Vorkommen und Charakterisierung konjugierter Fettsäure-Isomere in Lebensmitteln und humanen Gewebearten

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

aus dem Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie - Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Hamburg





vorgelegt von

Kirstin Winkler aus Kiel

Hamburg 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis September 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, an der Universität Hamburg angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
- 2. Gutachter: Prof. Dr. B. Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2002

Meinen Eltern

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart möchte ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. B. Bisping danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Jörg Piost, Frau Kristina Hoffmann und Frau Isabell Michael für ihr Engagement und die hervorragende Zusammenarbeit sowie Herrn Andreas Heinze für seine großartige Unterstützung bei der Vorbereitung der Untersuchungsproben aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. R. Tauber, Chefarzt der urologischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Barmbek, Hamburg, sowie Herrn Prof. Dr. H. T. Öney, Chefarzt der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Zentralkrankenhauses Links der Weser, Bremen, danke ich für die Bereitstellung der Gewebeproben.

Für die zur Verfügung gestellten Karpfen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. F. J. Schwarz und Herrn Daniel Maaß.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Steinhart bedanke ich mich für das gute und angenehme Arbeitsklima sowie das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung während der Leitung des Chemischen Untersuchungsamtes.

Herrn Rainer Rickert möchte ich für seine wertvollen Diskussionen und Anregungen, die Durchsicht des Manuskriptes sowie seine wundervollen Aufmunterungen danken.

Herzlichster Dank gebührt Herrn Rüdiger Lohmann, der mich während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit unterstützt und immer an mich geglaubt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester sowie meiner Großmutter für ihre jahrelange großartige Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure	
5-HPETE	5-Hydroperoxyeicosatetraensäure	
Ag⁺-HPLC	Silberionen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	
AMP	2-Amino-2-Methylpropanol	
BHT	tert-Butylhydroxytoluol	
С	cis	
CAA	koni. Arachidonsäureisomere (coniugated arachidonic acid)	
CFA	konjugierte Fettsäuren (conjugated fatty acids)	
CLA	konjugierte Linolsäureisomere (conjugated linoleic acid)	
CLnA	konjugierte Linolensäureisomere (conjugated linolenic acid)	
DAD	Diodenarray-Detektor	
dest.	destilliert	
DMOX	4 4-Dimethyloxazolin	
eV	Flektronenvolt	
FG	Fettgewehe	
FID	Flammenionisationsdetektor	
FSME	Fettsäuremethylester	
FTIR	Fourier Transformationsinfrarotspektrometer	
GC	Gaschromatographie	
ны	High Density Lipoprotein	
	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	
i Tr	in der Trockenmasse	
	Innendurchmesser	
	Immundlobulin $X (X = A \in G)$	
	Low Density Linearatein	
	Low Density Lipopiotein L_{events}	
	$\frac{1}{2} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2} \sum_{i=1$	
m/z		
	maximale Arbeitenlatzkonzentration	
MAN	Massensnektrometer	
MO mu	Massensperitoniciei	
m\/	Millivolt	
N/N/	Mittohvort	
	Masso/Ladung	
111/Z	Nidsse/Lduuliy	
	Such provenuiniary $V(X = D = F = F = C + L)$	
	Prostagianum \land (\land – D_2 , \Box_2 , $\Box_1\alpha$, $\Box_{2\alpha}$, G_2 , \Box_2 , I_2)	
	Peroxisoni-promerationsaktiviener kezeptor	
	Dest siner Kehlenwessereteffkette	
к °		
	Raulkal Umkohrnhoson Hochleistungoflüssigshromstographis	
RP-HPLC	Onkeniphasen-Hochielstungsnussigchromatographie	
S 1	Standardabweichung	
	lialis Tumorfroice nobe dom Tumor gelegenee Cowebe	
	tumomeles name dem Tumor gelegenes Gewebe	
	Thrombovon $V (V = A \cap B)$	
	$HIUHUUXAH \land (\land - A_2, D_2)$	
	Volumon	
v	VOIUITIEIT	

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Grundlagen	1
1.1	Bildung und Struktur konjugierter Fettsäuren	2
1.2	Vorkommen konjugierter Fettsäuren	6
1.3	Physiologische Bedeutung konjugierter Fettsäuren	8
1.4	Stoffwechsel konjugierter Fettsäuren	11
1.5	Problemstellung	17
2	Referenzsubstanzen und Untersuchungsmaterial	19
2.1	Referenzsubstanzen	19
2.2	Untersuchungsmaterial	20
2.2.1	1 LEBENSMITTELPROBEN	20
2.2	2.1.1 Käse	20
2.2	2.1.2 Karpfen	22
2.2.2	2 GEWEBEPROBEN	23
2.2	2.2.1 Brustgewebe	23
2.2	2.2.2 Prostatagewebe	24
3	Analysenmethoden	25
3.1	Analytik der Fettsäuren	25
3.1.1	1 FETTEXTRAKTION	26
3.1	1.1.1 Käseproben	27
3.1	1.1.2 Karpfenproben	27
3.1	1.1.3 Gewebeproben	27
3.1.2	2 DERIVATISIERUNG ZU FETTSÄUREMETHYLESTERN (FSME)	28
3.1	1.2.1 Umesterung mit methanolischer Kaliummethylatlösung	28
3.1	1.2.2 Veresterung mit Trimethylsilyldiazomethan	28
3.1.3	B DERIVATISIERUNG ZU 4,4-DIMETHYLOXAZOLINEN (DMOX)	29
3.1.4	4 PARTIELLE HYDRAZINREDUKTION	30
3.1.	5 CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSENMETHODEN	31
3.1	1.5.1 Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)	31
3.1	1.5.2 Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)	32
3.1	1.5.3 Präparative Reversed-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeitschromato- graphie-UV-Detektion (RP-HPLC-UV)	32
3.1	1.5.4 Silberionen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Dioden- Array-Detektion (Ag ⁺ -HPLC-DAD)	33
3.1	1.5.5 Reversed-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie- Dioden-Array-Detektion (RP-HPLC-DAD)	34

4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Charakterisierung der chromatographischen Eigenschaften der CLnA und CAA	35
4.1.1	ALKALISCHE ISOMERISIERUNG	35
4.1.2	2 GC-FID- UNTERSUCHUNGEN	36
4.1.3	3 Ag ⁺ -HPLC-DAD-UNTERSUCHUNGEN	42
4.1.4	4 HYDRAZIN-REDUKTION	46
4.1.	5 RP-HPLC DER REDUZIERTEN CLNA UND CAA	49
4.1.6	3 ZUSAMMENFASSUNG DER ANALYTIK DER CLNA UND CAA	50
4.2	Untersuchung von Lebensmitteln	51
4.2.1	1 CLNA UND CAA IN KÄSEPROBEN	51
4.2	2.1.1 Isomerenmuster in unterschiedlichen Käsegruppen	51
4.2	2.1.2 Identifizierung der CLnA und CAA	52
4.2 4.2	2.1.3 Abschatzung der Gehalte an CLhA und CAA im Kasefett 2.1.4 Diskussion	57 57
4.2.2	2 CLNA UND CAA IN CLA-GEFÜTTERTEN KARPFEN	60
4.2	2.2.1 Identifizierung der CLnA und CAA	61
4.2	2.2.2 CLnA- und CAA-Gehalte in unterschiedlichen Fütterungsgruppen	62
4.2		63
4.3	Untersuchung von humanen Gewebearten	66
4.3.	1 IDENTIFIZIERUNG DER CLNA UND CAA	66
4.3.3	3 UNTERSUCHUNG VON MAMMAKARZINOMEN	67
4.3.4	UNTERSUCHUNG VON PROSTATAKARZINOMEN	68
4.3.	5 DISKUSSION	70
4.4	Zusammenfassende Diskussion zur Analytik von CLnA und CAA in biologischen Matrices	73
5	Zusammenfassung	75
5	Summary	77
6	Anhang	79
6.1	Referenzsubstanzen	79
6.1.1	1 FSME-Standard	79
6.1.2	2 CLA-Standard	80
6.1.3	B FSME-EINZELSTANDARDS	81

6.2	Untersuchungsmaterial	82
6.2.1	Käseproben	
6.2.2	KARPFENPROBEN	
6.2.3	Brustgewebeproben	
6.2.4	3.2.4 PROSTATAGEWEBEPROBEN	
6.3	Analysenmethoden	
6.3.1	Alkalische Isomerisierung	
6.3.2	6.3.2 FETTEXTRAKTION	
6.3.2	.1 Käse	87
6.3.2.2 Karpfen		88
6.3.2	6.3.2.3. Humangewebe	
6.3.3	DERIVATISIERUNGEN	89
6.3.3	.1 Umesterung mit methanolischer Kaliummethylatlösung zu FSME	89
6.3.3	2 Veresterung mit Trimethylsilydiazomethan	89
634		90
6 4	Coräto und Moconoromotor	01
0.4		91
6.4.1	GC-FID	91
0.4.2		91
0.4.3	A.3 PRÄPARATIVE RP-HPLC	
0.4.4	6.4.4 AG'-HPLC	
0.4.5		93
0.4.0	SONSTIGE GERATE	93
0.5	GC-FID-Ergebnisse	94
6.5.1	KASE	94
6.5.2	KARPFEN	95
6.5.3	HUMANGEWEBE	98
6.6	GC-MS-Ergebnisse	101
6.6.1	Käse	101
6.6.2	Karpfen	102
6.6.3	6.6.3 HUMANGEWEBE	
6.7	Chromatogramme	103
6.8	Chemikalien	110
7 L	iteratur	111

1 Einleitung und Grundlagen

In den letzten Jahren nahm das Interesse an Nahrungsbestandteilen mit protektiven physiologischen Eigenschaften im Hinblick auf die Entwicklung funktioneller Lebensmittel deutlich zu. Im Mittelpunkt der Forschungsarbeiten über die Nahrungsfette stehen aufgrund seiner vielfach beschriebenen positiven physiologischen Effekte die konjugierten Linolsäureisomere (conjugated linoleic acid, CLA). HA et al. wiesen bereits 1987 eine anticarcinogene Wirkung der CLA aus einem Extrakt aus gegrilltem Rindfleisch bei Mäusen nach. CLA bezeichnet in diesem Zusammenhang ein komplexes Gemisch aus positionellen und geometrischen Isomeren der Linolsäure, deren Doppelbindungen konjugiert angeordnet sind und in cis,cis-, cis/trans- oder trans,trans-Stellung vorkommen.

Bis heute ist jedoch der Mechanismus dieser anticarcinogenen Wirkung der CLA nicht geklärt. Diskutiert wird die Beeinflussung verschiedener Stoffwechselvorgänge durch CLA oder einzelne Isomere der CLA (PARIZA et al., 2000). So könnte CLA z.B. mit der Linolsäure konkurrieren und damit verändernd auf den Arachidonsäure-Stoffwechsel wirken. Nach Fütterung eines CLA-haltigen Futters an Ratten konnten sowohl SÉBÉDIO et al. (1997) als auch BANNI et al. (1999b) in den Leberlipiden konjugierte Isomere der Linolensäure (conjugated linolenic acid, CLnA), der Eicosatriensäure und der Arachidonsäure (conjugated arachidonic acid, CAA) nachweisen.

Weiterhin wird vermutet, dass CLA die Eicosanoidbiosynthese beeinflussen könnte (MOYA-CAMARENA und BELURY, 1999). Die aus der Arachidonsäure metabolisierten Eicosanoide haben vielfältige biologische, den Hormonen ähnliche Wirkungen. Die Eicosanoide Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin I₂ (PGI₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) spielen z.B. eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess sowie bei der Entstehung von Arteriosklerose und Thrombose (BUDDECKE, 1994). Mit einer erhöhten Tumorinduktion korreliert nach LIU und BELURY (1998) besonders das PGE₂.

1.1 Bildung und Struktur konjugierter Fettsäuren

Aus ernährungsphysiologischer Sicht sind Fette, welche mehrfach ungesättigte Fettsäuren (poly unsaturated fatty acids, PUFA) enthalten, von besonderer Bedeutung. Diese essentiellen Fettsäuren sind die Vorstufen zu den Fettsäuren der Kettenlänge C20 und C22, welche wiederum Vorstufen für die Eicosanoidbiosynthese sind und wichtige Funktionen beim Aufbau von Zellmembranen haben. Die natürlich vorkommende Konfiguration der ungesättigten Fettsäuren ist die cis-Stellung der Doppelbindungen. Bei den PUFA liegen die Doppelbindungen in der Regel isoliert, d.h. mit einer Methylengruppe zwischen den Doppelbindungen, vor. Durch technologische oder mikrobiologische Prozesse können die cis-Doppelbindungen in die trans-Konfiguration zu den sogenannten trans-Fettsäuren (trans fatty acids, TFA) isomerisiert werden (Abb. 1.1).



