

Project nr. 512.0000

Ontwikkeling van bevestigingsstrategieën voor residuen van legaal en illegaal toegepaste
therapeutica met behulp van massaspectrometrie

Projectleider: drs. J.A. van Rhijn

Rapport 94.28

november 1994

LC-MS ANALYSE VAN β -CAROTEEN EN RETINOL

J.A. van Rhijn, H.H. Heskamp en M. van Lieshout*

Afdeling: Instrumentele Analyse

*LUW, vakgroep Humane Voeding

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telefax 08370-17717

Copyright 1994, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (2x)

public relations en secretariaat (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Landbouw Universiteit Wageningen, Vakgroep Humane Voeding, Prof dr C. West

Landbouw Universiteit Wageningen, Vakgroep Organische Chemie, dr M.A. Posthumus

Rijks Universiteit Leiden, Vakgroep Organische Chemie, Prof dr J. Lugtenburg

ABSTRACT

To perform a study of the production of retinol from ingested β -carotene in man using isotope labelled β -carotene and retinol, the availability of a reliable and specific method of analysis is essential. Therefore an analytical method was developed, able to distinguish β -carotene containing six isotope-labelled sites and retinol containing three and six isotope-labelled sites in the presence of unlabelled β -carotene and retinol.

Experiments were performed to evaluate the feasibility of the analysis of ^{13}C labelled retinol and β -carotene in the presence of native retinol and β -carotene. Experiments were carried out using unlabelled analytes, the possibilities for simultaneous detection of the labelled analytes were subsequently estimated assuming similar sensitivity and behaviour of the labelled compounds compared to that of the native compound.

Results indicate that retinol, $^{13}\text{C}_3$ -retinol and $^{13}\text{C}_6$ -retinol can all be analysed down to a concentration of 5 pg/ μl . For $^{13}\text{C}_3$ -retinol however mathematical correction for the contribution of unlabelled retinol to the signal for $^{13}\text{C}_3$ -retinol has to be performed. This may result in less accurate results depending on the concentration difference.

β -carotene can also be analysed using LC-MS but the limit of detection is much higher at about 50 pg/ μl . The presence of unlabelled β -carotene is not of any influence on the determination of

$^{13}\text{C}_6$ - β -carotene. Sensitivity for β -carotene may be improved in future experiments by further optimization of the mass spectrometric conditions and by more strictly excluding light and higher temperature during sample handling.

The HPLC separation developed at the Agricultural University has proven to be compatible with LC-MS without any changes.

Application of tandem mass spectrometry does not improve sensitivity or specificity for these analytes.

Keywords: retinol, β -carotene, isotope-labelling, HPLC-MS

INHOUD	<u>blz</u>
 SAMENVATTING	 3
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODEN	6
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	7
3.1 Optimalisatie	7
3.2 Tandem massaspectrometrie	8
3.3 Flow Injectie	9
3.4 HPLC-MS	11
 CONCLUSIES	 11
 REFERENTIES	 12

()

()

SAMENVATTING

Voor de uitvoering van onderzoek naar de omzetting van β -caroteen in retinol in de mens met behulp van isotoop gelabeld β -caroteen en retinol, is de beschikbaarheid van een betrouwbare en specifieke analysemethode essentieel. Daarom is een analysemethode ontwikkeld waarmee gelabeld en ongelabeld retinol en β -caroteen naast elkaar bepaald kan worden.

Dit rapport beschrijft de experimenten die zijn uitgevoerd in een studie betreffende de haalbaarheid van de analyse met behulp van LC-MS van ongelabeld β -caroteen en retinol. Op grond van de resultaten is een inschatting gemaakt van de haalbaarheid van de analyse van ^{13}C gelabeld β -caroteen en retinol in aanwezigheid van ongelabeld β -caroteen en retinol. Daarbij is de aanname gemaakt dat het signaal per massaeenheid voor de gelabelde verbindingen gelijk is aan dat voor de ongelabelde verbindingen.

