	3,0	Bananen	1,0
Mandeln	6,7	Kirschen	2,6	Kiwi	0,8
Erdnüsse	5,8	Haselnüsse	2,5	Blattsalat	0,6
Fenchel	5,3	Walnüsse	2,5	Bier	0,6
Brokkoli	4,8	Kartoffeln	2,3	Äpfel	0,5
Weizenbrot	4,1	Gurken	1,9	Birnen	0,3
Avokado	4,0	Roggenbrot	1,8	Orangen, Zitronen	0,1

Milchprodukte					
	mg/kg		mg/kg		mg/kg
Ziegenkäse	127	Quark	30	Edamer	15
Kondensmilch	97	Briekäse	27	Gouda, jung	14
Schafskäse	65	Zaziki	27	Butter	11
Hüttenkäse	53	Creme Fraiche	26	Hefe	11
Joghurt	41	Molke	22	Kochkäse	11
Milch	40	Gouda, alt	20	Gorgonzola	10
Sahne	38	Camembert	18	Butterkäse	8
Schafskäse/Rind	36	Mozzarella	18	Babybel	6
Milcheis	35	Harzer Käse	17	Margarine	0,5
Buttermilch	34	Frischkäse	16		

Meeresfrüchte					
	mg/kg		mg/kg		mg/kg
Hummer (Körper)	270	Scholle	63	Schellfisch	33
Felsenaustern	243	Schillerlocke	56	Makrele	32
Langusten- schwanz	154	Barschfilets	55	Lachs	31
Hummer (Schere)	142	Meerbrasse	50	Haifisch	30
Seelachsfilet	132	Hecht	40	Krabben (Cocktail)	30
Heringe (gebraten)	124	Seezunge	38	Miesmuscheln	28
Seelachs (Alaska)	97	Hering (Filet)	37	Forelle	28
Heringe (Grün)	86	Kaviar	37	Seeteufel	24
Riesengarnelen	74	Wildlachs	37	Tintenfisch	21
Aal (geräuchert)	65	Thunfisch	34		

### 2.1.6 Carnitin-Aufnahme mit der Nahrung

Die Carnitinaufnahme durch die Nahrung schwankt in der Bevölkerung sehr stark. Mischköstler bzw. Omnivoren nehmen beispielsweise täglich zwischen 120 und 1200  $\mu\text{mol}$  (entspricht 20 – 200 mg) [REBOUCHE, 1992; LÖSTER, 2007] bzw. 100 – 300 mg [FELLER und RUDMAN, 1988], Vegetarier dagegen nur 0,1  $\mu\text{mol}$  Carnitin pro kg Körpergewicht auf. Unter normalen Bedingungen werden bei Mischköstlern etwa 70 – 80% des Nahrungs-Carnitins absorbiert. Deshalb stellt die Carnitinsynthese bei Allesfressern nur ein Achtel bis zur Hälfte des Gesamtcarnitins bereit, wohingegen bei Veganern nahezu 90% des zur Verfügung stehenden Carnitins selbst synthetisiert werden. [REBOUCHE, 1992; LÖSTER, 2007]

### 2.1.7 Carnitin-Biosynthese

Carnitin wird in der Leber und in der Niere aus den zwei essentiellen Aminosäuren Methionin und Lysin synthetisiert. [LÖFFLER, 2008] L-Methionin fungiert dabei als Methylgruppendonator und L-Lysin stellt das übrige Kohlenstoffgerüst und das Stickstoffatom bereit. Proteingebundenes Lysin wird im Rahmen des Protein-Turn Overs verfügbar und durch eine Methyltransferase zu Trimethyllysin umgesetzt. Das proteingebundene  $\epsilon$ -N-Trimethyllysin gilt als Vorläufer für die daran gekoppelte Carnitinsynthese. Der größte Teil des im Körper hergestellten  $\epsilon$ -N-Trimethyllysin wird im Skelettmuskel synthetisiert.

$\epsilon$ -N-Trimethyllysin, welches für die Carnitinbiosynthese vorgesehen ist, unterliegt vier enzymatischen Reaktionen: In der ersten Reaktion wird das durch Proteolyse freigesetzte  $\epsilon$ -N-Trimethyllysin durch die mitochondriale  $\epsilon$ -N-Trimethyllysin-Hydroxylase zu  $\beta$ -Hydroxy-  $\epsilon$ -N-Trimethyllysin hydroxyliert. Durch eine Aldolase (Serin-Hydroxymethyltransferase) wird  $\beta$ -Hydroxy-  $\epsilon$ -N-Trimethyllysin im zweiten Schritt zu Glycin und  $\gamma$ -Butyrobetain-Aldehyd gespalten.

Der Aldehyd oxidiert schließlich zu  $\gamma$ -Butyrobetain durch eine Aldehyd Dehydrogenase und als letzte Reaktion wird  $\gamma$ -Butyrobetain durch eine Hydroxylierung am C3 mittels  $\gamma$ -Butyrobetain-Hydroxylase zu L-Carnitin umgesetzt. [REBOUCHE, 1992]

Beide Hydroxylasen benötigen Sauerstoff und  $\alpha$ -Ketoglutarat als Co-Substrate. Vier Mikronährstoffe spielen als Co-Faktoren für verschiedene Enzyme des Synthesewegs ebenfalls eine bedeutende Rolle, nämlich Vitamin C, Vitamin B 6, Niacin und Eisen. Zudem sind Folsäure und Vitamin B12 an der Synthese beteiligt. [LOHNINGER et al., 2005; KOUMANTAKIS et al., 2001; FELLER und RUDMAN, 1988]

Der gesamte Biosyntheseweg wird in Abb. 3 veranschaulicht:

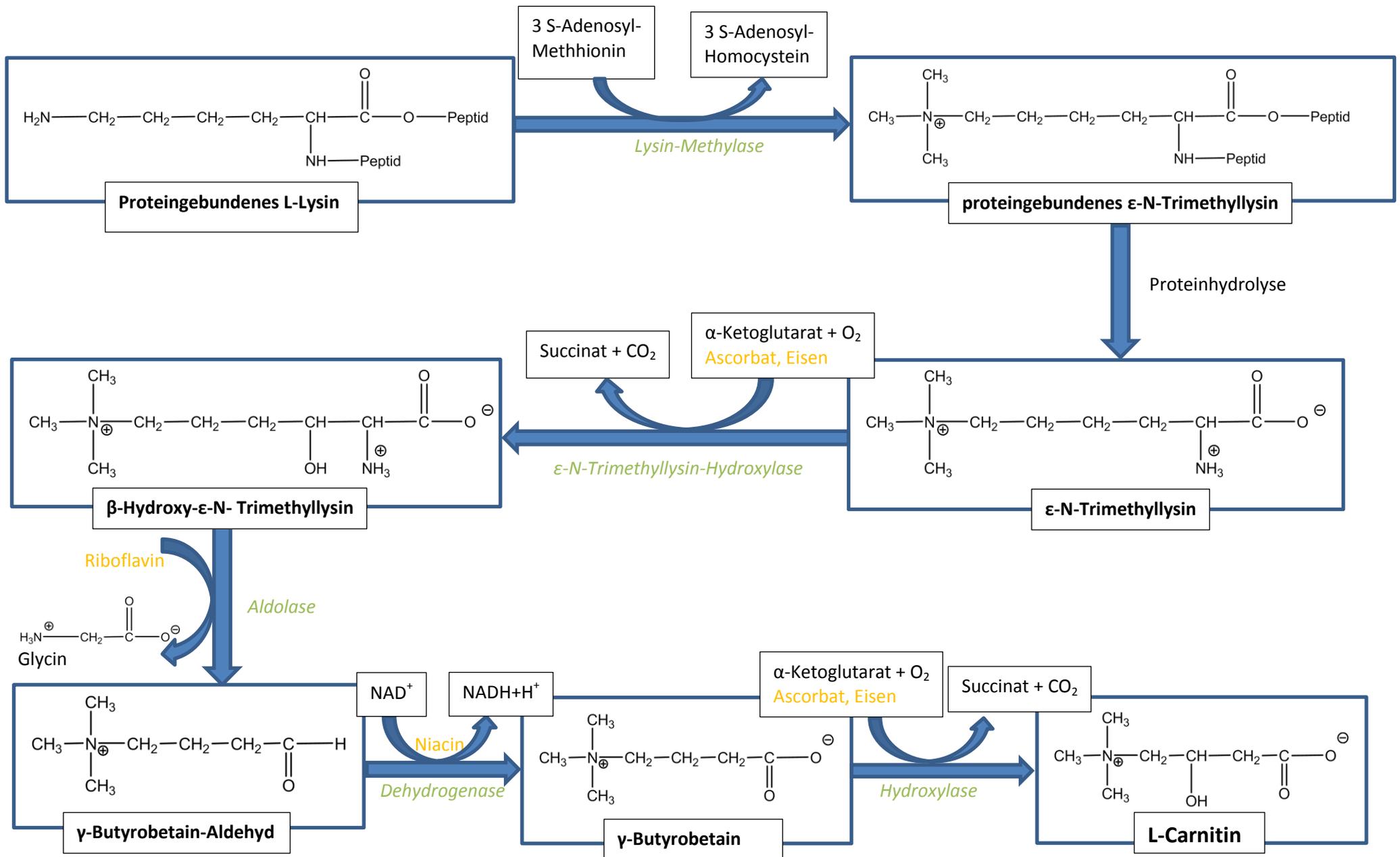


Abbildung 3: Carnitin - Biosyntheseweg

Die Verfügbarkeit von Trimethyllysin limitiert die Carnitin-Biosynthese, wobei die größten Trimethyllysin-Speicher im Protein der Skelettmuskeln lokalisiert sind und somit der Protein-Turn Over im Skelettmuskel als limitierender Faktor der Carnitin-Biosynthese betrachtet wird. Der letzte Syntheseschritt, die Hydroxylierung von Butyrobetain zu Carnitin ist auf die Leber, die Nieren und das Gehirn limitiert. Andere Gewebe sind auf eine direkte Aufnahme von Carnitin aus dem Kreislauf angewiesen, da sie zwar den direkten Vorläufer von Carnitin synthetisieren können, das Enzym welches  $\gamma$ -Butyrobetain zu Carnitin hydroxyliert jedoch fehlt. [LOHNINGER und PITTNER et al., 2005; KOUMANTAKIS et al., 2001]

Die Carnitin-Biosyntheserate wird auf 1,2  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht pro Tag geschätzt. Dieser Schätzwert stammt aus der steady state Rate der Ausscheidung von Carnitin bei erwachsenen Vegetariern und jener bei Kindern. Vegetarier haben einen sehr geringen Carnitingehalt in ihrer Nahrung und, weil Carnitin nicht systematisch abgebaut wird, stellt die Ausscheidung eine sinnvolle indirekte Abschätzung der Carnitinsynthese dar. [REBOUCHE, 1992; STEIBER et al., 2004]

Bei Mischköstlern kommen nahezu 75% des Carnitins aus der Ernährung und nur 25% wird neu synthetisiert. Die Effizienz der Absorption liegt zwischen 65 und 75% und ist somit niedriger als bei proteinogenen Aminosäuren. [LOHNINGER et al., 2005a]

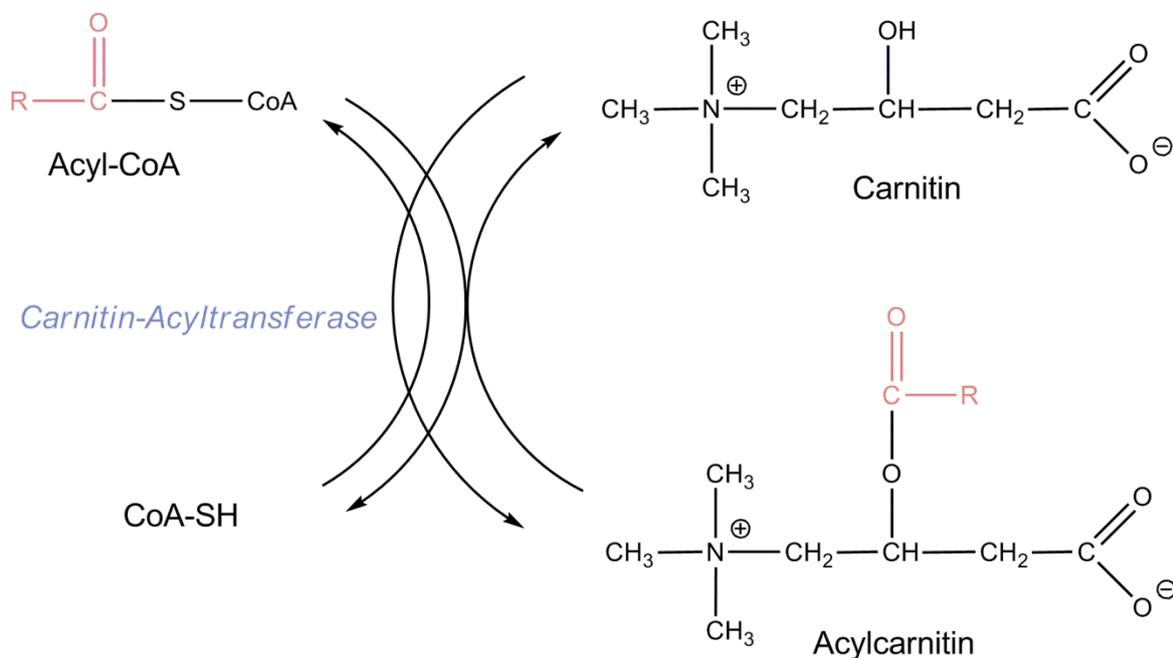
### 2.1.8 **Ausscheidung**

Der einzige bekannte Weg um Carnitin aus dem Körper abzubauen ist die Exkretion mit dem Urin. Die renale Clearance (Ausscheidung) widerspiegelt einigermaßen die Plasma-Konzentration: Wenn das Plasma-Carnitinlevel fällt, sinkt auch die Ausscheidung über den Urin. Carnitin wird auf dieselbe Art und Weise wie Kreatinin durch die Glomeruli gefiltert. Über 90% des gefilterten Carnitins wird durch die renalen Tubuli rückresorbiert. [FELLER und RUDMAN, 1988]

Gesunde Individuen scheiden Carnitin mit einer Rate von 5  $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{Tag}$  aus, was bei einer 80 kg schweren Person ca. 400  $\mu\text{mol}/\text{Tag}$  ausmacht. [STEIBER et al., 2004]

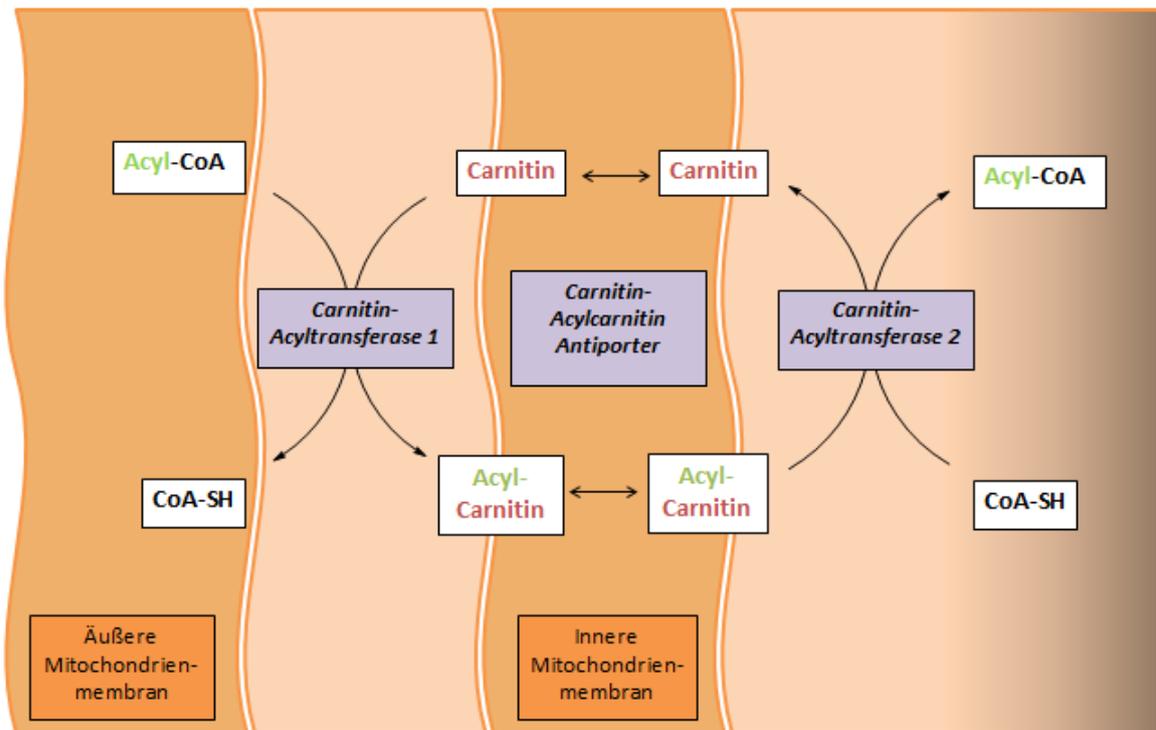
### 2.1.9 Funktion

Carnitin besitzt mehrere Funktionen im Intermediärstoffwechsel. Als besonders wichtig und am längsten bekannt gilt seine katalytische Funktion als Carrier für den Transport langkettiger Fettsäuren (FS) durch die Innenmembran der Mitochondrien, wo der eigentliche Abbau der FS und schließlich die Energiesynthese stattfinden. Carnitin spielt also eine essentielle Rolle in der Fettverbrennung und übt eine Schlüsselfunktion in der Energiebereitstellung im menschlichen Körper aus. Ohne Carnitin kann der Mensch langkettige FS nicht verwerten und somit auch keine Energie daraus gewinnen.



**Abbildung 4: Aktivierung der langkettigen Fettsäuren durch die reversible Bindung an Coenym A mittels Acyl-CoA Synthase und reversible Bindung von Acylcarnitin**

Die durch die Nahrung aufgenommenen oder mit der Lipolyse freigesetzten langkettigen FS werden durch Acyl-CoA-Synthasen aktiviert (Abb. 4). Der intermitochondriale Transport aus dem Cytosol durch die Mitochondrienmembran erfolgt also in Form von aktivierten Fettsäure-Carnitineestern. Dieser spezifische Transportmechanismus von Acyl-CoA besteht aus drei Schritten, die in Abb. 5 dargestellt werden.



**Abbildung 5: Carnitin- Carrier als spezifischer Transportmechanismus von Acyl-CoA (aktivierte Fettsäure-Carnitinester) durch die mitochondriale Innenmembran**

1. Durch die Porin-Poren in der äußeren Membran kann Acyl-CoA problemlos diffundieren, die innere Membran kann jedoch wegen der großen Polarität des CoA-Anteils nicht direkt passiert werden, weshalb die FS (durch Veresterung der langkettigen FS mit der Hydroxygruppe des Carnitins) auf ein membrangängiges Molekül übertragen werden: das Carnitin. Durch das Enzym Carnitin-Acyl-Transferase I (CAT 1) auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran erfolgt die Übertragung des Fettsäurerests vom Acyl-CoA auf Carnitin (Abb. 4), wobei Acyl-Carnitin und CoA-SH entstehen.

2. Durch die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase, ein spezieller Antiporter, wird Acylcarnitin im Austausch mit freiem Carnitin durch die innere Mitochondrienmembran transportiert.
  
3. In den Mitochondrien wird der FS-Rest des Acylcarnitins durch die in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Carnitin-Acyl-Transferase II (CAT 2) von Carnitin auf CoA rückübertragen, wobei wieder Acyl-CoA und freies Carnitin entsteht. Während das Carnitin wieder für den Transport von freien FS zur Verfügung steht, werden die aktivierten FS durch  $\beta$ -Oxidation zu Acetylgruppen abgebaut, welche im Citratzyklus und schließlich in der Atmungskette unter Energiebildung zu  $\text{CO}_2$  und Wasser oxidiert werden.  
[DOENECKE et al., 2005; LÖFFLER, 2008; REBOUCHE, 1992]

Dieser Transportprozess wird durch Fasten, Diabetes, Glucagon und Glucocorticoide stimuliert. [FELLER und RUDMAN, 1988]

Die Regulierung dieses Carnitinsystems übernimmt der „peroxisom proliferator-activated“ Rezeptor, sowie Hormone wie Insulin, Glucagon, Norepinephrin, Schilddrüsenhormone, Dopamin und Androgene. [SCHOLTE, 2011]

Alternativ zu diesem Abbauweg können die Acetylgruppen in der Leber zu Ketonkörpern umgebaut werden. Diese Moleküle werden ins Blut transportiert und über Acetyl-CoA in anderen Zellen oxidiert. [SCHOLTE, 2011]

Der Transport von kurzkettigen FS erfolgt Carnitin-unabhängig und wird von spezifischen Acyltransferasen katalysiert.

Zusätzlich zu seiner Hauptfunktion ist Carnitin an vielen weiteren biochemischen Prozessen im Organismus direkt oder indirekt beteiligt. Einige weitere Funktionen des Carnitins werden kurz angeführt:

- Carnitin puffert potenziell toxische Acyl-CoA Metabolite und reguliert das Verhältnis von Acyl-CoA zu freiem CoA: Wenn die  $\beta$ -Oxidation überproportional ansteigt, oder wenn unter Vermittlung der Pyruvatdehydrogenase viel Pyruvat zu Acetyl-CoA umgesetzt wird, kann sich das Verhältnis in Richtung einer hohen Konzentration von Acetyl-CoA verschieben.
- Eine niedrige Konzentration an freiem CoA beeinträchtigt die Funktion des Citratzyklus, da CoA bei der Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA benötigt wird. L-Carnitin fungiert dabei als Acetylpuffer und regeneriert freies CoA indem der aktivierte Acetylrest vom CoA auf Carnitin übertragen werden kann. Auf diesem Wege können hohe Konzentrationen an Acetyl-CoA sowie von anderen an CoA gebundene Abbauprodukte, welche als Resultat von normalen oder abnormalen Stoffwechselwegen in den Mitochondrien akkumulieren, wie z.B verzweigtkettige Fettsäuren, die bei bestimmten Stoffwechselerkrankungen auftreten, aus den Mitochondrien entfernt und schließlich als Carnitinester über den Urin ausgeschieden werden. Dieser Weg ermöglicht es, unter Konditionen einer Überproduktion an Acetyl-CoA, welches schneller produziert als gebraucht wird, intramitochondriales CoA zu regenerieren. [LOHNINGER et al., 2005; BRODERICK et al., 2000; REBOUCHE, 1992]
- Carnitin und auch Acylcarnitine schützen vor Vergiftung durch (Neuro)toxine (neuroprotektiver Effekt) und korrigieren Mitochondrien-, Lipid- und Neurotransmitterrezeptor- Anomalitäten im alternden Gehirn und Herz.

- Carnitin fördert die Integrität und die Funktion der Zellmembran und ist an der Membran-Instandhaltung durch Reacylierung beteiligt, ein Prozess, der in allen Zellen (von Erythrozyten bis zu Neuronen) stattfindet.
- Carnitin stabilisiert die Zellmembran und verhindert  $\text{Ca}^{2+}$  Überladung
- Carnitin reguliert die Aktivität vieler mitochondrialer Enzyme welche im Citratzyklus, der Gluconeogenese, dem Harnstoffzyklus und der Fettsäureoxidation involviert sind.
- Intrazelluläre Carnitinlevel beeinflussen (zusätzlich) die Transkriptionsrate von Enzymen. Es wurde ermittelt, dass Carnitin-Acyltransferasen und Carnitin in Bezug auf die Kontrolle des oxidativen Metabolismus, Adipogenese, Glycolyse und Glyconeogenese, denkbar an der Regulation von Transkriptionsfaktoren und einer großen Varietät von Genen mitwirken können. [LOHNINGER et al., 2005a]
- Microsomale Carnitin-Acyltransferasen sind in die Lipoproteinsynthese der Leber (VLDL) involviert.
- Carnitin ist in die Acetyl-Bereitstellung für Cholin, Aspartat, Lipide, Histone und Proteine involviert.
- Carnitin stimuliert die Transkriptionsaktivität des Glucocorticoid Rezeptors (GR  $\alpha$ ).
- In der fetalen Lungenreifung konnten additive Effekte von Carnitin und Bethametason (Glucocorticoid-Steroid) im Falle einer Frühgeburt festgestellt werden.
- Carnitin fördert die Reifung des Fetus, der fetalen Lungen und des Spermas.
- Carnitin gilt als peripherer Antagonist der Aktivität der Schilddrüsenhormone: es inhibiert den Einstrom von Trijodothyronin und

Thyroxin in den Zellkern. Von Benvenaga et al. konnte gezeigt werden, dass durch 2-4 g L-Carnitin pro Tag Hyperthyreose-Symptome sogar in der schwerwiegendsten Form von Hyperthyreose, der thyreotoxischen Krise, aufgehoben werden können.

- Bei Nagetieren unterdrückt eine Behandlung mit Carnitin (50-100 mg/kg Körpergewicht) merklich die Lipopolysaccharid-induzierte Cytokin-Produktion und steigert damit ihre Überlebenschancen bei Kachexie und septischem Schock.
- Carnitin stimuliert die Immun-Antwort und verringert entzündungsfördernde Cytokine.
- Carnitin reduziert die ex vivo Abgabe von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in *Staphylokokkus aureus*-stimulierten menschlichen polymorphonuclearen Leukozyten. Des Weiteren wurden erniedrigte Serum-TNF $\alpha$ -Levels nach Carnitin-Supplementierung bei chirurgischen Patienten und AIDS-Patienten berichtet.
- Millimolare Konzentrationen von Carnitin steigern die Osteoblasten-Aktivität in vitro.
- Carnitin reduziert oxidativen Stress und inhibiert die Apoptose (Zelltod) durch eine Interaktion mit dem FasL (Fas-Ligand)-FasR (Fas-Rezeptor)-System. Die Signaltransduktion über den Fas-Rezeptor aktiviert die Sphingomyelinase (in den Lysosomen) und dadurch geschieht ein breakdown von Sphingomyelin und Ceramid wird freigesetzt. Die direkte Inhibierung der Sphingomyelinase durch Carnitin und dadurch die Verhinderung der Ceramidbildung aus Palmitat sowie die Öffnung der permeablen Poren konnte bereits in vivo und in vitro nachgewiesen werden.

- Ein anderer antiapoptotischer Mechanismus von Carnitin konnte in T-Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei eine Supplementierung von L-Carnitin und als Konsequenz eine Reduzierung der Ceramide das Level des Insulin-like growth factor (IGF-1) im Serum stimulieren.
- Carnitin inhibiert Caspasen (Enzyme der Apoptose).
- Maturama et al. berichten von einem Zusammenhang zwischen L-Carnitin und Stammzellen sowie Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems (Blutbildung), sowie einer Stimulierung der Erythropoese (Bildung der roten Blutkörperchen) durch Carnitin.
- Carnitin hält die Fluidität der Erythrozyten in Stand.
- Bei Inkubation von Thrombozyten (Blutplättchen) mit Carnitin wird eine Dosis-abhängige Collagen-induzierte Blättchenaggregation, Thromboxan A<sub>2</sub>-Bildung (=Prostaglandin) inhibiert und als Konsequenz daraus resultiert ein reduziertes Risiko von Arteriosklerose.
- Klinische Versuche mit Acyl-Carnitin zeigen einige Verbesserungen bei Alzheimer oder Demenz-assoziierten kognitiven Dysfunktionen.
- Carnitin ist im Stande dosis-abhängige Arachidonsäure-Aufnahme in Phospholipide und Arachidonsäure-Abgabe (und damit einhergehende Entzündungsprozesse) zu inhibieren.
- Volek et al. berichten von einer signifikanten Abänderung der anwendungs-induzierten Steigerung von: Plasma-Marker des Purin-Katabolismus (Hypoxanthin und Xanthin Oxidase), Harnsäure im Serum, zirkulierende cytosolische Proteine/Myoglobin, FS-Bindungsprotein und Kreatin-Kinase durch orale Supplementierung von L-Carnitin-L-Tartrat.

- Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Carnitin den altersassoziierten Abfall des Cardiolipin-Levels, der Aktivität von verschiedenen mitochondrialen Translokasen und der Cytochrom-C-Oxidase umdreht, was wiederum darauf hindeutet, dass viele andere Carnitin-Funktionen neben seiner Rolle im FS-Metabolismus existieren.

[LOHNINGER und PITTNER et al., 2005; SCHOLTE, 2011; BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

### 2.1.10 Theoretische Gründe für zellulären Carnitin-Mangel oder Beeinträchtigung der Carnitin-Funktion

Theoretisch gibt es mindestens sieben verschiedene Gründe für eine Beeinträchtigung der Carnitin-Funktion in den Zellen, welche sich teils auch überlappen:

#### 1) *Reduzierte Kapazität für die Biosynthese.*

Dafür gibt es viele verschiedene Gründe: unzureichende Aufnahme von Lysin, Methionin oder den Co-Faktoren durch Mangelernährung; Fortgeschrittene Erkrankung einer der beiden Hauptorgane der Carnitinsynthese – Skelettmuskel und Leber; Frühreife des biosynthetischen Stoffwechselwegs bei Neugeborenen; Eine angeborene Blockierung im biosynthetischen Stoffwechselweg.

#### 2) *Subnormale CPT A.*

#### 3) *Subnormaler Transport von Carnitin durch die Zellmembran.*

#### 4) *Subnormaler Transport von Carnitin durch die Mitochondrienmembran.*

#### 5) *Subnormaler transepithelialer Transport (Dünndarm, Nierentubulus).*

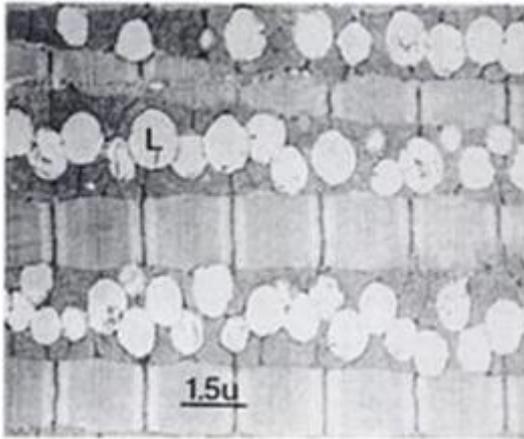
- 6) *Übermäßige Verluste* durch Erkrankungen der Nierentubuli, Hämodialyse, Acidose, Medikamente (Benzoate, Lidocain, Pivaloyl Antibiotikas, Valproate,...), Diarrhoe...
- 7) *Erhöhter Carnitin-Bedarf*: rasches Wachstum bei Kleinkindern, Sättigung von unterernährten Kindern und Erwachsenen; Schwangerschaft und Stillzeit, erhöhte Acyl-Belastung. [FELLER und RUDMAN, 1988; SCHOLTE, 2011]

### 2.1.11 Carnitin-Mangel

In verschiedenen Lebenssituation kann es zu einer Unterversorgung an Carnitin kommen und es kann sich in weiterer Folge sogar ein sekundärer Carnitinmangel einstellen, z.B. bei schwangeren Frauen, Diabetikern, Sportlern (die sich vegetarisch ernähren), bei langfristiger parenteraler Ernährung, Dialyse usw.

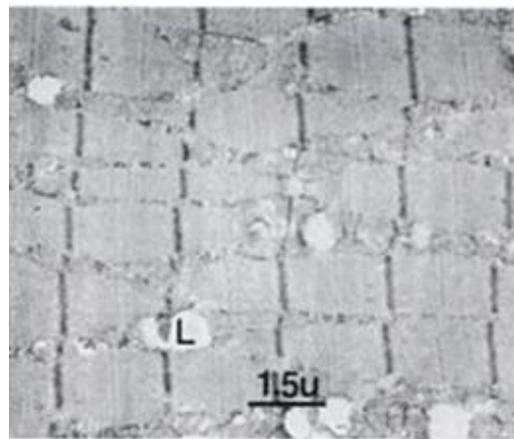
Bei einem klinischen Carnitinmangel sinkt die Fettverwertung und die Fettverbrennung wird reduziert. Daher lagert der Körper bei einem Carnitinmangel meist mehr Fett ein und die gesamte Energieproduktion wird negativ beeinflusst. Als Folge davon gilt rasche Erschöpfbarkeit, Leistungsminderung, Schwächung des Immunsystems, Müdigkeit, Muskelschwäche, Verschlechterung der Blutparameter, Herzerkrankungen, Leberfunktionsstörungen usw.

Eine Gewebeprobe aus dem Trizeps bei einem Patienten mit Carnitinmangel (Abb. 6a und 6b) im Herzzentrum Berlin, zeigt wie sich im Extremfall das Fett in der Muskulatur ansammelt. [BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]



**Abbildung 6a: Fetttropfchen im Trizeps eines Patienten mit L-Carnitin Mangel**

[BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]



**Abbildung 6b: Nach 6-monatiger Therapie durch die Gabe von L-Carnitin**

Nach einer Carnitin Supplementierung über einen Zeitraum von 6 Monaten konnte das Fett durch die Muskulatur des Patienten wieder besser abgebaut werden.

[BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

Wenn der Carnitin-Defekt die Leber involviert, wird die Anlieferung von Ketonkörpern und die Nutzung von langkettigen FS während eines Hungerzustandes abgeschnitten; Jedes Gewebe wird glucoseabhängig. Wenn der hepatische Carnitin-Pool aufgebraucht ist, kann dadurch eine nonketotische, insulinopenische (Reduzierung von Insulin) Hypoglykämie ausgelöst werden. Dadurch, dass die Energiegewinnung der Hepatocyten von den Fettsäuren abhängt (während des Fastens) löst der Carnitinabbau ebenfalls klinische Leberfunktionsstörungen aus, gekennzeichnet durch Hyperammonämie, Enzephalopathie, Hyperbilirubinämie. [FELLER und RUDMAN, 1988]

### 2.1.12 Therapeutische Eigenschaften und Supplementierung

Carnitin gilt als ein erwünschter und generell sicherer therapeutischer Wirkstoff, da bei einer Supplementierung bis zu 3000 mg/d keine negativen oder toxischen Effekte bekannt sind. Weshalb Carnitin mittlerweile als anerkanntes verschreibungspflichtiges Medikament für die Behandlung von primären und einigen sekundären Carnitinmängeln gilt.