Abb. 1.1: Strukturformeln von Linolsäure sowie zwei trans-Isomeren

Gleichzeitig können die Doppelbindungen so verschoben werden, dass aus den isolierten Doppelbindungen konjugierte Doppelbindungen, d.h. ohne eine zwischenständige Methylengruppe, werden. Das Hauptisomer natürlich vorkommender CLA ist die cis9, trans11-Octadecadiensäure (C18:2 c9t11) (IP et al., 1994). Durch verbesserte Analysenmethoden wurden neben diesem Isomer jedoch auch die unterschiedlichsten Minorisomere in verschiedenen Lebensmitteln (CHIN et al., 1992, FRITSCHE und STEINHART, 1998, RICKERT et al., 1999) identifiziert. Weitere konjugierte Fettsäuren (conjugated fatty acids, CFA), in denen mindestens eine konjugierte Doppelbindung z.T. auch neben weiteren isolierten Doppelbindungen auftrat, wurden in Fütterungsstudien mit CLA in unterschiedlichen biologischen Matrices nachgewiesen (BANNI et al., 1996, JUANÉDA und SÉBÉDIO, 1999). In Abbildung 1.2 sind Beispiele der CFA gegenüber ihren natürlichen Homologen, den isolierten all-cis-konfigurierten Fettsäuren, aufgeführt:



Abb. 1.2: Strukturformeln üblicher PUFA mit möglichen konjugierten Homologen

BANNI et al. (1996) untersuchten den Metabolismus von CLA zu konjugierten Isomeren der Linolensäure (C18:3, CLnA) und der Eicosatriensäure (C20:3) in Lammlebern, da Lämmer einen hohen Gehalt an CLA, zum einen durch die Produktion im Pansen und zum anderen durch die vorwiegend aus Milch bestehende Nahrung, als Stoffwechselsubstanz zur Verfügung haben. Sie konnten in den Phospholipiden der Leber und im Fettgewebe CLnA, konjugierte Isomere der Eicosatriensäure sowie der Arachidonsäure (C20:4, CAA) detektieren. In Kuhmilch und Milcherzeugnissen wiesen die Autoren hingegen nur CLnA nach, welche vermutlich aus der Biohydrierung der Linolensäure stammen. Eine Identifizierung der CLnA und CAA wurde von BANNI et al. (1996) nicht durchgeführt. Bei den detektierten Isomeren handelte es sich grundsätzlich um Fettsäuren mit einer konjugierten Dien-Struktur. JUANÉDA und SÉBÉDIO (1999) detektierten in Leberlipiden von Ratten, welche ein CLA-haltiges Futter erhielten, längerkettige Metaboliten der CLA. Ihnen gelang die Identifizierung der Lage der Doppelbindungen des konjugierten Isomers der Eicosatriensäure C20:3 Δ 8,12,14 sowie der CAA C20:4 Δ 5,8,12,14 und C20:4 Δ 5,8,11,13. In einer weiterführenden Studie bestimmten SÉBÉDIO et al. (1999) die geometrische Anordnung der Doppelbindungen der CAA als C20:4 c5c8t12c14 und C20:4 c5c8c11t13.

Für die Entstehung der CFA gibt es verschiedene Möglichkeiten. CLA werden z.B. natürlicherweise im Pansen der Wiederkäuer gebildet. Unter anaeroben Bedingungen isomerisiert das Bakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* im Pansen Linolsäure zu CLA (KEPLER et al., 1966), wodurch der relativ hohe Gehalt an CLA im Milchfett und im Fleisch der Wiederkäuer erklärt wird. Aufgrund der Substratspezifikation für ein c9c12-Doppelbindungssystem sowie für eine Carboxylgruppe (Kepler et al., 1970) der Linoleat-Isomerase (EC 5.2.1.5) entsteht ebenfalls das Hauptisomer C18:2 c9t11. Andere CLA-Isomere enstehen durch das Vorhandensein weiterer Isomerasen (GRIINARI und BAUMAN, 1999). Die Bildung von C18:2 c9t11 kann auch durch die Δ^9 -Desaturierung der trans-Vaccensäure C18:1 t11 im Euter von Kühen erfolgen (GRIINARI et al., 2000).

Linolsäure und α -Linolensäure sind wichtige Vorstufen für die Bildung vieler PUFA über Desaturierung und Kettenverlängerung *in-vivo*. Eine wichtige Rolle spielt unter den PUFA die Arachidonsäure, da sie die Ausgangssubstanz für die Eicosanoide ist. In Abbildung 1.3 ist der Bildungsweg der Arachidonsäure aus der Linolsäure über die γ -Linolensäure dargestellt. Es handelt sich hierbei um die n6-Fettsäuren. Auf demselben Weg entsteht aus der α -Linolensäure



Abb. 1.3: Stoffwechselweg der n6-Fettsäuren

(C18:3 c9c12c15), einer n3-Fettsäure, durch Desaturierung zunächst die Octadecatetraensäure (C18:4 c6c9c12c15) und nach Kettenverlängerung die Eicosatetraensäure (C20:4 c8c11c14c17). Zur Klärung der Bildung von CFA bzw. zur Aufklärung des Stoffwechselweges der CLA leisteten JUANÉDA und SÉBÉDIO (1999) durch die Identifizierung der CLA-Metaboliten, insbesondere durch die Bestimmung der Position und der Konfiguration der Doppelbindungen, einen wichtigen Beitrag. Ihre Ergebnisse zeigten, dass bestimmte CLA-Isomere in ungewöhnliche PUFA umgewandelt werden können. Der übliche Stoffwechselweg der Fettsäuren über die Δ^6 -Desaturierung, die Elongation und die Δ^5 -Desaturierung sei somit übertragbar auf die CLA. BANNI et al. vermuteten bereits 1996 die Umwandlung der CLA zu CAA, ohne die genaue Struktur der CAA zu identifizieren. Sie konnten jedoch zeigen, dass die CAA wie auch die Arachidonsäure in die Phospholipide eingebaut wurden, während CLnA und konjugierte Isomere der C20:3 vorwiegend im Neutralfett angereichert wurden (BANNI et al., 1999b, BANNI et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse erzielten Sébédio et al. (2001) in einem Fütterungsversuch ebenfalls an Ratten mit einzelnen CLA-Isomeren. Dabei wurde ausgehend von dem CLA-Hauptisomer C18:2 c9t11 in den Leberlipiden mehr konjugierte C20:3 als CLnA gefunden, während es sich bei dem CLA-Isomer C18:2 t10c12 genau entgegengesetzt verhielt. GNÄDIG (2002) untersuchte daraufhin mit dem synthetisierten konjugierten Isomer der CLnA C18:3 c6c9t11 und dem Isomer der Eicosatriensäure C20:3 c8c11t13 deren Stoffwechsel im direkten Vergleich zu den aus der Linolsäure gebildeten Metaboliten. Es konnte so gezeigt werden, dass die Umsetzunggsrate von γ -Linolensäure und C18:2 t10c12 vergleichbar war, während die der C18:2 c9t11 nur die Hälfte betrug. Weiterhin ergab sich im Vergleich zur γ -Linolensäure eine bessere Umsetzung der synthetisierten C18:3 c6c9t11 und eine schlechtere Desaturierung der konjugierten C20:3 c8c11t13 verglichen mit der natürlich vorkommenden C20:3 c8c11c14. Somit kann geschlossen werden, dass das CLA-Hauptisomer C18:2 c9t11 hauptsächlich zu konjugierter C20:3 metabolisiert wird.

Neben der Biosynthese sind konjugierte Fettsäuren auch durch chemische Synthese zugänglich. CLA werden z.B. durch die alkalische Isomerisierung der Linolsäue erhalten, wobei vorwiegend die Isomere C18:2 c9t11 (45 %) und C18:2 t10c12 (43 %) entstehen (CHIPAULT und HAWKINS, 1959). Neben diesen Major-Isomeren treten viele andere CLA-Isomere auf, wobei nicht nur die cis/trans-Konfiguration sondern auch all-cis- und all-trans-Isomere enthalten sind (CHRISTIE, 1997). SPITZER et al. (1994)

identifizierten nach alkalischer Isomerisierung von Linolsäure und α -Linolensäure konjugierte Diene und auch konjugierte Triene, wobei sie jedoch nur die Position der Doppelbindungen erfassten.

BERDEAUX et al. (1998) isolierten aus dem durch alkalische Isomerisierung der Linolsäure erhaltenen komplexen Gemisch der CLA-Isomere die beiden Isomere C18:2 c9t11 und t10c12 durch fraktionierte Kristallisation in Aceton. Die so extrahierten Einzel-Isomere in Mengen von bis zu 70 g wiesen eine Reinheit von 90-97 % auf. Eine weitere Möglichkeit, reine Einzel-Isomere der CLA zu erhalten, ist die stereoselektive Synthese. Diese Methode wurde von LEHMANN (2001) zur Herstellung der CLA-Isomere C18:2 c9t11, c9c11, t9t11, t10c12 und t7c9 erfolgreich entwickelt.

Schließlich gelang GNÄDIG (2002) erstmals die stereoselektive Synthese der zwei CLA-Metaboliten C18:3 c6c9t11 und C20:3 c8c11t13 sowie ihrer radioaktivmarkierten Analoga. Diese Synthesen verlaufen über mehrere Stufen, und die Ausbeuten sind aufgrund der oxidations- und isomerisierungsanfälligen Doppelbindungen sehr niedrig.

1.2 Vorkommen konjugierter Fettsäuren

Die Hauptquelle der CLA sind Lebensmittel tierischen Ursprungs. Aufgrund der CLA-Bildung im Pansen und des Carry-over-Effektes enthalten Milch und Milcherzeugnisse sowie Fleisch und Fleischerzeugnisse von Wiederkäuern die höchsten CLA-Gehalte. FRITSCHE und STEINHART (1998) bestimmten mittlere Gehalte des CLA-Hauptisomers C18:2 c9t11 in den unterschiedlichsten Lebensmitteln, während die meisten Autoren hauptsächlich Milch und Milcherzeugnisse sowie Fleisch und Fleischerzeugnisse untersuchten. Während in Europa für Milch und Milcherzeugnisse Gehalte des CLA-Isomers C18:2 c9t11 von 0,40 bis 1,70 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren erhalten wurden (FRITSCHE und STEINHART, 1998), lagen die Gehalte in den USA aufgrund anderer Fütterungsbedingungen mit 0,36 bis 0,62 % (SHANTA et al., 1995, MA et al., 1999) etwas darunter. In Rindfleisch und Rindfleischerzeugnissen wurden Gehalte von 0,11 bis 1,20 % ermittelt (FRITSCHE und STEINHART, 1998), während in Fisch nur etwa 0,04 bis 0,28 % C18:2 c9t11 enthalten waren (GNÄDIG, 1996). Pflanzenöle und Margarinen sind mit 0,01 bis 0,05 % C18:2 c9t11 nur

schlechte CLA-Lieferanten (CHIN et al., 1992). Ihr Gehalt ist vermutlich auf die Verarbeitungsprozesse der Rohöle bei der Raffination, insbesondere der Bleichung und Desodorierung, zurückzuführen (CHIN et al., 1992). YURAWECZ et al. (1993) analysierten in diesem Zusammenhang unterschiedliche Speiseöle und konnten so in Maisöl, Reisöl und Sojaöl konjugierte Triene der Kettenlänge C18 mit Gehalten von 0,009 bis 0,035 % nachweisen. Im Fett aus Rindfleisch und im Öl aus Haferkleie waren dagegen keine konjugierten Triene detektierbar. Weiterhin stellten sie fest, dass der Gehalt an konjugierten Trienen in benutzten Brat- und Kochfetten deutlich höher liegt (0,051 %) und auch mit Verlängerung der Erhitzungsdauer weiter zunimmt.

BANNI et al. (1996) konnten ebenfalls konjugierte Isomere der Linolensäure C18:3 nachweisen. Allerdings handelte es sich hierbei nur um konjugierte Diene, d.h. die dritte Doppelbindung lag isoliert vor. In Milch und Milcherzeugnissen aus Italien (Pecorino, Ricotta, Parmesan, Joghurt sowie Kuh- und Schafsmilch) bestimmten sie im Mittel 0,6 bis 7,3 nmol CLnA / mg Fett. In Lebern von Lämmern gelang ihnen neben CLnA auch der Nachweis konjugierter Eicosatriensäure-Isomeren sowie CAA. Die Gehalte dieser CFA sind vermutlich auf den Metabolismus der CLA aus der Nahrung zurückzuführen.