Blijkens de resultaten van dit onderzoek mag verwacht worden dat $^{13}\text{C}_6$ -retinol zonder problemen geanalyseerd kan worden tot op een niveau van ca 5 pg/ μl bij een injectievolume van 50 μl . $^{13}\text{C}_3$ -retinol kan ook tot op dit niveau geanalyseerd worden, echter rekenkundige correctie voor de bijdrage van ongelabeld retinol op het signaal voor $^{13}\text{C}_3$ -retinol is noodzakelijk en daarmee kan, afhankelijk van het concentratieverschil, de onnauwkeurigheid toenemen. Ongelabeld retinol kan zonder problemen geanalyseerd worden tot op een niveau van 5 pg/ μl .

Ook β -caroteen kan geanalyseerd worden met behulp van LC-MS. De minimaal te detecteren hoeveelheid is echter aanzienlijk hoger; ca 50 pg/ μl . De analyse van $^{13}\text{C}_6$ - β -caroteen wordt niet gestoord door de aanwezigheid van ongelabeld β -caroteen. In toekomstig werk is echter wellicht enige ruimte voor verbetering van de detectielimiet door verdere optimalisatie van de massaspectrometrische condities en door in verdergaande mate dan in de gerapporteerde studie te werken bij verlaagde temperatuur en uitsluiting van licht.

De bij de vakgroep Human Voeding ontwikkelde scheidingsmethode blijkt ongewijzigd te kunnen worden gekoppeld aan de massaspectrometer.

De toepassing van tandem massaspectrometrie levert voor deze verbindingen geen mogelijkheden voor een gevoeliger of specifiekere detectiemethode.

()

()

1 INLEIDING

In een onderzoek van de vakgroep Humane Voeding van de Landbouw Universiteit Wageningen wordt de mate van omzetting van β -caroteen in retinol in de mens bestudeerd. Daartoe wordt β -caroteen en retinol toegediend aan proefpersonen waarna de β -caroteen- en retinol-gehalten in serum op verschillende tijdstippen na toediening worden bepaald. Om onderscheid te kunnen maken tussen reeds aanwezig β -caroteen en retinol enerzijds en de gedoseerde hoeveelheid β -caroteen en retinol anderzijds alsmede om de mate van omzetting te kunnen bepalen, worden beide stoffen gelabeld met zes stabiele ^{13}C atomen. De labelling geschiedt zodanig dat retinol dat in het lichaam gevormd wordt uit de toegediende β -caroteen, drie in plaats van zes ^{13}C atomen bevat. Voor een weergave van de molekuulstructuur en de labelling posities zie figuur 1.

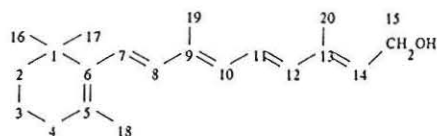
Bij de gehaltebepaling is het derhalve van belang om met $^{13}\text{C}_6$ - en $^{13}\text{C}_3$ -gelabeld retinol en met $^{13}\text{C}_6$ -gelabeld β -caroteen te kunnen bepalen naast ongelabeld retinol en β -caroteen.

De analyse van β -caroteen en retinol geschiedt met behulp van vloeistofchromatografie waarbij UV detectie wordt gebruikt [1,2,3]. De gelabelde verbindingen zijn echter chemisch en fysisch identiek aan de ongelabelde en elueren daarom tegelijkertijd. UV-detectie is derhalve niet geschikt om de individuele gehalten te bepalen. Het gebruik van massaspectrometrie als detectietechniek na HPLC scheiding zou die mogelijkheid wel bieden. Daarbij kan gebruik gemaakt worden van thermospray als interface-techniek [4,5]. Thermospray levert in het algemeen geprotoneerde ionen op, bovendien blijft het oorspronkelijke molecuul veelal intact.