Jedoch auch nicht rezeptpflichtig ist Carnitin in verschiedenen Rezepturen erhältlich - vor allem als Nahrungsergänzungsmittel, oft auch angepriesen als ein Hilfsmittel zur Gewichtsreduktion oder um die sportliche Leistungsfähigkeit zu steigern. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Carnitin weit mehr in Metabolismus, Gesundheitsvorsorge, Fitness und Wellness involviert ist als bisher angenommen, sofern es in einer reinen Form supplementiert und in einer korrekten und ausreichenden Dosis angewandt wird. [PITTNER et al., 2005]

Carnitin wird bereits bei einer großen Variation von Erkrankungen supplementiert. Dazu zählen: AIDS, Diabetes mellitus, chronische Ermüdungserscheinungen, durch Chemotherapie oder Interferon- $\alpha$  induzierte Ermüdungserscheinungen, ADHD (Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom), sowie bei angeborenen Fehlern im Carnitin-System, der  $\beta$ -Oxidation, mitochondrialen Acyl-CoA-gekoppelten Enzymen, oxidativer Phosphorylierung, oder bei kardiovaskulären Erkrankungen.

Nicht nur freies Carnitin sondern auch Carnitinester werden für die Therapie genutzt, Acetylcarnitine beispielsweise für Gehirnerkrankungen, Propionylcarnitin für kardiovaskuläre Funktionsstörungen, sowie bei Erschöpfungszuständen.

Eine Carnitin Supplementierung wird ebenfalls für gesunde Babys, welche keine Milch konsumieren, schwangere und stillende Frauen, Sportlern, bei Mangelernährung und für Tierfütterung empfohlen.

Wie bereits vorher erwähnt, gelten Carnitin, Acetylcarnitin und Propionylcarnitin als relativ sicher und nur einige wenige Nebenwirkungen in einer Minderheit von Patienten wie etwa Diarrhoe, Schlaflosigkeit, oder Trimethylaminbildung- ein fauliger Fischgeruch der Haut und Haare - sind bekannt. Diese Nebenwirkungen können gewöhnlich durch eine niedrigere Aufnahmedosis oder durch eine zusätzliche Supplementierung mit Riboflavin aufgehoben werden.

Carnitin verbessert die Lebensqualität bei einer großen Anzahl an chronischen Erkrankungen. [SCHOLTE, 2011]

In Anbetracht der altersassoziierten Down-Regulierung der Carnitin-Acyltransferasen, sollte die Carnitin-Supplementierung besonders bei älteren Menschen in Betracht gezogen werden. [LOHNINGER und PITTNER et al., 2005]



## 2.2 Schwangerschaftsdiabetes

### 2.2.1 Definition

Schwangerschafts- bzw. Gestationsdiabetes (GDM) wird definiert als eine Kohlenhydratstoffwechselstörung, welche erstmals in der Schwangerschaft auftritt oder diagnostiziert wird, und beschreibt eine Form der Hyperglykämie. [PSCHYREMBEL, 2004; KAUTZKY-WILLER et al., 2007; AG DIABETES UND SCHWANGERSCHAFT, 2011]

Die Definition umfasst jeden GDM, d.h. ebenfalls die Möglichkeit der Erstmanifestation eines Typ 1 oder 2 Diabetes Mellitus oder anderer spezifischer Formen während der Schwangerschaft, sowie einen präkonzeptionell entwickelten Diabetes mellitus (DM) Typ 2, der jedoch erst während der Schwangerschaft erkannt wird. Eine genaue Unterscheidung zwischen einem manifesten DM und einem DM, der lediglich während der Schwangerschaft auftritt ist erst nach der Geburt möglich. [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003; AG DIABETES UND SCHWANGERSCHAFT, 2011]

Da es sich bei dieser Erkrankung um eine spezielle Form des DM handelt, fällt sie in der Klassifikation des ICD 10 in eine eigene Kategorie: O24.4. [ICD-10 2011]

### 2.2.2 Häufigkeit

GDM ist mit steigender Tendenz eine der häufigsten Schwangerschaftskomplikationen weltweit, [AG DIABETES UND SCHWANGERSCHAFT, 2011] wobei die Prävalenz laut internationalen Studien Schwankungen zwischen 1% -20% unterliegt. [HIGGINS et al., 2010; SCHUH, 2007]

Diese große Schwankungsbreite resultiert aus der unbekanntem Häufigkeit bereits bestehender DM Typen vor der Schwangerschaft, dem methodischen Vorgehen (unterschiedliche Screeningverfahren) und den unterschiedlichen Bewertungskriterien (verschiedene Grenzwerte) für den GDM. [AG DIABETES UND SCHWANGERSCHAFT, 2011] Des Weiteren existiert eine hohe Variation zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen (analog zu DM Typ 2, höher in Gruppen mit erhöhter Prävalenz für Hyperglykämie). [BUCHANAN und XIANG, 2005]

In Mitteleuropa liegt die Prävalenz für GDM bei 5-7%, Tendenz steigend. [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003]. Im Jahr 2010 waren beispielsweise in Deutschland bei der Entbindung bei rund 650.000 Geburten fast 24.000 Mütter (3.7%) davon betroffen. Im Jahre 2002 waren es im Vergleich dazu lediglich 8.000 Mütter (1.5%), wobei diese steigende Tendenz nicht zuletzt mit der Zunahme von Adipositas bei jungen Frauen zusammenhängt. [DGE, 2011]

### 2.2.3 Entstehung/Ätiologie

Jede Schwangerschaft stellt durch die Umstellung des Organismus eine erhebliche Belastung für den mütterlichen Stoffwechsel dar. [SCHUH, 2007]

Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die Insulinsekretion mit der Insulinsensitivität durch eine negative Feedback-Schleife gekoppelt: Dabei kompensieren die pankreatischen  $\beta$ -Zellen jede Veränderung in der Gesamtkörper-Insulinsensitivität durch eine angemessene und wechselseitige Änderung in der Insulinsekretion. [RETNAKARAN, 2009]

Während der Schwangerschaft unterliegt der weibliche Körper jedoch massiven Veränderungen. Unter anderem ist davon auch der Kohlenhydratstoffwechsel betroffen:

Während zu Beginn der Schwangerschaft die Insulinsensitivität eher ansteigt und relativ niedrige Nüchternblutglucosewerte gemessen werden, nimmt diese in der 2. Schwangerschaftshälfte kontinuierlich ab. Diese progressive Insulinresistenz beginnt in der Mitte der Schwangerschaft und schreitet bis ins 3. Trimester auf Levels voran, welche sich der Insulinresistenz, die bei Individuen mit DM Typ 2 beobachtet werden, annähern. [RETNAKARAN, 2009] Sie führt zu einer kompensatorischen Insulin“mehr“sekretion und stellt eine große Herausforderung für die  $\beta$ -Zellen dar.

Im Normalfall kann die physiologische Abnahme der Insulinsensitivität durch eine gesteigerte Insulinsekretion ausgeglichen werden. Ist der kompensatorische Anstieg der Insulinsekretion jedoch ungenügend, um die Insulinresistenz der Schwangerschaft völlig auszugleichen, kommt es schließlich zum sogenannten Gestationsdiabetes. GDM wird also charakterisiert durch eine ungenügende  $\beta$ -Zellfunktion, die nicht in der Lage ist, den erhöhten Insulinbedarf während der Schwangerschaft auszugleichen.

Bei Frauen mit GDM sind der insulinstimulierte Glucosetransport der Skelettmuskulatur und die gesamte Insulinsensitivität während der späten Schwangerschaft signifikant niedriger im Vergleich zu gewichtsgleichen Schwangeren mit einer normalen Glucosetoleranz. Zusätzlich zur reduzierten Glucosetransportaktivität ist GDM assoziiert mit spezifischer Schwächung der Insulinsignale in der Skelettmuskulatur und im Fettgewebe. [FRIEDMAN et al., 2007]

Bedingt wird GDM also durch einen zugrundeliegenden chronischen Defekt der  $\beta$ -Zellfunktion [RETNAKARAN, 2009], oder eine genetische Prädisposition für Diabetes mellitus Typ 2 und hormonellen Umstellungen während der Schwangerschaft (Östrogen, Progesteron, Humanes Plazenta Lactogen, plazentares

Wachstumshormon, Prolaktin und Nebennierenrindenhormone) im 2. Trimenon. Diese diabetogene Stoffwechsellage führt zu einer Reduktion der Insulinsensitivität auf 30-50% und trägt zu einer vermehrten hepatischen Glykogenproduktion bei. [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003]

Es scheint als resultiere die Insulinresistenz aus einer Kombination aus erhöhtem mütterlichem Übergewicht und den Insulin-Desensibilisierungseffekt von hormonellen Produkten auf die Plazenta.

Die pankreatischen  $\beta$ -Zellen erhöhen normalerweise ihre Insulinsekretion um die Insulinresistenz als Folge der Schwangerschaft zu kompensieren. Die daraus resultierenden Veränderungen der zirkulierenden Glukoselevels während der Schwangerschaft sind jedoch sehr gering im Vergleich mit der großen Veränderung der Insulinsensitivität.

Im Generellen resultiert Hyperglykämie aus einer Insulinbereitstellung welche inadäquat ist um die Gewebsbeanspruchung für normale Blutglukoseregulierung zu erfüllen.

Außerhalb der Schwangerschaft gibt es 3 Settings, die als verschiedene Formen der  $\beta$ -Zelldysfunktion anerkannt sind:

➤ *autoimmun*

Typ 1 Diabetes mellitus (DM) resultiert dabei aus einer autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen. Die Prävalenz dafür beträgt in der Gesamtbevölkerung ca. 5-10% und variiert stark zwischen den verschiedenen Ethnien. Typ 1 Diabetes wird charakterisiert durch Antikörper die im Blut zirkulieren, welche direkt gegen die  $\beta$ -Zellen gerichtet sind und deren Zerstörung hervorrufen. Bei einer Minderheit der Schwangeren mit GDM (weniger als 10%) konnten diese Marker im Blutkreislauf nachgewiesen werden.

➤ *monogenetisch*

Diese Form des DM wurde außerhalb der Schwangerschaft in 2 Formen identifiziert: Mutationen der Autosomen (= Chromosomen, die nicht zu den Geschlechtschromosomen gehören) und Mutationen der mitochondrialen DNA mit oftmals bereits klinischen Symptomen wie Gehörlosigkeit. Auch zu dieser Form gehören weniger als 10% der diagnostizierten GDM Fälle. In diesem Falle wird ein bereits existierender DM lediglich in der Schwangerschaft diagnostiziert.

➤ *vorkommend aufgrund eines Insulinresistenz-Hintergrunds*

Diese Form betrifft die meisten Schwangeren mit GDM und entwickelt sich aufgrund einer chronischen Insulinresistenz.

Es besteht die Evidenz, dass die  $\beta$ -Zelldysfunktion in der Schwangerschaft in allen drei Formen verlaufen kann - ein Fakt, der nicht überraschend ist, angesichts dessen, dass GDM als solcher, im Wesentlichen erst beim Screening für erhöhte Glukoselevels bei schwangeren Frauen entlarvt wird. Bei dem Großteil der Frauen mit GDM scheint es sich um eine  $\beta$ -Zelldysfunktion mit dem Hintergrund einer chronischen Insulinresistenz zu handeln. [BUCHANAN und XIANG, 2005]

## 2.2.4 Risikofaktoren

Folgende, in Tabelle 3 aufgelistete Risikofaktoren, scheinen mit dem Auftreten eines Gestationsdiabetes in Verbindung zu stehen:

**Tabelle 3: Risikofaktoren für Gestationsdiabetes**

<b>Hohes Risiko</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prädiabetes in der Anamnese (gestörte Glucosetoleranz und/oder Nüchtern-glucose <math>\geq 100</math> mg/dl)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GDM bei einer vorherigen Schwangerschaft</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwere kongenitale Fehlbildungen in einer vorausgegangenen Schwangerschaft</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geburt eines makrosomen Kind (= Geburtsgewicht <math>&gt; 4500</math>g) in einer vorausgegangenen Schwangerschaft</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Todgeburt oder habituelle Aborte in der Vorgeschichte</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Habituelle Abortneigung (<math>\geq 3</math> Fehlgeburten hintereinander)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes Symptome (Durst, Polyurie, Glucosurie...)</li> </ul>
<b>Mittleres Risiko</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adipositas (präkonzeptioneller BMI <math>\geq 27</math> kg/m<sup>2</sup>)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Höheres Alter der Patientin</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positive Familienanamnese bezüglich DM/GDM bei Familienmitgliedern 1. Grades</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorbestehende Hypertonie (<math>\geq 140/90</math> mm Hg) und/oder Fettstoffwechselstörung (HDL <math>\leq 36</math> mg/dl, ges. TG <math>\geq 250</math> mg/dl)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zugehörigkeit zu einer ethnischen Gruppe mit hoher Diabetesprävalenz (v.a. asiatische Herkunft)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Übermäßige Gewichtszunahme in einer vorherigen Schwangerschaft</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polyzystisches Ovarsyndrom</li> </ul>

[AG DIABETES UND SCHWANGERSCHAFT, 2011; BUCHANAN und XIANG, 2005; KAUTZKY-WILLER et al., 2007]

Meist genügt das Vorliegen eines Risikofaktors für die Entstehung, je mehr Einzelfaktoren sich jedoch addieren, desto höher wird das Risiko für einen GDM.

[BUCHANAN und XIANG, 2005]

## 2.2.5 Auswirkungen der Glukosestoffwechselstörung für Mutter und Kind

### 2.2.5.1 Risiko für die Schwangere

Das Hauptmerkmal des GDM ist die Entwicklung einer diabetischen Fetopathie. Diese bedingt eine höhere Rate an makrosomen Kindern, operativen Entbindungen, neonatalen Hypoglykämien und Anpassungsstörungen bis zur Entwicklung eines metabolischen Syndroms im Kindesalter. [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003]

Frauen, die während der Schwangerschaft GDM entwickeln, haben ein erhöhtes Risiko, in der Folge an einem DM Typ 2 zu erkranken.

Frauen mit GDM haben ein höheres Risiko an perinataler Morbidität und Mortalität, eine höhere Rate an operativen Entbindungen und ein höheres Risiko, postpartal einen DM Typ 2 zu entwickeln. [KAUTZKY-WILLER et al., 2007]

Schwangere mit GDM haben häufiger Harnwegsinfekte und eine Hypertonie als Frauen mit normaler Glucosetoleranz. Patientinnen mit GDM tragen ein 2-3fach höheres Risiko für die Entwicklung einer schwangerschaftsinduzierten Hypertonie und Präeklampsie/Eklampsie. Bei der Geburt steht eine höhere Rate an Kaiserschnitt- und vaginal-operativen Entbindungen im Vordergrund. [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003]

Frauen mit einer GDM Geschichte haben ein 60%ige Chance innerhalb von fünf Jahren nach der Schwangerschaft einen Typ 2 Diabetes zu entwickeln, abhängig von der fortschreitenden Insulinresistenz und der Verschlechterung der Inselzell-Funktion. [FRIEDMAN et al., 2007]

Diabetes in der Schwangerschaft ist assoziiert mit einer erhöhten Rate an kongenitalen Abnormalitäten, spontanen Aborten, perinatalen Komplikationen und Tod des Neonaten. Eine gute metabolische Kontrolle des prägestationalen Diabetes mellitus (PGDM) bei der Empfängnis und während der Schwangerschaft

scheint die Malformationsrate zu reduzieren und eindeutig die Überlebenschancen des Kindes zu erhöhen.

Mütterliche Hyperglykämie im 2. oder 3. Trimester der Schwangerschaft kann Hyperplasie und Hyperaktivität der pankreatischen  $\beta$ -Zellen verursachen, dies führt in weiterer Folge zu einer Insulinüberproduktion und als Konsequenz daraus zu einem exzessiven fetalen Wachstum, unausgereiften Lungen und metabolische Störungen in der Neonatalperiode, wie Hypoglykämie, Hypocalziämie, Hypomagnesiämie und Hyperbilirubinämie. Es hat sich gezeigt, dass die Prävalenz von Übergewicht und Typ 2 Diabetes beim Nachwuchs von diabetischen Müttern höher ist, als bei Kindern, die von gesunden Müttern geboren werden. [WROBLEWSKA-SENIUK et al., 2009]

#### **2.2.5.2 Risiko für das (ungeborene) Kind**

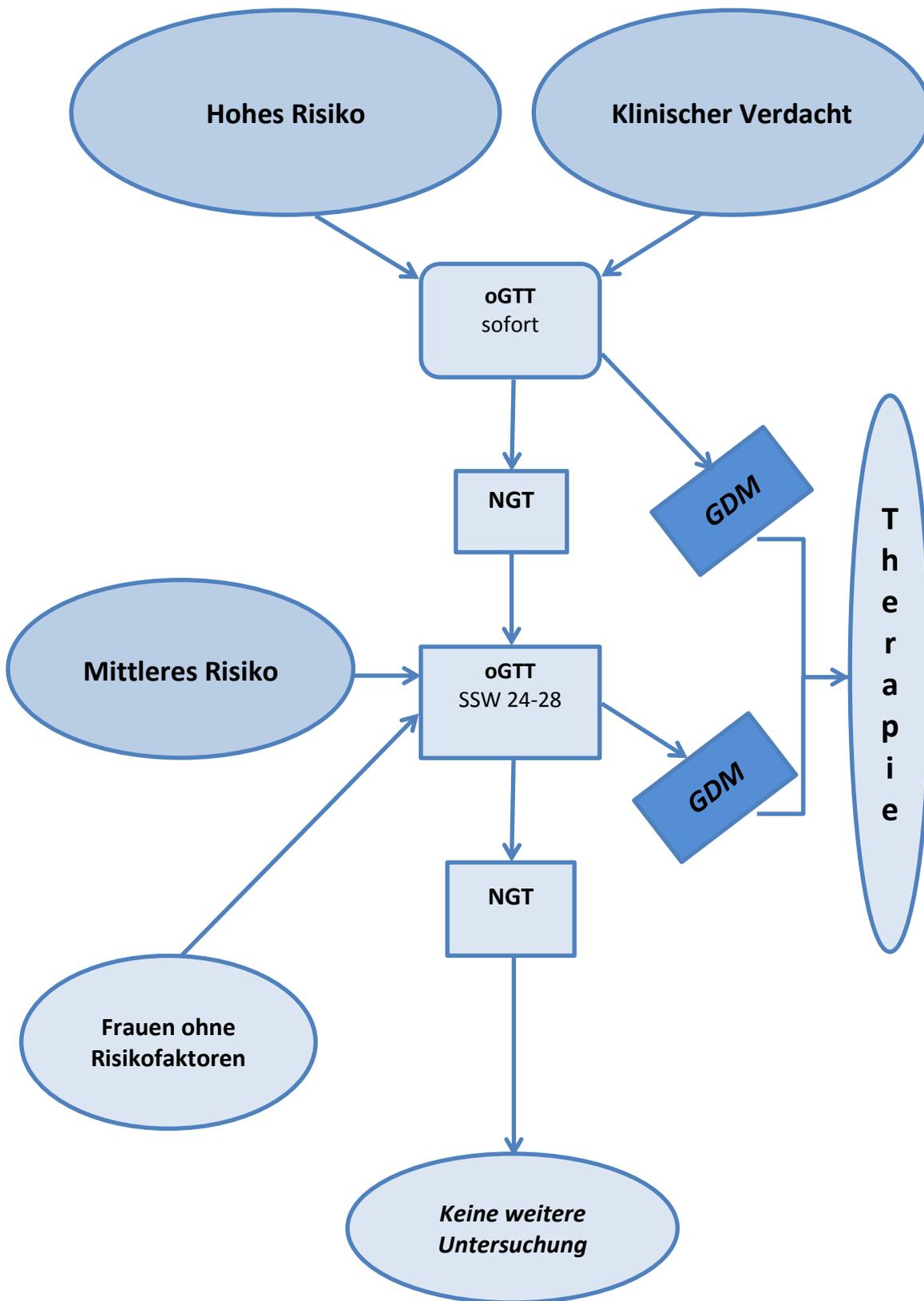
GDM ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko an ungünstigen geburtlichen Ergebnissen/Folgen, hauptsächlich verbunden mit übermäßigem fetalem Wachstum. Diese geburtlichen Folgen inkludieren a) neonatale Risiken wie etwa Makrosomie, Schulterdystokie (gestörter Geburtsverlauf), Geburtsverletzungen, Frühreife und Frühgeburt bzw. perinatale Mortalität und b) mütterliche Risiken wie Präeklampsie und Kaiserschnitt.

### 2.2.6 Diagnose

Aufgrund des erheblichen Risikos für Mutter und Kind, welches durch eine unbehandelte Hyperglykämie in der Schwangerschaft entstehen kann, und die daraus resultierenden Folgen erhält das Screening von schwangeren Frauen auf das Vorhandensein eines GDM eine immer größere Bedeutung und wurde zu einer Standardprozedur in der Behandlung von Schwangeren. [RETNAKARAN, 2009]

In der Regel macht sich Gestationsdiabetes nicht durch Beschwerden bemerkbar, weshalb er nur durch einen Suchtest festgestellt werden kann. [KAUTZKY-WILLER et al., 2007]

In Österreich wurde erst 2010 der orale 75 g Glucose Toleranztest (oGTT) in die Mutter-Kind-Pass-Untersuchungen mitaufgenommen. Mit diesem Test werden Schwangere zwischen der 24. und der 28. Schwangerschaftswoche (= 2. Trimenon) auf GDM getestet. Mehr als 40 Jahre nach der Publikation der originalen Diagnosekriterien gibt es heute jedoch immer noch keinen globalen (einheitlichen) Konsensus der Screening Methode oder der Kriterien zur Diagnose von GDM. [PIRKOLA, 2010] In Abb. 7 werden die Risikoerhebung der Schwangeren und der Weg zur Diagnose von GDM graphisch dargestellt.



**Abbildung 7: Risikoerhebung bei Erstvorstellung der Schwangeren [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003]**

Beim Vorliegen von mindestens einem der oben genannten hohen Risikofaktoren sollte der oGTT schon im 1. Trimenon (vor der 24. Schwangerschaftswoche) durchgeführt und in der 24.- 28. Schwangerschaftswoche wiederholt werden. [AG DIABETES UND SCHWANGERSCHAFT, 2011]

Weiters kann die Risikoabschätzung beim Vorliegen mindestens eines Risikofaktors auch in Form einer Messung der Gelegenheitsglucose oder der Nüchternglucose im venösen Plasma vorgenommen werden. Dabei gelten die folgenden, in Tabelle 4 aufgelisteten Grenzwerte [DGE, 2011]:

**Tabelle 4: Grenzwerte für die Messung von Gelegenheits- und Nüchternblutglucose [DGE, 2011]**

Gelegenheitsglucose $\geq$ <b>200 mg/dl</b> oder Nüchternglucose $\geq$ <b>92 mg/dl</b>	-> Zweitmessung erforderlich
<b>Erhöhte Werte bei der Zweitmessung</b> Gelegenheitsglucose $\geq$ <b>200 mg/dl</b> Nüchternglucose $\geq$ <b>126 mg/dl</b>	-> Bestätigung der Diagnose eines manifesten Diabetes mellitus
Werte der Nüchternblutglucose bei der Zweitmessung <b>zwischen 92 und 125 mg/dl</b>	-> Bestätigung der Diagnose eines Gestationsdiabetes

Ein Schwangerschaftsdiabetes im 2. Trimenon liegt vor, wenn beim oGTT (75 g Glucose, zwei Stunden Dauer unter Standardbedingungen aus venösem Plasma) mindestens einer der 3 Grenzwerte, nach der International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group (IADPSG), in Tabelle 5 überschritten wird:

**Tabelle 5: Diagnosegrenzwerte für Gestationsdiabetes nach IADPSG-Konsensus-Empfehlungen im venösen Plasma [DGE, 2011]**

Grenzwerte im venösen Plasma		
Zeitpunkt	mg/dl	mmol/l
24. bis 27. (+ 6) SSW		
<b>nüchtern</b>	92	5.1
<b>nach 1 Stunde</b>	180	10.0
<b>nach 2 Stunden</b>	153	8.5

### 2.2.7 Neue Leitlinie GDM

[DGE, 2011]

Aufgrund der abweichenden/unterschiedlichen Grenzwerte für den oralen Glucosetoleranztest, sowie um das aus Sicht der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) völlig unzureichende Urinzucker-Screening durch ein Blutzucker gestütztes Verfahren abzulösen, wurde im August 2011 von der DDG zusammen mit der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) eine „Evidenzbasierte Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Gestationsdiabetes mellitus“ entwickelt. Diese Leitlinie soll Ärzten und Ernährungsfachkräften Informationen und Handlungsempfehlungen zu Epidemiologie, Screening, Diagnostik, Folgen und Therapie des GDM geben und sowohl regional als auch international gültige Richtwerte geben.

### 2.2.8 Therapie

Nach der Diagnosestellung eines GDM sollte die Patientin umgehend in eine diabetologische Schwerpunktpraxis überwiesen werden. Dort wird unter enger Zusammenarbeit zwischen Internisten, Geburtshelfern, Neonatologen und Diabetologen die geeignete Therapieform ermittelt.

Die diabetologische Betreuung setzt sich aus folgenden 3 Therapiemaßnahmen zusammen:

#### **1. Ernährungsumstellung**

Durch eine an das Körpergewicht und die körperliche Aktivität angepasste Diät soll eine Ernährungsumstellung erfolgen. Im Vordergrund der Therapie steht dabei eine Ernährungsberatung, bei welcher sowohl individuelle als auch kulturelle und religiöse Besonderheiten der Schwangeren berücksichtigt werden.

Der Referenzwert für die tägliche Energiezufuhr beträgt dabei 25-30 kcal pro kg Körpergewicht, wobei vom Sollgewicht der Patientin ausgegangen wird. Dazu kommen zusätzlich noch 225 kcal täglich, welche den erhöhten Energiebedarf während der Schwangerschaft decken. Die Ernährung sollte sich in der Schwangerschaft aus 30 bis max. 35% Fett, 15% Eiweiß und mind. 40% Kohlenhydrate zusammensetzen. Die Nahrungsaufnahme sollte auf 5-6 Mahlzeiten pro Tag, inklusive einer Spätmahlzeit, aufgeteilt werden.

Generell gilt: Es handelt sich nicht um eine Reduktionsdiät, vielmehr soll auf die Auswahl der Lebensmittel und auf die Verminderung von Lebensmitteln mit schnell resorbierbaren Kohlenhydraten geachtet werden. Die Schwangeren sollten sich nährstoffreich, nicht aber energiereich ernähren.

[D-A-CH, 2008]

## **2. Bewegung**

Moderate körperliche Aktivität (bei unkomplizierten Schwangerschaften) führt zur Verbesserung der Insulinsensitivität und zur Senkung der Blutzuckerwerte. Ein Spaziergang von 30 min, 3 Mal/Woche gilt dabei als effektives Minimum.

## **3. Schulungen zur Blutglucose-Selbstmessung**

Mindestens vier Mal am Tag muss der Blutzucker von den Patientinnen selbst gemessen werden.

Werden die Glucosegrenzwerte überschritten, muss eine individuelle Insulintherapie begonnen werden. Da jedoch in der Schwangerschaft generell auf langwirksame Insulinanaloga verzichtet werden soll und auch bei einigen kurzwirksamen Insulinformen derzeit unzureichende Ergebnisse für Schwangere vorliegen, liegt das Augenmerk der Therapie vor allem auf einer effizienten Ernährungsumstellung, die wenn möglich mit einer angepassten physischen Aktivität einhergeht. [KAUTZKY-WILLER et al., 2007]



## 2.3 Carnitin in der Schwangerschaft

### 2.3.1 Allgemein

Die Schwangerschaft ist ein dynamischer, anaboler Zustand. Während dieser Zeit haben Frauen aufgrund der Notwendigkeit, das Wachstum und die Entwicklung des Fetus, der Plazenta und des reproduktiven Gewebes wie Uterus und Brust zu sichern, einen erhöhten Energiebedarf. [KING, 2000]

Die Energieaufnahme steigt mit dem Fortschreiten der Schwangerschaft signifikant an. Der Fetus im Mutterleib erhält das meiste seines Energiebedarfs von den mütterlichen Kohlenhydraten über die Plazenta. [CHO und CHA, 2005]

Über denselben Weg gelangt Carnitin in den kindlichen Stoffwechsel. Bei der Geburt jedoch findet ein plötzlicher Abbruch dieses Mutter-Fetus-Transfers von Carnitin, sowie der Vorläufer-Aminosäuren Methionin und Lysin statt. [BILLIGMANN und SIEBRECHT, 2004]

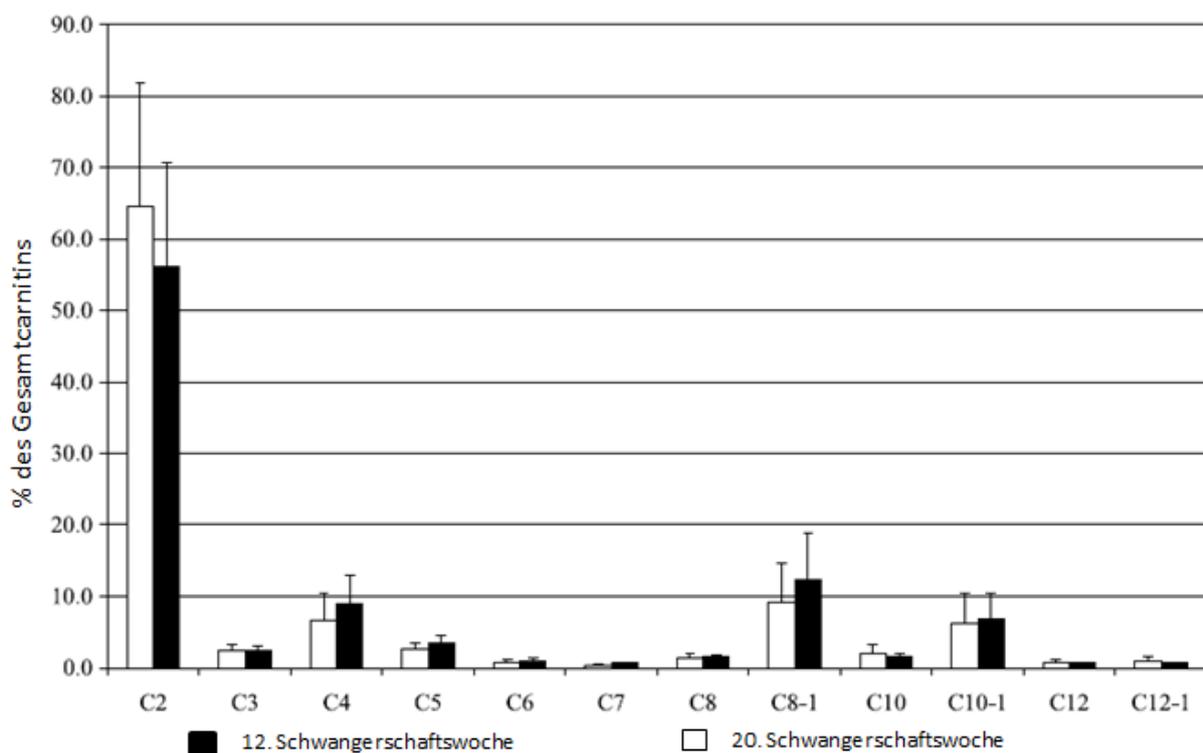
Unter verschiedenen Bedingungen, wie etwa dem niedrigen Vorrat an Carnitin und seiner Vorstufen, zusammen mit der Unreife der Leber und der Annahme, dass Fett die größte Energieressource in der postnatalen Periode darstellt, könnten die niedrigen Carnitin Depots zusammen mit der limitierten Kapazität der Neugeborenen zur Carnitinbiosynthese (bzw. der reduzierten Fähigkeit enzymatische Reaktionen durchzuführen) zur Aufrechterhaltung der neugeborenen Energiehomöostase oder sogar für das Überleben von Frühchen, ohne eine exogene Carnitinaufnahme, kritisch sein. Dies deutet darauf hin, dass Carnitin für Neugeborene essentiell ist. [KOUMANTAKIS et al., 2001; REBOUCHE, 1992]

Der Carnitinspiegel im Plasma sinkt während der Schwangerschaft graduell ab (CHO S W 2005) und bereits in der 12. Schwangerschaftswoche ist der Gesamt-Carnitingehalt im Blut signifikant ( $p < 0.01$ ) niedriger als jener der nicht schwangeren Kontrollgruppe.