CLnA und CAA wurden bisher hauptsächlich in Ratten nachgewiesen, wobei Fütterungsversuche mit CLA-haltigen Diäten zugrundelagen. Der Metabolismus sowie die Verteilung der CLA im Fett oder den Organen hängt dabei von der Dauer und dem Gehalt der CLA-Gabe ab (BANNI et al., 1995). JUANÉDA und SÉBÉDIO (1999) fütterten männliche Wistar-Ratten nach einer zweiwöchigen fettfreien Diät sechs Tage lang mit 180 mg/Tag eines CLA-Gemisches in Form von Triacylglycerinen, in dem überwiegend die Isomere C18:2 c9t11 und t10c12 enthalten waren. Sie konnten danach konjugierte Isomere der Eicosatriensäure und CAA in den Leberlipiden der Ratten detektieren und identifizieren. SEBEDIO et al. (1999) bestimmten den Gehalt an CAA mit 0,2 % bezogen auf den Gesamtfettgehalt der Lebern und den Gehalt an konjugierter C20:3 mit nur 0,1 %.

1.3 Physiologische Bedeutung konjugierter Fettsäuren

Bisher sind nur die physiologischen Wirkungen der CLA untersucht worden. Während den all-trans-Fettsäuren eher negative Wirkungen gerade in Bezug auf Arteriosklerose zugeschrieben wurden, konnten bei den CLA einige positive physiologische Eigenschaften festgestellt werden, welche in Abbildung 1.4 in einem Überblick dargestellt sind.



Abb. 1.4: Physiologische Wirkungen von CLA

Eine große Anzahl der Forschungsarbeiten wurde bezüglich der anticarcinogenen Wirkung der CLA durchgeführt. Dabei wurden Auswirkungen auf induzierten Hautkrebs, Dickdarm- und Magenkrebs sowie auf die Tumorbildung bei Prostata- und Brustkrebs aufgezeichnet. Untersuchungen an Ratten und Mäusen zeigten bei einer dosisabhängigen Diät mit CLA bis zu 1 % im Futter eine reduzierte Tumorbildung (BELURY, 1995, WHIGHAM et al., 2000). IP et al. (1996) stellten eine Verminderung der Brustkrebsbildung durch CLA unabhängig von der Art oder des Gehaltes des verabreichten Fettes fest. Auch in in-vitro Untersuchungen mit humanen Zellinien konnte eine Hemmung des Zellwachstums durch CLA-Zusatz erreicht werden (DURGAM und FERNANDES, 1997). In einer neueren Studie berichteten IP et al. (1999) von einer Reduzierung der "terminal end buds" bei Ratten durch Gabe einer CLA-angereicherten Butter. Sie vermuten, dass in diesem Fall C18:2 c9t11 das aktive CLA-Isomer darstellt, da dieses 85 % der eingesetzten CLA darstellt. Die "terminal end buds" sind die Ansatzpunkte der Brusttumorbildung durch chemische Induktion bei Ratten. Durch eine Veränderung der Epitheldichte und der DNA-Synthese in den "terminal end buds" begründen BANNI et al. (1999a) die reduzierte Brustkrebsentstehung. Diese Ergebnisse wurden von IP et al. (2000) bestätigt und mit dem Auftreten von Apoptose in Zusammenhang gebracht. Als weitere anticarcinogene Wirkung der CLA wird die Beeinflussung der Eicosanoidbiosynthese diskutiert. So konnte in Zell-kulturversuchen mit Keratinozyten eine Reduzierung der PGE₂-Synthese, welches positiv mit der Tumorentstehung korreliert, durch CLA-Zusatz (16µg/mL) erreicht werden (LIU und BELURY, 1998). Schließlich wird derzeit im Hinblick auf die Anticarcinogenität der CLA ein Zusammenhang mit Peroxisom-proliferationsaktivierten Rezeptoren (PPAR) vermutet, welche wiederum Enzyme des Fettsäurestoffwechsels beeinflussen. In Untersuchungen mit Sprague-Dawley-Ratten aktivierte CLA PPAR α und PPAR γ , wobei der direkte Mechanismus der PPAR jedoch noch unklar ist (BELURY et al., 1997, MOYA-CAMARENA et al., 1999).

Eine weitere diskutierte Eigenschaft der CLA ist die Wirkung bezüglich Arteriosklerose. In einem Fütterungsversuch an Kaninchen mit 0,5 % CLA bezogen auf die Gesamtfettsäuren in der Diät stellten LEE et al. (1994) eine signifikante Reduzierung des LDL-Spiegels (low density lipoprotein) sowie des LDL/HDL-Spiegels (high density lipoprotein) und somit einen Schutz gegen Fettablagerung in den Arterien fest. Jüngste Studien am gleichen Tier ergaben sogar eine 30 %ige Reduzierung der arteriosklerotischen Erkrankungen (KRITCHEVSKY et al., 2000). Untersuchungen mit einzelnen CLA-Isomeren zeigten nur bei C18:2 t10c12 und nicht bei C18:2 c9t11 eine Abnahme der Gehalte an Triacylglycerinen und Gesamtcholesterol im Blut (DE DECKERE et al., 1999, GAVINO et al., 2000). Nur MUNDAY et al. (1999) stellten im Gegensatz zu den eben genannten Ergebnissen nach der CLA-Gabe in Höhe von 0-5 % CLA-Isomerengemisch im Futter bei C57BL/6-Mäusen (transgene Mäuse für toxikologische Untersuchungen) einen Anstieg der "fatty streaks", einen Anstieg des HDL-Cholesterol/Gesamtcholesterol-Quotienten sowie eine Abnahme des Triacylglyceringehaltes im Serum fest. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um den Einfluss von CLA auf Arteriosklerose erklären zu können.

TRUITT et al. (1999) entdeckten *in-vitro* einen antithrombotischen Effekt eines Gemisches der beiden CLA-Isomere C18:2 c9t11 und t10c12. Im Vergleich zu Linolsäure zeigten diese Isomere eine deutliche Verminderung der Thrombocytenaggregation durch Arachidonsäure, Kollagen oder Thrombin. Vergleichbare Untersuchungen

beim Menschen ergaben jedoch mit einer täglichen Aufnahme von 3,9 g CLA über einen Zeitraum von 63 Tagen keinen Einfluss auf die Plättchenaggregation. Als Ursache dafür nennen BENITO et al. (2001) den zu kurzen Zeitraum der CLA-Aufnahme. Auch hier sind demnach noch weitere Untersuchungen notwendig.

Ein deutlich anaboler Effekt der CLA wurde in verschiedenen Studien an Schweinen, Ratten und Mäusen festgestellt (DUGAN et al., 1997, PARK et al. 1997, WEST et al., 1998). Durch Aufnahme von 0,5-1,2 % CLA im Futter wurde der Körperfettanteil reduziert, wobei die fettfreie Körpermasse ("lean body mass") gleichzeitig zunahm. Ergebnisse einer neueren Studie von PARK et al. (1999) lassen vermuten, dass das CLA-Isomer C18:2 t10c12 verantwortlich für die Körperfettreduzierung ist. Diese wiederum ist auf eine Abnahme der Fettzellengröße und nicht auf eine Reduzierung der Anzahl der Fettzellen zurückzuführen (AZAIN et al., 2000). In Humanstudien mit CLA-Gaben wurden einerseits vergleichbare Ergebnisse, die sich in einer Reduzierung des Körperfettanteils und eine Steigerung der Muskel- und fettfreien Körpermasse wiederspiegelten (WHIGHAM et al., 2000) erzielt, andererseits konnten ZAMBELL et al. (2000) keinen Unterschied in der Körperzusammensetzung und dem Energieverbrauch zwischen den Untersuchungsgruppen mit und ohne CLA-Zulage feststellen. Aufgrund der Hypothese, dass die Aufnahme von CLA eine Auswirkung auf Leptin, welches den Fettstoffwechsel im Körper reguliert, und auch auf den Appetit hat, wurde der Leptingehalt im Plasma von Frauen während einer neunwöchigen CLA-Gabe bestimmt (MEDINA et al., 2000). Nach einem zunächst deutlichen Anstieg des Leptingehaltes fiel dieser zum Ende der Studie wieder auf den Ausgangswert zurück, so dass auch hier keine konkreten anabolen Wirkungen von CLA gezeigt werden konnten.

Ebenso unklar sind bisher die Wirkungen von CLA auf die Entwicklung von Diabetes. HOUSEKNECHT et al. (1998) konnten durch CLA-Fütterung an prädiabetische Ratten eine Normalisierung der gestörten Glucosetoleranz sowie eine Linderung der Hyperinsulinämie feststellen. Eine mit dem Hauptisomer C18:2 c9t11 angereicherte Butter zeigte am gleichen Tier keine verbesserte Glucosetoleranz (RYDER et al., 2001). Nur mit dem CLA-Isomerengemisch wurden dieselben Ergebnisse wie von HOUSEKNECHT et al. (1998) erreicht. Im Widerspruch dazu stehen die von TSUBOYAMA-KASAOKA et al.

(2000) beschriebenen Effekte. Mit CLA gefütterte C57BL/6J-Mäuse zeigten eine Hyperinsulinämie, welche nach kontinuierlicher Gabe von Leptin wieder zurückging.

Schließlich wird CLA eine immunmodulierende Wirkung zugeschrieben. Durch Fütterung von CLA an Hühner konnten COOK et al. (1993) eine immuninduzierte Kachexie (Wachstumshemmung und Gewebeschwund) mindern. Es wird eine Beziehung zwischen CLA und einem veränderten Interleukin-1-Spiegel vermutet. HAYEK et al. (1999) bestimmten in diesem Zusammenhang die Kapazität von CLA, die Konzentration an Interleukin zu verändern. Weiterhin könnte CLA einen Einfluss auf die Immunglobuline (Ig) haben. Durch die Gabe von 1 % CLA-Isomerengemisch im Futter an Ratten stellten SUGANO et al. (1998) eine Abnahme des IgE-Gehaltes fest, während die Konzentrationen an IgA, IgG und IgM anstiegen. Auch WHIGHAM et al. (2000) bestimmten in verschiedenen Geweben sowie im Serum von CLA-gefütterten Ratten einen geringeren Gehalt an IgE. IgE wird bei Allergikern während der Sensibilisierung gebildet. Eine Abnahme der IgE-Gehalte reduziert wiederum die Mediatorfreisetzung.

1.4 Stoffwechsel konjugierter Fettsäuren

CLnA und CAA treten wie bereits erwähnt meist dort auf, wo parallel ein erhöhter CLA-Gehalt festgestellt wurde oder wo zuvor eine CLA-Gabe stattfand. Im Folgenden werden derzeit diskutierte Stoffwechselwege der CLA beschrieben, die zu längerkettigen Metaboliten führen. Diese wurden bereits z.T. unter 1.1 beschrieben, da die Bildung von CLnA und CAA in der Literatur bisher auf den Metabolismus von CLA begründet wird.

Eine Hypothese besagt, dass CLA und Linolsäure kompetitiv den gleichen Syntheseweg zur Arachidonsäure bzw. deren Isomeren nutzen. BANNI et al. berichteten bereits 1995 von konjugierten Dienstrukturen der Linolensäure und der Eicosatriensäure als vermutliche Metaboliten von CLA. Männliche und weibliche Fischer-344-Ratten (genetisch stabile Albinoratten) bekamen eine einwöchige Diät ohne Cholin oder mit Cholin-Anreicherung, wobei die Diäten entweder gehärtetes Pflanzenöl oder Maisöl enthielten. CLA konnten die Autoren im Fettgewebe aller Ratten, unabhängig von der Fütterungsgruppe, jedoch in der Leber nur in den Ratten, die gehärtetes Pflanzenöl