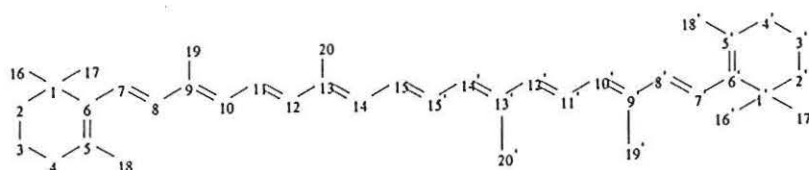
Van retinol dienen de geprotoneerde $^{13}\text{C}_6$ -, de $^{13}\text{C}_3$ - en de ongelabelde variant gemeten te worden. Deze componenten hebben een massa van respectievelijk 293,2 , 290,2 en 287,2. Massaspectrometrisch is het zeer wel mogelijk deze verbindingen elk afzonderlijk te meten binnen één chromatografische piek. Datzelfde geldt voor β -caroteen waarvoor de geprotoneerde $^{13}\text{C}_6$ - en de ongelabelde verbinding moeten worden gemeten. De massa daarvan is respectievelijk 543,4 en 537,4.

Dit rapport beschrijft de experimenten die zijn uitgevoerd in het kader van een studie naar de haalbaarheid van de analyse van gelabeld en ongelabeld retinol en β -caroteen met behulp van HPLC-MS. De massaspectrometrische omstandigheden zijn geoptimaliseerd waarna de lineariteit en de minimaal te detecteren hoeveelheid analyt zijn bepaald. Tevens is onderzocht of de reeds bestaande HPLC-scheiding zonder verlies van gevoeligheid gekoppeld kon worden aan de massaspectrometer.

Alle experimenten zijn uitgevoerd met ongelabeld β -caroteen en retinol. Aangenomen wordt dat de detectielimiet voor de gelabelde componenten gelijk is aan de detectielimiet die voor de ongelabelde componenten gehaald kan worden. Deze aanname is gebaseerd op het gegeven dat de ongelabelde en gelabelde componenten fysisch en chemisch identiek zijn.



retinol



β -caroteen

Figuur 1 Molekuulstructuur van β -caroteen en retinol. β -caroteen wordt gelabeld met ^{13}C op de 12,13,20,12',13',20' posities, retinol op de 10,11,12,13,14,15 posities. Retinol dat in het lichaam gevormd wordt uit $^{13}\text{C}_6$ - β -caroteen bevat slechts drie ^{13}C atomen op de 12,13,20 posities.

2 MATERIAAL EN METHODEN

De experimenten zijn uitgevoerd op een Finnigan MAT TSQ70 massaspectrometer uitgerust met een Finnigan MAT Thermospray II interface. De vloeistofchromatografische apparatuur bestond uit Gilson 302 pompen, een Gilson 231-401 autosampler en Orlita pulsdempers. De HPLC scheiding van retinol en β -caroteen werd uitgevoerd op een Vydac 218TP54 C18 kolom met een lengte van 20 cm.

Alle oplosmiddelen waren van pro analyse kwaliteit. All-trans β -caroteen (Sigma C-9750) en retinol (Serva 38280) werden opgelost in tetrahydrofuraan en doorverdund in methanol tot een concentratie van 2 mg/l. Voor gebruik voor de optimalisatie-experimenten werden deze oplossingen 1:1 (v/v) gemengd met 0,1 M ammoniumacetaatoplossing in HPLC-grade water. De resulterende oplossing van 1 mg/l werd direct ingevoerd in de massaspectrometer. Voor gebruik in de flow injectie-

experimenten en de HPLC-experimenten werden oplossingen in methanol bereid.

Flow injectie-experimenten zijn uitgevoerd door injectie van aliquots van analytoplossingen met verschillende concentratie in een eluensstroom bestaande uit een mengsel van methanol/tetrahydrofuraan/0,1 M ammoniumacetaat (49/1/50). Er vindt hierbij geen HPLC scheiding plaats: de monsterplug wordt direct in de massaspectrometer gebracht.