Schließlich kommt es zu einem weiteren signifikanten Abfall von der 12. Schwangerschaftswoche bis zur Geburt. [LOHNINGER und KARLIC et al., 2005; LOHNIGER et al., 2009]

Bei der Geburt ist der Carnitingehalt im mütterlichen Plasma etwa auf die Hälfte des Carnitinlevels von nicht schwangeren Frauen herabgesunken. [LOHNINGER und KARLIC et al., 2005]

Diese Reduktion des Gesamt-Carnitins wird größtenteils durch eine signifikante Reduktion des Gehalts an freiem Carnitin (ca. 80% des Gesamtcarnitins) bewirkt, da keine merklichen Veränderungen des Gehalts an kurzkettigen Acylcarnitinen während der Schwangerschaft, wie in Abb. 8 dargestellt, beobachtet werden konnten. [CHO und CHA, 2005; LOHNINGER und KARLIC et al., 2005]



**Abbildung 8: Zusammensetzung ausgeschiedener kurzkettiger Acylcarnitine in der 12. und 20. Schwangerschaftswoche. Auflistung der Fettsäurereste nach Anzahl der C-Atome (C8) und möglichen Doppelbindungen (C8-1)** [LOHNINGER und KARLIC et al., 2005]

Ähnlich niedrige Werte von freiem Carnitin konnten lediglich bei Patienten mit Carnitinmangel nachgewiesen werden. [LOHNINGER und KARLIC et al., 2005]

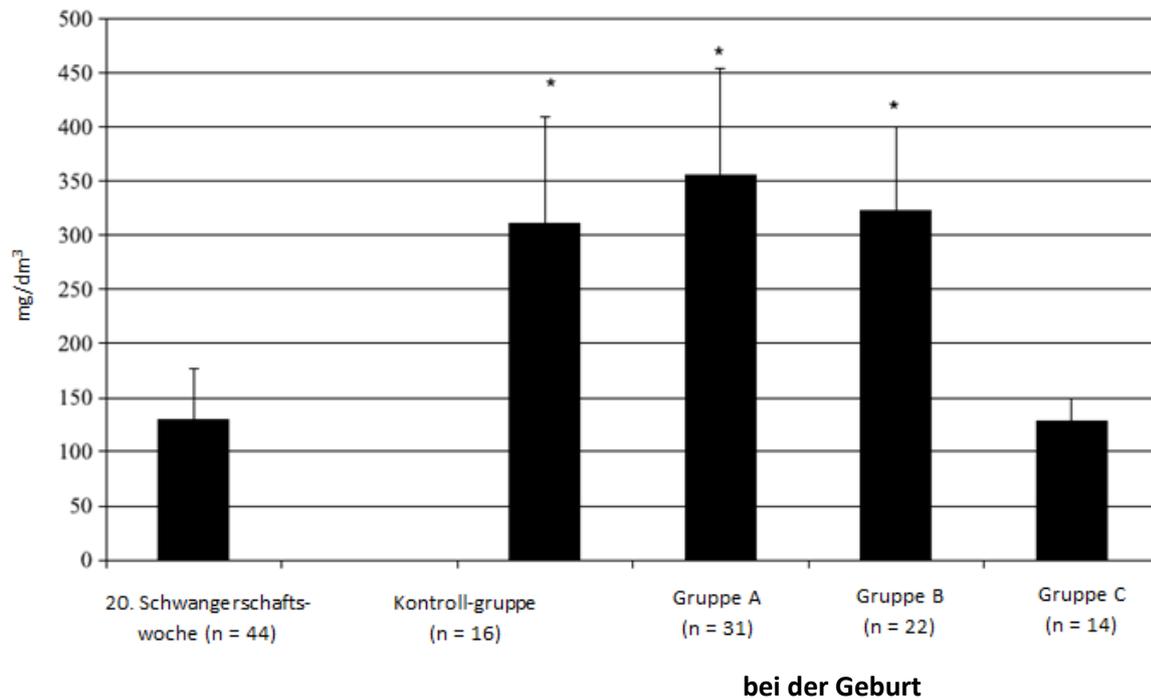
Dieser beobachtete Abfall der Carnitin Konzentration im Plasma während der Schwangerschaft könnte durch eine Reihe von Ursachen ausgelöst werden. Die Steigerung des Gesamt-Körperwassers ist möglicherweise eine davon, wodurch eine erhöhte renale Clearance der Carnitine möglich ist. Carnitin ermöglicht die Ausscheidung von überschüssigen und potentiell toxischen Acylgruppen aus der Zelle, welche als Acylcarnitine mit dem Urin ausgeschieden werden. Es ist möglich, dass ein erhöhter Bedarf an Carnitin nötig ist, um diese metabolische Funktion zu bewerkstelligen. Wenn das so ist, dann würde der Gehalt an freiem Carnitin abfallen und die Ausscheidung der Acylcarnitine ansteigen. [KOUMANTAKIS et al., 2001]

Versuche an Ratten haben gezeigt, dass der Carnitingehalt im Plasma ebenfalls von Androgenen und Östrogenen beeinflusst werden, weshalb hormonelle Veränderungen in der Schwangerschaft ebenfalls für das niedrige Plasmacarnitinlevel während der Schwangerschaft verantwortlich sein könnten. Cho und Cha (2005) haben weiters herausgefunden, dass die Carnitinaufnahme, der Gehalt im Plasma, sowie die Ausscheidung im Urin während der Schwangerschaft verändert sind. Die Aufnahme von Carnitin aus der Nahrung ist in der Schwangerschaft tatsächlich negativ korreliert mit der Carnitinkonzentration im Plasma ( $p = 0.01$ ).

Besonders im Kindesalter und in Lebenssituationen mit erhöhtem Energiebedarf wie Schwangerschaft und Stillzeit kann also der Carnitinbedarf die körpereigene Produktion übersteigen. [CHO und CHA, 2005]

Die niedrigen Carnitingehalte stehen im direkten Zusammenhang mit erhöhten Konzentrationen an freien Fettsäuren im Plasma (Abb. 9), welche eine wichtige physiologische Rolle in den meisten Geweben wie etwa Skelettmuskulatur, Herz, Leber und Pankreas einnehmen.

Chronisch erhöhte Konzentrationen an freien Fettsäuren (FFS), wie sie in der Schwangerschaft vorkommen, sind als ein wichtiger kausaler Zusammenhang zwischen Übergewicht und hepatischer und peripherer Insulinresistenz identifiziert worden. Zusätzlich nimmt die Fähigkeit des Insulins, den Gehalt an FFS niedrig zu halten, von der frühen bis zur späten Schwangerschaft ebenfalls graduell ab. [LOHNINGER et al., 2009]



**Abbildung 9: freie Fettsäuren im Plasma von Schwangeren in der 20. Woche, verglichen mit unsupplementierten (Kontrollgruppe) und supplementierten Schwangeren bei der Geburt;** Werte: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n: Anzahl der Experimente; \* signifikant höher ( $p < 0.001$ ) verglichen mit der 20. Schwangerschaftswoche und Gruppe C; Anfangswerte in der 20. Schwangerschaftswoche; Kontrollgruppe ohne Supplementierung; Gruppe A: Supplementierung mit 0.5 g L-Carnitin pro Tag; Gruppe B: Supplementierung mit 1 g L-Carnitin pro Tag; Gruppe C: Supplementierung mit 2 g L-Carnitin-L-Tartrat pro Tag; [LOHNINGER et al., 2009]

### 2.3.2 Die Rolle der freien Fettsäuren

Die freien Fettsäuren zählen mitunter zu der größten Quelle zur Energiegewinnung für Leber, Niere und Skelettmuskulatur und als Ausgangsstoff für die Triglyceridbildung in der Leber.

In verschiedenen Lebenssituationen mit erhöhtem Energiebedarf stellen FFS eine alternative Energiequelle zu Glucose dar. FFS werden im Körper in Form von Triglyceriden (TG) im weißen Fettgewebe gespeichert und durch die Lipolyse aus den TG wieder freigesetzt.

Nach dem Transport in das Gewebe werden sie größtenteils in den Muskelzellen zur Energiegewinnung oxidiert oder in der Leber in Lipoproteine umgewandelt.

Das Enzym, welches den limitierenden Schritt der Mobilisierung der TG im Fettgewebe darstellt, wird hormonell reguliert. Insulin stellt dabei eines der bedeutendsten Hormone, die bei diesem regulatorischen Prozess eine Rolle spielen, dar und gilt als wirksamstes antilipolytisches Hormon.

Die FFS scheinen eine wichtige Bedeutung für die Insulinsensitivität im menschlichen Körper zu haben, da ihre Konzentration negativ mit der Insulinsensitivität/Empfindlichkeit korreliert. [BALDEWEG et al., 2000; HUSSAIN et al., 2010]

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass ein erhöhter Gehalt an FFS als Risikofaktor für die Entstehung von Typ 2 Diabetes gilt. [KELLEY et al., 1993]

Es wird vermutet, dass dieser erhöhte Gehalt an FFS im Plasma auf eine vermehrte Lipolyse im Fettgewebe zurückzuführen ist, jedoch gehen die Expertenmeinungen dazu auseinander und der genaue Mechanismus (wie ein hohes Angebot an FFS zu Insulinresistenz führt) scheint noch nicht vollkommen aufgedeckt, wobei sehr wohl mehrere Hypothesen dazu manifestiert sind:

1. Bei einem Überangebot an FFS kommt es zu einem Konkurrenzkampf zwischen den beiden Substraten FFS und Glucose, dem sog. Randle Mechanismus, dargestellt in Abb. 10: Dabei wird Energie vermehrt aus der Lipidoxidation gewonnen und die Verwendung von Glucose als Energiesubstrat wird vermindert. Es steigt das Verhältnis NADH/NAD sowie das Verhältnis Acetyl-CoA/CoA, wodurch eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase ausgelöst wird. Die Citratkonzentration steigt an, wodurch die Phosphofruktokinase gehemmt wird und infolge dessen die intrazelluläre Glucose-6-Phosphatkonzentration ansteigt, was wiederum zur Hemmung des Enzyms Hexokinase führt und letztlich einen Rückgang der Glucose-Aufnahme bewirkt.

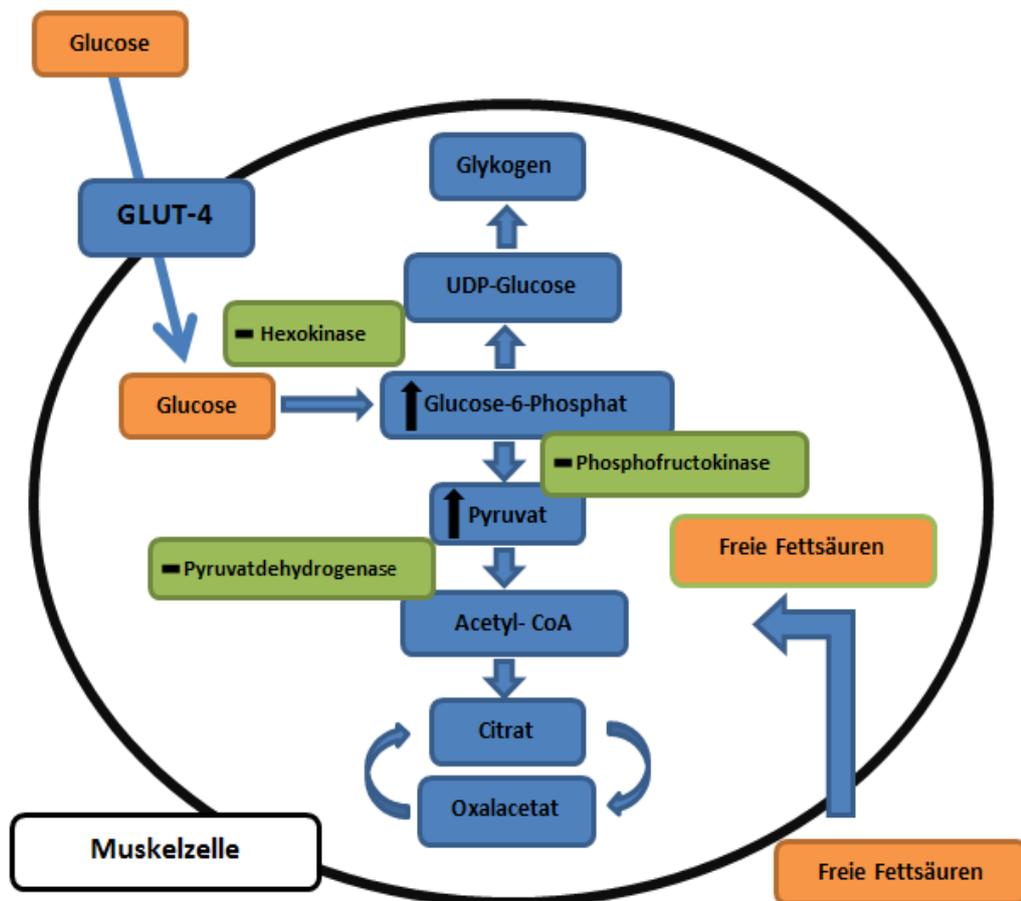


Abbildung 10: Randle-Mechanismus modifiziert nach [RANDLE et al., 2006]

Diese Verwertungsstörung der Glukose charakterisiert die Insulinresistenz. Als Reaktion darauf kommt es zu einer erhöhten Insulinausschüttung, dies wiederum führt zu einer Downregulierung der zellulären Rezeptoren und die Resistenz nimmt weiter zu.

Aus anderen klinischen Studien geht hervor, dass die Substratkompetition nur einen Teil des fettinduzierten Abfalls der Glucose Aufnahme erklärt und die Theorie von Randle der Substratkompetition als alleinige Ursache der verminderten Glucoseaufnahme kritisiert wird. [RODEN et al., 1996]

2. Störung der Insulin-Signaltransduktion auf Post-Rezeptorebene, wodurch das Schlüsselenzym des Glut-4-Transporters (verantwortlich für Glucose Transport in die Zelle) und dadurch der Glucose Transport gehemmt wird. [GRIFFIN et al., 1999]

In verschiedenen Experimenten ist es gelungen, durch eine mindestens vierstündige Fettinfusion bei insulinsensitiven Personen eine akute Verminderung der insulinstimulierten Glucose-Aufnahme hervorzurufen.

Wenn der FS Metabolismus in Richtung Sekretion von Triglyceriden erhöht ist, steigt die Sekretion der TG möglicherweise genügend an, um eine Insulinresistenz zu induzieren.

Es wird jedoch nicht angenommen, dass TG per se mit Insulin Signalen interferieren, sondern vielmehr, dass Acylcoenzym A (CoA-Ester), Diacylglycerol und Ceramide für die Insulinresistenz verantwortlich sind. [ZAMMIT et al., 2001]

Wenn Fettgewebe Insulin-resistent wird, steigt die Lipolyserate und resultiert in einer chronischen Erhöhung der Konzentration von freien FS im Plasma, was wiederum direkt zur Muskel-Insulinresistenz sowie einer erhöhten Rate an VLDL Triglycerid Sekretion der Leber beiträgt. [DU et al., 2006]

Der Anstieg der FS Oxidation, welcher wie vorher erwähnt, vor allem gegen Ende der Schwangerschaft und während der Geburt vorkommt, könnte mit der Überführung von Carnitin zu Carnitineestern assoziiert sein. [CHO und CHA, 2005; KOUMANTAKIS et al., 2001]

Die Pathophysiologie der Insulinresistenz bzw. der gestörten Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas ist bis heute noch nicht geklärt und man geht nun davon aus, dass es sich bei der durch FFS induzierten Insulinresistenz und der daraus resultierenden Entwicklung eines Diabetes mellitus um ein Zusammenspiel aller Hypothesen handelt.

Eine Reduktion von erhöhten freien FS im Plasma als Ergebnis einer erhöhten FS Oxidation sollte ein wichtiges therapeutisches Ziel in der Schwangerschaft, bei Übergewicht und Typ 2 Diabetes sein. [LOHNINGER et al., 2009]

In der Schwangerschaft wird die Kohlenhydratverwertung zusätzlich erheblich von dem Hormonhaushalt beeinflusst. Dabei wird der steigenden Produktion der Plazentahormone HPL (humanes Plazenta Lactogen) und Progesteron als antiinsulinären Hormonen besondere Bedeutung beigemessen. Man spricht von einer wachsenden Insulinresistenz, wobei HPL die Aktivierung der hormonsensitiven Lipase und somit die Freisetzung von FFS aus TG bewirkt und Progesteron, in jenen Konzentrationen, in denen es im letzten Schwangerschaftsdrittel gemessen wurde, zu einer verringerten peripheren Insulinempfindlichkeit führt. Ebenfalls steigt der Plasmaspiegel des Hormons Cortisol (= Gegenspieler des Insulins) im Laufe der Schwangerschaft an, was wiederum eine Verringerung der Insulinempfindlichkeit von Muskel und Leber bewirkt. [BECK und DAUGHADAY, 1967; KALKHOFF et al., 1970]

In der ersten Zeit der Schwangerschaft ist die Insulinsensitivität noch normal bis leicht erhöht und der Insulin- und Glucosespiegel entsprechend niedrig. Ab der 2. Hälfte der Schwangerschaft kommt es jedoch zu einem erhöhten Gehalt an FFS, einer deutlichen Abschwächung der Insulinwirkung auf die Glucoseneubildung in

der Leber, sowie auf deren Aufnahme in die Skelettmuskulatur. Es kommt zu einer Insulinresistenz – die Insulinmengen reichen nicht mehr aus, um die Gluconeogenese sowie die Lipolyse zu hemmen, die Glycogensynthese zu fördern und die Glucose aus dem Blut in die Muskelzellen zu transportieren. Die Schwangere ist auf Grund der Glukosetoleranzstörung nicht mehr in der Lage, die Insulinproduktion als Antwort auf die Insulinresistenz entsprechend zu steigern und es kommt zu einem relativen Insulinmangel. Beobachtet wurde bei schwangeren Frauen mit Gestationsdiabetes etwa die exzessive Ausschüttung von Proinsulin bei der Glukosebelastung, infolge der erhöhten Anforderungen an die  $\beta$ -Zellen aufgrund der verringerten Insulinsensitivität der Zielzellen. [KAUTZKY-WILLER et al., 2001]

### 2.3.3 Supplementierung

[LOHNINGER et al., 2009]

Die Schwangerschaft verursacht eine Reduktion von TC und FC Levels im Plasma und eine auffällige Erhöhung der freien FS Levels. Dies hat, wie schon erwähnt, wichtige physiologische und pathophysiologische Konsequenzen, wodurch die Überlegung der Carnitin-Supplementierung legitimiert wird.

Lohninger et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass eine Supplementierung bei Schwangeren mit 2 g L-Carnitin pro Tag in einer 5- bis 10fachen Steigerung der relativen mRNA–Levels von Carnitin-Acyltransferasen und OCTN2 (organic cation/carnitine Transporter = Carnitin-Carrier für die renale Reabsorption), resultiert. Es konnten damit Werte erreicht werden, wie sie in nichtschwangeren, gesunden Probanden gefunden wurden.

Es ist bekannt, dass L-Carnitin sehr effektiv die Insulin-vermittelte Glucose-Freisetzung bei Gesunden sowie bei Typ 2 Diabetes Patienten verbessert. Es wird vermutet, dass diese Verbesserung nicht zuletzt auf dem Entfernen von Acetatgruppen wie Acylcarnitin aus der mitochondrialen Matrix basiert. [VAN DER LEIJ et al., 2000] Vor allem die urinäre Ausscheidung von Pivalyl-Carnitin oder Valproyl-Carnitin während der Therapie sowie die korrespondierenden Carnitin-Ester der  $\beta$ -Oxidationsintermediaten bei Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel-Patienten demonstriert den umfangreichen Transport von intrazellulären Estern [RAMSAY et al., 2001], was zu einem Mangel an freiem Carnitin führen könnte.

Des Weiteren haben Zellkultur-Experimente gezeigt, dass niedrige Konzentrationen an freiem Carnitin in einer 2-3fachen Downregulierung der Carnitin-Acyltransferasen resultieren, welche durch die Carnitin Supplementierung in einer Dosis-Wirkungsbeziehung wiederhergestellt werden.

Die Carnitin Supplementierung resultiert in einem signifikanten Abfall der FFS Konzentration und einer Erhöhung von totalem und freiem (nicht jedoch von kurzkettigen Acylcarnitinen) Carnitin im Plasma.

Eine Carnitin Supplementierung in genügenden Dosen in der Schwangerschaft kann also einen dramatischen Anstieg der FFS, eine mögliche Insulinresistenz und einen daraus resultierenden Schwangerschaftsdiabetes verhindern. Weiters zeigte sich, dass eine zusätzliche Gabe von L-Carnitin beim Fetus die Lungenreife beschleunigt und dadurch die Gefahr des Atemnotsyndroms (= häufigste Todesursache bei Frühgeburten) bei Neugeborenen abwehrt. Funktionsstörungen der Plazenta wurden ebenfalls schon erfolgreich mit L-Carnitin behandelt.

### 3 PROBLEMSTELLUNG

GDM gehört zu den häufigsten Schwangerschaftskomplikationen und die Auftrittshäufigkeit nimmt stetig zu: Die Prävalenz beträgt in Mitteleuropa, wie schon vorher erwähnt, etwa 5-7%. [KAUTZKY-WILLER und BANCHER-TODESCA, 2003]

In einer Studie in den USA wurde bereits bei 10 – 15% der Patientinnen innerhalb 6-24 Wochen nach der Schwangerschaft ein GDM diagnostiziert. [BUCHANAN und XIANG, 2005]

Da derzeit lediglich der orale Glucose-Toleranz Test (oGTT) als Suchtest existiert und dieser meist erst eine vorhandene Glucosestoffwechselstörung diagnostiziert, stellt sich die Frage, ob durch Identifizierung von Risikoparametern ein effizienteres Eingreifen vor der Etablierung der Krankheit möglich wäre. Dabei gilt es, das Risiko für die Mutter zu erkennen, um ihm frühzeitig entgegenzuwirken und somit die schweren Folgen eines unzureichend behandelten Diabetes für Mutter und Kind zu vermeiden.

Als Risikofaktor für GDM wurde unter anderem ein niedriger Carnitinspiegel (zusammen mit einem hohen Gehalt an FFS) identifiziert, der in weiterer Folge Glucosestoffwechselstörungen auslösen kann.

Ziel dieser Arbeit ist es also, eine Methode zu erarbeiten, mit welcher freies Carnitin und Carnitinester in menschlichem Plasma extrahiert und mittels HPLC-MS identifiziert und quantitativ ermittelt werden kann.

**Aufgabenstellung:**

1. Ermittlung des Verhältnisses von freiem Carnitin zu verestertem Carnitin (und sich daraus ergebende Risiken für verschiedene Krankheitsbilder)
  
2. Identifizierung aussagekräftiger Fettsäure-Reste am Carnitin wie etwa:
  - Verzweigtkettige FS (durch oxidativer Desaminierung aus Valin, Leucin, Isoleucin)
  
  - Kurzkettige Ketosäuren verestert mit Carnitin
  
  - C8-C12 FS (-> gelten als Aktivatoren für den Entzündungsfaktor NFkappa)

## 4 METHODE

### 4.1 Literaturübersicht der bestehenden Methoden

Zur Ermittlung der optimalen Methode zur Bestimmung von freiem Carnitin und Carnitinstern in menschlichem Plasma wurde eine Metaanalyse verschiedener Studien durchgeführt (siehe Anhang).

Die Kriterien der Methodenwahl beinhalteten unter anderem die Durchführbarkeit, die verwendete Probenaufarbeitungs- und Extraktionsmethode sowie die ermittelten Ergebnisse zur Verwendung als Referenzen/Vergleichswerte.

Übernommene Methode: Quantifizierung von Carnitinen und Acylcarnitinen in biologischen Substanzen/Matrizes mit HPLC Electropray-Ionisierung –MS nach Paul Minkler et al., 2008.

### 4.2 Methode Allgemein

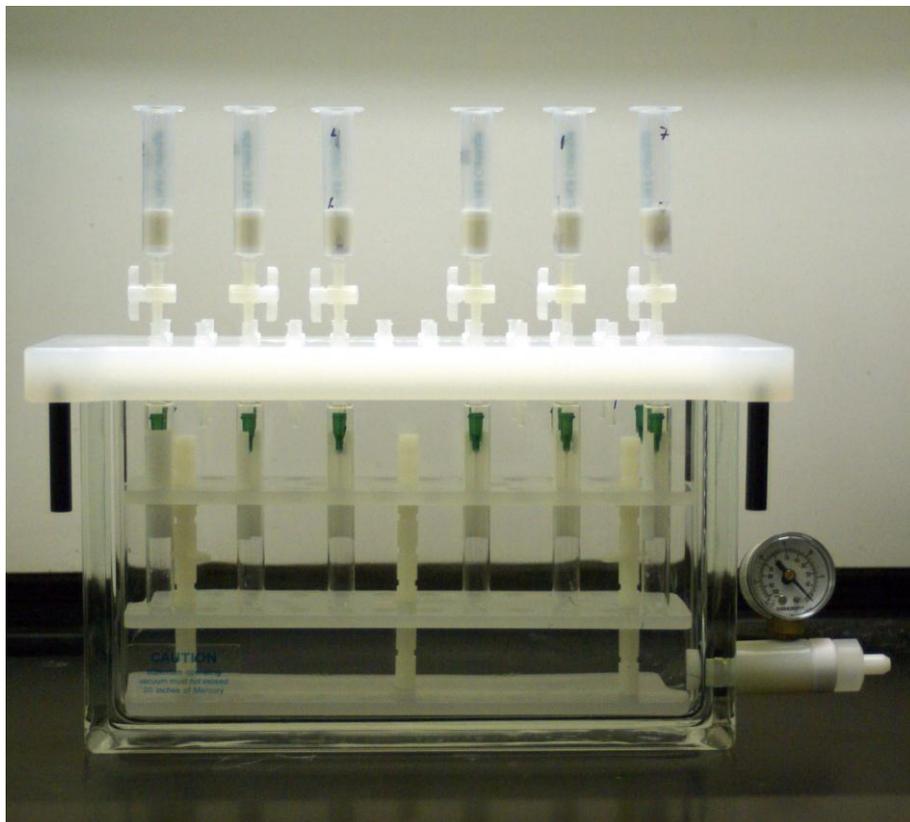
#### 4.2.1 Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction = SPE)

[HENNION, 1999; THURMAN und MILLS, 1998]

Die Festphasenextraktion zählt zu den beliebtesten und am weitesten verbreiteten Probenvorbereitungsmethoden. Die SPE dient der Anreicherung oder Isolation eines Analyten und findet durch einen physikalischen Extraktionsprozess zwischen einer flüssigen und einer festen Phase statt. Der Analyt befindet sich in einem Lösungsmittel und durch die Aufbringung dieses Lösungsmittels auf die feste Phase (polar oder unpolar) reichert sich der Analyt je nach Wechselwirkung in der Säule an, wobei das Lösungsmittel die Säule ungehindert passiert.

Durch ein geeignetes Elutionsmittel wird der Analyt anschließend wieder aus der Säule eluiert. Dieser Elutionsprozess kann durch das Anlegen eines Vakuums und die Verbindung mit einer Wasserstrahlpumpe beschleunigt werden, weshalb die Methode als sehr schnell und effizient gilt.

Die am häufigsten verwendete stationäre Phase ist Kieselgel. Polares Silica (durch freie OH-Gruppen an der Oberfläche) bindet polare Moleküle mittels Wasserstoffbrücken. Sehr stark polare Substanzen lassen sich kaum eluieren. Daher bietet sich bei stark polaren Substanzen die Verwendung von Reversed – Phase – Silica (unpolar) an.



**Abbildung 11: Vorrichtung zur Festphasenextraktion**

## 4.2.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography = HPLC)

[McMASTER, 2005; ARDREY, 2003]

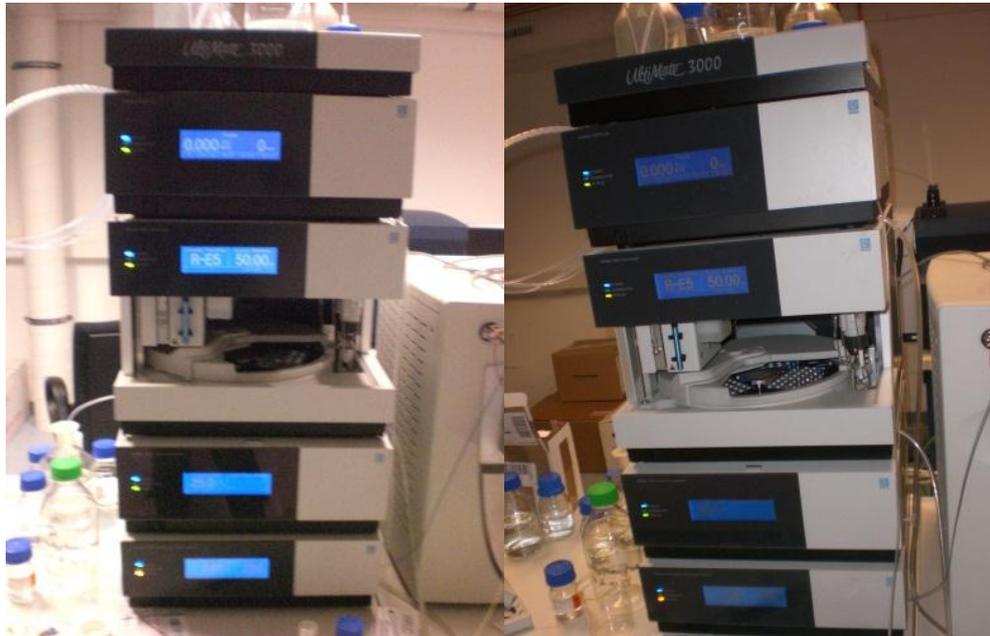


Abbildung 12: Hochdruckflüssigkeitschromatograph der Firma Dionex

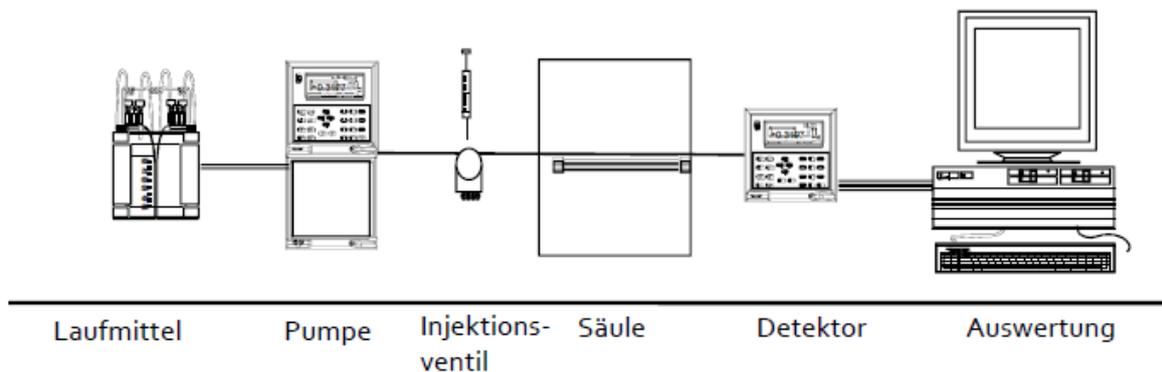
### 4.2.2.1 Allgemein

Die HPLC ist eine physikalische Methode zur Stofftrennung, genauer gesagt eine Flüssigkeitschromatographie, bei welcher die flüssige Probe mit einer flüssigen mobilen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird, wobei die Probensubstanz absorbiert und dadurch aufgetrennt wird.

Im Gegensatz zur Gaschromatographie, welche eine gute Methode zur Trennung verdampfbarer Stoffe darstellt, können mittels HPLC auch nicht flüchtige Substanzen analysiert werden.

Ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph besteht, wie in Abb. 13 graphisch dargestellt, aus folgenden Bestandteilen:

- Pumpe
- Injektor (Probeneinlasssystem)
- Trennsäule
- Detektor
- Auswertungssystem



**Abbildung 13: Bestandteile des Hochdruckflüssigkeitschromatographen**

Die Probenflüssigkeit wird durch die Injektion eines bestimmten Volumens auf die Säule aufgebracht und es findet eine Gleichgewichtseinstellung des Analyten zwischen der mobilen Phase und den Plätzen an der Oberfläche der stat. Phase (dicht gepacktes Trägermaterial) statt. Je nach Wechselwirkung der mobilen mit der stationären Phase werden die Analyten unterschiedlich lang zurückgehalten bzw. mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit über die Säule transportiert und dadurch getrennt.

Der Verteilungskoeffizient, der die Retention der Analyten bestimmt, hängt wesentlich von zwei Punkten ab:

- Von der Stärke der Wechselwirkung zwischen Analyt und Adsorptionsplätzen der stationären Oberfläche und (von der Affinität des Analyten zu der stat. Phase)
- von der Stärke der Wechselwirkung zwischen Analyt und mobiler Phase. (Affinität zur mobilen Phase)

Je stärker diese ist, umso besser ist der Analyt in der mobilen Phase gelöst, wobei ein Laufmittel mit einer dem Analyt ähnlichen chemischen Struktur diesen am besten solvatisiert.

#### **4.2.2.2 Phasensysteme**

Es können prinzipiell zwei unterschiedliche Phasensysteme unterschieden werden:

1. Normal-Phase System (NP)
2. Reversed-Phase System (RP)

Bei NP handelt es sich um eine polare stationäre Phase und eine weitgehend unpolare mobile Phase. Dabei gilt: Je polarer die mobile Phase ist, desto schneller wird eine Probensubstanz eluiert.

Unpolare Moleküle werden auf dieser Säule weniger lang zurückgehalten und verlassen die Säule somit früher.

Eine Normalphase ist Kieselgel oder Aluminiumoxid, wobei reine Adsorptionsmechanismen an den polaren OH-Gruppen die Trennung bewirken.

Silica-Partikel:  $\text{SiO}_2$  stellen das heute am häufigsten eingesetzte Trägermaterial dar. Die  $-\text{Si}-\text{OH}$  (Silanol) –Gruppen an der Oberfläche sind sauer mit pKa Werten von 4.5 bis 5.5.

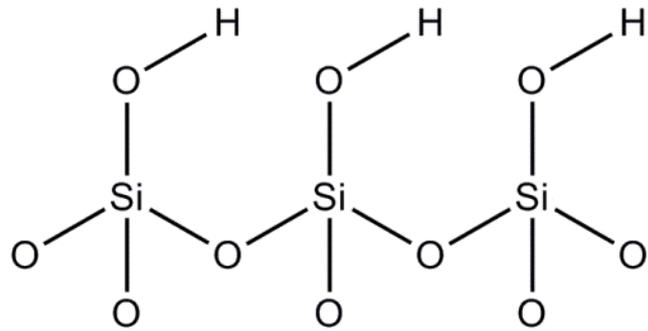


Abbildung 14: Silica Grundgerüst

Durch eine polare Komponente in der mobilen Phase kann in den meisten Fällen die Lösung der Analyte in der mobilen Phase verbessert werden und es tritt eine kompetitive Adsorption auf, das heißt sie konkurriert mit dem Analyten um die Adsorptionsplätze an der Oberfläche.

Bei RP handelt es sich hingegen um einen unpolaren Adsorbens (zumeist Octyl- oder Octadecylsilica; in Abb. 15 graphisch dargestellt), sowie einer polaren (wässrigen) mobilen Phase, wobei durch die Anlagerung einer unpolaren Verbindung an die Säule die Polarität der stationären Phase umgekehrt wird.