verabreicht bekamen, nachweisen. Diese Rattenlebern enthielten ebenfalls CLnA und konjugierte Isomere der Eicosatriensäure, welche vermutlich aus Desaturierung und Kettenverlängerung der CLA stammen. Da der Metabolismus sowie die Verteilung in den Organen und Lipidklassen von der Menge und von der Dauer der CLA-Aufnahme abhängen (IP et al., 1994), analysierten BANNI et al. (1996) in einer weiteren Studie Fettgewebe und Leberlipide von Lämmern, welche natürlicherweise einen hohen Umsatz von CLA zum einen aus der aufgenommenen Milch und zum anderen aus der Bildung im Pansen aufweisen. In den Phospholipiden der Leber detektierten sie zwei konjugierte Diene der Linolensäure, zwei der Arachidonsäure und ein Dien der Eicosatriensäure neben drei CLA-Isomeren. In den Neutralfetten der Leber sowie im Fettgewebe waren jedoch keine CAA enthalten. Demnach findet also eine Synthese von CAA aus CLA statt, wobei CAA offenbar nur in Phospholipide eingebaut wird. Auch Sébédio et al. (1997) konnten in Leberlipiden von Ratten ein konjugiertes Isomer der Eicosatriensäure und zwei Isomere der CAA identifizieren. Sie verabreichten männlichen Wistar-Ratten nach einer zweiwöchigen fettfreien Diät sechs Tage lang 180 mg CLA mit den Isomeren C18:2 c9t11 und t10c12. Ihnen gelang danach die Bestimmung der Position der Doppelbindungen der konjugierten CLA-Metaboliten, so dass sie diese Isomere als Ausgangssubstanzen zuordnen konnten. BANNI et al. (1999) gaben an weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Albinoratten) einen Monat 0,5 bis 2 % CLA im Futter. Sie konnten sowohl im Brustgewebe als auch in der Leber CLnA sowie konjugierte Eicosatriensäue nachweisen, während CAA in keinem der Gewebe gefunden wurde. Dieser Unterschied zu den Ergebnissen von SÉBÉDIO et al. (1997) wird durch die zweiwöchige fettfreie Diät vor der CLA-Gabe begründet, da hier zunächst die Konkurrenz zwischen Linolsäure und CLA um die Enzyme (Desaturase und Elongase) fehlt. In einem Fütterungsversuch mit CLAangereicherter Butter hingegen konnten BANNI et al. (2001) kürzlich CLnA, konjugierte Eicosatriensäure und auch CAA in der Leber der Sprague-Dawley-Ratten bestimmen. Während CLnA und konjugierte C20:3 überwiegend in den Neutralfetten nachgewiesen wurden, gelang die Bestimmung von CAA vorwiegend in den Phospholipiden. Der Gehalt an konjugierter C20:3 war dabei ungefähr viermal höher als der von CLnA und CAA. Ähnliche Ergebnisse erzielten Sébédio et al. (2001) in einem Fütterungsversuch mit einzelnen CLA-Isomeren. Dabei wurde C18:2 c9t11 eher zu konjugierter C20:3 als zu CLnA metabolisiert, während C18:2 t10c12 überwiegend zu CLnA umgewandelt wurde. Bereits 1997 untersuchten BELURY und KEMPA-STECZKO die Wirkung von Δ^6 -Desaturase auf CLA. In Rattenlebermikrosomen konnten sie die Umwandlung von CLA zu Isomeren der Linolensäure feststellen. Aufgrund der Ergebnisse des zuletzt zitierten Versuches untersuchte GNÄDIG (2002), ob CLA mit denselben Enzymen verstoffwechselt wird wie Linolsäure (siehe Abb. 1.3). Sie verfolgte den Metabolismus von CLA zu CAA *in-vitro* in isolierten Rattenlebermikroso-

men, indem sie zunächst die Umsetzungsrate von CLA-Isomeren durch Δ^6 -Desaturase im Vergleich zur Linolsäure bestimmte und anschließend auch die weiteren Metabolisierungsschritte über die Elongation und die Δ^5 -Desaturierung anhand von synthetisierten Isomeren der CLnA und konjugierter C20:3 verfolgte (siehe Abb. 1.5). Dabei ergab sich, dass C18:3 c6c11t13 besser desaturiert wurde als γ -Linolensäure, während C20:3 c8c11t13 weniger zu Arachidon-





säure umgesetzt wurde als C20:3 c8c11c14. Demnach wird das CLA-Hauptisomer C18:2 c9t11 hauptsächlich zu konjugierter C20:3 metabolisiert.

Begleitend zum Auftreten der CLA-Metaboliten wurde eine Abnahme der Gehalte an Linolsäure und Arachidonsäure im Leberfett der mit CLA gefütterten Mäuse festgestellt (BELURY und KEMPA-STECZKO, 1997, LIU und BELURY, 1998), während γ -Linolensäure und Eicosatriensäure C20:3 c8c11c14 nach CLA-Gabe nur im Brust-gewebe und nicht in den Leberlipiden abnahmen (BANNI et al., 1999b, BANNI et al., 2001).

Durch die Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels durch CLA wird letztlich auch die Biosynthese der biologisch aktiven Eicosanoide beeinflusst. Die Eicosanoide, welche sich in die drei Gruppen der PG, der TX und der Leukotriene (LT) einteilen lassen, werden auf zwei unterschiedlichen enzymatischen Wegen aus der Arachidonsäure gebildet. Während PG und TX über den Cyclooxygenase-Weg entstehen, werden LT über den Lipoxygenase-Weg gebildet. In Abbildung 1.6 sind beide Synthesewege schematisch dargestellt.



Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Eicosanoidbildung aus Arachidonsäure nach BUDDECKE (1994)

^{*}5-Hydroperoxy-eicosatetraensäure

** 5-Hydroxy-eicosatetraensäure

PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} und TXB₂ umfassen von den in Abbildung 1.6 genannten Eicosanoiden 90 % (SCHRÖR, 1990). Die Buchstaben D,F,G und H geben die Art und die Stellung der Sauerstoffgruppen im Molekül an. Die physiologischen Wirkungen der Eicosanoide sind vielseitig und treten bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml Serum auf. So beeinflussen die cyclooxygenaseabhängigen Arachidonsäuremetaboliten den Entzündungsprozess, die Immunaktivität, die Blutdruckregulation, die Blutplättchenfunktion und die Thrombose, Schmerzzustände, den Knochenaufbau sowie die Muskelkontraktion (BUDDECKE, 1994).

Nach Fütterung von CLA an Meerschweinchen, Hamster oder Ratten wurde im Gewebe oder im Serum der Tiere ein reduzierter Gehalt an PGE₂ festgestellt (HA et al., 1987, BELURY, 1995, TUREK et al., 1998, WHIGHAM et al., 2001). In einer Studie mit Keratinozyten konnte CLA die 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat-induzierte PGE₂-Synthese im Vergleich zu Linolsäure ebenfalls deutlich senken (LIU und BELURY, 1998).

Zur Klärung des Mechanismus der Prostaglandin-reduzierenden Wirkung der CLA wurde in einer Studie die Veränderung der Cyclooxygenase Prostaglandin-H-Synthase in Anwesenheit von CLA untersucht (BULGARELLA et al., 2001). Mikrosomen aus Widderspermien wurden mit Arachidonsäure inkubiert, wobei PGH₂ entstand. Nach Zugabe einzelner CLA-Isomere konnte eine Hemmung der Prostaglandin-H-Synthase gemessen werden, die gleichfalls in einer Reduzierung der Gehalte an PGD₂, PGF_{2a}, PGE₂, PGI₂ und TXA₂ resultierte. In einer *in-vivo* Interventionsstudie wurde kürzlich der Einfluss der an Ratten verabreichten CLA-Isomere C18:2 c9t11 und t10c12 auf den Stoffwechsel von PGI2 und TXA2 untersucht (GNÄDIG, 2002). Die Gehalte dieser Eicosanoide im Plasma bzw. Serum wurden durch Quantifizierung der stabileren Metaboliten 6-Keto- PGF_{1a}, und TXB₂ ermittelt. Während in alten Ratten keine Beeinflussung durch CLA zu erkennen war, sank der Gehalt an TXB₂ in der jungen Ratte nach Aufnahme des CLA-Isomers C18:2 t10c12 deutlich ab. NUGTEREN (1970) und NUGTEREN und CHRIST-HAZELHOF (1987) berichteten schon früher von einer Cyclooxygenase- bzw. Lipoxygenase-hemmenden Wirkung konjugierter Fettsäuren der Kettenlänge C18 und C20. Weitere Studien auch unter Berücksichtigung der CLA-Metaboliten CLnA, konjugierte C20:2 sowie CAA sind auch hier erforderlich.

In Abbildung 1.7 sind noch einmal zusammenfassend die hypothetischen Stoffwechselprodukte bei einer CLA-Gabe an verschiedene Tiere aufgezeichnet. Metaboliten der einzelnen Teilschritte wurden bereits mehrfach nachgewiesen.



Abb. 1.7: Hypothetischer Stoffwechselweg der CLA und Beeinflussung der Eicosanoidbiosynthese

1.5 Problemstellung

Die bisherigen Untersuchungen bezüglich der qualitativen und quantitativen Bestimmung von CLA-Metaboliten beschränkten sich weitgehend auf Gewebe- oder Serumproben. Lediglich BANNI et al. (1996) berichteten von CLnA in Milch und Milchprodukten. Allerdings gelang es ihnen nicht, die Position der Doppelbindungen und ihre geometrische Anordnung zu charakterisieren. Eine in Bezug auf Zeit und Aufwand ausgewogene Analytik der nur in Spuren auftretenden CLnA, CAA sowie der konjugierten Eicosatriensäuren ist daher erstrebenswert. Sie sollte es ermöglichen, sowohl die Doppelbindungsposition als auch die Geometrie zu identifizieren. Die mögliche Methode, die Konfiguration von Doppelbindungen mittels Gaschromatographie mit gekoppelter Fourier-Transform-Infrarot-spektroskopie (GC-FTIR) zu bestimmen, erweist sich bei mehr als zwei Doppelbindungen als schwierig bzw. zu ungenau, da keine Aussage getroffen werden kann, an welcher Doppelbindung welche Konfiguration vorliegt. Die zweite Methode zur Bestimmung der Geometrie der Doppelbindungen über die partielle Hydrazinreduktion, erweist sich insofern als kompliziert, als die Identifizierung der entstehenden Monoene bisher nur mit Hilfe der sehr aufwendigen Silberionen-Dünnschichtchromatographie beschrieben wird (BERDEAUX et al., 1998).

Ein Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Analytik der konjugierten Fettsäuren, insbesondere der Minorfettsäuren CLnA und CAA, so zu optimieren, dass ihr Nachweis in CLA-reichen Lebensmitteln und ihre Identifizierung, auch im Hinblick auf die Konfiguration der Doppelbindungen, möglich ist. Deshalb sollte dieses anhand von Käsefett, auch unter Berücksichtigung verschiedener Käsegruppen, erfolgen.

Bei Fütterungsversuchen mit CLA wurde in den meisten Publikationen der Metabolismus der CLA verfolgt. Unterschiedliche Gewebe sowie Seren der Tiere wurden auf CLnA- und CAA-Gehalte untersucht. Eine Beurteilung der Gehalte dieser CLA-Metaboliten im Hinblick auf die Ernährung des Menschen unterblieb bisher, obgleich auch diese, wie in den Kapiteln vorher geschildert, vermutlich Auswirkungen auf den Fettsäurestoffwechsel und die Eicosanoidbiosynthese haben.

In der vorliegenden Arbeit standen Karpfen, die nur sehr wenig CLA in der Fettmatrix enthalten (siehe 1.2), aus einem Fütterungsversuch zur Verfügung, die 0 %, 3 %

oder 9 % CLA-Zulagenöl (62,7 % CLA als freie Fettsäuren) über ihr Futter verabreicht bekamen. Es sollte zum einen untersucht werden, inwieweit CLA in den Karpfen verstoffwechselt wird und seine Metaboliten in den Filets nachweisbar sind, und zum anderen galt es, Unterschiede der Gehalte an CLnA und CAA in den Fütterungsgruppen zu bestimmen. Im Vergleich zum Futter für landwirtschaftliche Nutztiere enthält Fischfutter deutlich höhere Fettgehalte von bis zu 40 %. Man könnte vermuten, dass damit auch mehr CLA in den Fischrationen enthalten ist. Es existieren bisher nur wenig Fütterungsversuche mit Fischen hinsichtlich gesundheitsfördernder Eigenschaften oder verbesserter Sensorik durch CLA. Insbesondere sind Untersuchungen über das Vorkommen anderer konjugierter Fettsäuren als CLA nicht bekannt.

Eine überwiegend beschriebene Wirkung der CLA ist die Anticancerogenität. Bei den beschriebenen Tierstudien (siehe 1.3) wurden meist die verschiedenen Gewebe unterschiedlicher Fütterungsgruppen mit denen einer Kontrollgruppe verglichen. Nicht bekannt ist jedoch bisher, wie sich die Fettsäurezusammensetzung von erkranktem Tumorgewebe grundsätzlich von gesundem Gewebe beim Menschen unterscheidet. Zu differenzieren sind dabei noch die Krebsarten, deren Entstehung durch die Ernährung beeinflusst werden kann, von den ernährungsunabhängigen Tumorerkrankungen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher auch, die Verteilung und die Gehalte an CLA-Metaboliten in unterschiedlichen menschlichen Geweben zu ermitteln. Es standen dafür zum einen die ernährungsabhängigen Brustkrebstumore und zum anderen die vermutlich von der Ernährung unabhängigen Prostatakrebsgewebe zur Verfügung. Zu den letzteren Tumoren lagen zusätzlich Proben vom Fettgewebe sowie vom Gewebe nahe des Tumors jeweils desselben Patienten vor.