HPLC-experimenten zijn uitgevoerd door isocratische elutie voor retinol en β -caroteen elk afzonderlijk. Voor retinol is een mengsel gebruikt van methanol/tetrahydrofuraan/water (92/2/6). Voor β -caroteen is een mengsel van 98/2 methanol/tetrahydrofuraan gebruikt. Het debiet bedroeg voor beide scheidingen 1,0 ml/min. Het injectievolume bedroeg 50 μ l. In beide gevallen is direct na de HPLC-kolom middels een T-koppeling een oplossing van 0,1 M ammoniumacetaat toegevoegd, eveneens met een debiet van 1,0 ml/min.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Optimalisatie

Enkele parameters die van grote invloed zijn op de efficiency van ionisatie en introductie van de gevormde ionen in de massaspectrometer zijn de temperatuur van de interface (vaporizer), het repeller voltage en het discharge voltage. Met behulp van een procedure zijn deze parameters geoptimaliseerd waarbij gewerkt is naar het verkrijgen van de hoogst mogelijke gevoeligheid. Voor retinol wordt een optimaal signaal verkregen bij een vaporizertemperatuur van 95°C, een discharge voltage van 0 V en een repeller voltage van 20 V. Voor β -caroteen wordt een optimaal signaal verkregen bij een vaporizer temperatuur van eveneens 95°C, een discharge voltage van 0 V en een repeller voltage van 50 V.

In het spectrum van retinol is zowel het $[M+H]^+$ ion (m/z 287,2) als een ion overeenkomend met $[M+H-H_2O]^+$ (m/z 269,2). De afsplitsing van water uit alcoholen is een veel voorkomende fragmentatie die ook in thermospray spectra veelvuldig voorkomt. Voor retinol is m/z 269,2 base peak terwijl het molekulair ion slechts een relatieve intensiteit van 10% vertoont. Meting van het $[M+H-H_2O]^+$ -ion levert daarom wellicht een lagere detectielimiet op dan meting van het $[M+H]^+$ -ion. Voor de gelabelde verbindingen komt dat overeen met de meting van respectievelijk m/z 272,2 en m/z 275,2. Voor alle experimenten zijn vervolgens deze ionen gemeten.

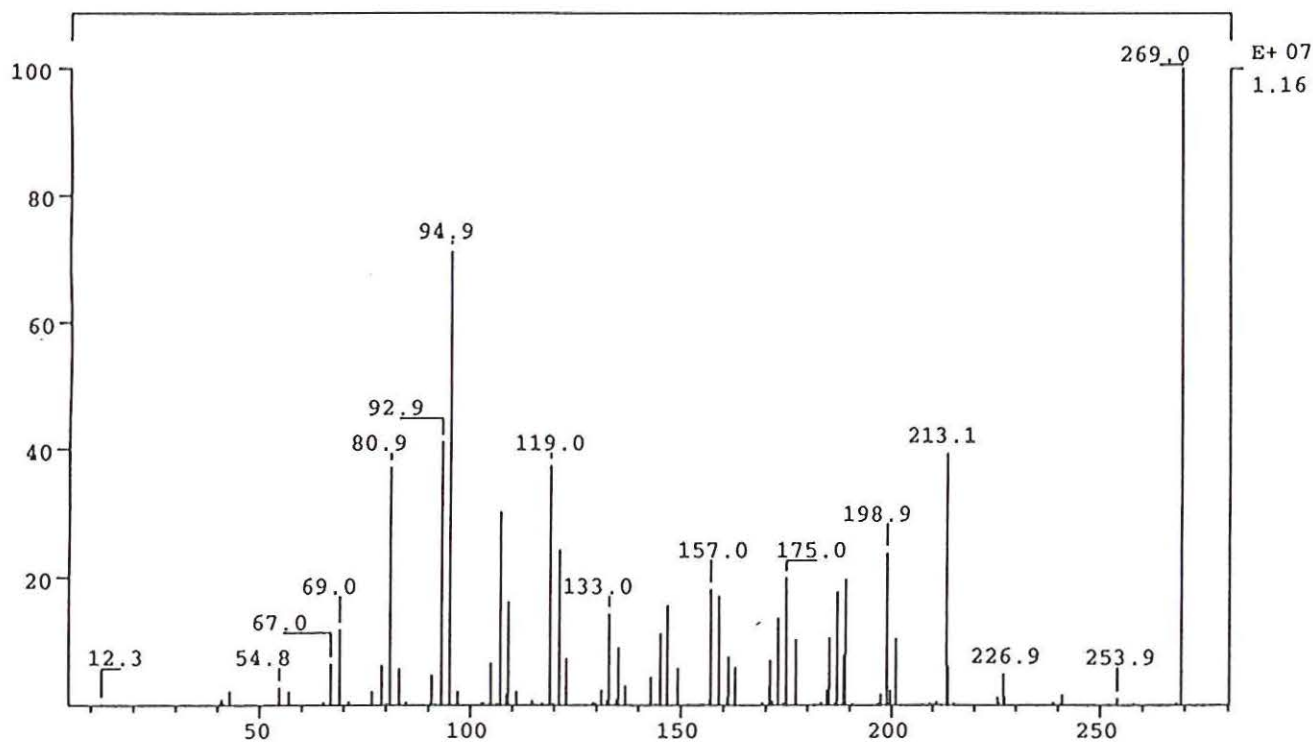
Het spectrum van ongelabeld retinol bevat naast de $[M+H]^+$ -piek ook pieken bij $[M+H+1]$, $[M+H+2]$ en $[M+H+3]$ tengevolge van de natuurlijke abundantie van isotopen. $[M+H+3]$ is slechts 0,2% van $[M+H]$, echter wanneer een geringe hoeveelheid $^{13}C_3$ -retinol gemeten moet worden in aanwezigheid van een grote hoeveelheid ongelabeld retinol, kan het analyseresultaat voor $^{13}C_3$ -retinol toch significant verhoogd worden. Het is daarom noodzakelijk op rekenkundige