Dabei sind apolare Seitenketten an ein Kieselgelgerüst oder an ein Polymer gebunden – mit zunehmender Kettenlänge wird die Phase unpolarer.

Der Trennungsprozess beruht dabei auf den Van der Waals – Kräften, das heißt je ähnlicher der Analyt der Kohlenwasserstoffkette der Phase ist, desto größer sind seine Wechselwirkungen mit der Säule.

Umkehrphasen werden heutzutage weit häufiger eingesetzt als Normalphasen, weil sie universell für polare und unpolare Analyten einsetzbar sind.

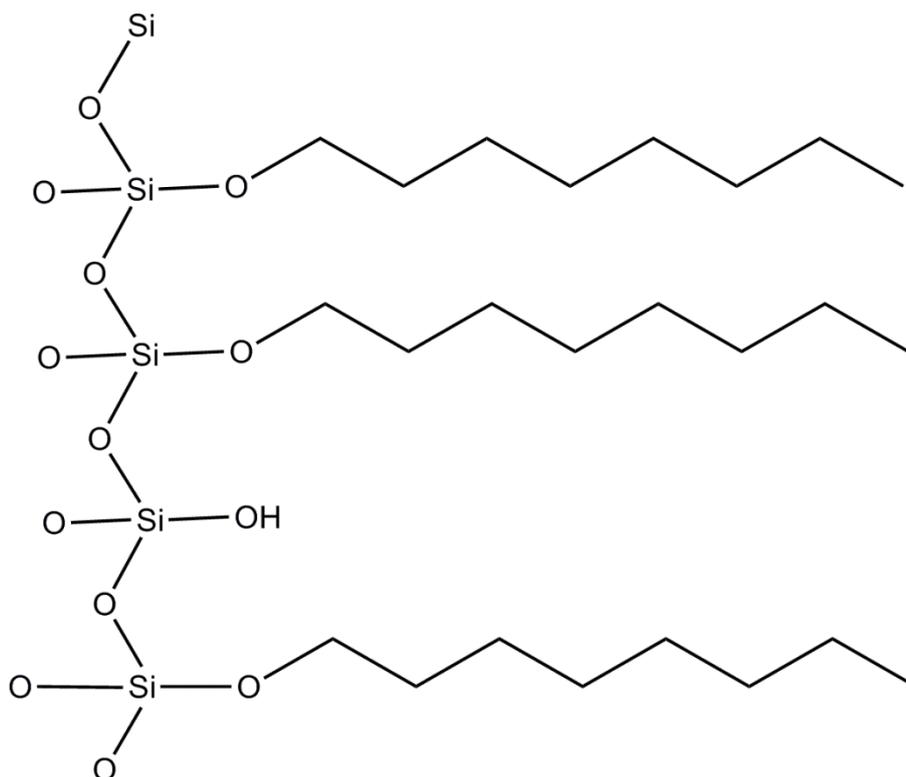


Abbildung 15: Octylsilica

Diese unpolaren stationären Phasen werden im Produktionsprozess durch den Austausch der Silanolgruppen durch längerkettige Kohlenstoffketten (bzw. die Bindung an) gebildet. Bei dieser Derivatisierung des Gundsilicas können jedoch nicht alle Silanolgruppen derivatisiert werden und es bleiben sogenannte „Rest-Silanolgruppen“, was dazu führt, dass diese unbesetzten SiOH-gruppen bei kleinen Analytmolekülen weiterhin als polare Wechselwirkungsstellen wirken, auch wenn die restliche Säule unpolar ist. Diese starke Adsorption von basischen Analyten gilt als Ursache dafür, dass bei basischen Analyten oftmals „Peak-Tailing“ beobachtet wird. Daher wird die Säulenoberfläche oft in einem zweiten Schritt mit kurz-kettigen Silanen umgesetzt, wodurch die restlichen Silanolgruppen erreicht und unpolar gemacht werden. Dieser Schritt wird als „endcapping“ bezeichnet. Ebenfalls als gute Methode zur Verhinderung von „Peak-Tailing“ gilt die Zugabe von 0,1 bis 0,2% Triethylamin zur mobilen Phase.

Der Analyt wird an die Kohlenstoffketten der stationären Phase adsorbiert. Je länger seine Kohlestoffketten, desto größer ist die Wechselwirkung mit der stationären Phase und somit seine Verweildauer auf der Säule.

Weniger polare Analyten (hydrophobe Analyten) fühlen sich mehr zu der hydrophoben stationären Phase hingezogen. Je hydrophober der Analyt, desto länger bleibt er an den Silanolgruppen haften und desto stärker wird er zurückgehalten und verlässt die Säule dementsprechend langsamer.

Da meistens Gemische aus Acetonitril (ACN) und Wasser (H<sub>2</sub>O), bzw. wässrige Puffersysteme als mobile Phase verwendet werden, hängt die Löslichkeit in der mobilen Phase auch von der Polarität der Probenmoleküle ab. Je unpolarer die Probenmoleküle, desto schwächer ihre Wechselwirkungen mit polaren Laufmitteln wie etwa Wasser und umgekehrt. Durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln, vor allem Acetonitril und Methanol, sind selektive Effekte möglich.

Durch Zugabe von weniger polaren organischen Komponenten zum Wasser wird die Lösung der Analyten in der mobilen Phase also erheblich verbessert. Es besteht zwar eine kompetitive Wirkung um die unpolaren Adsorptionsplätze, sie ist aber zumeist von geringer Bedeutung.

#### **4.2.2.3 Elutionsverfahren**

Weiters unterscheidet man zwischen einer isokratischen oder einer Gradienten-Elution.

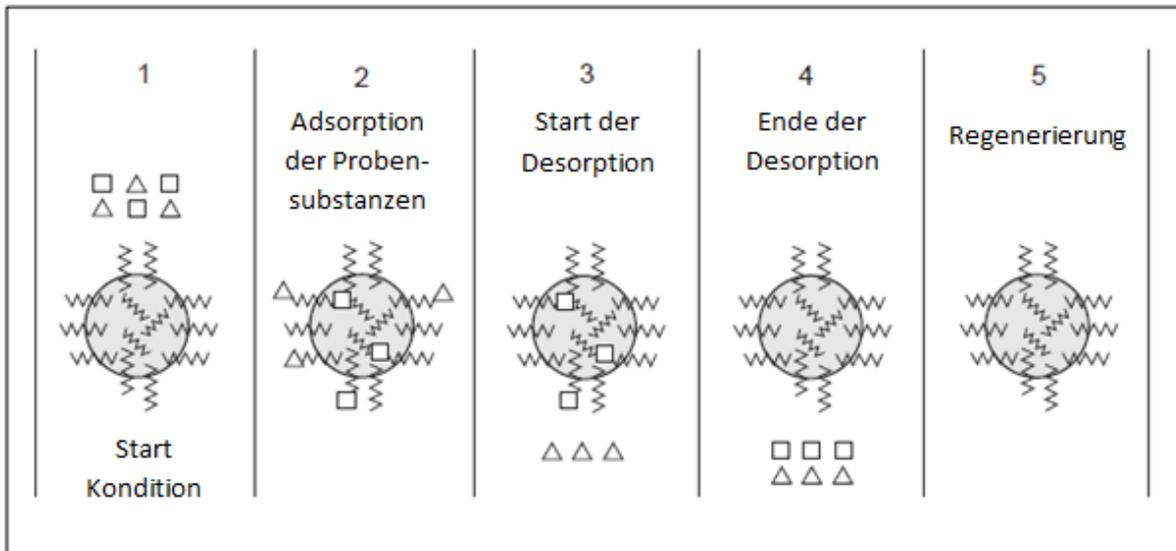
Bei der isokratischen Elution wird das Lösungsmittel(-gemisch) mit konstanter Zusammensetzung auf die Säule gepumpt, wodurch die Elutionsstärke während des Durchlaufs konstant bleibt.

Bei einer Gradienten-Elution hingegen werden verschiedene mobile Phasen in programmierten Verhältnissen gemischt, wobei die Zusammensetzung im Laufe der Messung so geändert wird, dass die Elutionskraft steigt.

In der Umkehrphase (RP) von biologisch aktiven Molekülen wird im Allgemeinen ein multistep-Gradient anstelle der isokratischen Elution verwendet. Während Biomoleküle unter wässrigen Bedingungen sehr stark an die Oberfläche der RP-Matrix binden, desorbieren sie bereits mit sehr geringen Konzentrationen an organischem Lösungsmittel. Neben den hochmolekulargewichtigen Biomolekülen mit deren einzigartigen Adsorptionseigenschaften, enthält die typische biologische Probe üblicherweise eine breite Mischung an Biomolekülen mit einer entsprechend unterschiedlichen Spanne an Adsorptionsaffinitäten (-sympathien). Die einzige praktische Methode für die Trennung von komplexen, biologischen Proben mit Umkehrphase ist dementsprechend eine Gradientenelution. [MANUAL AMERSHAM RPC, 1999]

Zusammenfassend hängen Trennungen in der Umkehrphase von der reversiblen Adsorption/Desorption der gelösten Moleküle mit unterschiedlichem Grad hydrophober Eigenschaft zu einer hydrophoben stationären Phase ab.

Die Mehrheit der RP-Trennungsexperimente wird, wie in Abb. 16 dargestellt, in fünf grundsätzlichen Schritten durchgeführt:



**Abbildung 16: Prinzip der reversed phase Chromatographie mit Gradienten Elution** [MANUAL AMERSHAM RPC, 1999]

Der erste Schritt im chromatographischen Prozess dient der Äquilibrierung der mit dem RP-Medium bepackten Säule. Die Polarität der initialen mobilen Phase (meistens mobile Phase A genannt) wird durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln (wie etwa Acetonitril) kontrolliert und muss zu Beginn niedrig genug sein, um den partiell hydrophobischen gelösten Stoff aufzulösen/zu trennen und hoch genug, um die Bindung des gelösten Stoffes an die RP – Matrix sicherzustellen.

Im zweiten Schritt wird die Probe mit den zu analysierenden Substanzen, die aufgetrennt werden sollen, aufgetragen. Idealerweise wird die Probe in derselben mobilen Phase, welche zur Äquilibrierung verwendet wird, aufgelöst. Sobald die Probe aufgetragen ist, wird die Säule noch weiter mit Phase A gewaschen, um alle ungebundenen und unerwünschten Substanzen zu entfernen.

Die gebundenen Substanzen werden nun von dem RP- Medium desorbiert, indem die Polarität der mobilen Phase so adjustiert wird, dass die gebundenen Moleküle der Reihe nach desorbieren und von der Säule eluieren.

In der RP- Chromatographie beinhaltet dies üblicherweise die Polarität der mobilen Phase durch die Steigerung des organischen Lösungsmittles zu verringern (mobile Phase B).

Der vierte Schritt beinhaltet die Entfernung von Substanzen, die bis dahin noch nicht desorbiert wurden. Dies wird größtenteils durch die Änderung der mobilen Phase auf nahezu 100% organischem Lösungsmittel bewirkt.

Der fünfte Schritt dient der Re-Äquilibrierung der Säule von 100% B zurück zu den Anfangskonditionen.

Typischerweise wird eine RP-chromatographische Trennung anfangs durch einen Gradienten mit breitem Bereich von 100% A zu 100% B erreicht. Die Menge an organischem Lösungsmittel kann sowohl in der anfänglichen als auch in der finalen mobilen Phase sehr stark variieren. Dennoch liegen die routinemäßigen Prozentwerte des organischen Lösungsmittels bei 5% oder weniger in der Phase A und bei 95% oder mehr in der Phase B. [MANUAL AMERSHAM RPC, 1999]

RP-Systeme gelten als am häufigsten eingesetzte chromatographische Methoden und erlangen besondere Bedeutung bei Analyten, die in wässrigen Eluentien (+ Acetonitril) löslich sind (v.a. biologische, pharmazeutische und klinische Proben).



### 4.2.3 Massenspektrometrie (MS)

[FENN et al., 1990; ARDREY, 2003; McMASTER, 2005; MANUAL LCQ FLEET HARDWARE 2007]



Abbildung 17: Massenspektrometer

#### 4.2.3.1 Allgemein

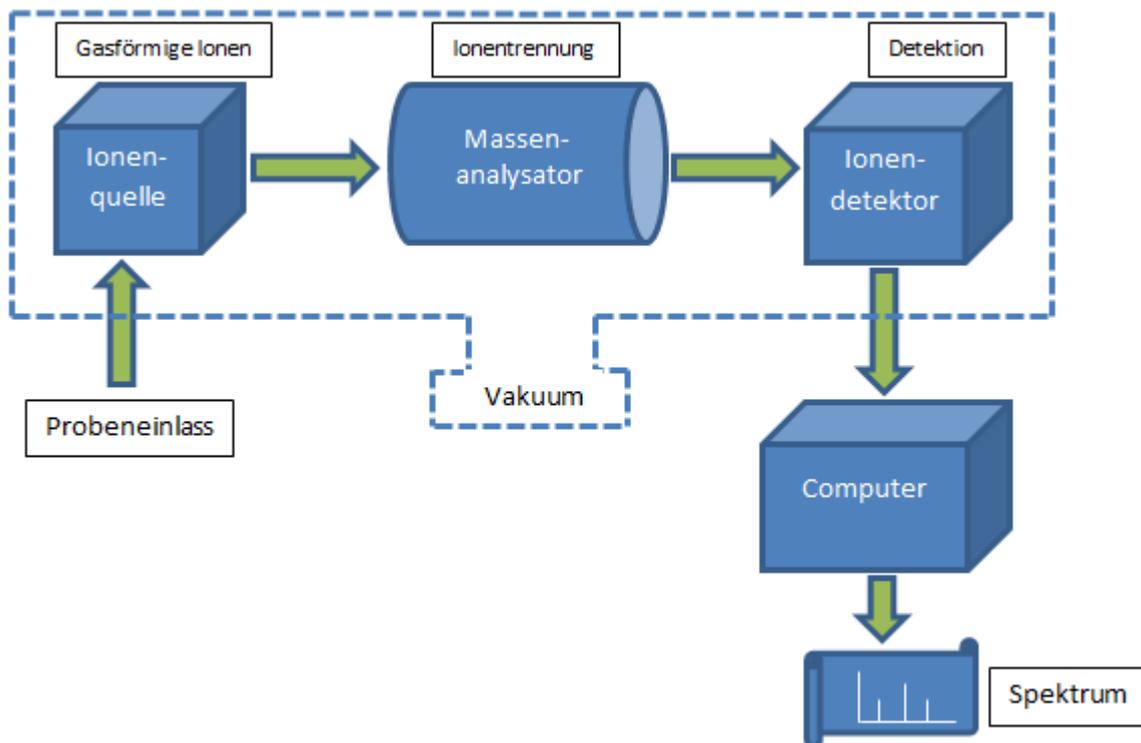
Die MS ist eine sehr empfindliche, analytische Methode zur Bestimmung der Molekularmasse freier, gasförmiger Ionen in einem Hochvakuum durch die Auftrennung dieser nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ). Sie dient dem Nachweis chemischer Verbindungen, deren Quantifizierung und der Strukturermittlung.

Dabei werden die Probenmoleküle (Analyten) in der Gasphase ionisiert, durch ein elektrisches Feld auf eine bestimmte kinetische Energie beschleunigt, zu einem Ionenstrahl fokussiert und in einem Massenanalysator auf unterschiedliche Flugbahnen, welche von der Masse der Teilchen abhängig sind, gezwungen und somit nach ihrem  $m/z$  Verhältnis aufgetrennt.

Die aufgetrennten Ionen gelangen nacheinander zum Detektor und werden gemessen.

Ein MS besteht aus folgenden Teilen, welche in Abb. 18 graphisch dargestellt sind:

- Probeneinlasssystem
- Ionenquelle
- Massenanalysator
- Detektor und
- Datenauswertungssystem



**Abbildung 18: Bestandteile des Massenspektrometers**

Heute steht eine große Zahl von verschiedenen Typen von Massenspektrometern mit unterschiedlichen Ionenquellen/Ionisierungsmethoden und unterschiedlichen Analysatoren zur Verfügung. Im Anschluss wird jedoch lediglich kurz auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden eingegangen.

#### 4.2.3.2 Electrospray-Ionisierung (ESI)

Bei dieser Methode wird die Probenflüssigkeit, welche meist in einem Gemisch aus Wasser und org. Lösungsmittel vorliegt, durch eine Metallkapillare (ESI-Nadel) geleitet, an deren Spitze ein Spannungsfeld angelegt ist. Dabei wird die Analytlösung unter bestimmten Bedingungen in einem elektrischen Feld zu einem Nebel feiner Tröpfchen versprüht, die an ihrer Oberfläche hoch geladen sind. Die Art der Spannung an der Kapillare bestimmt die Ladung der Ionen: durch eine pos. Spannung werden positiv geladene Ionen erzeugt (durch Anlagerung von Protonen ( $H^+$ ) oder anderen Kationen ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) an die Analytmoleküle) und umgekehrt. Die Dichte der elektrischen Ladung an der Tröpfchenoberfläche steigt durch die Lösungsmittelverdampfung bis zu einem kritischen Punkt (Rayleigh stability limit), die Ionen wandern an die Tropfenoberfläche und es kommt zu einem Ionenausstoß – die Tröpfchen zerfallen (nach mehreren Wiederholungen) in kleinste Tröpfchen - da die elektrostatische Abstoßung größer wird als die Oberflächenspannung - und liegen schließlich komplett desolvatisiert und durch die anhaftenden Protonen mehrfach geladen vor. Die Analyt-Ionen passieren eine Ionentransfer-Kapillare und gelangen in den MS-Detektor, wo sie analysiert werden.

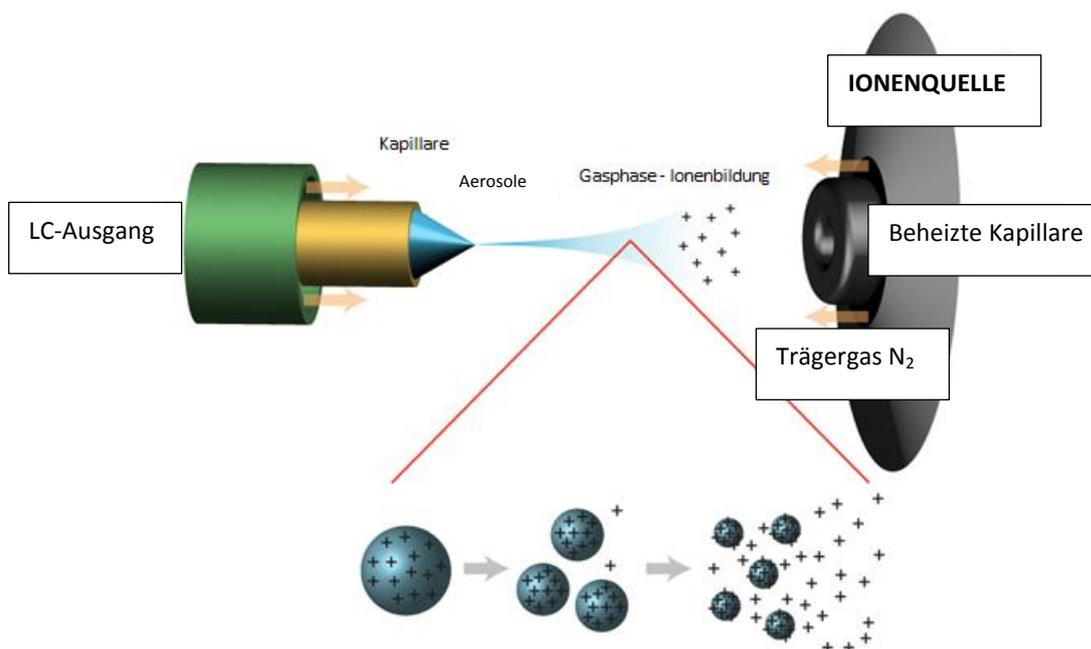


Abbildung 19: Electrospray-Ionisierung

Die ESI (graphisch dargestellt in Abb. 19) gilt als sanfte Ionisationstechnik und ist besonders geeignet für größere Moleküle (wie etwa Proteine).

Dabei entsteht eine Verteilung vielfach positiv geladener Quasi-Molekülionen ohne Bildung von Fragmentionen ( $M + nH^+ \rightarrow [M+nH^+]^{n+}$ ) und zu einem wesentlich geringeren Teil entstehen neben den positiven auch negative Ionen, die durch den Verlust eines Protons (bzw. mehrerer Protonen) zustande kommen:  $M-nH^+ \rightarrow [M-nH^+]^{n-}$

Sowohl positive Ionen als auch negative Ionen können durch den entsprechend gewählten Ionenmodus und die Wahl der Polarität der Ionenblenden alternativ analysiert werden.

#### **4.2.3.3 Ionenfalle (Ion Trap)**

Das Prinzip der Methode beruht darauf, Ionen in einem Massenanalysator (Quadrupolfeld, Ringelektrode mit 2 Endkappen) durch Hochfrequenzspannung festzuhalten. Je nach Art der einwirkenden Felder kann man entweder nur Ionen einer bestimmten Masse festhalten, oder aber sämtliche Ionen gefangen halten und durch Veränderung der Felder, Ionen mit einer bestimmten Masse dazu zwingen, die Falle zu verlassen. Die Ionen zirkulieren nach Eintritt in die Falle [Abb. 20] innerhalb des Elektroden und werden, beginnend bei den Kleinsten, durch Anlegen zusätzlicher Wechselfspannung instabil gemacht und durch eine Öffnung auf den Detektor geschossen, wo der Ionenstrom massenaufgetrennt gescannt wird.

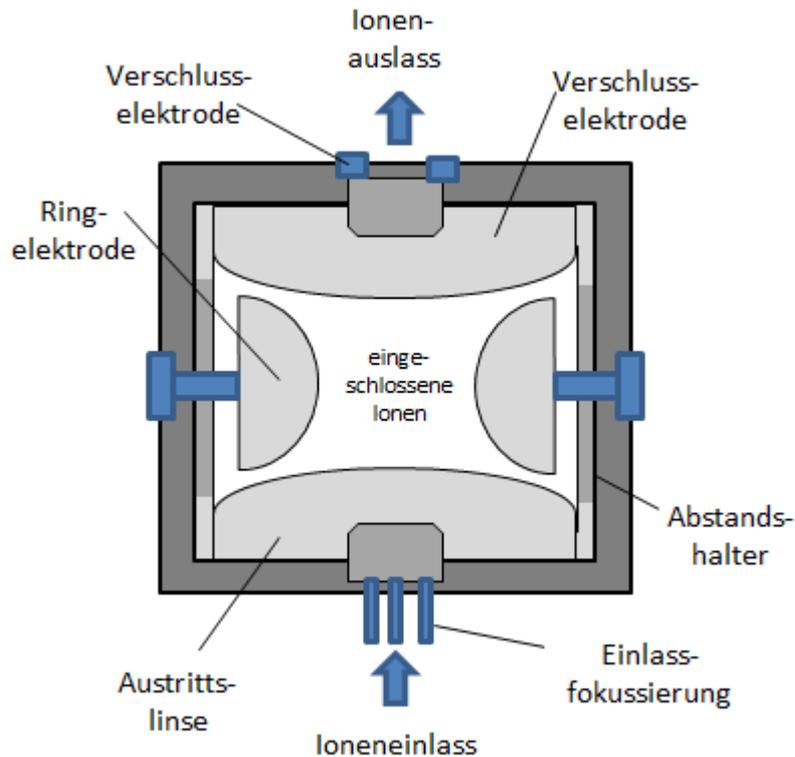


Abbildung 20: Bestandteile der Ionenfalle

Die Ionen werden entweder gleichzeitig oder nacheinander registriert und die jeweilige Intensität wird aus der Fläche und der Höhe der Signale (Peaks) ermittelt.

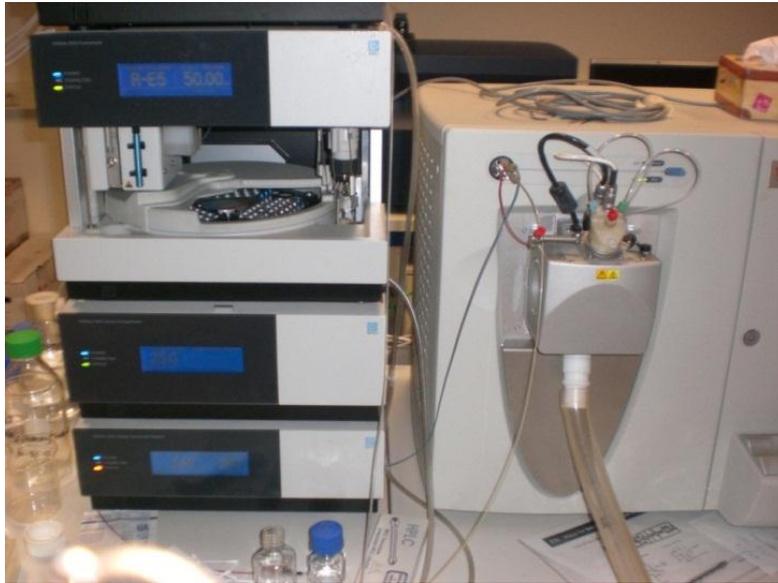
#### 4.2.3.4 Signalauswertung

Bei der Massenspektrometrie wird das Masse–Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) der Ionen zweidimensional dargestellt. Die jeweilige Intensität der bei der Ionisierung erzeugten Ionen wird aus der Fläche oder aus der Höhe der sogenannten Peaks ermittelt und auf den stärksten Peak im Spektrum (Basispeak) normiert (= relative Intensität in %).

Bei konzentrationsabhängigen Detektoren ist die Peakhöhe proportional zu der Analytkonzentration in der mobilen Phase und die Peakfläche proportional zu der injizierten Analytmenge.

#### 4.2.4 HPLC-MS

[MANUAL LCQ FLEET HARDWARE, 2007; ARDREY, 2003]



**Abbildung 21: HPLC-MS Kopplung**

Die on-line Kopplung von HPLC und MS (Abb. 21) hat inzwischen immer weitere Verbreitung gefunden und erfolgt meistens über eine ESI oder eine APCI (atmospheric-pressure-chemical-ionisation) Ionenquelle. Dabei dient die Chromatographie der Auftrennung des Probengemischs und die Spektrometrie der Strukturaufklärung/Identifizierung und der Quantifizierung des Analyten. Die Methode besitzt eine hohe quantitative Aussagekraft. Durch eine Kopplung dieser beiden Methoden wird für jeden Punkt des Chromatogramms ein Massenspektrum generiert, wodurch die chemische Struktur von etwaigen Verunreinigungen schnell aufgeklärt werden kann.

## 4.3 Methodenbeschreibung

### 4.3.1 Übernommene Methode nach Minkler et al., 2008

*Hintergrund:* Die übliche Methode zur Analyse von Carnitinen und Acylcarnitinen mit MS/MS hat verschiedene Limitationen. Sie ist zwar sehr einfach und schnell, jedoch kann es einerseits zu einer Hydrolyse der Acylcarnitine bei der Herstellung von Butylestern kommen, was zu erhöhten freien Carnitinwerten führt, andererseits können isobare Nicht-Acylcarnitinkomponenten zu falsch-positiven Ergebnissen bei der Analyse der Acylcarnitine führen. Ebenfalls können durch diese Methode Strukturisomere von Acylcarnitinen nicht unterschieden werden.

Mit dieser Methode werden freies Carnitin und Acylcarnitine mit Ionenaustauscher Festphasenextraktion isoliert, mit Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat derivatisiert, mit HPLC getrennt und mit einer Ionenfallen MS detektiert.

Durch diese modifizierte Methode basiert die Probenisolierung auf empfindlichen Kationenaustauscher-Säulen aus Silica-Gel und durch die Derivatisierungsmethode wird eine mögliche Hydrolyse der Acylcarnitine verhindert.

Standard-Lösungen in verschiedenen Verdünnungen dienen zur Quantifizierung.

Da Referenzwerte aus der Studie von Minkler et al. vorliegen, ist durch die Übernahme der Methode ein guter Vergleich der eigenen Standardverbindungen und der Proben möglich. Durch Standardverbindungen in verschiedenen Verdünnungen wird eine Quantifizierung der Carnitinmenge in den Proben möglich. [MINKLER et al., 2008]

### 4.3.2 Probenbeschreibung:

#### 4.3.2.1 Probenmaterial

Plasma schwangerer Frauen aus dem Allgemeinen Krankenhaus Wien (alle Proben wurden zwischen der 20. und der 38. Schwangerschaftswoche abgenommen, teilweise auch Endproben -> Plasmaproben bei der Geburt)

Tabelle 6: Codierung der Plasmaproben

Code	Schwangerschafts- woche	Anfangsprobe	Endprobe
DKW1	36/37	31.03.2009	07.04.2009
DKW2	34	31.03.2009	nein
DKW3	31	31.03.2009	nein
DKW4	33	31.03.2009	nein
DKW5	34	31.03.2009	nein
DKW6	34	07.04.2009	nein
DKW7	25	07.04.2009	nein
DKW8	28	07.04.2009	nein
DKW9	38	05.05.2009	nein
AKH1		2011	nein
AKH2		2011	nein
AKH3		2011	nein
AKH5		2011	nein
AKH7		28.04.2011	12.05.2011

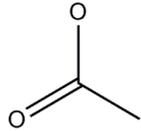
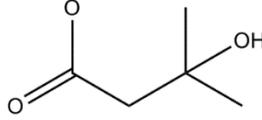
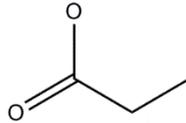
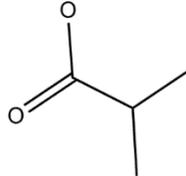
#### 4.3.2.2 CARNITINE –Erwartung

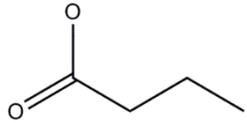
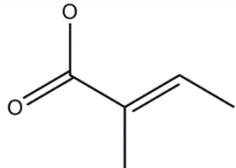
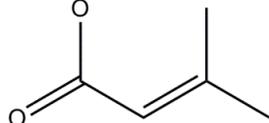
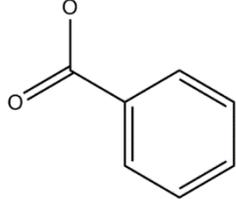
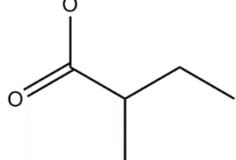
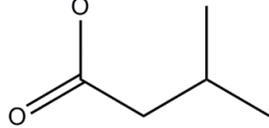
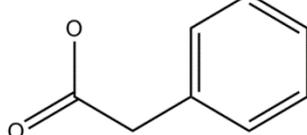
Die Erwartung von freiem Carnitin im Plasma der Schwangeren liegt bei  $\leq 25$   $\mu\text{mol/l}$ , da der Normalwert von Carnitin im Plasma ca.  $50 \mu\text{mol/l}$  beträgt und bei der Schwangerschaft auf etwa die Hälfte absinkt, wobei freies Carnitin noch stärker vermindert ist. Der Anteil von freiem Carnitin am Gesamtcarnitin beträgt ca. 70%.

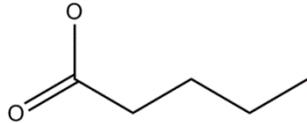
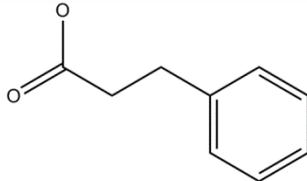
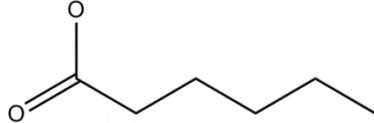
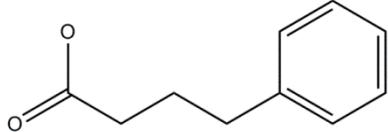
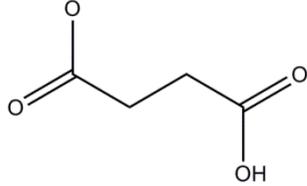
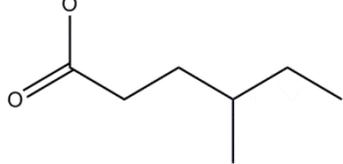
### 4.3.3 Übersicht der untersuchten Acylcarnitine

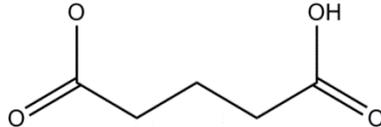
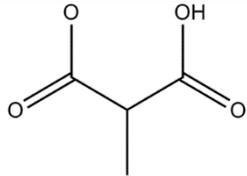
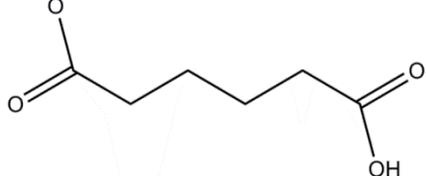
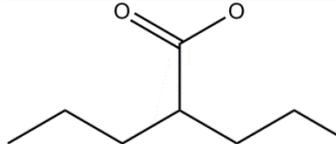
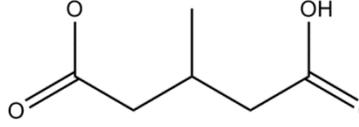
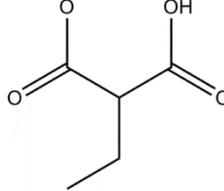
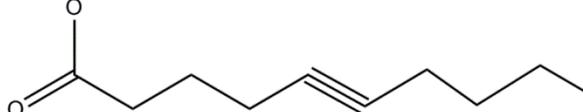
Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 45 Acylcarnitine, welche in der nachfolgenden Tabelle 7 aufgelistet sind, untersucht.