2 Referenzsubstanzen und Untersuchungsmaterial

2.1 Referenzsubstanzen

Zur Identifizierung der CLnA und CAA sowie zur Bestimmung ihrer Gehalte im Gesamtfettsäuremuster des Untersuchungsmaterials wurden sowohl einzelne Fettsäuremethylester als auch deren Gemische verwendet (s. 6.1).

Da bisher im Gegensatz zur Linolsäure von der Linolensäure und der Arachidonsäure keine konjugierten Isomere kommerziell erhältlich sind, wurden zur Einstufung der chromatographischen Eigenschaften der CLnA und der CAA γ -Linolensäure und Arachidonsäure alkalisch isomerisiert (s. 6.3.1). Die so erhaltenen sehr komplexen Gemische unterschiedlicher Isomere der Fettsäuren wurden ohne weitere Fraktionierung oder Aufreinigung zur Identifizierung herangezogen.

Bei der alkalischen Isomerisierung von Fettsäuren entstehen neben anderen Isomerisierungsprodukten auch konjugierte Fettsäure-Isomere (SPITZER et al., 1994). Die Durchführung der Isomerisierung erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach einer Methode von CHIPAULT und HAWKINS (1959) (Anhang 6.3.1). Dabei können sowohl die freien Fettsäuren als auch die Methylester der Fettsäuren eingesetzt werden. In einem Dreihalskolben wurde ein Gemisch aus Ethylenglykol und Natriumhydroxid erhitzt, die entsprechende Fettsäure bzw. deren Methylester gelöst in Ethylenglykol hinzugegeben und weitere 30 Minuten erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit Schwefelsäure angesäuert und die entstehenden Fettsäure-Isomere dreimal mit n-Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte konnten nach dem Einengen zu weiteren Untersuchungen eingesetzt werden. Im Laufe des Untersuchungszeitraums wurden γ -Linolensäure, n6-Eicosadiensäure, n6-Eicosatriensäure und Arachidonsäure alkalisch isomerisiert.

2.2 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten tierische Lebensmittel und menschliche Geweberoben. Menschliches Gewebe wurde im Hinblick auf den diskutierten anticarcinogenen Wirkungsmechanismus der CLA (siehe 1.3) auf CLnA und CAA untersucht.

2.2.1 LEBENSMITTELPROBEN

Die Auswahl der Lebensmittel für die Identifizierung von CLnA und CAA erfolgte im Hinblick auf die in der Literatur (FRITSCHE und STEINHART, 1998) beschriebenen Gehalte an CLA; bei höheren Gehalten an CLA wird aufgrund des vorausgegangenen Stoffwechsels das Vorhandensein konjugierter Metaboliten dieser oder ähnlicher konjugierter Fettsäuren wie CLnA und CAA vermutet.

2.2.1.1 Käse

Fleisch und Fleischerzeugnisse von Wiederkäuern sowie Milch und Milcherzeugnisse sind nach FRITSCHE und STEINHART (1998) aufgrund der Bildung durch das Pansenbakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* und den Carry-over-Effekt die Hauptquelle von CLA (siehe 1.2). Sie bestimmten in Milch, Käse, Butter oder Joghurt mittlere Gehalte des CLA-Hauptisomers C18:2 c9t11 von 0,40 bis 1,70 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren. CHIN et al. (1992) hingegen erhielten bei ihren Untersuchungen verschiedener Milch und Milcherzeugnisse etwas geringere Gehalte von 0,36 bis 0,70 % bezogen auf den Fettgehalt, obwohl sie nicht nur das CLA-Hauptisomer sondern auch weitere Isomere zur Quantifizierung hinzuzogen. Der CLA-Gehalt in Lebensmitteln tierischer Herkunft, insbesondere derjenige in Wiederkäuerprodukten, ist jedoch auch in ihren Untersuchungen generell sehr hoch. Nach § 6 Käseverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986 zuletzt geändert am 14.10.1999 wird Käse nach dem Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse in folgende Gruppen eingeteilt (Tabelle 2.1):

Käsegruppe	Wassergehalt in der fettfreien Käsemasse
Hartkäse	56 % oder weniger
Schnittkäse	mehr als 54 % bis 63 %
Halbfester Schnittkäse	mehr als 61 % bis 69 %
Sauermilchkäse	mehr als 60 % bis 73 %
Weichkäse	mehr als 67 %
Frischkäse	mehr als 73 %

Tab. 2.1: Einteilung der Käsegruppen gemäß § 6 Käseverordnung

Da sich einzelne Käsesorten nicht nur in ihrem Fettgehalt sondern auch in ihrer Verarbeitung oder Lagerung unterscheiden, wurden aus den Käsegruppen Hartkäse, Schnittkäse, Weichkäse und Frischkäse jeweils zwei Käsesorten zur Untersuchung auf das Vorhandensein und die Verteilung von CLnA und CAA ausgewählt. Auf eine Käsesorte aus der Gruppe der halbfesten Schnittkäse wurde bei der Untersuchung verzichtet, da sich diese Gruppe lediglich in ihrem Wassergehalt und nicht in der Herstellung von der Gruppe der Schnittkäse unterscheidet. Ein Unterschied im Gehalt und auch in der Verteilung der CLnA und CAA war daher nicht zu erwarten. Ebenfalls nicht untersucht wurde die Gruppe der Sauermilchkäse. Zu dieser Gruppe zählen die Magerkäse mit Fettgehalten in der Trockenmasse von höchstens 10 %. Aufgrund des geringen Fettgehaltes wäre vermutlich der Nachweis und die Identifizierung der nur in geringen Mengen erwarteten CLnA und CAA nicht möglich gewesen.

Eine Aufstellung der untersuchten Käseproben befindet sich im Anhang unter 6.2.1.

2.2.1.2 Karpfen

Fische enthalten sowohl nach FRITSCHE und STEINHART (1998) als auch nach CHIN et al. (1992) sehr geringe Gehalte an CLA. Karpfen weisen dabei mit 0,09 % der Gesamtfettsäuren den höchsten Gehalt des CLA-Hauptisomers C18 c9t11 auf (FRITSCHE und STEINHART (1998). Allerdings enthält Fischfett einen hohen Anteil mehrfachungesättigter Fettsäuren, wie z.B. 5,5 % α -Linolensäure, 1,4-2,3 % Arachidonsäure und 1,5-3,8 % Docosahexaensäure (OBERLE et al., 1998).

Die zur Untersuchung herangezogenen Karpfen (Spiegelkarpfen, *Cyprinus carpio* L.) entstammen einer Studie "Zum Einfluss konjugierter Linolsäureisomere auf zootechnische Parameter und das Lebensmittel Fisch am Beispiel von Karpfen und Forellen" (MAAß, 2002). Die Karpfen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung möglicher Stoffwechselvorgänge bei Fütterung einer CLA-angereicherten Diät über einen längeren Zeitraum von vier Monaten herangezogen. Genaue Halterungsund Fütterungsbedingungen können der Arbeit von MAAß (2002) entnommen werden. Das Futter verschiedener Fütterungsgruppen unterschied sich in ihrem Fettgehalt (9 oder 18 %) und der CLA-Zulage (0 %, 1 % oder 3 %), wobei hier ein Isomerengemisch aus den vier Haupt-Isomeren C18:2 t8c10, c9t11, t10c12 und c11t13 verwendet wurde. Diese wurden durch alkalische Isomerisierung aus Sonnenblumenöl hergestellt und lagen als freie Fettsäuren vor. Die genaue Zusammensetzung der Futterration ist im Anhang unter 6.2.2 aufgeführt. Es wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nur Karpfen der Fettgehaltstufe I untersucht.

Zum Nachweis und zur Identifizierung von CLnA und CAA wurde jeweils das rechte Filet von vier Karpfen der Fütterungsgruppen mit 0 % und 3 % CLA-Zulage herangezogen. Die Abschätzung des Gehaltes an CLnA und CAA erfolgte anhand von zwölf Karpfenfilets aus unterschiedlichen Fütterungsgruppen. Bis zur Untersuchung wurden die Filets bei -80 °C gelagert.

2.2.2 GEWEBEPROBEN

Aufgrund der Vermutung, dass die anticarcinogene Wirkungsweise von CLA auf ein Eingreifen in den Eicosanoidstoffwechsel zurückzuführen ist, wurden in der vorliegenden Arbeit gesundes Fettgewebe, Mammakarzinomgewebe und Prostatakarzinomgewebe auf das Vorkommen von CLnA und CAA untersucht.

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen und bei Frauen über 60 Jahren auch die häufigste Todesursache. Während die Tendenz, an Brustkrebs zu erkranken, ernährungsbeeinflusst ist, ist die Entstehung von Prostatatumoren vermutlich nicht von der Ernährung abhängig. Alkohol, gesättigte Fettsäuren und Fleisch könnten die Entstehung von Brustkrebs steigernd beeinflussen. Ein gesteigertes Risiko ist bei hohem body mass index und bei hoher Gewichtszunahme im Erwachsenenalter festgestellt worden. Prostatakrebs zählt zu den vierthäufigsten Krebserkrankungen bei Männern. Unter den Todesfällen durch Krebs nimmt Prostatakrebs die siebente Stelle ein. Als mögliche negative Beeinflussung der Prostatakrebserkrankung wird derzeit der Verzehr von Fett, Fleisch und auch von Milch und Milcherzeugnissen diskutiert. Eine tatsächliche Auswirkung der Ernährung auf Prostatakrebs ist jedoch noch nicht erwiesen (World Cancer Research Fund, 1997).

Im Anhang unter 6.2.3 und 6.2.4 sind die Nummerierungen, die Massen sowie ergänzende Angaben der untersuchten Gewebe aufgeführt.

2.2.2.1 Brustgewebe

Die Ursachen, welche zu einer Umwandlung der Epithelzellen der Brustdrüse und somit zur Entstehung von duktalen Mammakarzinomen führen, sind bisher noch nicht bekannt. Lobuläre Mammakarzinome gehen aus dem Gewebe der Drüsenläppchen und der terminalen Gänge hervor.

Bei den hier zugrundeliegenden Mammakarzinomgeweben handelt es sich um intraoperativ gewonnene Biopsien von Patientinnen im Alter von 55 bis 80 Jahren. Von einer Patientin stand neben dem Karzinomgewebe gesundes Fettgewebe derselben Mamma zur Verfügung. Dieses wurde zum direkten Vergleich der Verteilung der CLnA und der CAA im Fettsäuremuster herangezogen. Zur Ermittlung der Gehalte an CLnA und CAA im Fett der Mammakarzinome lagen zwölf Proben vor.

2.2.2.2 Prostatagewebe

Ungefähr 70 % der polypenartigen Karzinome entstehen im Randgebiet, 25 % in der Übergangszone und die restlichen 5 % im Zentrum der Drüse. Prostatakrebs breitet sich durch direkte Invasion durch die Kapsel in die Samenbläschen und zum Grund der Blase bis hin zur Harnröhre aus.

Zur Bestimmung der CLnA und CAA aus dem Prostatagewebe standen jeweils drei verschiedene Gewebeproben von insgesamt 22 Patienten bereit: Karzinome aus der Prostata (TU), das tumorfreie aber nahe dem Tumor gelegene Drüsengewebe (TF) und zum Vergleich das Fettgewebe aus der Bauchdecke (FG).
3 Analysenmethoden

3.1 Analytik der Fettsäuren

Aufgrund der großen Vielfalt an möglichen Isomeren der Linolensäure und der Arachidonsäure ist bei der zuverlässigen Analytik dieser Fettsäuren die Kombination verschiedener Methoden notwendig. Erschwerend kommt hinzu, dass die untersuchten konjugierten Isomere in nur sehr geringen Mengen vorkommen; eine Überlagerung mit Majorfettsäuren beeinträchtigt so die eindeutige Identifizierung. In Abbildung 3.1 ist der Analysenweg zur Anreicherung, zur Isolierung und zur Identifizierung und Quantifizierung der CLnA und CAA aufgezeigt.



Abb. 3.1: Schema zur Analytik der CLnA und CAA

Zunächst wurde das Fett den unterschiedlichen biologischen aus Untersuchungsmaterialen, welche zum Teil aufgrund des hohen Wassergehaltes (Karpfenproben) vorher lyophilisiert wurden, mit geeigneten organischen Lösungsmitteln extrahiert. Es folgte eine schonende Umesterung mit Kaliummethylat zu Fettsäuremethylestern (FSME), an welche sich die Quantifizierung bzw. die Abschätzung der Gehalte der CLnA und CAA mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID) anschloss. Zur Anreicherung und ersten Abtrennung dieser CFA von anderen in höherer Konzentration enthaltenen Fettsäuren wurde eine Fraktionierung mit Hilfe der präparativen Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) durchgeführt. Die CLnA- und CAA-enthaltene Fraktion wurde mittels GC-FID und Silberionen-HPLC (Ag⁺-HPLC) auf das Vorhandensein dieser konjugierten Fettsäuren untersucht und schließlich an einer semipräparativen Ag⁺-HPLC nachfraktioniert. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die fraktionierten Methylester der CLnA bzw. CAA zu den entsprechenden 4,4-Dimethyloxazolin-Derivaten (DMOX) umgesetzt. Mit Hilfe der GC-Massenspektrometrie (MS) kann so die Position der Doppelbindungen der fraktionierten unbekannten CLnA bzw. CAA bestimmt werden. Von deutlich angereicherten und sehr reinen Fraktionen sollte die Konfiguration der Doppelbindungen durch Hydrazinreduktion mit anschließender partielle Identifizierung der entstehenden Monoene über RP-HPLC mit Diodenarraydetektion (DAD) ermittelt werden.