wijze te corrigeren voor de 0,2% bijdrage van ongelabeld retinol in het gehalte $^{13}\text{C}_3$ -retinol.

In het spectrum van β -caroteen is slechts één piek te zien en dat is het molekulaire ion bij m/z 537,4. De gelabelde verbinding kan daarom gemeten worden bij m/z 543,4. De detecteerbaarheid van β -caroteen (m/z 537,4) en retinol (m/z 287) is nagenoeg gelijk gezien de intensiteit van het signaal bij continue invoer van oplossingen van 1 mg/l.

3.2 Tandem massaspectrometrie

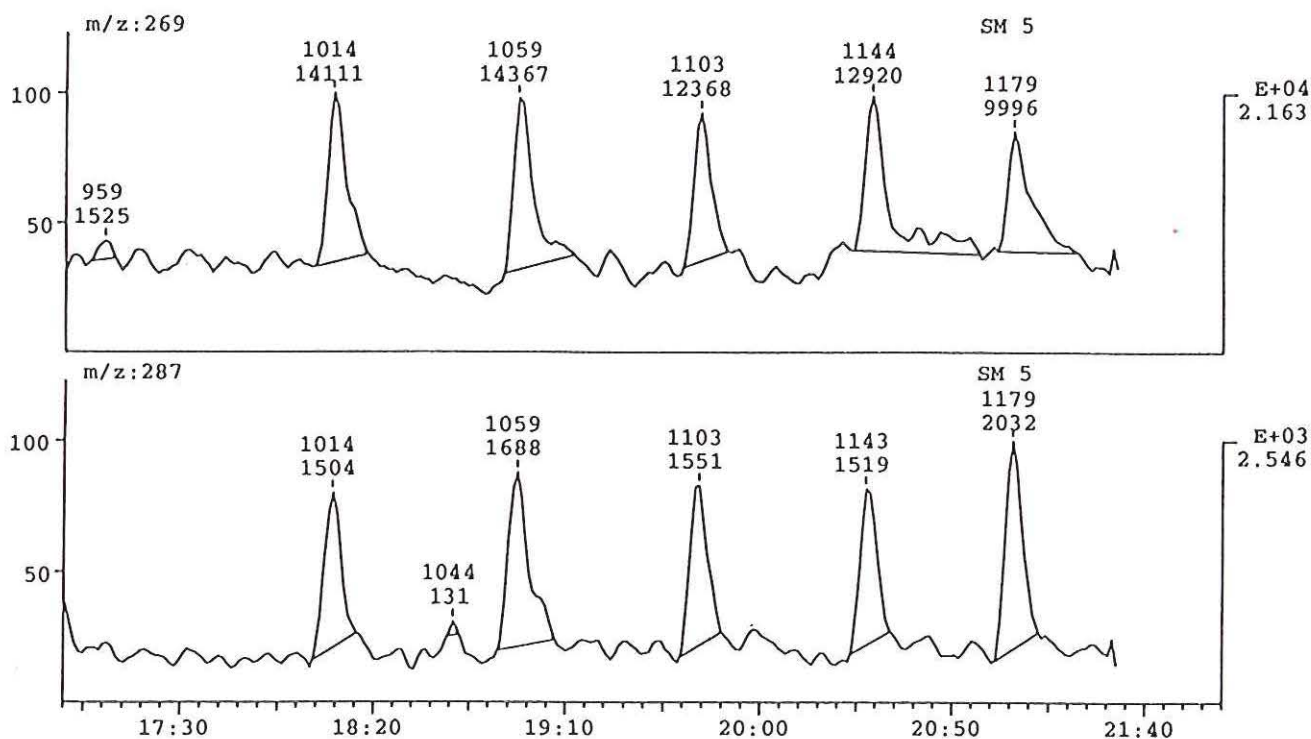
Tandem massaspectrometrie waarbij het dochterspectrum van m/z 269,2 en van m/z 287,2 van retinol is opgenomen, levert niets op als het gaat om de verbetering van de gevoeligheid van de meting. Beide dochterspectra vertonen een veelheid aan fragmenten met een lage intensiteit, allen afkomstig van fragmentatie van de alkeenketen op verschillende plaatsen. Deze fragmentaties zijn niet bruikbaar om de specificiteit of de gevoeligheid van de meting te verbeteren (figuur 2).