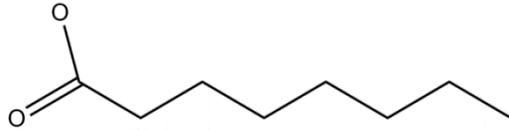
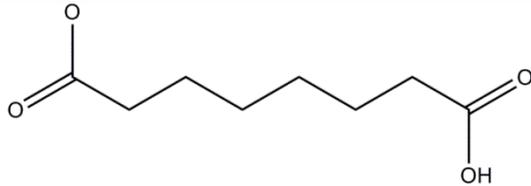
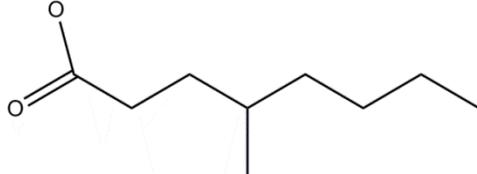
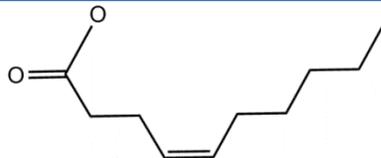
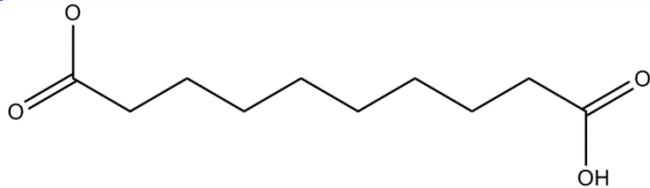
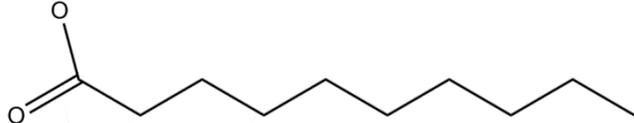
**Tabelle 7: Übersicht der untersuchten Acylcarnitine, dargestellt mit Bezeichnung, Kurzbezeichnung, theoretischer Retentionszeit, Molekulargewicht und Summenformel als Carnitinpentafluorophenacylester**

Name	Kurzbezeichnung	Retentionszeit [min]	Masse [g/mol]	Summenformel des Acylrests	Strukturformel (REST)
Acetyl-	C <sub>2</sub>	12	412	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	
3-Hydroxyisovaleryl-	C <sub>5</sub> -OH	13	470	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	
Propionyl-	C <sub>3</sub>	16.5	426	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	
Isobutyryl-	C <sub>4</sub>	21	440	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	

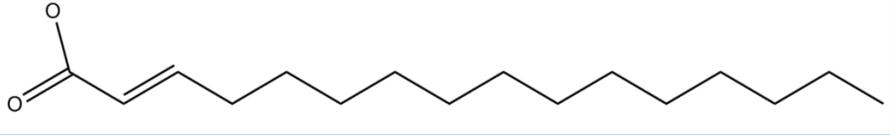
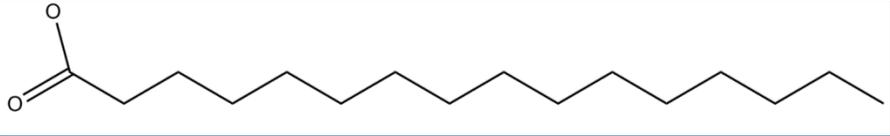
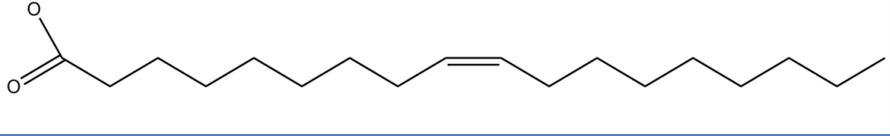
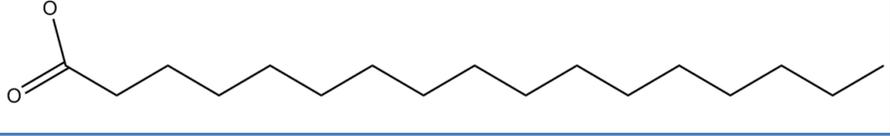
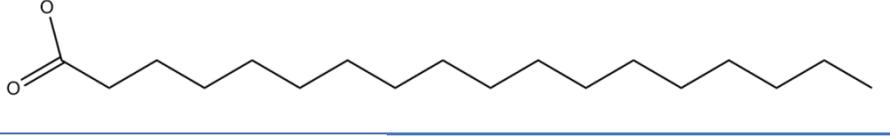
<b>Butyryl-</b>	C <sub>4</sub>	22	440	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Tigloyl-</b>	C <sub>5</sub>	23	452	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	
<b>3-Methyl-Crotonyl-</b>	C <sub>5</sub>	23.5	452	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Benzoyl-</b>	C <sub>7</sub>	24	474	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	
<b>2-Methyl-Butyryl-</b>	C <sub>5</sub>	25	454	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Isovaleryl-</b>	C <sub>5</sub>	26	454	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Phenyl-acetyl-</b>	C <sub>8</sub>	26.5	488	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	

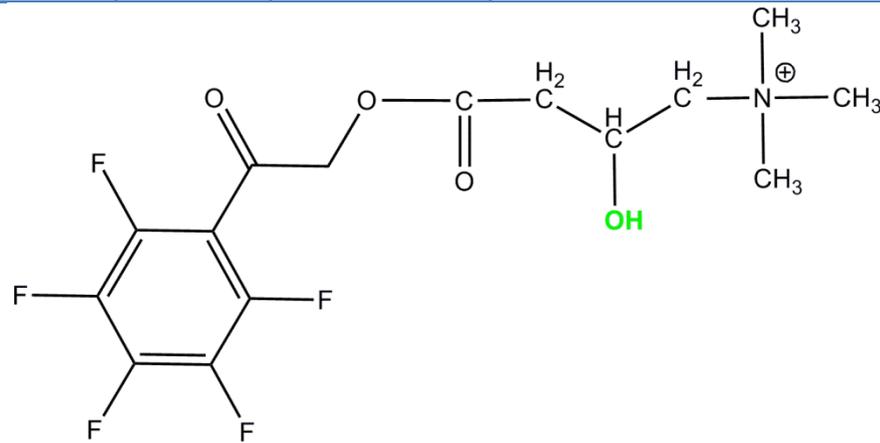
<b>Valeryl-</b>	C <sub>5</sub>	27	454	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Phenyl-propionyl-</b>	C <sub>9</sub>	30.5	502	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Hexanoyl-</b>	C <sub>6</sub>	32.5	468	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	
<b>4-Phenyl-Butyryl-</b>	C <sub>10</sub>	34.5	516	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Succinyl-</b>	C <sub>3</sub> - COOH	35	470	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	
<b>4-Methyl-Hexanoyl-</b>	C <sub>7</sub>	36	482	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	
<b>cis-3,4-Methylene-Heptanoyl-</b>	C <sub>8</sub>	37	494	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	

<b>Glutaroyl-</b>	C <sub>4</sub> -COOH	37.1	484	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Methyl-malonyl-</b>	C <sub>3</sub> -COOH	37.2	470	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Adipoyl-</b>	C <sub>5</sub> -COOH	39	498	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Valproyl-</b>	C <sub>8</sub>	39.5	496	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	
<b>3-Methyl-Glutaroyl-</b>	C <sub>5</sub> -COOH	40	498	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Ethyl-malonyl-</b>	C <sub>4</sub> -COOH	40.5	484	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	
<b>5-Decynoyl-</b>	C <sub>10</sub>	41.5	520	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	

<b>Octanoyl-</b>	C <sub>8</sub>	42.5	496	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Suberoyl-</b>	C <sub>7</sub> -COOH	44.5	526	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	
<b>4-Methyl-Octanoyl-</b>	C <sub>9</sub>	46	510	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	
<b>cis-3,4-Methylene-Nonanoyl-</b>	C <sub>10</sub>	46.5	522	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	
<b>cis-4-Decenoyl-</b>	C <sub>10</sub>	47.5	522	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	
<b>Sebacoyl-</b>	C <sub>9</sub> -COOH	49.5	554	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub>	
<b>Decanoyl-</b>	C <sub>10</sub>	51	524	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	

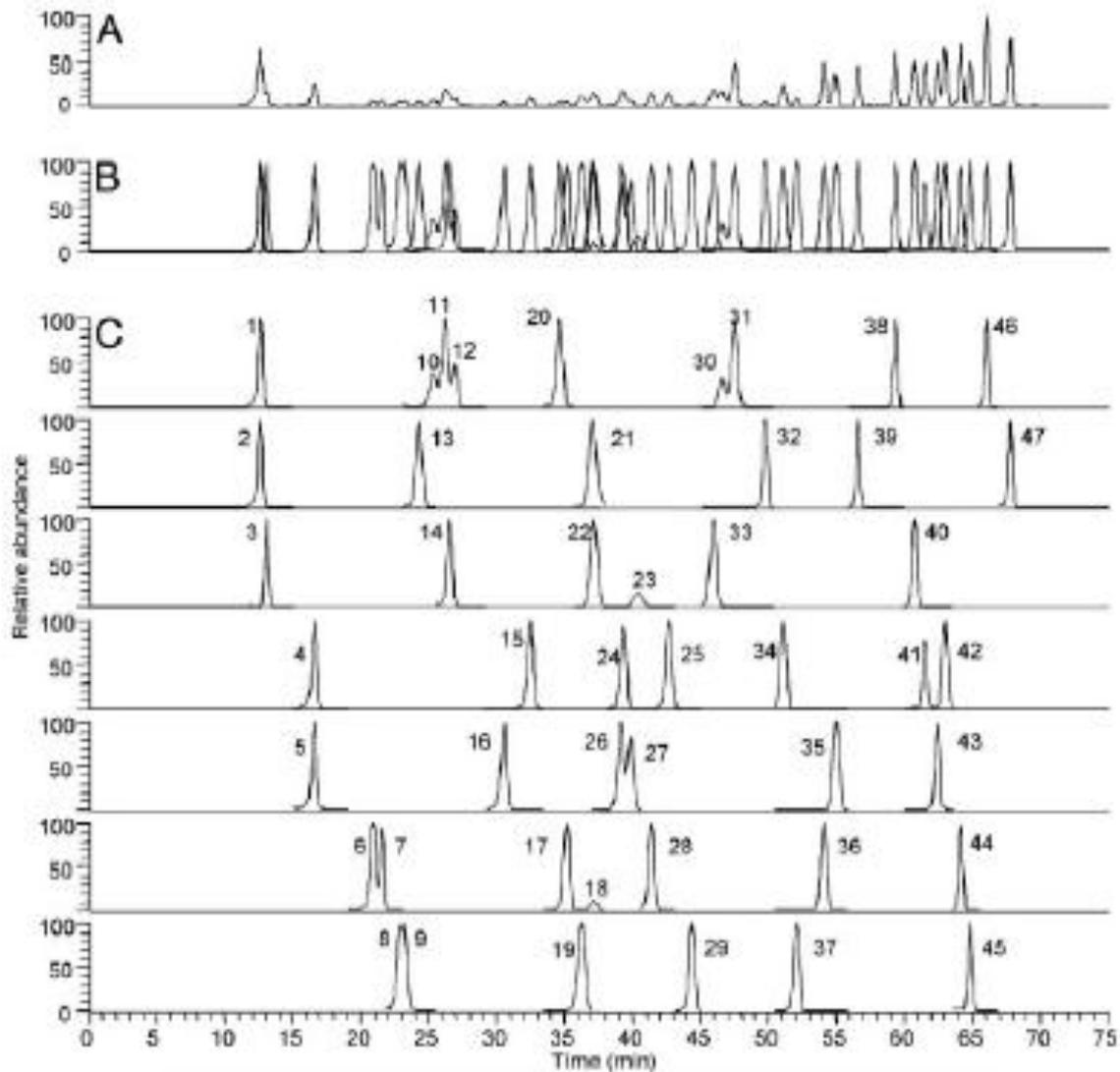
<b>Undecan- dioyl-</b>	$C_{10}\text{-COOH}$	52	568	$C_{11}H_{19}O_4$	
<b>Undecanoyl-</b>	$C_{11}$	54	538	$C_{11}H_{21}O_2$	
<b>trans-2- Dodecenoyl-</b>	$C_{12}$	55	550	$C_{12}H_{21}O_2$	
<b>Lauroyl-</b>	$C_{12}$	56.5	552	$C_{12}H_{23}O_2$	
<b>trans-2- Tetra- decenoyl-</b>	$C_{14}$	59.5	578	$C_{14}H_{25}O_2$	
<b>Myristoyl-</b>	$C_{14}$	61	580	$C_{14}H_{27}O_2$	
<b>Palmitoleyl-</b>	$C_{16}$	61.5	606	$C_{16}H_{29}O_2$	
<b>Linoleoyl-</b>	$C_{18}$	62.5	632	$C_{18}H_{31}O_2$	

<b>trans-2-Hexadecenoyl-</b>	$C_{16}$	63	606	$C_{16}H_{29}O_2$	
<b>Palmitoyl-</b>	$C_{16}$	64	608	$C_{16}H_{31}O_2$	
<b>Oleoyl-</b>	$C_{18}$	65	634	$C_{18}H_{33}O_2$	
<b>Heptadecanoyl-</b>	$C_{17}$	66	622	$C_{17}H_{33}O_2$	
<b>Stearoyl-</b>	$C_{18}$	68	636	$C_{18}H_{35}O_2$	

**- Carnitin Pentafluorophenacyl Ester**

### 4.3.4 Referenzwerte

#### 4.3.4.1 Retentionszeiten



**Abbildung 22: Vergleichschromatogramme der untersuchten Acylcarnitine nach [MINKLER et al., 2008]** (A) Total-Ionen Spur. (B) überlagernder rekonstruierter Ionenstrom „RIC“ (reconstructed ion current) durch Integration über sämtliche Ionenintensitäten aller vollständig gescannten Spektren der unterschiedlichen Acylcarnitin-Pentafluorophenacyl-ester erhalten. (C) aufgetrennte Peaks der einzelnen Acylcarnitin-Pentafluorophenacyl-ester: 1. Acetyl-; 2. d6-Acetyl-; 3. 3-Hydroxy-Isovaleryl-; 4. Propionyl-; 5. d3-Propionyl-; 6. Isobutyryl-; 7. Butyryl-; 8. Tigloyl-; 9. 3-Methyl-Crotonyl-; 10. 2-Methyl-Butyryl-; 11. Isovaleryl-; 12. Valeryl-; 13. Benzoyl-; 14. Phenylacetyl-; 15. Hexanoyl-; 16. Phenylpropionyl-; 17. Succinyl-; 18. Methylmalonyl-; 19. 4-Methyl-Hexanoyl-; 20. 4-Phenyl-Butyryl-; 21. cis-3,4-Methylene-Heptanoyl-; 22. Glutaroyl-; 23. Ethylmalonyl-; 24. Valproyl-; 25. Octanoyl-; 26. Adipoyl-; 27. 3-Methyl-Glutaroyl-; 28. 5-Decynoyl-; 29. Suberoyl-; 30. cis-3,4-Methylene-Nonanoyl-; 31. cis-4-Decenoyl-; 32. Sebacyl-; 33. 4-Methyl-Octanoyl-; 34. Decanoyl-; 35. trans-2- Dodecenoyl-; 36. Undecanoyl-; 37. Undecanedioyl-; 38. trans-2-Tetradecenoyl-; 39. Lauroyl-; 40. Myristoyl-; 41. Palmitoleoyl-; 42. trans-2-Hexadecenoyl-; 43. Linoleoyl-; 44. Palmitoyl-; 45. Oleoyl-; 46. Heptadecanoyl-; 47. Stearoylcarnitine Pentafluorophenacyl-ester.

#### 4.3.4.2 Referenzwerte für gemessene Konzentrationen in menschlichem Blut

Blood spot: healthy adult, $\mu\text{mol/L}$		Whole blood: healthy adult, $\mu\text{mol/L}$	
Total carnitine	69.4	Total carnitine	71.3
Free carnitine	46.8	Free carnitine	44.8
Acetylcarnitine	9.32	Acetylcarnitine	14.2
Propionylcarnitine	1.71	Propionylcarnitine	1.84
<i>cis</i> -3,4-Methylene-heptanoylcarnitine	0.08	<i>cis</i> -3,4-Methylene-heptanoylcarnitine	0.13
Linoleoylcarnitine	0.87	Linoleoylcarnitine	0.91
Oleoylcarnitine	1.28	Oleoylcarnitine	1.64
Palmitoylcarnitine	0.92	Palmitoylcarnitine	0.87
Stearoylcarnitine	0.81	Stearoylcarnitine	0.81
Other acylcarnitines	1.40	Other acylcarnitines	2.60
Total-free	22.6	Total-free	26.5
Sum (AC)	16.4	Sum (AC)	22.2
Sum/Total-free ratio	0.72	Sum/Total-free ratio	0.84

**Abbildung 23a: gemessene Carnitinkonzentrationen bei einem gesunden Erwachsenen in einem Blutstropfen in  $\mu\text{mol/L}$**

**Abbildung 23b: gemessene Carnitinkonzentrationen bei einem gesunden Erwachsenen im Gesamtblut in  $\mu\text{mol/L}$**

[MINKLER et al., 2008]



## 5 EXPERIMENTELLER TEIL und RESULTATE

### 5.1 Verwendete Reagenzien und Standardverbindungen

	Name	Firma
<b>Materialien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1ml Silicagel Säulen</li> <li>• 50ml Silica Bond Elut</li> </ul>	J.T BAKER
<b>Chemikalien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triethylamin</li> <li>• N,N-Diisopropylethylamin</li> <li>• Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat</li> </ul>	SIGMA-ALDRICH
<b>Lösungsmittel/ Laufmittel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acetonitril</li> <li>• Methanol</li> <li>• Essigsäure</li> </ul>	SIGMA-ALDRICH
<b>Standards/ Referenzsubstanzen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DL-Decanoylcarnitine Chloride C17H34ClNO4</li> <li>• DL-Lauroylcarnitine Chloride C19H38ClNO4</li> <li>• DL-Octanoylcarnitine Chloride C15H30ClNO4</li> <li>• Palmitoyl-DL- Carnitine Chloride C23H45NO4 * HCl</li> <li>• Myristoyl-DL- Carnitine Chloride C21H42ClNO4</li> <li>• Actyl-L-Carnitin Hydrochloride 99%</li> </ul>	SIGMA-ALDRICH Handels GmbH, Wien

## 5.2 Verwendete Geräte:

### 5.2.1 HPLC

In dieser Arbeit wurde eine HPLC Ultimate 3000 der Firma Dionex eingesetzt.

HPLC-Säule: EC 125/4,6 NUCLEODUR 100-3 C8 ec

Für die Trennung mehrerer Komponenten werden meist längere Säulen benötigt. Daher wurde bei dieser Messung eine C8 Säule der Firma NUCLEODUR mit niedrigerer Retention in Umkehrphase verwendet.

Partikelgröße [ $\mu\text{m}$ ]: 3.0

Länge [mm] = 125

Interner Durchmesser [mm] = 4.6

### 5.2.2 MS

MS LCQ Fleet Firma Thermo Scientific

3D Quadrupol Ionenfallen MS

## 5.3 Probenaufbereitung

### 5.3.1 Übersicht

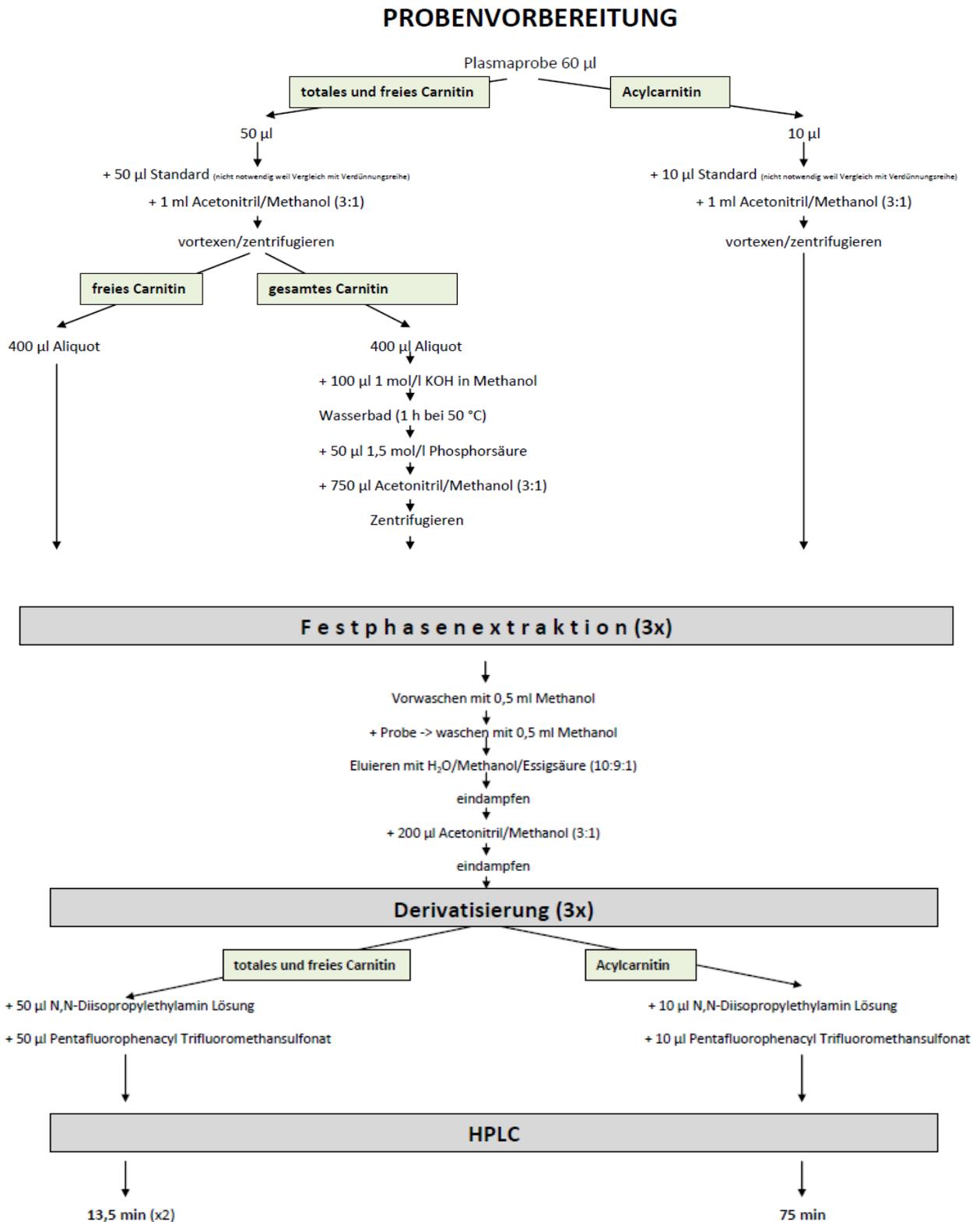


Abbildung 24: graphische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der Probenvorbereitung

### 5.3.2 Festphasenextraktion

Die Silicagel Säulen (1 ml) wurden vorbereitet und mit 1ml Wasser/Methanol/Essigsäure - Gemisch (10:9:1) und anschließend mit 5 ml reinem Methanol gewaschen. 1 ml der zu analysierenden Verbindung (gelöst in ACN/Methanol 3:1) wurde auf die Säule aufgetragen und mit 0.5 ml Methanol gewaschen. Mit 3 ml Wasser/Methanol/Essigsäure Gemisch (10:9:1) werden dann die freien Carnitine und Acylcarnitine eluiert. Das Eluat wird am Rotavapor zur Trockenheit eingedampft und in 1 ml Acetonitril aufgenommen.

100 µl davon werden entnommen und in einer Phiole derivatisiert.

### 5.3.3 Synthese des Derivatisierungsreagenz in 2 Schritten

#### 5.3.3.1 Synthese von Pentafluoro-2-diazoacetophenon nach Minkler et al., 2005 modifiziert nach Shwetlick et al., 1993

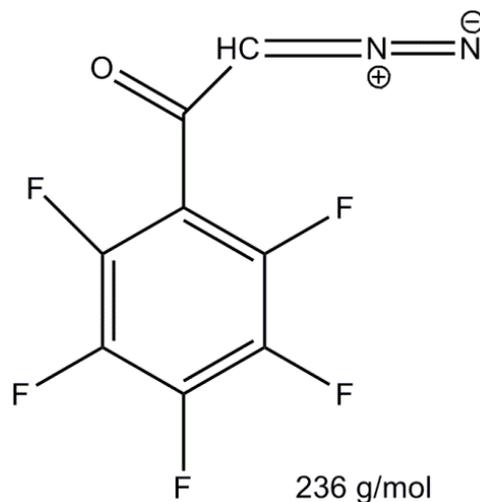


Abbildung 25: Pentafluoro-2-diazoacetophenon

Diazomethan wurde nach der Arbeitsvorschrift „Darstellung von Diazomethan“ aus N-Methyl-N-Nitroso-harnstoff synthetisiert. [SHWETLICK, 1993] Dazu wurde ein 500 ml Erlenmeyerkolben am Stativ befestigt, mit einem Magnetrührer ausgestattet und in ein Eisbad gestellt.

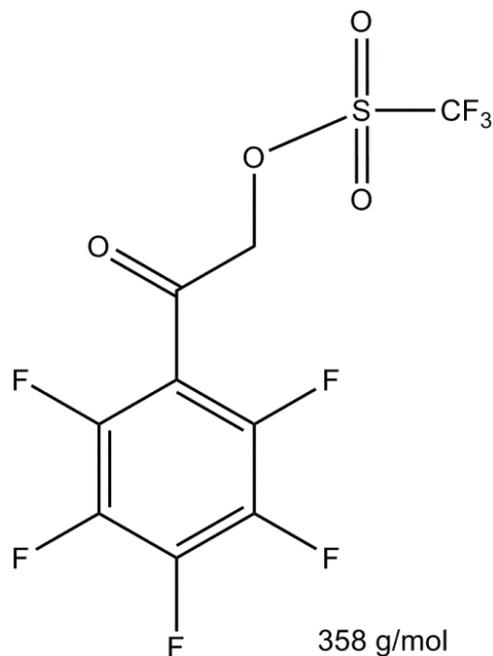
Der Kolben wurde mit 300 ml Ether gefüllt und dieser mit 105 ml eisgekühlter 40% KOH (= 42g) unterschichtet. In sehr kleinen Portionen wurden 31g N-Methyl-N-Nitroso-Harnstoff (0,3mol) in den Ether eingetragen - die Temperatur durfte dabei 5 °C nicht übersteigen. Nach der letzten Zugabe wurde noch 10 min gerührt und schließlich die Etherphase (= Diazomethanlösung) abgegossen, welche dann 3 h über KOH getrocknet wurde. Die ätherische Lösung wurde gefiltert, in einen 1 L Rundkolben überführt und wieder gekühlt.

Anschließend wurde mit einem Tropftrichter langsam eine Lösung aus 25g ( $1,06 \times 10^{-1}$  mol) Pentafluorobenzoylchlorid in 100 ml Diethylether zugetropft, das Eisbad entfernt und die Reaktionslösung 1 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Der Ether wurde am Rotavapor abrotiert, bis ein leicht visköses gelbes Öl zurückblieb, welches in 200 ml Chloroform gelöst und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert wurde. Das Chloroformfiltrat wurde mittels Rotavapor auf ca. 75 ml eingengt und langsam mit ca. 200 ml Hexan versetzt. Die Lösung wurde schließlich auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt (- 20 °C).

Die entstandenen Kristalle wurden mittels Nutsche durch Vakuumfiltration abgetrennt, mit etwas Hexan gewaschen und nach zehnmütigem Trocknen an der Luft im Vakuumexsikkator gelagert. [MINKLER et al., 2005]

**Ausbeute an blass gelben Nadeln:** 14,9g (60% Theorie = 80% Literatur)

### 5.3.3.2 Synthese von Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat nach Minkler et al., 2005



**Abbildung 26: Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat**

Zur Synthese von Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat wurde ein sauberer und trockener 500 ml 3-Hals Rundkolben mit einem Magnetrührer, CaCl<sub>2</sub>-Trocknungsrohr, Glasstopfen und Gaszuleitungsrohr ausgestattet und unter dem Reaktionsgefäß ein Trockeneis/Propanolbad (ca. -20 °C) platziert. Durch das Gaszuleitungsrohr wurde Schwefeldioxid (bp -10 °C) in den Kolben eingeleitet, welches durch die niedrige Temperatur darin kondensierte.

Nach der Kondensation von ca. 300 ml SO<sub>2</sub> wurde der Kolben kurz geöffnet und das zuvor synthetisierte (= 14,9 g = 6,3 · 10<sup>-2</sup> mol) Pentafluoro-2-diazoacetophenon mit einem Schlifftrichter in einem Mal zugefügt. Der Inhalt wurde ca. 5 min gerührt, bevor mittels Pasteurpipette 10g Trifluoromethansulfonsäure (6,7 · 10<sup>-2</sup> mol) hinzugefügt und nach Aufsetzen des Trocknungsrohrs erneut 5 min gerührt wurde.

Anschließend wurde die Kühlvorrichtung entfernt und damit sich die Reaktionslösung nicht zu schnell erwärmt, durch ein Eis/Wasserbad ersetzt.

Nach Verdampfung des  $\text{SO}_2$  (ca. 1h) blieb ein blass grün-gelbes Produkt zurück, welches in 160 ml Dichlormethan gelöst und schließlich mit Aktivkohle gesäubert und mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet wurde. Die Lösung wurde anschließend gefiltert und das Filtrat (nahezu farblos) mittels Rotavapor auf ca. 75 ml eingedampft (rot).

Der Kolben wurde von dem Rotavapor abmontiert, erneut am Stativ befestigt und mit einem heißen Wasserbad kurz erwärmt. Das Produkt wurde langsam so lange mit Pentan (ca. 160ml) versetzt, bis eine Konsistenzänderung der Lösung zu erkennen war und durch die Zugabe eines Impfkristalls (=entnommener Tropfen der Lösung, der durch Kratzen bei Raumtemperatur sofort kristallisiert) der Kristallisationsprozess initiiert.

Um eine sehr langsame Kristallisation zu gewährleisten und somit eine Ausbeute an sehr großen Kristallen zu erhalten, wurde der Kolben zuerst aus dem heißen Wasser entfernt und über 1 Stunde bei Raumtemperatur abgekühlt und schließlich in ein kaltes Wasserbad gestellt, welches durch langsame Zugabe von Eis immer weiter abkühlt wurde.

Nach ca. einer weiteren Stunde wurden die entstandenen Kristalle mit einer Nutsche vakuumfiltriert, mit etwas Pentan gewaschen und nach 10minütigem Trocknen an der Luft im Vakuumexsikkator gelagert. [MINKLER et al., 2005]

**Ausbeute an farblosen, transparenten, flachen Nadeln:** 17,7 g (= 78% Theorie = 90% Literatur)

Die Identität der Verbindung wurde mittels NMR-Spektroskopie und Schmelzpunktbestimmung überprüft (siehe 5.5.1).



### 5.3.4 Herstellung des Derivatisierungsreagenz und Derivatisierung

Jede Probe wurde durch die Zugabe von N,N-Diisopropylethylamin Lösung (10 µl in 100 ml Acetonitril) und Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat Lösung (0,1 mol/l in Acetonitril) derivatisiert.

*Herstellung des Derivatisierungsreagenz:*

- N,N-Diisopropylethylamin Lösung (10 µl in 10 ml Acetonitril)
  - = 30 µl in 30 ml Acetonitril
  
- Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat Lösung (0,1 mol/l in Acetonitril)
  - = 1,8 g in 50 ml Acetonitril

### 5.3.5 Laufmittel

Mobile Phase: Acetonitril/Wasser

Flussrate: laut Literatur eigentlich 1,3 ml/min aber das ist zu viel für ESI Quelle, deshalb 0,8 ml/min

Tabelle 8: Laufmittel Verhältnisse

Bezeichnung	Laufmittel	Verhältnis
Eluent A	ACN:H <sub>2</sub> O	80:20
Eluent B	ACN:H <sub>2</sub> O	20:80
Eluent C	ACN:H <sub>2</sub> O:Essigsäure:Triethylamin	20:80:0.5:0.5
Eluent D	ACN:H <sub>2</sub> O:Essigsäure:Triethylamin	90:10:0.5:0.5

### 5.3.6 HPLC – Einstellungen

#### 5.3.6.1 Colum oven:

- Temperature: 25°C
- Lower Limit: 5°C
- Upper Limit: 85°C
- Equilibration Time: 0.5 min
- Ready Temp Delta: 1°C

#### 5.3.6.2 Pump:

<b>Pressure Limits</b>	Lower Limit:	5 bar
	Upper Limit:	300 bar
<b>Maximum Flow</b>	Up:	1.2 ml/min <sup>2</sup>
	Down:	1.2 ml/min <sup>2</sup>
<b>Acceleration/Deceleration</b>		

#### 5.3.6.3 Multistepgradient

Zur optimalen Auftrennung der Acylcarnitine sowie des freien Carnitins wurde ein Multistep Gradient zu Elution verwendet:

- Die Elution beginnt mit 100% Eluent A mit einer Flussrate von 0.8 ml/min
- 2 min nach der Injektion wird Eluent A durch 100% Eluent B ersetzt
- 4min nach der Injektion wird ein Gradient errichtet von 100% B zu 80% C und 20% D über einen Zeitraum von 3 min
- Anschließend über 15 min Gardient von 70% C und 30% D
- 20 min 50% C, 50% D
- 20 min 100% D
- Eluent D 100% für 8 min
- 70 min nach der Injektion wird das System rückgebracht auf 100% A für weitere 5 min.

Die Multistep Gradient - Methode für Acylcarnitin, sowie freies- und Gesamtcarnitin werden in Tabelle 9 und 10 verdeutlicht.