3.1.1 FETTEXTRAKTION

Neben den freien leicht extrahierbaren Fetten sollten mit der Fettextraktionsmethode auch die chemisch oder absorptiv an Proteine der Probenmatrix gebundenen Fette erfasset werden. Verbindungen mit einem konjugierten Doppelbindungssystem wie die hier untersuchten CLnA und CAA neigen bei Temperaturerhöhung zur Autoxidation (SHEPPARD und IVERSON, 1975, CHRISTIE, 1989), so dass eine schonende Extraktion möglichst bei Raumtemperatur erforderlich war.

3.1.1.1 Käseproben

Die tiefgekühlte Käseprobe wurde mit einem Messer fein zerkleinert, mit wasserfreiem Natriumsulfat versetzt und das Fett unter Eiskühlung dreimal mit n-Hexan im Ultra-Turrax extrahiert. Die vereinigten Lösungsmittelextrakte wurden filtriert und zur Trockene eingeengt. Das so erhaltene Fett wurde anschließend in definiertem Volumen n-Hexan aufgenommen. Genaue Arbeitsbedingungen werden im Anhang 6.3.2.1 beschrieben.

3.1.1.2 Karpfenproben

Die Fettextraktion aus den Filets erfolgte nach einer modifizierten Methode von PFALZGRAF (1995). Die tiefgekühlten Karpfenfilets wurden in kleine Stücke geteilt und mit Hilfe einer Moulinette[®] fein zerkleinert. Die so erhaltenen Proben wurden zur vollständigen Entfernung des Wassers und somit zur Vermeidung der Emulsionsbildung bei der weiteren Aufarbeitung lyophilisiert. Die Fettextraktion erfolgte unter Eiskühlung dreimal mit Dichlormethan/Methanol (2:1, v/v) und einmal mit n-Hexan im Ultra-Turrax. Die nach Zentrifugation vereinigten Lösungsmittelextrakte wurden zur Trockene eingeengt und das extrahierte Fett dann zur weiteren Analyse in einem definierten Volumen n-Hexan gelöst (siehe Anhang 6.3.2.2).

3.1.1.3 Gewebeproben

Sämtliche untersuchten menschlichen Gewebeproben wurden einer modifizierten Fettextraktion nach FOLCH et al. (1957) unterzogen. Dabei wurde das tiefgefrorene Gewebe mit einem Skalpell fein zerkleinert, zur Unterstützung der weiteren Zerkleinerung mit Seesand versetzt und das Fett zweimal mit Dichlormethan/Methanol (2:1, v/v) und einmal mit n-Hexan im Mörser extrahiert. Zur Entfernung des Wassers aus dem Gewebe wurden die vereinigten Lösungsmittelextrakte über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und diese anschließend zur Trockene eingeengt. Zur weiteren Analytik wurde das Fett in definiertem Volumen n-Hexan aufgenommen (Anhang 6.3.2.3).

3.1.2 DERIVATISIERUNG ZU FETTSÄUREMETHYLESTERN (FSME)

Zur Analyse der Fettsäuren mittels GC-FID oder HPLC-DAD ist es notwendig, die freien Fettsäuren zu verestern bzw. die Fettsäuren der Triacylglycerine umzuestern. Dabei war es wichtig, dass während dieser Reaktionen keine Isomerisierungen der zu untersuchenden Fettsäure-Isomere auftreten.

CHIN et al. (1992) diskutierten den Einfluss verschiedener Umesterungsmethoden auf das Isomerenverhältnis von CLA und stellten bei sauer katalysierten Methoden eine Konfigurationsänderung der konjugierten c/t-Isomere zu t,t-Isomeren fest. Nach KRAMER et al. (1997) und PARK et al. (2001) treten bei basisch katalysierter Umesterung keine Isomerisierungen der CLA-Isomere auf.

Die Veresterung freier Fettsäuren verläuft üblicherweise mit Diazomethan bzw. mit Diazomethan freisetzendem Trimethylsilyldiazomethan oder mit Bortrifluorid/Methanol, wobei KRAMER et al. (1997) mit Diazomethan hinsichtlich der Vermeidung von Isomerisierungen die besseren Ergebnisse erzielte.

3.1.2.1 Umesterung mit methanolischer Kaliummethylatlösung

Als Grundlage zur Umesterung der Fettsäuren der Triacylglycerine aus den Käseproben, den Karpfenproben und den menschlichen Gewebeproben diente eine schwach alkalische Methode von PFALZGRAF (1995) mit methanolischer Kaliummethylatlösung als Methylierungsreagenz. Nach Neutralisation mit Schwefelsäure wurden die FSME mit n-Hexan extrahiert und zur weiteren Untersuchung eingesetzt (genaue Bedingungen unter 6.3.3.1).

3.1.2.2 Veresterung mit Trimethylsilyldiazomethan

Bei der Veresterung mit Trimethylsilyldiazomethan ist durch die milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, annähernd neutrales Milieu) nicht mit Isomerisierungen zu rechnen (HASHIMOTO et al., 1981). Durch die Bildung des Diazomethans aus dem Trimethylsilyldiazomethan *in situ* wird weiterhin das Gefährdungspotential dieser Versterungsmethode im Vergleich zur direkten Reaktion mit Diazomethan deutlich gesenkt und die Durchführung somit erleichtert (CHRISTIE, 1989, KRAMER et al., 1997). Unter Rühren bei Raumtemperatur wurde ein Aliquot der Trimethylsilyldiazo-

3 Analysenmethoden

methanlösung zu der in n-Hexan/Methanol gelösten freien Fettsäure gegeben und 30 Minuten lang gerührt. Zur Entfernung des überschüssigen Trimethylsilyldiazomethans wurde mit Eisessig angesäuert, wobei unter Sprudeln Stickstoff entweicht. Nach Zugabe von n-Hexan und Wasser wurde zentrifugiert, das n-Hexan abgenommen und über wasserfreies Natriumsulfat filtriert und schließlich im Stickstoffstrom zur Trockene eingeengt. Die FSME wurden in einem definierten Volumen n-Hexan aufgenommen und zur Analytik eingesetzt. Die detaillierte Beschreibung des Verfahrens befindet sich im Anhang unter 6.3.3.2.

3.1.3 DERIVATISIERUNG ZU 4,4-DIMETHYLOXAZOLINEN (DMOX)

Aufgrund der Wanderung der Doppelbindungen ungesättigter FSME während der Fragmentierung bei der Strukturanalyse mittels GC-MS ist keine Aussage über die genaue Lage der Doppelbindungen möglich (MARX und CLASSEN, 1994). Nach SPITZER (1997) gibt es zwei analytische Vorgehensweisen, diese Wanderung der Doppelbindungen zu unterbinden. Zum einen lassen sich an den Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren spezifische Additionen durchführen, wobei die Analyse der entstehenden Derivate Aufschluss über die genaue Position der Doppelbindungen gibt. Hier eignen sich die Methyltriazolindion-Addukte (DOBSON, 1998). Allerdings entstehen so im Vergleich zu den FSME polarere und schwerere Derivate, so dass sich ihre chromatographischen Eigenschaften ändern. Dieses wiederum erschwert einen Vergleich der derivatisierten Fettsäuren mit den FSME hinsichtlich der Elutionsreihenfolge. Eine zweite Möglichkeit, die Wanderung der Doppelbindungen zu unterbinden, ist die Derivatisierung der Carboxylgruppe der Fettsäuren. Pyrrolidinderivate (ANDERSON und HOLMANN, 1974), Picolinylderivate und 4,4-Dimethyloxazoline (ZHANG et al., 1988, YU et al., 1989) stellen adäquate Derivate für die GC-MS-Analyse dar. Die bevorzugte Ionisation des Stickstoffs bewirkt eine Unterdrückung der Ionisation des ungesättigten Systems der Fettsäuren, was eine reduzierte Wanderungstendenz der Doppelbindungen innerhalb der Kohlenwasserstoffkette zur Folge hat (SPITZER, 1997). Die DMOX-Derivate bieten darüber hinaus den Vorteil, dass ihr chromatographisches Verhalten dem der FSME sehr ähnlich ist, so dass wiederum die Trennqualität und die Elutionsreihenfolge weitgehend direkt übertragbar ist (ZHANG et al., 1988).

Die Derivatisierung der FSME zu den DMOX erfolgte nach einer modifizierten Methode von FAY und RICHLI (1991). Dabei wurden die FSME mit 2-Amino-2methylpropanol (AMP) bei 180 °C in 18 Stunden derivatisiert (siehe Abb. 3.2). Die genaue Durchführung wird unter Anhang 6.3.3.3 beschrieben.



Abb. 3.2: Kondensation von FSME und AMP zu DMOX-Derivaten

3.1.4 PARTIELLE HYDRAZINREDUKTION

Die geometrische Anordnung der Doppelbindungen mehrfach ungesättigter Fettsäuren kann durch die Identifizierung der Produkte einer partiellen Reduktion mittels Hydrazin bestimmt werden (PARODI, 1977). Nach HÜNIG et al. (1965) tritt dabei weder eine Isomerisierung noch eine Wanderung der Doppelbindungen auf. Man erhält so die entsprechenden einfach ungesättigten Fettsäuren (Monoene), welche sich mittels GC-FID oder RP-HPLC hinsichtlich ihrer cis/trans-Konfiguration bestimmen lassen. Diese Methode wurde bereits von einigen Autoren zur Strukturaufklärung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren eingesetzt (BERDEAUX et al., 1998, LAVILLONNIÈRE et al., 1998a). Allerdings wird hier die partielle Reduktion der freien Fettsäuren oder deren Methylester beschrieben. Nach HÜNIG et al. (1965) weist die Reduktion mit Hydrazin eine hohe Substratspezifität auf. Unsymmetrische Mehrfachbindungen, wie z.B. die im DMOX-Derivat enthaltene -N=C< - Bindung, werden nicht angegriffen. Die Wasserstoffübertragung erfolgt allgemein auf symmetrische Mehrfachbindungen vom Typ -C=C-, >C=C<, -N=N- oder -O=O-. Ausgehend von dieser Eigenschaft des Hydrazins wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, die bereits mittels GC-MS analysierten DMOX-Derivate der zu untersuchenden CLnA und CAA direkt zur

Reduktion und somit zur Bestimmung der geometrischen Anordnung der Doppelbindungen einzusetzen. Grundlage war die von BERDEAUX et al. (1998) beschriebene Methode, bei der die Fettsäuren in einer Mischung aus Ethanol und Hydrazin bei 40 °C unter leichter Sauerstoffzufuhr reduziert werden. Nach Unterbrechen der Reaktion durch Zugabe von Wasser werden die entstehenden Monoene mit n-Hexan extrahiert und direkt mittels GC-MS oder RP-HPLC analysiert. Entscheidende Reaktionsparameter sind hierbei die Reaktionstemperatur, die Reaktionszeit und die eingesetzte Menge an Hydrazin, welche zur Bestimmung der optimalen Bedingungen nacheinander variiert wurden.

Die Methode wurde anhand des DMOX-Derivates der Arachidonsäure optimiert und sowohl für die Derivate der n6-Eicosadiensäure, die n6-Eicosatriensäure als auch für die fraktionierten Isomere der CLnA und CAA angewandt (genaue Durchführung siehe Anhang 6.3.4).

3.1.5 CHROMATOGRAPHISCHE ANALYSENMETHODEN

Sowohl die Isolierung und Anreicherung als auch die Identifizierung der CLnA und CAA erfolgte ausschließlich über chromatographische Analysenmethoden.

3.1.5.1 Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

In der Fettanalytik hat sich die Gaschromatographie seit langem bewährt. Auf hochpolaren, mit einem 100 %igen Cyanopropylsiloxan-Trägerfilm belegten Kapillarsäulen, das sind z.B. SP-2560- oder CP-Sil88-Säulen, können FSME nach ihrer Kettenlänge und nach Anzahl ihrer Doppelbindungen voneinander getrennt werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analytik an einer 100 m CP-Sil88-Säule. Zur Detektion der FSME wurde ein Flammenionisationsdetektor eingesetzt, welcher sich in der Fettanalytik sowohl zur qualitativen Untersuchung als auch zur Quantifizierung bewährt hat (FIRESTONE und MOSSOBA, 1997).