Figuur 2 Dochter spectrum van $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 269) van retinol.

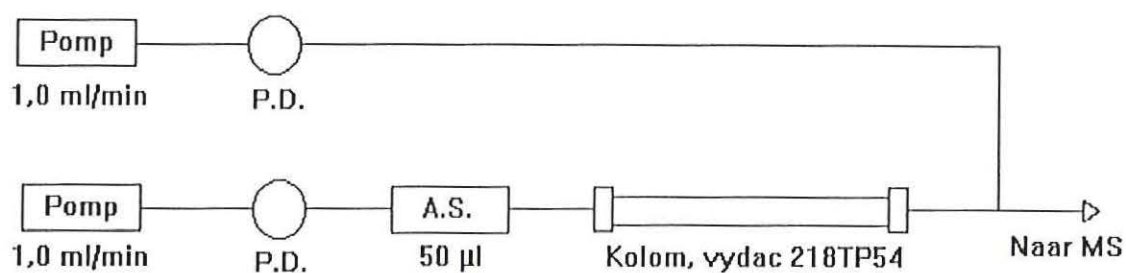
3.3 Flow injectie

Bij geoptimaliseerde instellingen zijn aliquots van 50 μl van een oplossing van 5 pg/ μl retinol geïnjecteerd. De absolute hoeveelheid in de MS was dus 250 pg retinol bij iedere injectie. In figuur 3 is de respons voor m/z 269,2 weergegeven. Uit deze resultaten blijkt dat een detectielimiet van 250 pg ruimschoots haalbaar is. In figuur 3 is eveneens de respons voor m/z 287,2 weergegeven. Voor dit ion wordt bij benadering dezelfde signaal/ruis-verhouding verkregen en dus is dezelfde detectielimiet haalbaar ondanks een verschil in absolute intensiteit van een factor 10 in het nadeel van m/z 287,2. Voor β -caroteen wordt voor m/z 537,4 ongeveer dezelfde absolute intensiteit gemeten als voor m/z 287,2 voor retinol. Op basis daarvan mag ook voor β -caroteen een detectielimiet van tenminste 250 pg verwacht worden onder de aanname dat de ruis voor m/z 537,4 vergelijkbaar is met de ruis op m/z 287,2.



Figuur 3 Respons van 250 pg retinol in vijfvoud geïnjecteerd in Flow Injectie mode.