**Tabelle 9: Multistep Gradient - Methode für die Messung der Acylcarnitine**

	Retention (min)	Flow (ml/min)	%A	%B	%C	%D
1	0	0.8	100	0	0	0
2	0	0.8	100	0	0	0
3	2	0.8	100	0	0	0
4	2	0.8	0	100	0	0
5	4	0.8	0	100	0	0
6	4	0.8	0	0	100	0
7	7	0.8	0	0	80	20
8	22	0.8	0	0	70	30
9	42	0.8	0	0	50	50
10	62	0.8	0	0	0	100
11	70	0.8	0	0	0	100
12	70	0.8	100	0	0	0
13	75	0.8	100	0	0	0

**Totale Laufzeit pro Probe/Injektion: 75 min**

**UV- Detektor: 300nm 10-80min**

**Tabelle 10: Verkürzte Version für die Analyse von Gesamtcarnitin und freiem Carnitin**

	Retention (min)	Flow (ml/min)	%A	%B	%C	%D
1	0	0.8	100	0	0	0
2	0	0.8	100	0	0	0
3	2	0.8	100	0	0	0
4	2	0.8	0	100	0	0
5	4	0.8	0	100	0	0
6	4	0.8	0	0	100	0
7	7	0.8	0	0	80	20
8	7	0.8	0	0	0	100
9	12	0.8	0	0	0	100
10	12	0.8	100	0	0	0
11	14	0.8	100	0	0	0

**Totale Laufzeit pro Probe/Injektion: 14 min**

**UV- Detektor: 300nm 0-14min**

**5.3.6.4 Sampler:**

<b>Draw speed</b>	30.000 µl/sec
<b>Draw delay</b>	3000 ms
<b>Dispense speed</b>	20.000 µl/sec
<b>Dispense delay</b>	0 ms
<b>Dispense to waste speed</b>	32.000 µl/sec
<b>Sample hight</b>	2 mm

<b>Injekt wash:</b>	Both
<b>Wash volume:</b>	100 µl
<b>Wash speed:</b>	20 µl/s
<b>Injektion mode:</b>	normal

**5.3.7 MS- Einstellungen**

Methode: Ionisierung durch ESI im positiven Mode.

LCQ FLEET MS:

<b>Mass range</b>	normal
<b>Scan rate</b>	normal
<b>Scan type</b>	full
<b>Polarity</b>	positive
<b>Data typ</b>	profile

	<b>First mass (m/z)</b>	<b>Last mass (m/z)</b>
<b>Scan ranges:</b>	150.00	750.00

### 5.3.8 **Messung**

Mittels Autosampler werden jeweils 5 µl sowohl der Standardverbindungen, als auch der Probenlösungen injiziert. Carnitin- und Acylcarnitin-Pentafluorphenacylester werden der Reihe nach durch Ionenaustauscher/RP-Chromatographie mit „single non-end-capped“ C8 Säule getrennt und durch Elektrospray ionisiert, in der Ionenfalle analysiert und schließlich detektiert.

## 5.4 Ergebnisse und Diskussion

### 5.4.1 Versuche mit Standardverbindungen

Um die Methode im Vorfeld zu testen, wurden einige Testsubstanzen gemessen, die in weiterer Folge als Standardlösungen dienen:

#### 5.4.1.1 Versuchsreihe Acylcarnitine

	Einwaage	m/z	Retentionszeit (min)
Acetylcarnitin (C2)	1.5mg	412	13
Octanoylcarnitin (C8)	0.6mg	496	44
Decanoylcarnitin (C10)	0.6mg	524	41
Lauroylcarnitin (C12)	0.6mg	552	56
Myristoylcarnitin (C14)	0.7mg	580	60
Palmitoylcarnitin (C16)	0.5mg	608	61

#### Durchführung:

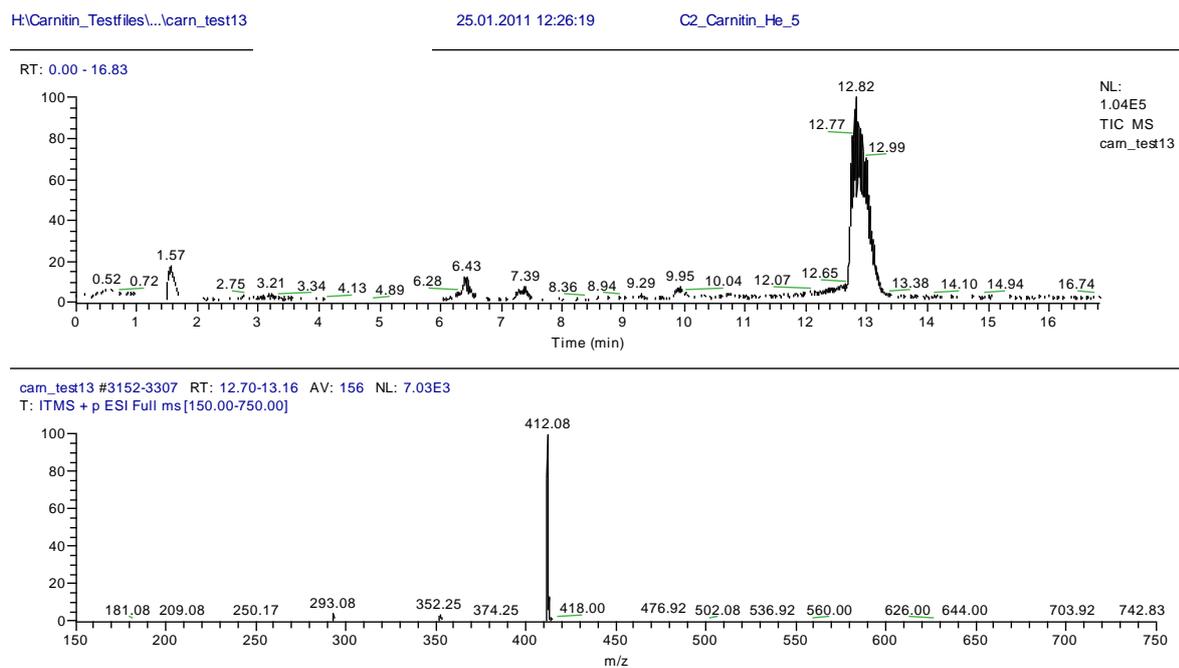
Die jeweilige Standardverbindung wurde mittels Analysenwaage in eine HPLC Phirole eingewogen, in 200  $\mu\text{l}$  Acetonitril gelöst, mit 300  $\mu\text{l}$  N,N-Diisopropylethylamin Lösung und 300  $\mu\text{l}$  Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat Lösung derivatisiert und anschließend unverdünnt gemessen.

**Anmerkung zur Interpretation von Chromatogrammen und Spektren:** Die nachfolgenden Abbildungen setzen sich aus zwei, beziehungsweise drei Spuren zusammen. In der ersten Spur wird immer der Totalionenstrom (total ion current = TIC) dargestellt, in der letzten das Massenspektrum. Bei der Spur dazwischen (wenn

vorhanden) handelt es sich um eine Einzelionenspur (single ion current = SIC). Der TIC ergibt sich aus der Summe der untersuchten Massen, in dieser Arbeit also um den Massenbereich 150 – 750 m/z. Aus dem Massenspektrum lassen sich Informationen über das Molekulargewicht der untersuchten Verbindungen entnehmen. War die zu untersuchende Verbindung im TIC nicht mehr als Peak zu erkennen, wurde eine SIC generiert. Diese Einzelionenspur erlaubt eine Einzeldarstellung der betreffenden Substanz, es handelt sich dabei jedoch nicht um eine reale Beobachtung, sondern um eine Rekonstruktion (Aufaddierung) des TIC.

Ebenfalls abgelesen werden können das injizierte Volumen, sowie die relative Intensität des größten Peaks im TIC, sowie der untersuchten Substanz im SIC.

### Ergebnis:



### **Abbildung 27: Acetylcarnitin (c= 0.2 mg/ml)**

In der Abbildung 27 kann man bei einer Retentionszeit von ca. 12.8 min einen deutlichen Peak mit einer Intensität  $1.04 \cdot 10^5$  erkennen. Im Ionenspektrum ( $M^+$  und nicht  $M+H$  Ion) konnte dieser Peak anhand der Masse von 412 als Acetylcarnitin identifiziert werden.

**5.4.1.2 Verdünnungsreihe**

	<b>Einwaage</b>	<b>m/z</b>	<b>Rt (min)</b>
<b>Octanoylcarnitin</b>	2.1 mg	496	39.7
<b>L-Carnitin</b>	2.2 mg	370	9.6
<b>L-Carnitinhydrochlorid</b>	2.0 mg	370	9.6

**Durchführung:**

Mittels Analysenwaage wurden die einzelnen Standardverbindungen jeweils in 10 ml Messkolben eingewogen und durch Auffüllen auf 10 ml in Acetonitril gelöst (c= 0.2 mg/ml). Daraus wurden jeweils 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen durch Entnahme eines Milliliters und erneutes Auffüllen auf 10 ml mit den Konzentrationen von 0.02 mg/ml, 0.002 mg/ml und 0.0002 mg/ml (2 µg/ml) hergestellt. Je 100 µl jeder Konzentration wurden entnommen, jeweils mit 300 µl Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat und 300 µl N,N-Diisopropylethylamin derivatisiert und schließlich 5 µl injiziert und gemessen.

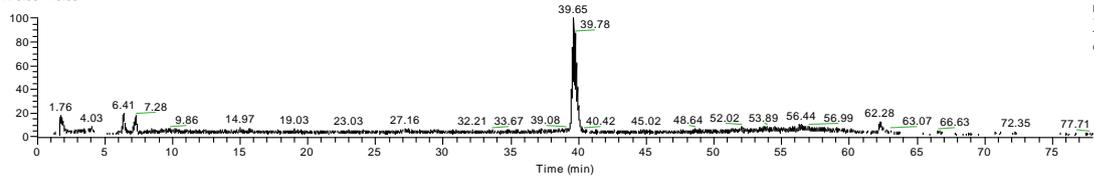
**Ergebnis:**

H:\Carnitin\_Testfiles\...c

25.01.2011 12:59:26

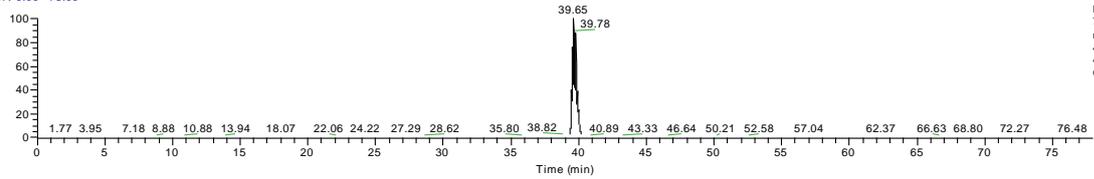
C8\_Carnitin\_0.2mg/ml\_5

RT: 0.00 - 78.00

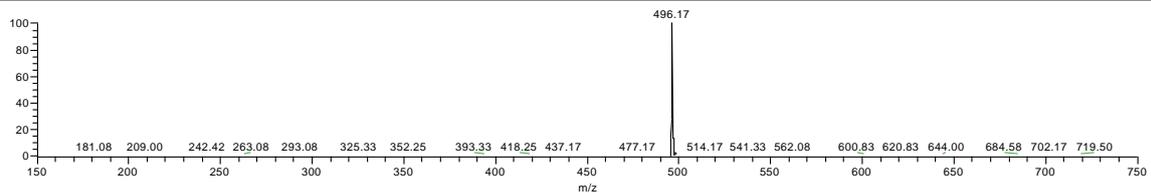


NL: 1.2E5  
TK: MS  
carn\_test14

RT: 0.00 - 78.00



NL: 7.9E4  
m/z: 495.50-496.50 MS  
carn\_test14



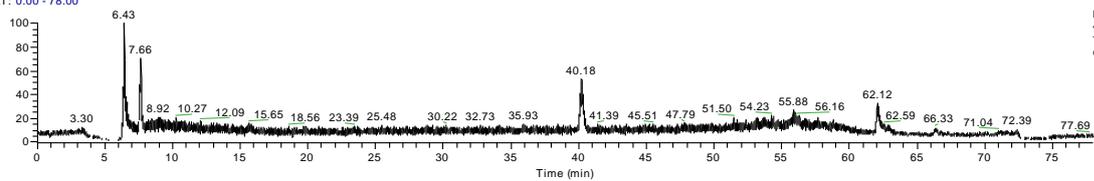
**Abbildung 28: Octanoylcarnitin (c = 0.2 mg/ml); Intensität 7.91 e4**

H:\Carnitin\_Testfiles\...c

25.01.2011 14:20:50

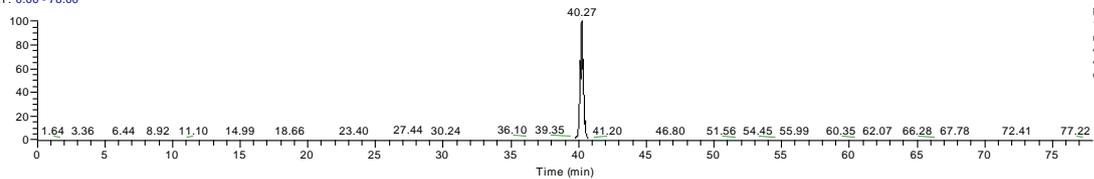
C8\_Carnitin\_0.02mg/ml\_5

RT: 0.00 - 78.00

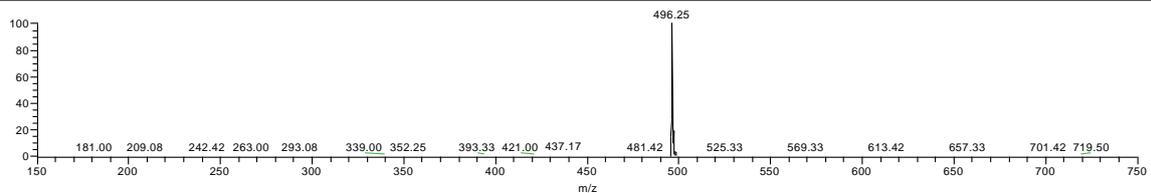


NL: 4.42E4  
TK: MS  
carn\_test15

RT: 0.00 - 78.00



NL: 1.35E4  
m/z: 495.50-496.50 MS  
carn\_test15



**Abbildung 29: Octanoylcarnitin (c = 0.02 mg/ml) Intensität 1.35 e4**

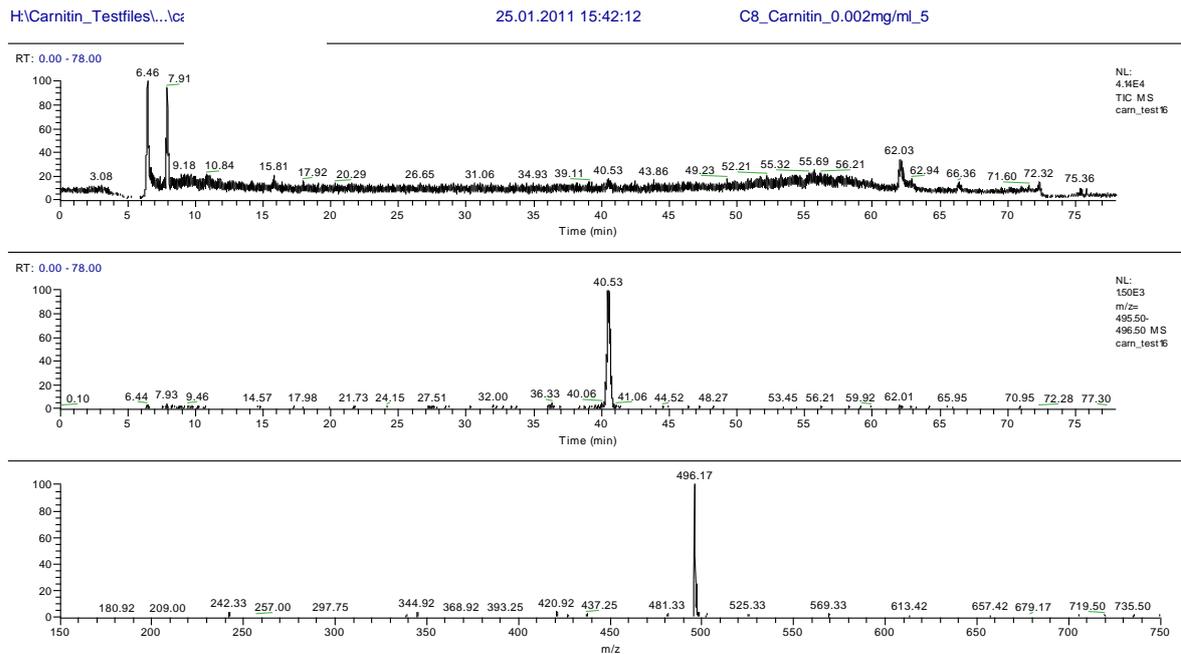


Abbildung 30: Octanoylcarnitin ( $c = 0.002 \text{ mg/ml}$ ) Intensität  $1.50 \text{ e}3$

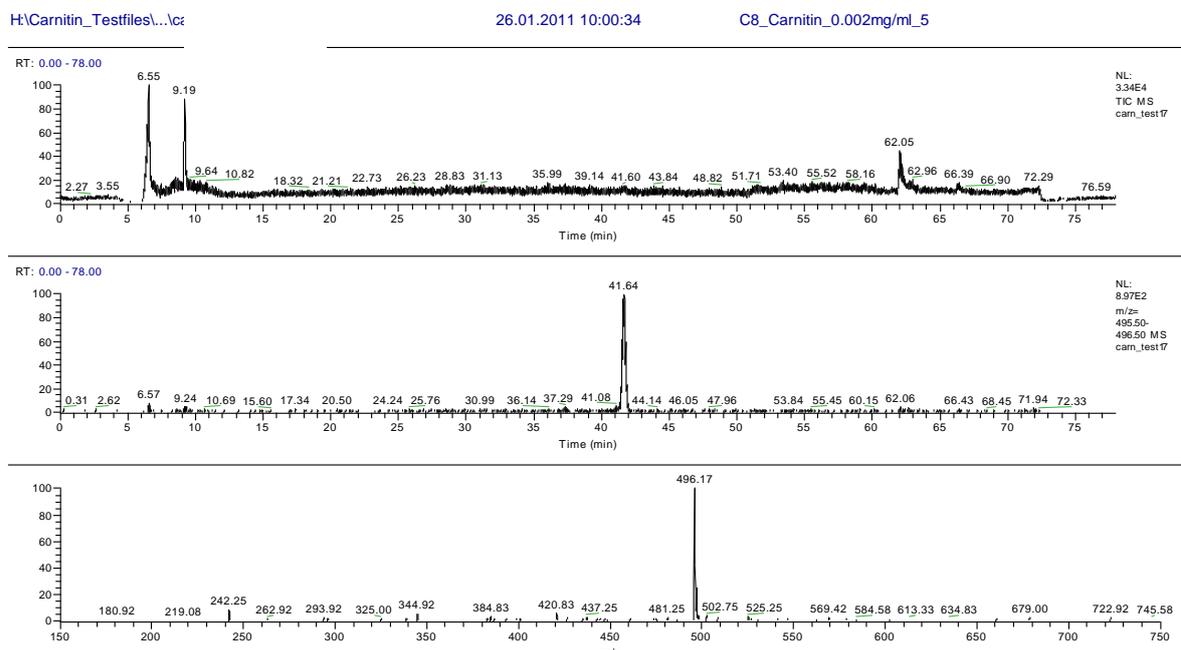


Abbildung 31: Octanoylcarnitin ( $c = 0.0002 \text{ mg/ml}$ ) Intensität  $8.97 \text{ e}2$

Bei einer Konzentration von  $0.2 \text{ mg/ml}$  (Abb. 28) kann man die Probensubstanz (in diesem Fall Octanoylcarnitin) im TIC bereits deutlich erkennen. Je verdünnter die Lösung, desto schwieriger wird dies (Abb. 29 und 30).

Bei einer Verdünnung von 1:1000 ( $c = 0.0002 \text{ mg/ml}$ ) ist die Substanz schließlich im TIC nicht mehr erkennbar (Abb. 31), durch die Aufaddierung zu einer Einzelionenspur kann jedoch wieder ein perfekter Peak generiert werden. Alle Spektren weisen eine sehr saubere Grundlinie auf, die Probensubstanz kann also klar von anderen Verbindungen (eventuell Verunreinigungen) unterschieden werden.

**Tabelle 11: Konzentrationen der verdünnten C8 -Lösungen und dazugehörige Intensitäten im Spektrum**

Konzentration [mg/ml]	Intensität
<b>0.2</b>	7.91 e4
<b>0.02</b>	1.35 e4
<b>0.002</b>	1.50 e3
<b>0.0002</b>	9.42 e1

In Tabelle 11 sind die unterschiedlichen Konzentrationen der Standardlösungen sowie die jeweiligen Intensitäten aufgelistet. Wie man daraus erkennen kann, verringert sich die Intensität durch jeden 1:10 Verdünnungsschritt ebenfalls um ca. um den Faktor 10.

Bei der Messung der Standardlösungen der freien Carnitine mit der etwas verkürzten und für FC modifizierten Methode wurden ähnlich gute Ergebnisse erzielt. Auch FC ist, wie in Abb. 32 und 33 ersichtlich, bis in den Mikrogramm Bereich ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) nachweisbar.

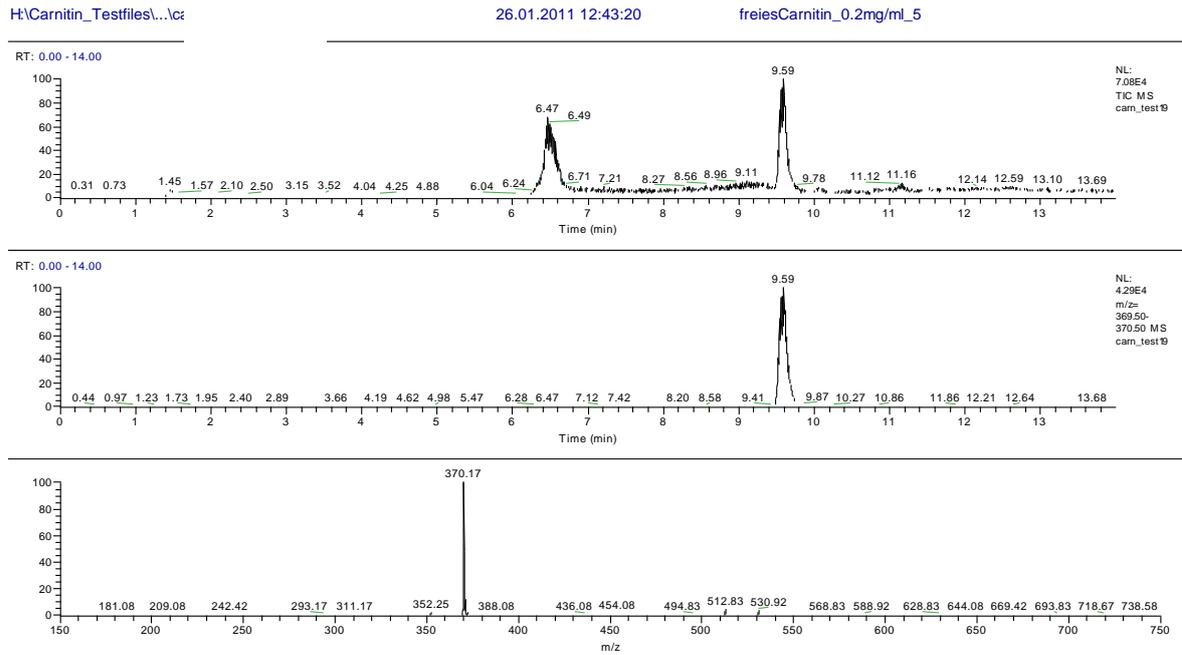


Abbildung 32: Freies Carnitin (c = 0.2 mg/ml) Intensität 4.29e4

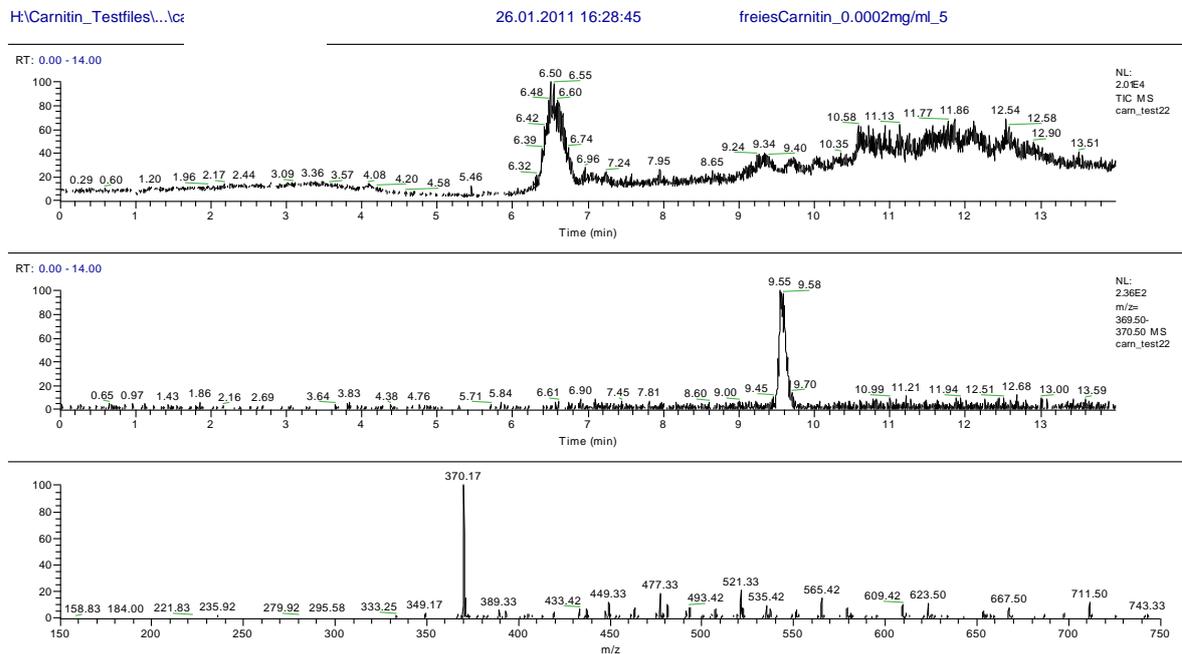


Abbildung 33: Freies Carnitin (c = 0.0002) mg/ml Intensität 2.36e2

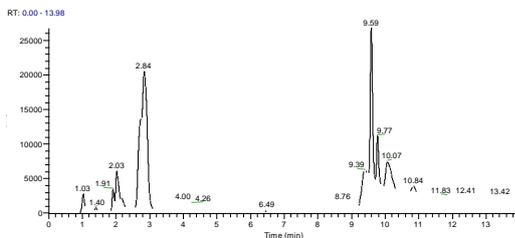
Bis zu einer Konzentration von 0.002 mg/ml war die Messsubstanz noch im Totalionenstrom sichtbar, bei einer Konzentration von 0.0002 mg/ml nur noch in der Einzelionenspur, jedoch gleich wie bei den Acylcarnitinen nach wie vor sehr

deutlich zu erkennen und auch das Spektrum weist nur sehr geringe Verunreinigungen auf. Mit jedem Verdünnungsschritt verringert sich auch hier, wie in Tabelle 12 ersichtlich, die Intensität jeweils ca. um den Faktor 10.

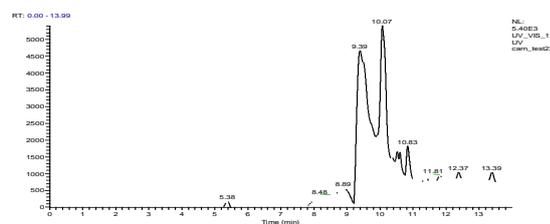
**Tabelle 12: Konzentrationen der verdünnten FC - Lösungen und dazugehörige Intensitäten im Spektrum**

Konzentration [mg/ml]	Intensität
0.2	4.29 e4
0.02	7.15 e3
0.002	1.44 e3
0.0002	2.36 e2

Zusätzlich wurde ein UV-Spektrum generiert, welches jedoch, wie in Abb. 34 a und 34b dargestellt, keine so deutlichen Aussagen zulässt wie die Peaks in der Einzelionenspur.



**Abbildung 34a: UV-Spektrum FC (c = 0.2 mg/ml) Intensität 2.68 e4**



**Abbildung 34b: UV-Spektrum FC (c = 0.0002 mg/ml) Intensität 5.4 e3**

#### 5.4.1.3 Mischung verschiedener Standardverbindungen

Um sicherzustellen, dass auch mehrere Acylcarnitine (welche ev. auch nahe beieinander liegen) gut getrennt werden, wurden Mischungen aus verschiedenen Standardlösungen in gleichen Verhältnissen (v:v) hergestellt und gemessen.

Durchführung:

Dazu wurden 500 µl bereits derivatisierte Octanoylcarnitinlösung und 500 µl ebenso bereits derivatisierte Acetylcarnitinlösung vereint und unter gleichen Bedingungen wie vorher gemessen.

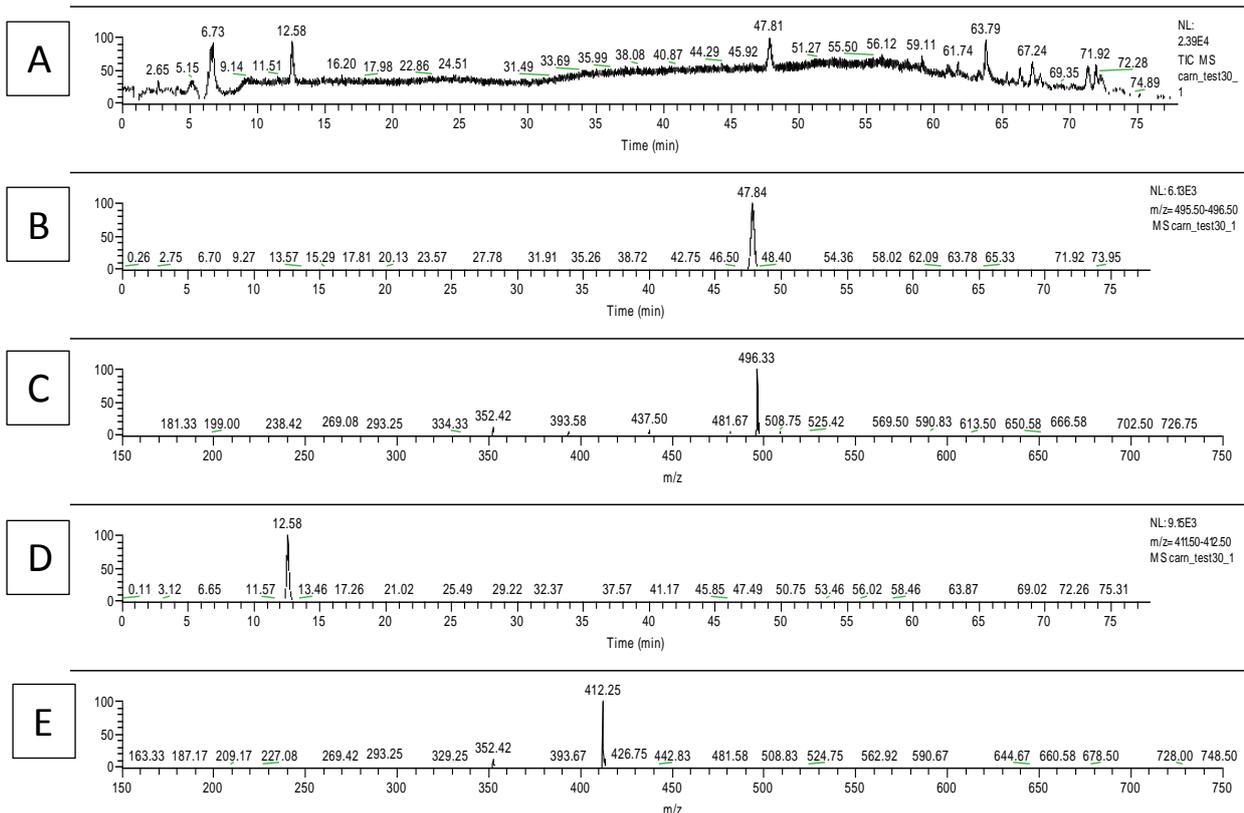
Dabei ist anzumerken, dass die Ausgangskonzentration beider Einzellösungen 0.02 mg/ml betrug. Da durch die Mischung jedoch eine 1:1 Verdünnung stattgefunden hat, musste das Doppelte Volumen injiziert werden (= 10 µl), um auf vergleichbare Ergebnisse zu den vorher ermittelten Werten zu kommen.

Ergebnis:

H:\Carnitin\_Testfiles\... \carn\_test30\_1

15.03.2011 11:03:08

C2\_C8\_Carnitin\_0.02mg/ml\_10



**Abbildung 35: Octanoylcarnitin und Acetylcarnitin, Mischung gleicher Verhältnisse**

In der Spur A wird der TIC dargestellt. Bereits hier kann man zumindest einen deutlichen Peak bei ca. 20 min erkennen. In Spur B wurde die Einzelionenspur für Octanoylcarnitin generiert, wobei der Peak mit einer Intensität von  $6.13 \cdot 10^3$  mit den vorher ermittelten Ergebnissen durchaus vergleichbar ist.

Ebenfalls Acetylcarnitin ist in der Einzelionenspur, dargestellt in Spur D, mit einer Intensität von  $9.15 \cdot 10^3$  deutlich zu erkennen. In Spur C und E finden sich jeweils die zugehörigen Massenspektren der Chromatogramme.

#### **5.4.1.4 Versuchsreihe Festphasenextraktion**

Um die Funktionstüchtigkeit der Festphasenextraktion zu testen, wurde erstmals versucht, definierte Menge an Standardverbindungen möglichst ohne Verluste zu extrahieren.