Mittels GC-FID erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Abschätzung des Gehaltes an CLnA und CAA in den Käseproben, in den Karpfenproben sowie in den Brust- und Prostatageweben als prozentualer Anteil am Gesamt-FSME-Muster. Weiterhin wurden sowohl die Vorfraktionen der präparativen RP-HPLC auf das Vorhandensein der

CLnA und CAA untersucht, als auch die nachfolgenden Fraktionen der semipräparativen Ag⁺-HPLC zur Identifizierung der CLnA und CAA gaschromatographisch analysiert (siehe Analysenschema in Abb. 3.1). Dazu wurden zum einen kommerzielle Referenzsubstanzen und zum anderen die Fettsäure-Isomere der alkalischen Isomerisierung (s. 3.1.1) zugrunde gelegt.

Die genauen GC-FID-Parameter sind im Anhang unter 6.4.1 aufgeführt.

3.1.5.2 Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)

Seit ihrer Einführung in die Fettanalytik durch RYHAGE und STENHAGEN (1960) dient die GC-MS zur Strukturaufklärung von Lipiden. Durch Elektronenstoßionisaton entstehen im Massenspektrometer charakteristische Fragmente, welche durch das detektierte Masse/Ladungsverhältnis (m/z) hochspezifisch sind (CHRISTIE, 1998). Es kann so die Position der Doppelbindungen in einer Fettsäure bestimmt werden. Wie bereits beschrieben (3.2.3) eignen sich dazu nicht die FSME sondern spezielle Derivate wie z.B. die DMOX-, Pyrrolidin-, Picolinylderivate oder die Methyltriazolindion-Addukte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die DMOX-Derivate der fraktionierten CLnA und CAA sowie die reduzierten DMOX-Derivate zur gaschromatographischen Analyse eingesetzt. Nach SPITZER (1997) unterscheiden sich die chromatographischen Eigenschaften der DMOX von den FSME unwesentlich, was die Identifizierung der CLnA und CAA vereinfachte.

Im Anhang unter 6.4.2 befinden sich die GC-MS-Bedingungen.

3.1.5.3 Präparative Reversed-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-UV-Detektion (RP-HPLC-UV)

Mit Hilfe der RP-HPLC-UV gelangen bereits JUANÉDA und SÉBÉDIO (1999) eine Separierung der nur in geringen Mengen vorkommenden CLA-Metaboliten der Kettenlänge C20 aus dem Fett von Rattenlebern. Konjugierte Diene besitzen eine maximale UV-Absorption bei Wellenlängen von 230-235 nm, während isolierte Doppelbindungen bei Wellenlängen von 206-210 nm absorbieren (CHRISTIE et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnten an einer LiChrospher C₁₈-Säule und UV-Detektion bei 208 nm die FSME aus den Käseproben, den Karpfenproben und den Brust- und

Prostatageweben in fünf bzw. sechs Fraktionen aufgetrennt werden, welche dann hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, insbesondere auf das Vorhandensein der CLnA und CAA, mittels GC-FID untersucht wurden. Die Fraktionierung wurde mehrfach durchgeführt, so dass die CLnA- und CAA-enthaltene Fraktion angereichert werden konnte.

Die genauen RP-HPLC-Parameter können dem Anhang 6.4.3 entnommen werden.

3.1.5.4 Silberionen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Dioden-Array-Detektion (Ag⁺-HPLC-DAD)

Die Silberionen-Chromatographie zählt zu den Standardmethoden der Fettanalytik. Sie basiert auf der reversiblen Reaktion ungesättigter organischer Moleküle mit Übergangsmetallen wie Silber zu einem polaren charge-transfer-Komplex (DOBSON et al., 1995). CHRISTIE beschreibt erstmals 1987 eine Silberionen-beladene HPLC-Säule zur Analytik mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Die Silberionen sind über Ionenbindungen mit den an die Kieselgelmatrix gebundenen Phenylsulfonsäuregruppen verbunden. Es war so eine sehr gute und reproduzierbare Trennung von geometrischen und positionellen Isomeren ungesättigter Fettsäuren möglich (CHRISTIE und BRECKENBRIDGE, 1989). Verschiedene Autoren beschreiben sehr unterschiedliche Untersuchungsparameter; so variieren z.B. die Elutionsmittel, die Anzahl der Säulen oder die Wahl der Detektoren (NIKOLOVA-DAMYANOVA et al., 1995, SEHAT et al., 1998a). Die Verwendung eines UV-Detektors ermöglicht die empfindliche Detektion konjugierter Diene bei einer Wellenlänge von 234 nm, während konjugierte Triene bei 268 nm und Fettsäuren mit isolierten Doppelbindungen bei 208 nm ihr Absorptionsmaximum haben (YURAWECZ et al., 1993, BANNI et al., 1995). Durch die Aufnahme des gesamten Spektrums von 200-400 nm mittels DAD können die charakteristischen Spektren von konjugierten Dienen und Trienen sowie Überlagerungen mit anderen Fettsäuren aufgezeigt werden.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Applikation der Methode von SEHAT et al. (1998a) auf die Analytik der CLnA und CAA anhand der alkalisch isomerisierten Fettsäuren γ -Linolensäure und Arachidonsäure überprüft. Dabei wurde die Trennung der CLnA und CAA sowohl untereinander als auch voneinander optimiert sowie die

Übertragbarkeit der Gesetzmäßigkeiten, welche bei der Elution der CLA-Isomere festgestellt wurden, auf die Elution der CLnA und CAA untersucht.

Schließlich wurden die Vorfraktionen von der präparativen RP-HPLC der Käse-, Karpfen- und Gewebeproben an einer semipräparativen Ag⁺-HPLC-Säule nachfraktioniert und daraufhin zur Identifizierung eingesetzt.

Sämtliche Ag⁺-HPLC-Parameter finden sich im Anhang unter 6.4.4.

3.1.5.5 Reversed-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Dioden-Array-Detektion (RP-HPLC-DAD)

Die geometrische Anordnung konjugierter Doppelbindungen kann nach partieller Hydrazinreduktion (s. 3.2.4) anhand der entstehenden Monoene bestimmt werden (PARODI, 1977). Bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen dabei je nach Anzahl der Doppelbindungen z.B. bis zu sechs (bei Docosahexaensäure) einfach ungesättigte Fettsäuren, welche dann wiederum nach der Position ihrer Doppelbindung und deren geometrischen Anordnung differenziert werden müssen. Liegen die reduzierten Fettsäuren als FSME vor, so ist die Trennung in cis- und trans-Monoene mittels Silberionen-Dünnschichtchromatographie eine gängige Methode (BERDEAUX et al., 1998).

Es wurde jedoch eine Methode entwickelt, in der nach der Identifizierung der Doppelbindungsposition mittels GC-MS direkt die Hydrazin-reduzierten DMOX-Derivate zur Bestimmung der Geometrie der Doppelbindungen eingesetzt wurden. GOISSET (1999) erreichte bereits bei DMOX-Derivaten der CLA-Isomeren eine Trennung an der RP-HPLC in die drei Gruppen der geometrischen Isomere cis/trans, cis,cis und trans,trans.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion mittels DAD bei einer Wellenlänge der maximalen Absorption von Monoenen entsprechend von 206 nm. Die anhand der reduzierten DMOX-Derivate der γ -Linolensäure und der Arachidonsäure optimierten Parameter sind im Anhang unter 6.4.5 aufgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der chromatographischen Eigenschaften der CLnA und CAA

4.1.1 ALKALISCHE ISOMERISIERUNG

Zur Untersuchung der chromatographischen Eigenschaften der CLnA und der CAA mussten diese zunächst synthetisiert werden, da bisher keine konjugierten Isomere dieser Fettsäuren kommerziell erhältlichen sind. Es folgte eine alkalische Isomerisierung der γ-Linolensäure und der Arachidonsäure nach der Methode in Anhang 6.3.1. Nach SPITZER et al. (1994) enthalten die entstehenden Isomeren-Gemische auch konjugierte Isomere der entsprechenden Fettsäure. Um in den unterschiedlichen chromatographischen Trennsystemen (GC und HPLC) die Differenzierung von CLnA und CAA auch von weiteren eventuell auftretenden Fettsäure-Isomeren zu berücksichtigen, wurden zusätzlich all-cis-11,14-Eicosadiensäure und all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure alkalisch isomerisiert. Es können dazu sowohl die freien Fettsäuren als auch ihre Methylester eingesetzt werden. Die entstehenden Isomere wurden anschließend mit Trimethylsilyldiazomethan verestert (Anhang 6.3.3.2). Mehrmalige Isomerisierungen der genannten Fettsäuren zeigten nach GC-FID-Analyse (siehe 4.1.2) immer das annähernd identische Isomerenmuster.

Wie aus der Literatur bekannt ist (JACKSON et al., 1952, SPITZER et al., 1994), entstehen bei der alkalischen Isomerisierung von Linolsäure die beiden Isomere C18:2 c9t11 und t10c12 neben weiteren Minor-Isomeren zu annähernd gleichen Anteilen. Die Isomere unterscheiden sich nicht nur in der Position der Doppelbindung sondern auch in deren geometrischen Anordnung. Es entstehen drei Gruppen von geometrischen Isomeren, in denen die Doppelbindungen die Konfigurationen cis,cis, cis/trans oder trans,trans besitzen. Eine vergleichbare Verteilung der Isomere wird nach der alkalischen Behandlung der γ -Linolensäure und der Arachidonsäure erwartet, wobei die Anzahl der möglichen Isomere hier sehr viel größer ist. Neben konjugierten Dienen können dabei außerdem konjugierte Triene entstehen (SPITZER et al., 1994). GRANDGIRARD et al. (1984) identifizierten aus Rapsöl und Sojaöl nach einer Hitzebe-

handlung geometrische Isomere der α -Linolensäure. Drei Jahre später stellten GRANDGIRARD et al. (1987) dieselben geometrischen C18:3 n3 Isomere auf zwei unterschiedlichen Wegen her. Zum einen isomerisierten sie aus Leinöl isolierte α -Linolensäure unter Hitzeeinfluss mit Salpetersäure und zum anderen erhitzten sie Leinöl und isolierten daraus die entstehenden Isomere der C18:3 n3. Sie identifizierten vier geometrische Isomere, in denen die Doppelbindungen jedoch immer an den Positionen 9, 12 und 15 lagen. Von konjugierten Isomeren der C18:3 berichteten sie nach keiner der beschriebenen Methoden. SPITZER et al. (1994) identifizierten jedoch nach alkalischer Isomerisierung der α -Linolensäure die zwei konjugierten Triene C18:3 Δ 9,11,13 und Δ 10,12,14, wobei letzteres Isomer eines der Hauptprodukte ist.

4.1.2 GC-FID-UNTERSUCHUNGEN

Zur Charakterisierung der bei der alkalischen Isomerisierung entstandenen Fettsäure-Isomere wurden die entsprechenden FSME gaschromatographisch mit Flammenionisationsdetektion untersucht (siehe Anhang 6.4.1). Diese Analyse lieferte zunächst einen Überblick über die ungefähre Anzahl der entstandenen Verbindungen. Während das Chromatogramm der isomerisierten all-cis-11,14-Eicosadiensäure dem des CLA-Standards (Zusammensetzung siehe Anhang 6.1.2) und das Chromatogramm der isomerisierten γ-Linolensäure dem der isomerisierten all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure gleicht, so ist im GC-FID-Chromatogramm der isomerisierten Arachidonsäure deutlich zu erkennen, dass hier im Vergleich dazu weitaus mehr Verbindungen entstanden sind (siehe Abb. 4.1-4.5). Bei den Dienen (CLA und C20:2) entstanden neben Minor-Isomeren zwei bzw. drei Hauptisomere zu annähernd gleichen Anteilen. Die Isomerisierung der Triene lieferte im Gegensatz dazu nur ein Hauptisomer mit weiteren Isomeren zu geringeren Anteilen, welche in zwei Gruppen eluieren. Die entstandenen Isomere der Arachidonsäure eluieren über einen weiten Zeitraum, wobei auch hier die Auftrennung in drei Gruppen zu erkennen ist. Ein deutliches Hauptisomer ist nicht entstanden.



Abb. 4.1: GC-FID-Chromatogramm des CLA-Standards (Ausschnitt)



Abb. 4.2: GC-FID-Chromatogramm der alkalisch isomerisierten all-cis-11,14-Eicosadiensäure (Ausschnitt)



Abb. 4.3: GC-FID-Chromatogramm der alkalisch isomerisierten γ-Linolensäure (Ausschnitt)



Abb. 4.4: GC-FID-Chromatogramm der alkalisch isomerisierten all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure (Ausschnitt)



Abb. 4.5: GC-FID-Chromatogramm der alkalisch isomerisierten Arachidonsäure (Ausschnitt)

Ersichtlich aus den Chromatogrammen ist weiterhin die um etwa zehn Minuten spätere Elution der Isomere der C20-FSME gegenüber denen der C18-FSME. Dieses ist sowohl bei den Dienen als auch bei den Trienen der Fall.