30/70 methanol/water, 0,1 M ammoniumacetaat



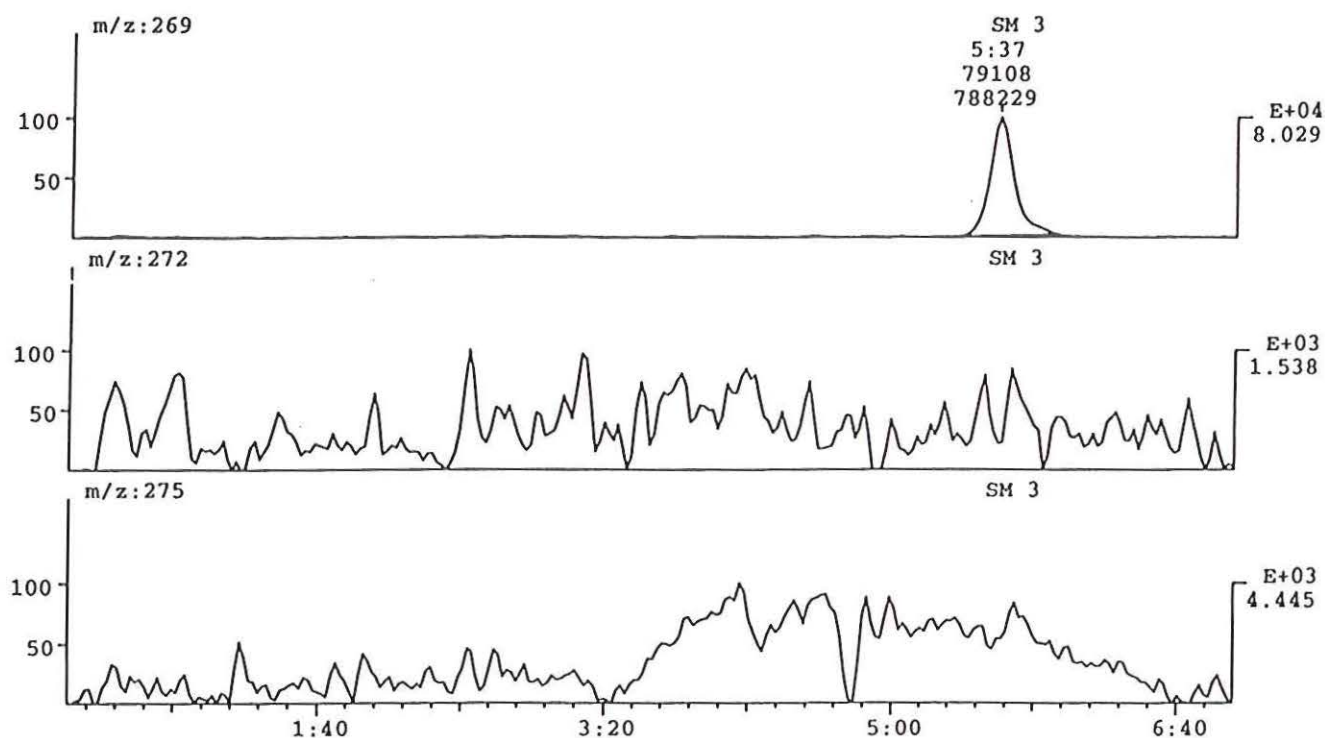
Organische fase *

* Voor retinol 93/2/6 methanol/THF/water

* Voor β -carateen 98/2 methanol/THF

Figuur 4

Schematische weergave van de HPLC-MS opstelling waarmee de scheiding in organisch milieu wordt uitgevoerd en post-column een oplossing van 0,1 M ammoniumacetaat wordt toegevoegd.



Figuur 5

Deel van een chromatogram van de HPLC scheiding van 250 pg retinol. De retentietijd van retinol is 5,37 minuten. De ionen voor de gelabelde componenten (m/z 272 en m/z 275) zijn eveneens weergegeven. Voor m/z 272 kan voor grotere hoeveelheden retinol een bijdrage verschijnen ten gevolge van ongelabeld retinol.