	<b>Einwaage</b>	<b>m/z</b>	<b>Rt (min)</b>
<b>Freies Carnitin/L-Carnitin</b>	2.0 mg	370	9.6
<b>Acetylcarnitin (C2)</b>	2.1 mg	412	13
<b>Octanoylcarnitin (C8)</b>	2.0 mg	496	39.7

#### Durchführung:

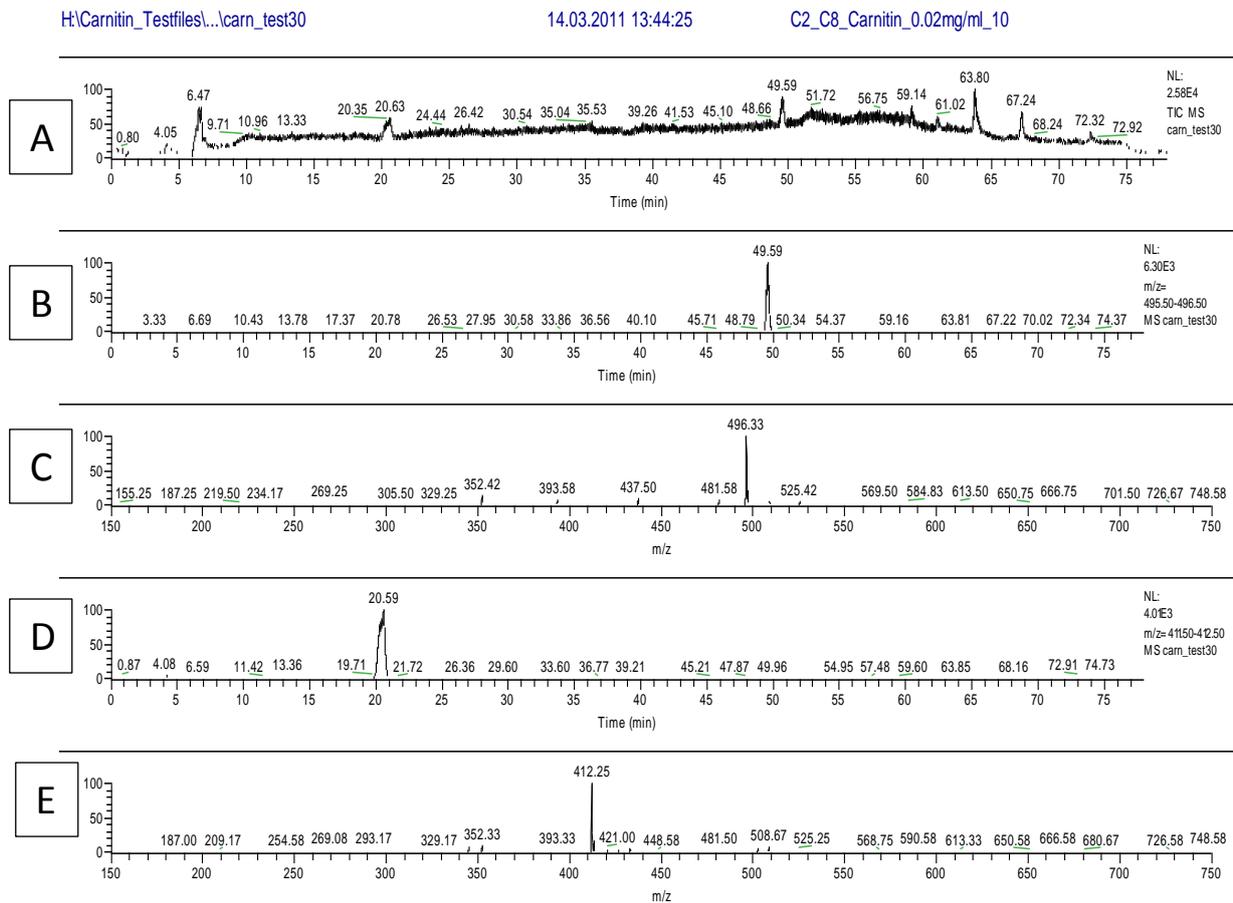
Jede Standardverbindung wurde nach Einwaage von ca. 2 g mit ACN/Methanol (3:1, v:v) auf 10 ml aufgefüllt und auf eine Konzentration von 0.02 mg/ml verdünnt (1:10)

Jeweils 1 ml der jeweiligen Lösung wurde auf die Festphase aufgetragen, die enthaltenen Carnitine extrahiert, anschließend am Rotavapor eingedampft, in einen Milliliter ACN/Methanol (3:1) aufgenommen und schließlich wieder derivatisiert und injiziert.

Ergebnis:

## Octanoyl und Acetylcarnitin:

Nach wie vor deutliche Peaks und saubere Spektren der beiden Acylcarnitine, jedoch kleine Einbußen in der Intensität.



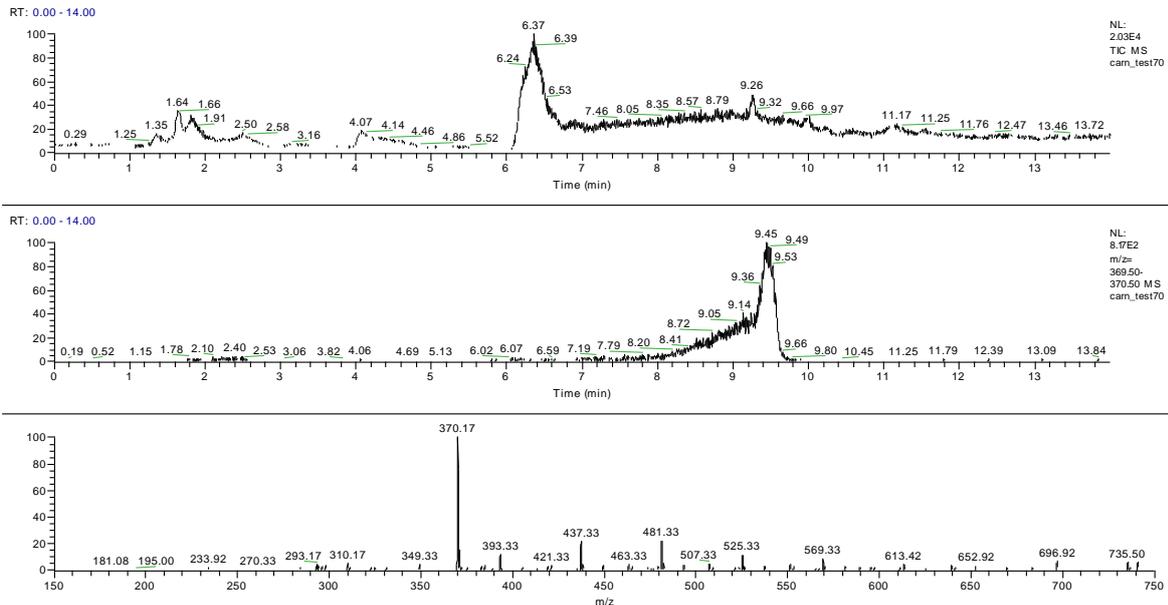
**Abbildung 36: Octanoylcarnitin und Acetylcarnitin mit Festphasenextraktion; Spur A: TIC; Spur B: SIC von Octanoylcarnitin, Intensität 6.30 e 3; Spur C: Massenspektrum von Octanoylcarnitin; Spur D: SIC von Acetylcarnitin, Intensität 4.01 e 3; Spur E: Massenspektrum von Acetylcarnitin;**

## Freies Carnitin:

H:\Carnitin\_Testfiles\...c

24.03.2011 15:30:03

FC\_FF\_neuDerivat\_tunever01\_0.02mg/ml\_\_10

**Abbildung 37: Freies Carnitin mit Festphasenextraktion, Intensität FC: 8.17 e 2**

Auch hier ist der Peak (bei einer Injektion von 10  $\mu$ l) in der Einzelionenspur deutlich ersichtlich, jedoch mit Einbußen der Intensität. Das Spektrum ist immer noch eindeutig, weist jedoch deutlich mehr Verunreinigungen auf.

## 5.4.2 Messung der Proben

### 5.4.2.1 Versuchsreihe Probe

#### Durchführung:

1 ml der Probe (505/1) wurde mit 1 ml ACN/Methanol (3:1) versetzt, 2 sec gevortext und 5 min bei 13200g zentrifugiert.

Anschließend wurden 400 µl des Überstands entnommen und auf die Festphase aufgetragen, mit 0.5 ml Methanol gewaschen und mit 1 ml Wasser/Methanol/Essigsäure Gemisch (10:9:1) die freien Carnitine und Acylcarnitine eluiert. Das Eluat wurde am Rotavapor bis zur Trockenheit eingedampft und in 200 µl ACN/Methanol (3:1) aufgenommen. Die gesamte Lösung wurde in HPLC Phiolen überführt und derivatisiert.

#### Ergebnis:

Im TIC konnten keine relevanten Peaks, weder für Acylcarnitine nach der verlängerten Methode, noch für freies Carnitin mittels verkürzter Methode, identifiziert werden. Die jeweilige Aufaddierung zur SICs konnte ebenfalls keine Peaks ermitteln, im Massenspektrum waren keine Peaks mit den untersuchten m/z zu finden.

Aufgrund der Annahme, dass die Festphasenextraktion durch das Plasma blockiert wird, wurde anschließend versucht, eine Plasmaprobe mit einer Standardlösung zu versetzen und diese vollständig zu extrahieren und nachzuweisen:

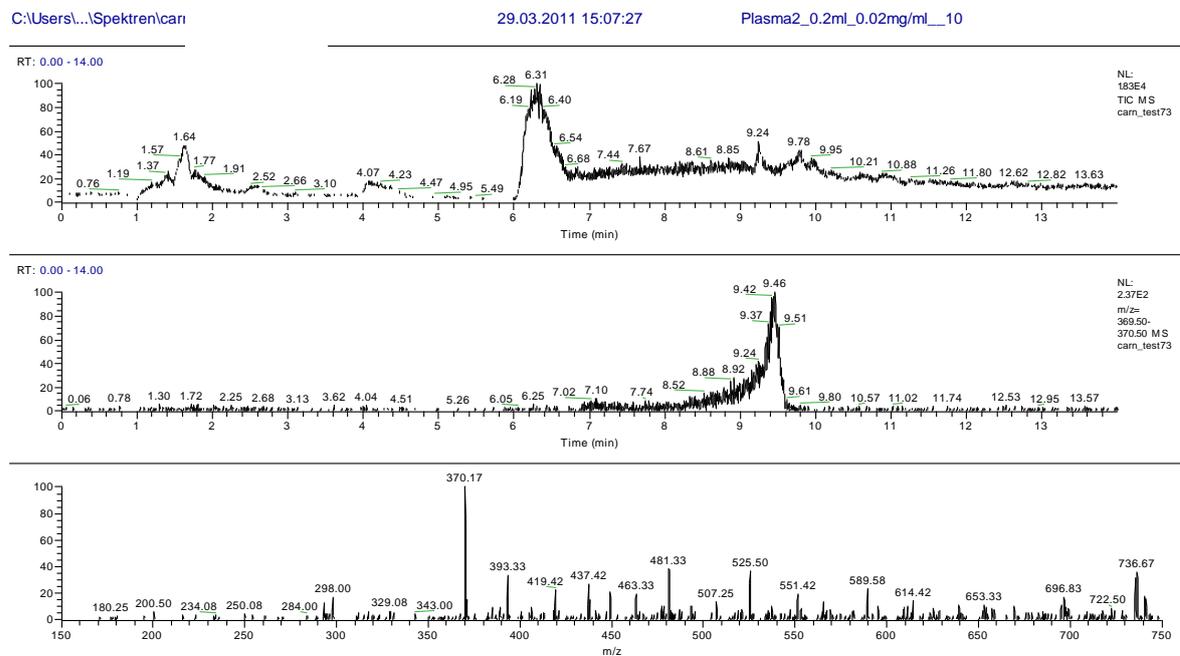
### 5.4.2.2 Versuchsreihe Standards mit Probe:

#### Durchführung Freies Carnitin:

50 µl der Probe (505/1) wurden dazu mit 1ml freiem Carnitin ( $c=0.02$  mg/ml) als Standard versetzt, 2 sec gevortext und 5 min zentrifugiert.

400 µl der Probe wurden auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde wie vorher am Rotavapor bis zur Trockenheit eingedampft und in 200 µl ACN/Methanol (3:1) aufgenommen. Die gesamte Lösung wurde in HPLC Phiolen überführt, derivatisiert und gemessen.

#### Ergebnis:



**Abbildung 38: Probe + freies Carnitin als Standard, Intensität  $2.97 \cdot 10^2$**

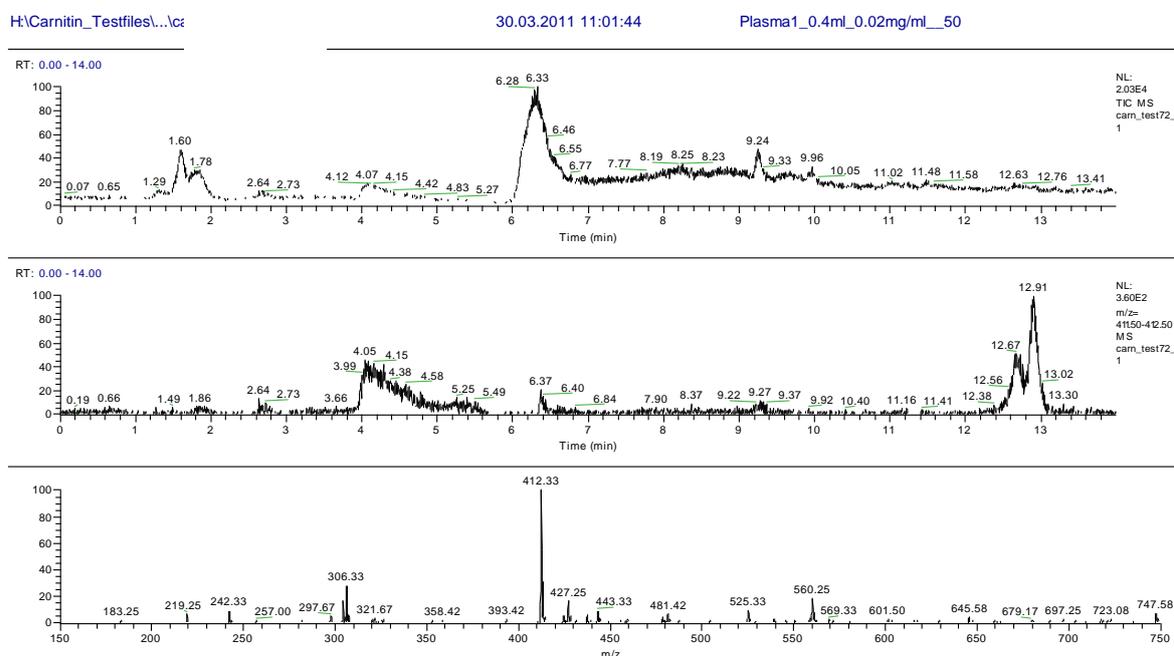
Das Spektrum weist viele Verunreinigungen auf, der Peak im SIC ist sehr in die Länge gezogen und die Intensität ist ca. um einen Faktor 10 geringer als vorher. Die Intensität dieser Probe müsste mindestens gleich groß, zuzüglich der FC, die in der Probe enthalten sind und einer Injektion von 10 anstatt 5 µl, jedoch sogar deutlich größer sein, als jene der zugehörigen Standardlösung (Intensität  $7.15 \cdot 10^3$ ). Dies war jedoch mit einer Intensität von lediglich  $2.97 \cdot 10^2$  keineswegs der Fall. Es scheint so, als würde das Plasma die zugesetzten Carnitine „schlucken“.

Durchführung Acylcarnitine:

10 µl der Probe (505/2) wurden mit 10 µl C8 und 10 µl C2 Carnitin als Standards und 1 ml ACN/Methanol (3:1) versetzt. Das Ganze wurde 2 Sekunden gevortext und 5 min bei 13200g zentrifugiert.

Der Überstand wurde entnommen und auf die Festphase aufgetragen. Festphasenextraktion und Derivatisierung wie bereits vorher beschrieben.

50 µl der derivatisierten Probe wurden injiziert.



**Abbildung 39: Probe + Acylcarnitine als Standard, Intensität Acetylcarnitin  $3.60 \text{ e } 2$ ;**

Auch hier konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Die Intensität des Acetylcarnitins ist bei einem Injektionsvolumen von 50 µl viel zu gering, Octanoylcarnitin konnte auch durch die Einzelionenspur nicht nachgewiesen werden.

## 5.5 Zusätzliche Experimente zur Fehlerermittlung

### 5.5.1 Derivatisierungsreagenz

#### 5.5.1.1 Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance = NMR) von Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat

Die Untersuchung der elektronischen Umgebung einzelner Atome und der Wechselwirkungen mit seinen Nachbaratomen, ermöglicht die Aufklärung der Struktur und der Dynamik von Molekülen. Dazu wurde ein NMR Spektrum von Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat erstellt, die Kristalle wurden in Deuteriochloroform gelöst.

#### Ergebnis:

Tabelle 13: Ergebnisse der Kernspinresonanz Spektroskopie

	Literatur	Ermittelte Werte
<sup>1</sup> H NMR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Singlet 5.31 ppm (CH<sub>2</sub>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Singlet 5.3 ppm</li> </ul>
<sup>13</sup> C NMR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triplet 76.39 ppm (CH<sub>2</sub>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triplet 76.52 ppm</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quartet 118.68 ppm (CF<sub>3</sub>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quartet 118.89 ppm</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 Duplets (Aromaten): 138.2 ppm 144.8 ppm 145.7 ppm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiplet: zwischen 137 und 147 ppm</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Singlet 183.21 ppm (CO)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Singlet 183.34 ppm</li> </ul>
<sup>19</sup> F NMR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Singlet -74.8 ppm (CF<sub>3</sub>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Singlet bei 74.8 ppm</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiplets: - 139.51 ppm - 143.98 ppm - 158.66 ppm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Multiplets: - 138.5 ppm - 134.9 ppm - 158.6 ppm</li> </ul>

Wie man aus der Tabelle 13 ablesen kann, stimmen die Spektren mit den Literaturangaben vollkommen überein.

Durch die Lagerung hat sich auf den Kristallen im Laufe von zwei Wochen eine watteartige Substanz gebildet (Sublimiert). Aufgrund der Annahme, dass es sich bei dieser Watte und den Kristallen um zwei verschiedene Produkte handelt, bzw. dass das Reagenz nicht vollkommen sauber ist und sich noch andere Substanzen darin befinden, wurde eine Schmelzpunktbestimmung der Watte sowie der Kristalle durchgeführt.

#### **5.5.1.2 Schmelzpunktbestimmung nach Kofler**

Der Schmelzpunkt von Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat wird mit einem Kofler-Heiztischmikroskop = Kristallisationsmikroskop ermittelt. Dieses besteht aus einer beheizbaren Metallplatte (typischer Temperaturbereich 50-350 °C) und einer Öffnung von ca. 1.5 cm in der Mitte, durch die das Licht des Mikroskops durchtreten kann, sowie einem Thermometer zur Temperaturablesung.

#### Durchführung:

Mit einem Spatel wurden einige Kristalle bzw. eine Spatelspitze der „Watte“ auf die Metallplatte aufgetragen und durch die Erhöhung der Temperatur deren Schmelzverhalten beobachtet. Die Temperatur am definitiven Schmelzpunkt wurde abgelesen.

#### Ergebnisse:

- Schmelzpunkt „Watte“: 67.3 °C

Ein komplettes Aufschmelzen der Probe innerhalb von 0.4 °C konnte beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass die Substanz sehr

rein ist. Dieser ermittelte Wert liegt etwas höher als der Literaturwert von 63 °C.

- Schmelzpunkt Kristalle: 66.3 °C

Der Schmelzpunkt der Kristalle lag bei 64 °C, wobei jedoch nicht alle Kristalle vollständig geschmolzen waren. Das Ende des Schmelzprozesses und somit die vollständige Aufschmelzung aller Kristalle konnte erst bei 67 °C beobachtet werden. Diese zwei verschiedenen Schmelzpunkte deuten auf 2 verschiedene Substanzen hin. Die einzige Möglichkeit, um dies zu überprüfen, war ein neues NMR- Spektrum:

#### ***5.5.1.3 Erneute NMR- Spektroskopie des Derivatisierungsreagenz***

Sowohl für die Watte als auch für die Kristalle wurde ein NMR Spektrum erstellt.

##### *Ergebnis:*

Die Werte beider Substanzen stimmten mit vorher ermittelten – und somit auch den Literaturwerten - überein. Bei der Watte und den Kristallen handelt es sich also eindeutig um dieselbe Substanz.

Daraus kann gefolgert werden, dass das synthetisierte Derivatisierungsreagenz bei Raumtemperatur im Dunkeln über einen sehr langen Zeitraum (mind. 4 Monate) stabil ist und sich nicht zersetzt. Die Kristalle wurden zu Beginn im Exsikator (im Vakuum) gelagert, jedoch konnte erwiesen werden, dass das Reagenz auch ohne Lagerung im Vakuum erhalten bleibt.

### 5.5.1.4 Unterschiedliche Derivatisierungsvolumina

Aufgrund der Annahme, dass auch andere Inhaltsstoffe des Plasmas mit dem Reagenz reagieren und folglich der Überschuss an Derivatisierungsreagenz erhöht werden muss, bzw. wenn durch zu großem Überschuss des Reagenz die Reaktion beeinträchtigt wird, erniedrigt werden muss.

Ermittlung der optimalen Menge an Derivatisierungsreagenz:

Probenbezeichnung	Volumen Standardlösung c = 0.2 mg/ml	Volumen N,N-Diisopropyl- ethylamin	Volumen Derivatisierungs- reagenz
FC 1	100 µl	300 µl	300 µl
FC 2	100 µl	200 µl	200 µl
FC 3	100 µl	200 µl	100 µl

Durch die Veränderung der Derivatisierungsvolumina auf 200µl N,N-Diisopropylethylamin und 100µl Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat konnte ein wesentlich besseres Ergebnis erzielt werden:

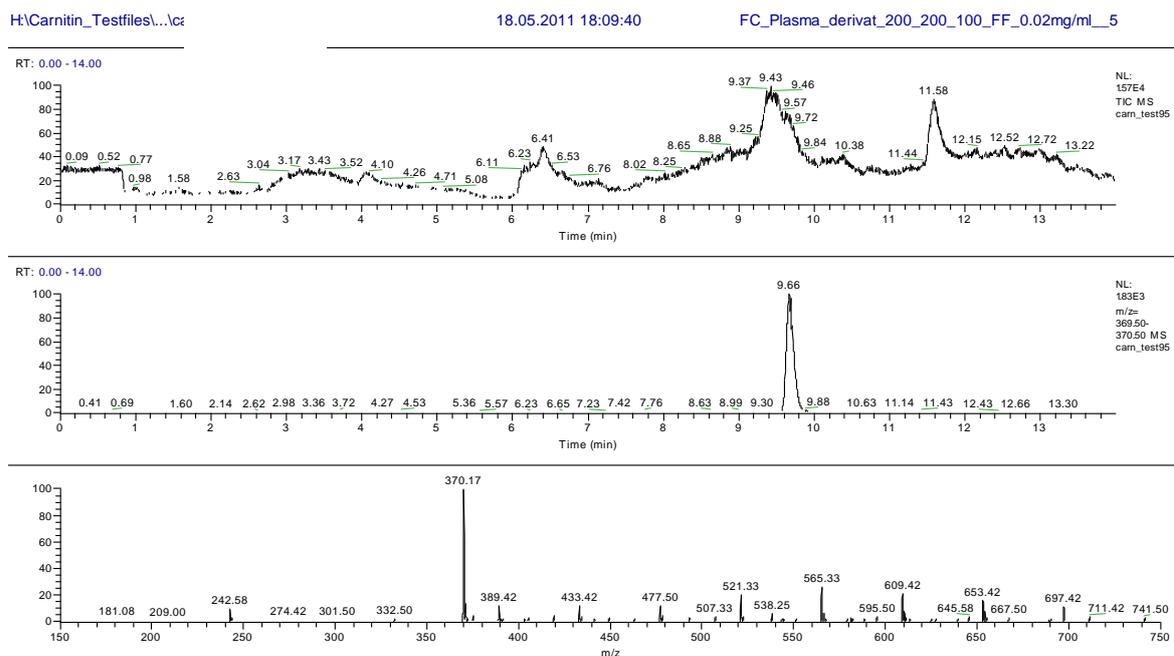


Abbildung 40: Freies Carnitin im Plasma, derivatisiert mit 200 µl N,N- Diisopropylethylamin und 100 µl Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat

Die Intensität des freien Carnitins mit  $1.83 \cdot 10^{-3}$  ist zwar wesentlich besser als vorher, jedoch immer noch um einen Faktor 10 geringer als die Intensität der Standardlösung. Die Verunreinigungen sind ebenfalls deutlich höher.

Bei der Messung von Plasma ohne Standardlösung (also der Messung der allein in der Plasmaprobe vorhandenen Carnitine) konnte nach wie vor weder für freies Carnitin, noch für die Acylcarnitine ein vernünftiges Spektrum generiert werden.

### 5.5.1.5 Verschiedene Lösungsmittel

	Einwaage	Lösungsmittel	Konzentration
<b>Freies Carnitin 1</b>	1.3 mg in 5ml	ACN/Methanol (3:1) getrennt	0.26 mg/ml
<b>Freies Carnitin 2</b>	1.2 mg in 5ml	ACN/Methanol (3:1) Mischung	0.24 mg/ml
<b>Freies Carnitin 3</b>	1.7 mg in 5ml	Methanol	0.34 mg/ml
<b>Freies Carnitin 4</b>	1.3 mg in 5ml	Acetonitril	0.26 mg/ml

#### Ergebnis:

Durch die unterschiedlichen Lösungsmittel konnte keine zusätzliche Optimierung erzielt werden.

### **5.5.1.6 Veränderung der Extraktionsmethode**

#### **- Mit Stickstoff einengen**

Aufgrund der Annahme dass die Carnitine eventuell bei der Abrotierung im Rotavapor verloren gehen, wurde versucht, diesen Schritt zu umgehen, indem die Probe mit Stickstoff eingengt wurde. Dabei wurde so lange Stickstoff auf die Probenlösung (Eluat der Festphase) geblasen, bis diese auf ca. 200µl aufkonzentriert war und anschließend wie bisher derivatisiert und gemessen.

Ergebnis: keine Verbesserung

#### **- Proteinfällung mit anschließender Zentrifugierung und Filtration**

Aufgrund der Annahme, dass die Carnitine in der Festphase hängen bleiben und nicht ausgewaschen werden, wurde versucht, auch diesen Schritt zu umgehen. Dabei wurde die Probe (nach wie vor 50 µl) mit 1 ml ACN/Methanol (3:1) versetzt und zentrifugiert. Anstelle der Festphasenextraktion wurde lediglich eine Filtration durchgeführt und 200 µl des Filtrats anschließend derivatisiert und in die HPLC injiziert. Zum Schutz der HPLC- Säule wurde dafür zusätzlich eine Vorsäule eingebaut.

Ergebnis: Auch durch diesen Schritt konnte keine Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden.

Ebenfalls durch die Kombination dieser beiden Modifikationen, also das Weglassen der FF-Extraktion, sowie das Eindampfen mit Stickstoff, konnte keine Optimierung bewirkt werden.

### 5.5.1.7 Unterschiedliche Zeitintervalle zwischen Derivatisierung und Messung

Aufgrund der Annahme, dass sich die durch die Derivatisierung gebildeten Carnitinester im Laufe der Zeit nach und nach zersetzen, wurde versucht, durch die Variation der Zeitintervalle zwischen Derivatisierung und Messung diese Hypothese zu ergründen. Die Annahme beruhte auf der Vermutung, dass die Derivatisierung im Laufe der Zeit rückgängig gemacht wird, denn je mehr Zeit verging, desto mehr Derivatisierungsreagenz und desto weniger Analyt waren im Chromatogramm zu sehen.

#### Durchführung:

Dazu wurden aus einer Standardlösung ( $c = 0.02 \text{ mg/ml}$ ) 7 Probelösungen á  $100\mu\text{l}$  entnommen, zeitgleich derivatisiert und mit jeweils  $500 \mu\text{l}$  Laufmittel D zeitversetzt direkt injiziert.

Proben- bezeichnung	Einengen	Verstrichene Zeit von der Derivatisierung bis zur Messung [min]	Laufmittel
1	+ 2 min	7	+ $500 \mu\text{l}$
2		19	
3		31	
4		49	
5		66	
6		85	
7		100	

#### Ergebnis:

Zwischen den unterschiedlichen Proben konnte kein Unterschied ermittelt werden: Die gesuchte Verbindung war nur minimal sichtbar.

### **5.5.1.8 Veränderung des Probenmaterials**

#### **- Gewebeproben vom Schwein**

Weil der Carnitingehalt im Muskel- bzw. Lebergewebe um ca. einen Faktor 100 bzw. 50 größer ist als im Plasma, wurde die Messmethode an Gewebeproben getestet.

Probenmaterial: Gewebe von Schweinen (sowohl Muskel, als auch Leber), Trockensubstanz

#### Durchführung:

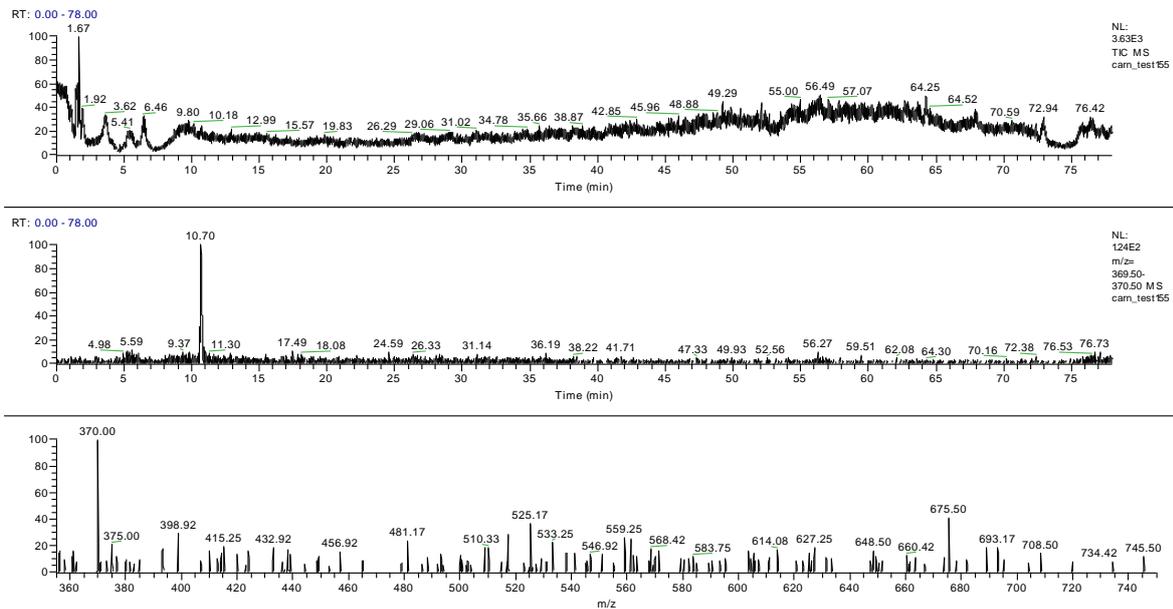
0.3 g Gewebe (getrocknet und gefroren) wurde mittels Mörser zermahlen und mit Stickstoff homogenisiert (dadurch platzen alle Zellen). Mit 15 ml Methanol/Wasser (2:1) wurde die Gewebeprobe schließlich gelöst und für 20 min ins Ultraschallbad gestellt. Der Überstand wurde in einen Spitzkolben überführt, am Rotavapor eingedampft und in 1 ml ACN/Methanol (3:1) aufgenommen. Diese Lösung wurde anschließend 5 min zentrifugiert und 200 µl des Überstands mit 200 µl N,N-Diisopropylethylamin Lösung und 100 µl Pentafluorophenacyl-Trifluoromethansulfonat Lösung derivatisiert und injiziert

Ergebnis:

H:\Carnitin\_Testfiles\...lc

05.07.2011 14:10:46

Muskelgewebe\_0.3g\_Meth/H2O\_10

**Abbildung 41: Muskelgewebeprobe**

Freies Carnitin (mit dem größten Anteil im Muskelgewebe) konnte zwar nachgewiesen werden, jedoch mit einer Intensität von  $1.24 \cdot 10^2$  für 0.3g Trockensubstanz in einer absolut ungenügenden Menge.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden viele weitere Versuche mit veränderten Methoden durchgeführt, wie etwa dem Verzicht auf die Zerreißung der Probe, mit alleiniger Zellzerstörung durch Ultraschall, der Versetzung des gelösten Gewebes mit Phosphorsäure zur sauren Verseifung und Spaltung der Acylcarnitine, der Anwendung verschiedener Lösungsmittel (ACN/Methanol 3:1, Methanol/H<sub>2</sub>O 3:1, ACN/Methanol/H<sub>2</sub>O 1:1:1, ...), der Veränderung der Volumina des Derivatisierungsreagenz etc., doch alles ohne relevante Verbesserungen der Messergebnisse/des Outputs.

### **5.5.1.9 Weitere Änderungen**

Im Laufe der Fehlerermittlung wurden viele weitere Modifikationen durchgeführt.

Dazu zählen unter anderem:

- Der Austausch aller Kunststoffschläuche aufgrund der Annahme, dass die Probe mit den Schlauchmaterialien reagiert;
- Die Erwärmung der Proben im Wasserbad um die Derivatisierungsreaktion zu begünstigen;
- Die direkte Messung aller Laufmittel zum Ausschluss von Verunreinigungen;
- Die direkte Derivatisierung großer Standardvolumina mit Direktinfusion in das MS;
- Die mehrmalige Reinigung der Ionenquelle;
- Die tagelange Spülung der Säule;
- Die Generierung unterschiedliche Tune-Files;
- Die Verwendung einer neuen Säule;
- Der Einbau einer Vorsäule und viele mehr.

All diese Maßnahmen konnten jedoch ebenfalls zu keiner Verbesserung der Messergebnisse führen.



## 6 SCHUSSBETRACHTUNG

Die im Rahmen dieser Masterarbeit ermittelten Analysenergebnisse werden im Anschluss noch einmal kurz dargestellt und interpretiert.

### 6.1 Derivatisierungsreagenz

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass das synthetisierte Pentafluorphenacyl-Trifluoromethansulfonat zur Derivatisierung des freien Carnitins und der Acylcarnitine sehr stabil und infolge dessen sehr lange lagerbar ist. Die synthetisierten Kristalle wurden anfangs unter Vakuumverschluss im Dunkeln gelagert, jedoch auch durch die Lagerung ohne Vakuum konnte keine Veränderung des Derivatisierungsreagenz festgestellt werden, was durch mehrmalige NMR-Messungen bestätigt werden konnte.

### 6.2 Verdünnungsreihe

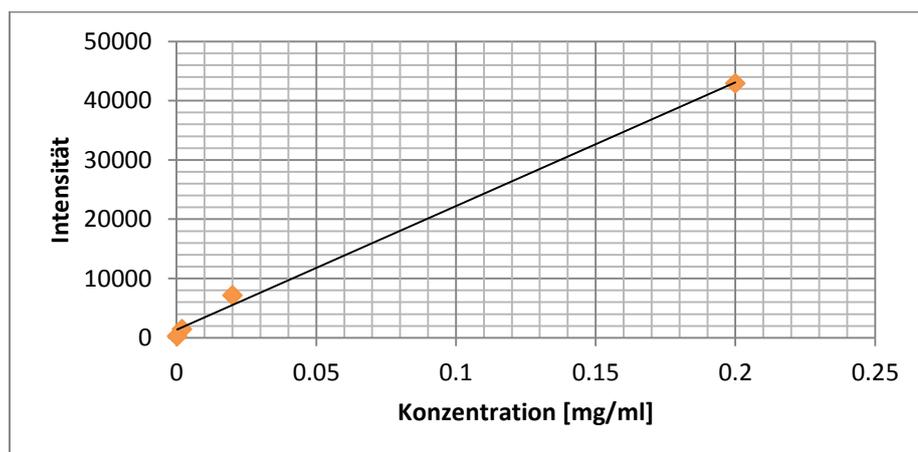
Durch die Erstellung einer Verdünnungsreihe mit mehreren Standardverbindungen konnten Carnitinkonzentrationen nachgewiesen werden, welche viel geringer waren, als jene, die im Plasma der schwangeren Frauen erwartet wurden.

Die erwartete Plasmacarnitinkonzentration bei den untersuchten Proben der Schwangeren in diesem Stadium betrug  $\leq 25\mu\text{mol/L} = 4,025\text{ mg/l}$ , also **4 $\mu\text{g/ml}$** . In dieser Arbeit war jedoch ein Nachweis der Standardverbindungen bis zu einer Konzentration von **2 $\mu\text{g/ml}$**  noch sehr gut möglich, wobei sicherlich geringere Konzentrationen - zwar etwas schlechter - aber immer noch nachweisbar/sichtbar wären.

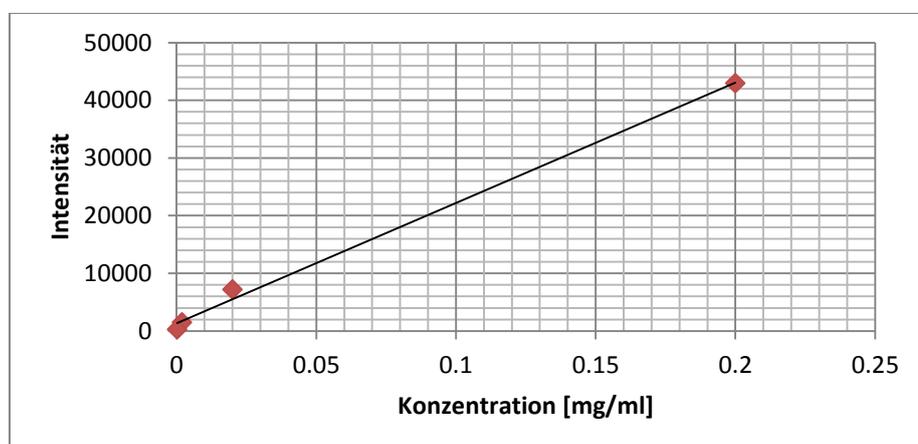
Die ermittelte Nachweisgrenze liegt also deutlich unter der, zur Messung und somit zur Quantifizierung der Carnitine in den Plasmaproben, notwendigen Nachweisgrenze.

Durch die Erstellung der Verdünnungsreihen konnten einerseits die Funktionstüchtigkeit der Methode bestätigt werden und andererseits gute Referenzwerte für die Quantifizierung der in den Realproben enthaltenen Carnitinen generiert werden.

Wie in Abb. 42 und 43 ersichtlich, konnten sowohl für Octanoylcarnitin als auch für freies Carnitin repräsentative Standardgeraden der Verdünnungsreihen erstellt werden, mit denen es auch durchaus möglich wäre, mittels gemessenen Intensitäten der Plasmaproben auf die jeweilige Carnitinkonzentration der Probe zu schließen.



**Abbildung 42: Standardgerade der Verdünnungsreihe von Octanoylcarnitin**



**Abbildung 43: Standardgerade der Verdünnungsreihe von Carnitin**

### 6.3 Probenmessung

Die Messungen der Plasmaproben mit der erarbeiteten Methode (ESI-HPLC-MS) konnten bisher zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führen. Trotz der Untersuchung auf geeignete Messparameter, Eliminierung vermeintlicher Methodenfehler und der Modifizierung der Methode durch verschiedenste Parameteränderungen, konnten in diese Richtung keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden viele verschiedene Theorien für das Misslingen dieser Methode bei Plasmaproben diskutiert und viele Vermutungen für mögliche Gründe dafür wurden geprüft und durch unterschiedliche Experimente ausgeschlossen, was jedoch zu keiner wesentlichen Verbesserung beitragen konnte.

Im Laufe der Arbeit erwies sich diese Methode also nicht als optimale Messmethode für den Carnitingehalt im Plasma Schwangerer. Aus nicht nachvollziehbaren Gründen konnten die Carnitine nicht aus dem Plasma extrahiert werden und es schien als würde das Plasma sogar zugesetzte Carnitine aus Standardlösungen verschlucken. Weiters schien es, als würde sich die Probenlösung im Gerät (HPLC-MS) zersetzen und über einen langen Zeitraum hängen bleiben, was es unmöglich machte, die Carnitine in einzelnen Proben zu quantifizieren.

Der Vergleich der Carnitinkonzentrationen in den Plasmaproben mit Referenzwerten bzw. Werten aus publizierten Studien war somit nicht möglich.

Abschließend kann man also sagen, dass die erarbeitete Methode zur Messung von Carnitinen mittels HPLC-MS bei Standardverbindungen einwandfrei funktioniert, was jedoch die Messungen der Plasmaproben betrifft und somit den Einsatz der Methode in der Diagnostik bzw. Risikoabschätzung für Schwangerschaftsdiabetes, jedenfalls weitere Experimente von Nöten sind.



## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Gestationsdiabetes, eine Glucosestoffwechselstörung, wird durch die stetig steigende Prävalenz zu einem immer größeren Problem in der Schwangerschaft. Die Manifestation dieser Stoffwechselerkrankung kann sowohl für die Mutter als auch für das Kind verheerende Folgen haben.

Da die Erkrankung meist symptomlos verläuft, erweist sich die Risikoabschätzung als schwierig. Derzeit gilt der orale Glucosetoleranztest als diagnostisches Mittel der Wahl, welcher sich jedoch nach Grenzwerten richtet, die oftmals weder einheitlich, noch evidenzbasiert sind.

Die Erforschung neuer Methoden für diagnostische Zwecke auf diesem Gebiet läuft auf Hochtouren, wobei besonders das vitaminähnliche Carnitin immer öfter als bedeutender Faktor diskutiert wird.

Ziel dieser Arbeit war die Erarbeitung einer Methode zur Messung von Carnitinstern mittels ESI-HPLC-MS in menschlichem Plasma zur Risikoabschätzung von Schwangerschaftsdiabetes.

Dazu wurde mittels Metaanalyse eine geeignete Methode eruiert und als Messsubstanzen dienten Plasmaproben schwangerer Frauen in der Mitte oder am Ende der Schwangerschaft.

Die Proben wurden mittels Festphase extrahiert, mit einem eigens hergestellten Reagenz derivatisiert, im Hochdruckflüssigkeitschromatographen getrennt und im Massenspektrometer detektiert.

Als Referenzwerte und Mittel zur Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Carnitinmenge dienten Standardverbindungen, welche bis unter die erwartete Plasmakonzentration verdünnt wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Methode an und für sich funktioniert, jedoch jedenfalls noch modifiziert werden muss. Die Messung der Standardverbindungen bis zu einer Konzentration von  $2\mu\text{g/ml}$ , welche deutlich unter der erwarteten Konzentration in den Proben lag, war einwandfrei möglich. Die Wiederfindungsrate von zum Plasma zugesetzten Carnitinen, sowie der direkte Nachweis von freiem Carnitin und Acylcarnitinen im Plasma bereitete jedoch große Schwierigkeiten und war kaum möglich.

Abschließend kann also festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit entwickelte Methode -in dieser Form- noch kein geeignetes Mittel zur Diagnostik bzw. Risikoabschätzung für Schwangerschaftsdiabetes darstellt. Im Rahmen der Risikoabschätzung ist jedenfalls weitere Forschung notwendig.

## 8 SUMMARY

Gestational diabetes, a disturbance of the glucose metabolism, becomes more and more problematic in pregnancy by the consistently increasing prevalence. The manifestation of this metabolic disease have severe consequences for the mother as well as for the child.

As the disease proceeds mostly without symptoms, the risk evaluation turns out to be difficult. At present the oral glucose tolerance test is consulted as diagnostic method, but critical values are neither uniform, nor evidence-based.

The investigation of new methods for diagnostic objectives in this area proceeds rapidly and particularly the vitamin-like carnitine is more and more often discussed as an important factor.

The aim of this work was the development of a method for the measurement of carnitine ester by ESI-HPLC-MS in human plasma for the risk estimation of gestational diabetes.

Therefore a suitable method was investigated by meta-analysis. As measuring substances plasma samples of pregnant women in the middle or at the end of their pregnancy were utilized.

The samples were extracted by solid phase extraction, derivatized and separated by high pressure liquid chromatography and detected in the mass spectrometer.

For quantification stock solutions of selective acylcarnitines were established and calibration curved of these serial dilutions were measured.

The results of the present work show that the method works in general, but needs to be modified.

Very low concentrations of the standard solutions (i.e. 2  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) which are definitively ten times lower than the expected sample concentration can be measured with good reproducibility. But the recovery rate of carnitine (added to the plasma), as well as the direct analysis of free carnitine and acylcarnitine in the plasma however caused great difficulties and was hardly possible.

Finally we can discover that the approach compiled in this work still shows no suitable method for the diagnostics or risk evaluation for gestational diabetes; within the scope of the risk evaluation further research is necessary.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

*Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.*

**AG DIABETES UND SCHWANGERSCHAFT DER DDG.** *Diagnostik und Therapie des Gestationsdiabetes (GDM).* Richtlinien der Arbeitsgemeinschaft Diabetes und Schwangerschaft der DDG 2001;

[http://www.diabetes-heute.uni-](http://www.diabetes-heute.uni-duesseldorf.de/fachthemen/schwangerschaft/index.html?TextID=1447)

[duesseldorf.de/fachthemen/schwangerschaft/index.html?TextID=1447](http://www.diabetes-heute.uni-duesseldorf.de/fachthemen/schwangerschaft/index.html?TextID=1447)

(Zugriff am 29. November 2010).

**ARDREY R E.** *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: an introduction.* (David J. Ando, Hrsg) John Wiley & Sons Verlag, West Sussex, England, 2003;

**BALDEWEG S E, GOLAY A, NATALI A, BALKAU B, DEL PRATO S, COPPACK S W.**

*Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR).*

*European Journal of Clinical Investigation*, 2000; 30: 45-52.

**BECK P, DAUGHADAY W H.** *Human Placental Lactogen: Studies of Its Acute Metabolic Effects and Disposition in Normal Man.* *Journal of Clinical Investigation*, 1967; 46(1): 103-110.

**BILLIGMANN P, SIEBRECHT S.** *Physiologie des L- Carnitins und seine Bedeutung für Sportler.* (Gesellschaft für Ernährungsforschung e. V., Hrsg), Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover, 2004; 13 - 18.

**BRODERICK T L, DRIEDZIC W, und PAULSON D J.** *Propionyl-L-carnitine effects on postischemic recovery of heart function and substrate oxidation in the diabetic rat.* *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2000; 206: 151–157.

**BUCHANAN T H, XIANG A H.** *Gestational diabetes mellitus.* *The Journal of Clinical Investigation*, 2005; 115(3): 485-491.

**CAVEDON C T, BOURDOUX P, MERTENS K, VIEN VAN THI H, HERREMANS N, DE LAET C, GOYENS P.** *Age-Related Variations in Acylcarnitine and Free Carnitine Concentrations Measured by Tandem Mass Spectrometry.* *Clinical Chemistry*, 2005; 51(4): 745-752.

- CHO S W, CHA Y S.** *Pregnancy increases urinary loss of carnitine and reduces plasma carnitine in Korean women.* British Journal of Nutrition, 2005; 93: 685-691.
- D-A-CH REFERENZWERTE FÜR DIE NÄHRSTOFFZUFUHR.** *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr der DGE, ÖGE, SGE/SVE.* (Deutschen Gesellschaft für Ernährung Hrsg). Umschau Buchverlag, Frankfurt am Main, 2008;
- DGE (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG).** *Die neue Leitlinie Schwangerschaftsdiabetes.* 2011.  
<http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=1190>  
(Zugriff am 17. Dezember 2011).
- DOENECKE D, KOOLMAN J, FUCHS G, GEROK W.** *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie.* Thieme Verlag , Stuttgart, 2005;
- DU X, EDELSTEIN D, OBICI S, HIGHAM N, ZOU M-H, BROWNLEE M.** *Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation.* The Journal of Clinical Investigation, 2006; 116(4): 1071-1080.
- FELLER A, RUDMAN D.** *Role of Carnitine in Human Nutrition.* The Journal of Nutrition, 1988; 118: 541-547.
- FENN J B, MANN M, MENG CH K, WONG S F.** *Electrospray ionization-principles and practice.* Mass Spectrometry Reviews, 1990; 9: 37-70.
- FRIEDMAN J E, KIRWAN J P, JING M, PRESLEY L, CATALANO P M.** *Increased Skeletal Muscle TNF- $\alpha$  and Impaired Insulin Signaling Persists in Obese GDM Women 1 Year Postpartum.* Diabetes, 2007; 57(3): 606-613.
- GRIFFIN M E, MARCUCCI M J, CLINE G W, BELL K, BARUCCI N, LEE D, GOODYEAR L J, KRAEGEN E W, WHITE M F, SHULMAN G I.** *Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance Is Associated With Activation of Protein Kinase C and Alterations in the Insulin Signaling Cascade.* Diabetes, 1999; 48(6): 1270-1274.
- GUSTAVSEN H.** *Bestimmung des L-Carnitin - Gehaltes in rohen und zubereiteten pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln.* Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Physiologisches Institut der tierärztlichen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Harmeyer. Hannover, 2000;

- HENNION M-C.** *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling.* Journal of Chromatography A, 1999; 856: 3–54.
- HIGGINS M, AULIFFE F M, SOUBT M, DUNNING B E, FOLEY J E.** *A Review of Maternal and Fetal Growth Factors in Diabetic Pregnancy.* Current Diabetes Reviews, 2010; 6(2):116-125.
- HUANG Z-H, GAGE D A, BIEBER L L, SWEELEY CH C.** *Analysis of Acylcarnitines as Their N-Demethylated Ester Derivates by Gas Chromatography-Chemical Ionization Mass Spectrometry.* Analytical Biochemistry, 1991; 199: 98-105.
- HUSSAIN A, HYDRIE M Z I, CLAUSSEN B, ASGHAR S.** *Type 2 Diabetes and obesity: A review.* The Journal of the Diabetes in Asia Study Group, 2010; 2(1): 1-7.
- ICD-10.** *ICD-10-GM Version 2011 Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme nach WHO.* 2010; <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2011/index.htm> (Zugriff am 20. November 2010).
- KAISER E, LOHNINGER A.** *Carnitine, its role in lung and heart disorders: proceedings of a satellite symposium on the occasion of the Central European Congress of Anesthesiology (ZAK), Graz (Austria) September 13, 1985.* Kager Verlag, 1987;
- KALKHOFF R K, JACOBSON M, LEMPER D.** *Progesterone, Pregnancy and the Augmented Plasma Insulin Response.* Journal of Clinical Endocrinology, 1970; 31(24): 24-28.
- KAUTZKY-WILLER A, BANCHER-TODESCA D.** *Gestationsdiabetes.* Wiener klinische Wochenschrift, 2003; 21(22): 478-484.
- KAUTZKY-WILLER A, PACINI G, TURA A, BIEGLMAYER C, SCHNEIDER B, LUDVIK B, PRAGER R, WALDHÄUSL W.** *Increased plasma leptin in gestational diabetes.* Diabetologia, 2001; 44: 164-172.
- KAUTZKY-WILLER A, REPA D, POLLAK A, AG** **Diabetes und Schwangerschaft der ODG, LECHLEITNER M, WEITGASSER R.** *Gestationsdiabetes (GDM).* Wiener klinische Wochenschrift, 2007;
- KELLEY D E, MOKAN M, SIMONEAU J A, MANDARINO L J.** *Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle.* Journal of Clinical Investigation, 1993; 92: 91–98.

**KING J C.** *Physiology of pregnancy and nutrient metabolism.* The American Journal of Clinical Nutrition, 2000; 71(5): 1218-1225.

**KOUMANTAKIS E, SIFAKIS S, KOUMANTAKI Y, HASSAN E, MATALLIOTAKIS I, PAPADOPOULOU E, EVAGELIOU A.** *Plasma Carnitine Levels of Pregnant Adolescents in Labor.* Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology, 2001; 14: 65-69.

**LÖFFLER G.** *Basiswissen Biochemie und Pathobiochemie.* Springer Medizin Verlag Heidelberg, Regensburg, 2008; 91-134.

**LOHNINGER A, KARLIC H, LOHNINGER S, TAMMAA A, JINNIATE S, MASCHER H, MASCHER D, SALZER H.** *Carnitine in Pregnancy.* Chemical Monthly, 2005; 136: 1523-1533.

**LOHNINGER A, PITTNER G, PITTNER F.** *L-Carnitine: New Aspects of a Known Compound - A Brief Survey.* Chemical Monthly, 2005; 136: 1255-1268.

**LOHNINGER A, RADLER U, JINNIATE S, LOHNINGER S, KARLIC H, LECHNER S, MASCHER D, TAMMAA A, SALZER H.** *Relationship between Carnitine, Fatty Acids and Insuline Resistance.* Gynäkologisch Geburtshilfliche Rundschau, 2009; 49: 230-235.

**LÖSTER H.** *Carnitine and cardiovascular diseases.* Ponte Press Verlag, Bochum, 2007;

**MANUAL AMERSHAM RPC.** *Reversed Phase - Principles and Methods.* Sweden: Amersham Biosciences, 1999;

**MANUAL LCQ FLEET HARDWARE.** *LCQ Fleet Hardware Manual.* Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved, 2007;

**McMASTER M.** *LC/MS a practical user's guide.* John Wiley & Sons Verlag, New Jersey, 2005;

**MILLINGTON D S, NORWOOD D L, KODO N, ROE CH R, FUMINO I.** *Application of Fast Bombardment with Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry to the Analysis of Acylcarnitines in Human Urine, Blood, and Tissue.* Analytical Biochemistry, 1989; 180: 331-339.

**MILLINGTON D S, KODO N, NORWOOD D L, ROE CH R.** *Tandem Mass Spectrometry: A New Method for Acylcarnitine Profiling with Potential for*

*Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism.* Journal of Inherited Metabolic Disease, 1990; 13: 321-324

**MINKLER P E, INGALLS S T, HOPPEL CH L.** *Strategy for the Isolation, Derivatisation, Chromatographic Separation, and Detection of Carnitine and Acylcarnitines.* Analytical Chemistry, 2005; 77(5): 1448-1457.

**MINKLER P E, STOLL M S K, INGALLS S T, YANG S, KERNER J, HOPPEL CH L.** *Quantification of Carnitine and Acylcarnitines in Biological Matrices by HPLC Electrospray Ionization– Mass Spectrometry.* Clinical Chemistry, 2008; 54(9): 1451–1462.

**MUELLER P, SCHULZE A, SCHINDLER I, ETHOFER T, BUEHRDEL P, CEGLAREK U.** *Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults.* Clinica Chimica Acta, 2003; 327: 47-57.

**PIRKOLA J.** *Gestational Diabetes; Long-term, metabolic consequences for the mother and child.* University of Oulu, Juventus Print Verlag, Tampere 2010;

**PITTNER F, LOHNINGER A, PITTNER G.** „*Editorial: 100 Years Research on Carnitine.*“ Chemical Monthly, 2005; 136: 8.

**PSCHYREMBEL.** *Klinisches Wörterbuch.* De Gruyter Verlag, Berlin/New York: 2004; 648.

**RAMSAY R R, GANDOUR R D, VAN DER LEIJ F R.** *Molecular enzymology of carnitine transfer and transport.* Biochimica et Biophysica Acta, 2001; 1546(1): 21-43.

**RANDLE P J, GARLAND P B, NEWSHOLMEI E A, HALEST C N.** *The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus.* Annals of the New York Academy of Science, 2006 (first year published online), 131(1): 324-333.

**REBOUCHE CH J.** *Carnitine function and requirements during the life cycle.* The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), 1992; 6: 3379-3386.

**RETNAKARAN R.** *Glucose Tolerance Status in Pregnancy: A Window to the Future Risk of Diabetes and Cardiovascular Disease in Young Women.* Current Diabetes Reviews, 2009; 5(4): 239-244.

- RODEN M, PRICE T B, PERSEGHIN G, PETERSEN K F, ROTHMAN D L, CLINE G W.** *Mechanism of FFA-induced Insulin Resistance.* Journal of Clinical Investigation, 1996; 97(12): 2859–2865.
- SCHOLTE H R.** *Carnitine.* Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, Holland, 2011;  
<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carnitine/Carnitine.htm> (Zugriff am 21. 10 2011).
- SCHUH H.** *Diabetes in der Schwangerschaft.* Verlag Kirchheim und Co GmbH, Mainz, 2007;
- SHEN J J, MATERN D, MILLINGTON D S, HILLMAN S, FEEZOR M D, BENNET M J, QUMSIYEH M, KAHLER S G, CHEN Y-T, VON HOVE J L K.** *Acylcarnitines in fibroblasts of patients with long-chain 3-hydroxyacetyl-CoA dehydrogenase deficiency and other fatty acid oxidation disorders.* Journal of Inherited Metabolic Disease, 2000; 23: 27-44.
- SHWETLICK K, BECKER H G O, BERGER W, DOMSCHKE G, FANGHÄNEL E, FAUST J, FISCHER M, GENTZ F, GEWALD K, GLUCH R, MAYER R, MÜLLER K, PAVEL D, SCHMIDT H, SCHOLLBERG K.** *Organikum.* (Johann Ambrosius Barth Hrsg), Edition Deutscher Verlag der Wissenschaften, Leipzig, Berlin, Heidelberg, 1993; 561-573.
- STEIBER A, KERNER J, HOPPEL CH, L.** *Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective.* Molecular Aspects of Medicine, 2004; 25(5-6): 455–473.
- TAKIYAMA N, MATSUMOTO K.** *Age- and Sex-Related Differences of Serum Carnitine in a Japanese Population.* Journal of the American College of Nutrition, 1998; 17(1): 71-74.
- THURMAN E M, MILLS M S.** *Solid-Phase Extraktion Principles an Practice.* John Wiley & Sons Verlag, New York, 1998;
- VAN DER LEIJ F R, HUIJKMAN N C A, BOOMSMA C, KUIPERS J R G, BARTELD S B.** *Genomics of the Human Carnitine Acyltransferase Genes.* Molecular Genetics and Metabolism, 2000; 71: 139–153.
- VAN KEMPEN T A T G, ODLE J.** *Carnitine Affects Octanoate Oxidation to Carbon Dioxide and Dicarboxylic Acids in Colostrum-Deprived Piglets: In Vivo Analysis of Mechanisms Involved Based on CoA- and Carnitine-Ester Profiles.* The Journal of Nutrition, 1995; 125: 238-250.

- VERNEZ L, WENK M, KRÄHENBÜHL S.** *Determination of carnitine and acylcarnitines in plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004; 18: 1233-1238.
- WROBLEWSKA-SENIUK K, WENDER-OZEGOWSKA E, SZCZAPA J.** *Long-term effects of diabetes during pregnancy on the offspring.* Pediatric Diabetes, 2009; 10(7): 432-440.
- YANG S, MINKLER P, HOPPEL CH.** *Cis-3,4-Methylene-heptanoylcarnitine: Characterization and verification of the C8:1 acylcarnitine in human urine.* Journal of Chromatography B, 2007; 857: 251-258.
- YOSHINO M, TOKUNANGA Y, WATANABE Y, YOSHIDA I, SAKAGUCHI M, HATA I, SHIGEMATSU Y; KIMURA M, YAMAGUCHI S.** *Effect of supplementation with L-carnitine at a small dose on acylcarnitine profiles in serum and urine and the renal handling of acylcarnitines in a patient with multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation defect.* Journal of Chromatography B, 2003; 792: 73-82.
- ZAMMIT V A, WATERMAN I J, TOPPING D, MCKAY G.** *Insulin Stimulation of Hepatic Triacylglycerol Secretion and the Etiology of Insulin Resistance.* The Journal of Nutrition, 2001; 131: 2074-2077.



## Anhang: Mögliche Vorgehensweisen zur Bestimmung von freiem Carnitin und Carnitinester in Plasma

	MILLINGTON et al., 1989	YOSHINO et al., 2003	MILLINGTON et al., 1990	HUANG et al., 1991
<b>Zur Erfassung von</b>	Acylcarnitinen		Acylcarnitinen	Acylcarnitinen und ihre N-demethylierten Esterderivate
<b>Proteinfällung (bzw. Extraktion)</b>	Methanol + zentrifugieren	Ethanol	Ethanol	Probe + Valproyl-carnitin HCl -> Anionenaustauschersäule, eluieren mit Aqua dest.
<b>+Zentrifugieren</b>				
<b>Quantifizierung</b>	Isotopenmarkierte Standards	Isotopenmarkierte Standards	Isotopenmarkierte Standards	
<b>Gewinnung Acylcarnitine</b>	RP-Filter AC mit Methanol eluiert		C 18 „Sep Pak“ Säule Eluieren mit Ethanol	RP- Säule, eluieren mit Methanol
<b>Konzentrieren</b>	Stickstoff			
<b>Waschen</b>	Hexan			
<b>Eindampfen</b>	Stickstoff	Stickstoff	Stickstoff	Stickstoff
<b>Methylieren/ Derivatisieren</b>	Methanolische HCl in wasserfreiem Methanol	Butanolische HCl	3 N HCl - MeOH	Direkte Veresterung mit Propylchloroform in wässrigem Propanol -> Ionenpaarextraktion mit KI in Chloroform -> N-Demethylierung der Acylesterpropylesteriodide
<b>Trocknen</b>		Stickstoff		
<b>Lösen</b>		50% Acetonitril = mobile Phase		
<b>Bestimmung</b>	FAB- MS (+ Glycerol)	HPLC	FAB – MS/MS (+ Glycerol)	GC-chemical ionisation-MS (der flüchtigen Acyl-N-demethylcarnitin-propylester)
<b>Anmerkung</b>	Proben die so nicht analysiert werden können: erneut eindampfen und in mobiler Phase lösen (20%Glycerol)			

	VERNEZ et al., 2004	VAN KEMPEN und ODLE 1995	SHEN et al., 2000	MUELLER et al., 2003
<b>Zur Erfassung von</b>	Canitinen, Vorläufer Butyrobetain und 8 Acylcarnitinen	Carnitinester	Acylcarnitinen	Acylcarnitinen
<b>Proteinfällung bzw. Extraktion +Zentrifugieren</b>	Mit HCl ansäuern, Proteinfällung mit Acetonitril/Methanol	Mischung aus 75% Acetonitril und 25% Methanol	Ethanol	Methanol (inkubieren damit anorganische Salze, Proteine und Peptide ausfallen)
<b>Quantifizierung</b>	Standardlösungen herstellen	Bestimmung nach Kempen and Odle (1992)		+ Methanol reference standard kid
<b>Gewinnung Carnitine, Extraktion</b>	Festphasenextraktion, Kationenaustauschersäule, waschen mit HCl/Methanol			
<b>Konzentrieren Waschen</b>			Stickstoff Hexan (um störende Lipide zu entfernen)	Gefriertrocknung
<b>Eindampfen Methylieren/ Derivatisieren</b>			Wässrige Phase + Stickstoff HCl in Methanol	Butylation mit HCl/Butanol
<b>Trocknen Lösen</b>			Stickstoff In Methanol-Glycerol Matrix (die Octylnatriumsulfat enthält)	Gefriertrocknung Acetonitril/Wasser (containing formic acid)
<b>Bestimmung</b>	LC/MS/MS	HPLC/UV	MS/MS	ESI/MS/MS (ohne vorherige Trennung mit Chromatographie)
<b>Anmerkung</b>	Myristoyl, Palmitoyl-, und Stearoylcarnitin werden separat durch flüssig-flüssig Extraktion extrahiert			

	<b>MINKLER et al., 2008</b>	<b>CAVEDON et al., 2005</b>	<b>YANG et al., 2007</b>
<b>Zur Erfassung von</b>	Carnitin + Acylcarnitinen	Basiert auf Butylesterderivatisierung	Urinprobe Nur Acylcarnitine!
<b>Proteinfällung bzw. Extraktion +Zentrifugieren Quantifizierung</b>	Acetonitril/Methanol	Methanol	
<b>Gewinnung Carnitine, Extraktion</b>	Internal Standards	Isotopenmarkierte Standards	RP – Festphasenextraktion (Urin direkt auf Filter) Eluieren mit Methanol
<b>Konzentrieren Waschen Eindampfen Methylieren/ Derivatisieren</b>	Ionenaustauscher Festphasenextraktion für AC und FC (+ KOH in Methanol für ges. Carnitin für Acylcarnitinhydrolyse) Silica Gel Säule, waschen mit H <sub>2</sub> O/Methanol/Essigsäure Lsg.	N <sub>2</sub> Butanolic HCl N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> Für GC: Transesterifizierung der AC! (Dichlormethan+ Mischung aus potassium-tert- butoxide in Tetrahydrofuran und Pyridylcarbindol ->erhitzen -> + H <sub>2</sub> O und Hexan -> durch Natriumsulfat filtrieren) Für HPLC: derivatisieren mit Pentafluorophenacyl Trifluoromethansulfonat
<b>Trocknen Lösen</b>	Acetonitril/Methanol (erst jetzt Derivatisierungsschritt)	Acetonitril/Wasser (= mobile Phase)	N <sub>2</sub> Isooctan
<b>Bestimmung</b>	HPLC -> Trennung Ion Trap MS -> detektiert	MS/MS	GC-MS HPLC
<b>Anmerkung</b>	Methodenentwicklung basiert auf Limitationen durch Bestimmung mit MS/MS (=übliche Methode, weil schnell und einfach)		

# LEBENS LAUF

**Veronika Weber, Bakk. rer. nat.**

## Persönliche Daten

**Vor- und Nachname:** Veronika Weber

**Adresse:** Rädernacherweg 1/B  
39040 Truden

**Tel:** +39 340 8916403

**Email:** veronika.weber@hotmail.com

**Geburtsdatum:** 17.12.1987

**Geburtsort:** Bozen

**Staatsbürgerschaft:** Italien

**Familienstand:** ledig

**Akademischer Grad:** Bakkalaurea der Naturwissenschaften



## Ausbildung

### **Studium**

- 03/2010 -dato      **Masterlehrgang Ernährungswissenschaften (Public Health Nutrition)**  
an der Universität Wien mit dem Abschluss Master of Science (Msc)
- 10/2006 – 02/2010      Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien mit dem Abschluss Bakkalaurea der Naturwissenschaften (Bakk.rer.nat)

### **Schulbildung**

- 09/2001 – 06/2006      Pädagogisches Gymnasium „St. Maria“, Bozen
- 09/1998 – 06/2001      Mittelschule Neumarkt
- 09/1993 – 06/1998      Volksschule Leonhard von Liebener, Truden

## **Berufserfahrung**

---

- 2010 – dato Tutorin am Institut für Chemie, Universität Wien
- 2009 – dato Freie Mitarbeiterin bei „LC-Events“ Lissa Czuray Eventmanagement
- 2011 Telefoninterviews im Auftrag des Wiener Krankenhausverbundes
- 2010 Organisch-chemisches Praktikum am Institut für Chemie, Universität Wien
- 2010 Praktikum in der Abteilung Psychologischer Dienst im Krankenhaus Brixen
- 2008 - 2011 Betreuerin bei VKE Kinderferien in Kohlern
- 2010 Betreuerin der VKE Sprachreise nach München
- 2008 Praktikum in der Abteilung Diätologie im Krankenhaus Bozen
- 2005 - 2006 Mitarbeiterin im Jugendzentrum „insel/isola“ in Völs am Schlern
- 2004 – 2006 Jungscharleiterin in Aldein
- 2003 Hospitation im Jugendzentrum Paperlapapp in Bozen

## **Fremdsprachen**

---

- Deutsch:** Muttersprache
- Italienisch:** fließend
- Englisch:** gut

## **Sonstige Qualifikationen**

---

**Zweisprachigkeitsnachweis:** ital/deut B

**EDV:** Windows Betriebssysteme, sehr gute Microsoft Office Kenntnisse (Word, Power Point), SPSS

**Führerschein:** B

## **Weiterbildungen**

---

- 2005 Seminar „Geschlechtsbewusste Pädagogik in der Jugendarbeit“ – Brixen, IT
- 2005 Seminar „Genau des mochmo!“- Ideenpool für ehrenamtliche Mitarbeiter/innen Jugendtreff – Brixen, IT
- 2005 Kurs „Philosophische Werkstatt“ Jenesien, IT
- 2003 Basislehrgang für ehrenamtliche Kinder – und Jugendgruppenleiter/innen, Bozen