3.4 HPLC-MS

Nadat gebleken was dat de MS detectie voldoende gevoelig was voor de meting van 250 pg analyt, zijn enkele experimenten uitgevoerd om de reeds bestaande HPLC scheiding on-line te koppelen met de massaspectrometer. De HPLC scheiding vindt plaats in organisch milieu terwijl voor thermospray een redelijke hoeveelheid water en een bufferzout vereist is. Daarom is direct na de HPLC kolom een T-koppeling gemonteerd waarmee post-column het effluent van de kolom gemengd kan worden met een oplossing van ammoniumacetaat. De scheiding kan in deze opzet ongewijzigd blijven plaatsvinden in organisch milieu. Een schema van de opstelling is weergegeven in figuur 4.

Met deze opstelling zijn oplossingen van retinol geïnjecteerd overeenkomend met 100, 250, 500, 1000, 2500 en 5000 pg retinol op de kolom. In figuur 5 is een deel van het chromatogram weergegeven van de scheiding van 250 pg retinol ($RT=5,37$ minuten). Naast het signaal voor ongelabeld retinol, zijn ook de signalen voor $^{13}C_3$ en $^{13}C_6$ weergegeven. Figuur 5 toont aan dat een hoeveelheid van 250 pg ook na HPLC scheiding ruimschoots te meten is.

De lineariteit over het aangegeven concentratiegebied is goed met een correlatiecoëfficiënt van 0,997. Ook oplossingen van β -caroteen zijn geïnjecteerd op het HPLC-MS systeem. β -caroteen heeft bij de toegepaste isocratische elutie een retentietijd van 13,07 minuten. Voor deze component wordt een veel hogere detectiegrens gemeten; ca 2500 pg. Dit is in tegenspraak met de eerdere observatie dat de absolute intensiteit van β -caroteen en retinol vergelijkbaar zijn. Mogelijk is dit resultaat nadelig beïnvloed door de hoge omgevingstemperatuur ten tijde van de experimenten en door een onvoldoende afschermen van licht. Wanneer deze twee aspecten zijn aangepast moet het mogelijk zijn een detectiegrens te bereiken die vergelijkbaar is met hetgeen voor retinol mogelijk is gebleken.

CONCLUSIES

Uit de beschreven haalbaarheidsstudie blijkt dat de analyse van $^{13}C_3$ - en $^{13}C_6$ -gelabeld retinol in aanwezigheid van ongelabeld retinol zeer goed mogelijk is met HPLC-MS tot op een niveau van tenminste 250 pg van elke component. De bestaande HPLC-scheiding kan zonder modificaties worden gebruikt voor koppeling aan de MS.

Analyse van $^{13}C_6$ -gelabeld β -caroteen is eveneens mogelijk in aanwezigheid van ongelabeld β -caroteen, echter met een veel hogere detectielimiet van ca 2500 pg. Hierin kan wellicht verbetering gebracht worden door optimalisatie van de omstandigheden waaronder β -caroteen bevattende oplossingen worden gehanteerd zoals verlaging van de temperatuur en verdergaande afscherming van licht. Toepassing van tandem massaspectrometrische technieken biedt voor deze componenten geen voordelen m.b.t. specificiteit en gevoeligheid.

REFERENTIES

- 1 Zaman Z., P.Fielden and P.G.Frost, Clin. Chem., 39/10, (1993), 2229-2234.
- 2 Sowell A.L., D.L.Huff, P.R.Yeager, S.P.Caudill and E.W.Gunter, Clin. Chem., 40/3, (1994), 411-416
- 3 Lambert W.E., H.J. Nelis, M.G.M. de Ruyter and A.P. de Leenheer, Vitamin A: Retinol, Carotenoids and related compounds. In: Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins. A.P. de Leenheer, W.E. Lambert and M.G.M. de Ruyter (eds). Marcel Dekker Inc, New York, 1985, 556pp.
- 4 Eckhoff C., W.Wittfoht, H.Nau and W.Slikker jr., Biomed. Environm. Mass Spectrom., 19 (1990) 428-433.
- 5 Huselton C.A., B.E.Fayer, W.A.Garland and D.J. Liberato, in: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Applications in Agricultural, Pharmaceutical and Environmental Chemistry. Ed. M.A. Brown, American Chemical Society, Washington DC, 1990.