Anhand der alkalisch isomerisierten γ-Linolensäure und der Arachidonsäure wurde schließlich auch deren gaschromatographische Trennung von anderen natürlich vorkommenden nichtkonjugierten FSME untersucht. In Abbildung 4.6 ist die Überlagerung eines GC-FID-Chromatogramms des FSME-Standards (Zusammensetzung siehe Anhang 6.1.1) mit dem Chromatogramm der alkalisch isomerisierten Arachidonsäure dargestellt. Die Hauptgruppe der entstandenen Isomere eluiert in einem Zeitraum von fünf Minuten zwischen der cis-15-Tetracosaensäure und der all-cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure. Lediglich bei der ersten Elutionsgruppe der Arachidonsäure-Isomere findet eine Koelution mit Tricosansäure statt. Arachidonsäure wurde bei der alkalischen Behandlung vollständig verbraucht bzw. isomerisiert.



Abb. 4.6: Überlagerung eines GC-FID-Chromatogramms des FSME-Standards mit dem der alkalisch isomerisierten Arachidonsäure

Die Trennung der FSME an hochpolaren Cyanopropylsiloxan-Kapillarsäulen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, erfolgt grundsätzlich nach ihrer Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen (WOLFF und BAYARD, 1995). Die zur alkalischen Isomerisierung eingesetzten FSME eluieren demnach in der Reihenfolge Linolsäure, Linolensäure, Eicosadiensäure, Eicosatriensäure und Arachidonsäure. Auch die entstandenen Hauptisomere der Isomerisierung eluieren in dieser Reihenfolge. Durch die große Anzahl der Minorisomere kommt es hier jedoch zu Koelutionen der FSME unterschiedlicher Kettenlänge oder unterschiedlicher Anzahl an Doppelbindungen. Die gaschromatographische Untersuchung von CLA-Isomeren ist bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben worden (FRITSCHE et al., 1997, SEHAT et al., 1998b). Die Elutionsfolge der CLA-Isomere bei einer 100-m-Kapillarsäule beginnt mit den cis/trans-Isomeren, gefolgt von den cis,cis-Isomeren und endet mit den trans, trans-Isomeren (SEHAT et al., 1998b). Allerdings treten auch hier Koelutionen zwischen diesen Gruppen auf, so wird z.B. das C18:2 t11c13-Isomer von dem C18:2 c9c11-Isomer überlagert. Innerhalb der cis/trans-Gruppe eluiert das Isomer später, in dem die cis-Konfiguraton am höheren C-Atom lokalisiert ist. Während auch bei den cis, cis-Isomeren die Isomere mit den Doppelbindungen an höheren C-Atomen später eluieren, sinkt im Gegensatz dazu bei den trans, trans-Isomeren die Elutionszeit mit steigender Doppelbindungsposition (KRAMER et al., 2001). Eine vergleichbare Gruppierung bei den alkalisch isomerisierten Fettsäuren C18:3 n6, C20:2 n6, C20:3 n6 und C20:4 n3 ist zwar erkennbar, aufgrund der hohen Anzahl entstandener Isomere jedoch nicht eindeutig zuzuordnen, insbesondere unter Berücksichtigung der weiteren Kombinationen bei Trienen und Tetraenen. Während es sich in dem Chromatogramm des kommerziell erworbenen CLA-Standards tatsächlich nur um konjugierte Isomere handelt, werden in den übrigen Chromatogrammen sämtliche entstandenen FSME mittels FID erfasst. Es handelt sich hierbei sowohl um konjugierte als auch um isolierte Isomere. Eine Unterscheidung zwischen Dienen und Trienen kann hier ebenfalls nicht erfolgen. Nach KRAMER et al. (2001) ist es bisher nicht gelungen, CLA-Metaboliten mittels GC-FID zu bestimmen. Sie liegen entweder in zu geringer Konzentration vor oder koeluieren mit anderen natürlich vorkommenden FSME. Zur Charakterisierung der chromatographischen Eigenschaften und auch zur Abschätzung des Gehaltes der beschriebenen isomerisierten Fettsäuren, insbesondere der CLnA und CAA, lässt sich jedoch die GC-FID-Analyse heranziehen.

4.1.3 AG⁺-HPLC-DAD-UNTERSUCHUNGEN

Im Gegensatz zur GC-FID-Analyse besteht bei der HPLC mit Diodenarraydetektion die Möglichkeit, konjugierte Dien-Systeme von den isolierten Doppelbindungssystemen sowie von den konjugierten Trienen anhand ihrer unterschiedlichen UV-Spektren zu unterscheiden. Im folgenden wird nur auf die bei der alkalischen Isomerisierung entstandenen Verbindungen mit einem konjugierten System eingegangen (CLnA und CAA). Zur HPLC-Analyse wurden wie bei der GC die FSME eingesetzt. Ausgehend von der Methode nach SEHAT et al. (1998a) wurde zunächst die Trennung der bei der Isomerisierung entstandenen CAA bei der Ag⁺-HPLC optimiert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 234 nm, welche ein typisches Absorptionsmaximum konjugierter Diene darstellt. Es wurden die unterschiedlichsten Parameter wie Zusammensetzung des Eluenten, insbesondere des Acetonitrilanteils, Fließgeschwindigkeit sowie die Temperatur verändert, wobei lediglich eine Verlängerung der Trennstrecke einen deutlich positiven Einfluss auf die Trennung der CAA ausübte (siehe Abb. 4.7).



Abb. 4.7: Chromatogramm der bei der Isomerisierung entstandenen CAA mit einer Ag⁺-HPLC-Säule (A) und mit Tandem-Ag⁺-HPLC-Säulen (B); 0,1 % Acetonitril in n-Hexan, Flow 1,0 ml/min, Raumtemperatur, λ = 234 nm

Zur Identifizierung einzelner entstandener CAA-Isomere wurden die detektierten Verbindungen fraktioniert. In Anhang 6.7 Abb. 6.1 ist ein Chromatogramm der Fraktionierung dargestellt. Es wurden so nach mehrmaligem Injizieren der CAA 14 Einzel-Fraktionen aufgefangen, welche im weiteren Verlauf der Analyse mittels GC-FID auf ihre Reinheit überprüft wurden und mittels GC-MS und nach partieller Hydrazin-Reduktion hinsichtlich der Position und Geometrie der Doppelbindungen untersucht wurden.

Zur Überprüfung, ob die gewählten Parameter (Tandem-Ag⁺-HPLC-Säulen, 0,1 % Acetonitril in n-Hexan) auch zur Differenzierung der CLnA von den CAA geeignet sind und ob Koelutionen mit weiteren konjugierten Fettsäure-Isomere auftreten, wurden wie bei der GC-FID-Analyse auch hier die alkalisch isomerisierten all-cis-11,14-Eicosadiensäure und all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure injiziert und ausgewertet. In den Abbildungen 4.8 und 4.9 sind deutliche Parallelen zwischen dem Isomerenmuster der CLA und der konjugierten C20:2 sowie zwischen CLnA und der konjugierten C20:3 zu erkennen.



Abb. 4.8: Ag⁺-HPLC-Chromatogramm des CLA-Standards (A) und der alkalisch isomerisierten C20:2 n6 (B); 0,1 % Acetonitril in n-Hexan, Flow 1,0 ml/min, Raumtemperatur, λ = 234 nm



Abb. 4.9: Ag⁺-HPLC-Chromatogramm der CLnA (A) und der alkalisch isomerisierten C20:3 n6 (B) 0,1 % Acetonitril in n-Hexan, Flow 1,0 ml/min, Raumtemperatur, λ = 234 nm

Während die entstandenen konjugierten Isomeren-Gruppen der Eicosadiensäure etwas früher als die CLA eluierten, war bei den konjugierten Fettsäuren-Isomeren mit mehr als zwei Doppelbindungen kein Unterschied in der Elutionszeit festzustellen. Sowohl die konjugierten Eicosatriensäure-Isomere als auch die CLnA und CAA eluierten über einen großen Zeitraum von ca. 150 min, eine Unterscheidung war anhand dieser Trennmethode auch nach Reduzierung des Acetonitrilanteils nicht möglich.

Mit Hilfe des DAD wurden die Spektren einzelner entstandener Isomere betrachtet. Es gelang so im vorderen Elutionsbereich unter den CLnA der Nachweis von konjugierten Trienen, welche ein charakteristisches UV-Spektrum mit drei Maxima aufweisen, wobei das Hauptmaximum bei 268 nm liegt



Abb. 4.10: UV-Spektrum eines konjugierten Triens (A) und eines vermuteten konjugierten Tetraens (B)

(YURAWECZ et al., 1993). Bei den CAA wurden zusätzlich Verbindungen detektiert, welche ein Maximum mit drei fingerartig benachbarten kleineren Maxima besitzen. Vermutlich handelt es sich hierbei um konjugierte Tetraene. In Abbildung 4.10 sind diese Spektren dargestellt.

Bei der Ag⁺-Chromatographie reagieren ungesättigte organische Moleküle mit Übergangsmetallen wie Silber reversibel zu polaren charge-transfer-Komplexen. Die Stabilität dieser Komplexe ist entscheidend für die Trennleistung. Nach DOBSON et al. (1995) steigt die Stabilität mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen, bilden Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen stärkere Komplexe als mit isolierten Doppelbindungen und cis-konfigurierte Doppelbindungen ebenfalls stabilere Komplexe als trans-konfigurierte. Bei gleichbleibender Anzahl an Doppelbindungen sinkt die Stabilität der charge-transfer-Komplexe mit zunehmender Kettenlänge (SEHAT et al., 1999). Diese Gesetzmäßigkeiten lassen sich auf die hier untersuchten konjugierten Isomere weitgehend übertragen. So eluierten die konjugierten Isomere der C20:2 vor den CLA-Isomeren (C18:2). Konjugierte Triene eluierten vor den entsprechenden Isomeren mit einem konjugierten Diensystem und einer isolierten Doppelbindung. Die Trennung der CLA-Isomere wurde schon von vielen Autoren beschrieben (KRAMER et al., 1998, LAVILLONIÈRE et al., 1998a). SEHAT et al. (1998a) gelangen die Trennung von zwölf Positionsisomeren, welche in den drei Gruppen der trans, trans-. cis/trans- und cis,cis-Konfiguration eluierten. Eine ähnliche Verteilung ist bei den alkalisch isomerisierten Fettsäuren zu erkennen. Mit steigender Anzahl an Doppelbindungen und somit durch die zunehmende Anzahl möglicher Isomere scheinen die Lage und die Konfiguration der Doppelbindungen mehr Einfluss auf die Trennung auszuüben als die Anzahl der Doppelbindungen. ADLOF (1994) isomerisierte α -Linolensäure und Arachidonsäure mit p-Toluolsulfonsäure als Katalysator. Diese Isomerisierung führt zu weniger als 0,5 % zu Doppelbindungswanderung und somit zu nur wenigen Isomeren der eingesetzten Fettsäuren. Er trennte die entstandenen Isomere an einer Ag⁺-HPLC-Säule mit Acetonitril/n-Hexan als Eluenten. Durch Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm konnte er so acht Isomere der Linolensäure und 16 Arachidonsäure-Isomere voneinander trennen. Er erfasste durch diese Wellenlänge, welche charakteristisch für die isoliert vorliegenden Doppelbindungen ist (ADLOF et al., 1995), nicht die konjugierten Isomere. Die Isomere der Linolensäure

eluierten in vier Gruppen je nach Anzahl ihrer trans-Doppelbindungen (trans,trans,trans; trans/trans/cis; trans/cis/cis und cis,cis,cis). Auch bei der isomerisierten Arachidonsäure ergab sich ein in Gruppen unterteiltes Elutionsmuster. Eine Schwierigkeit bei der Ag⁺-HPLC-Analyse ist die Empfindlichkeit des Eluenten. YURAWECZ und MOREHOUSE (2001) berichten von einer Verschiebung der Retentionszeiten verbunden mit einer schlechteren Trennung der CLA-Isomere innerhalb eines Tages. Eine Routine-Analyse erfordert dadurch eine ständige Überprüfung der detektierten Verbindungen anhand ihrer UV-Spektren oder durch den Vergleich mit Einzelisomeren. Ohne reine Einzelisomere ist die Analytik der CLnA und CAA sehr erschwert.

4.1.4 HYDRAZIN-REDUKTION

Mit Hilfe der Hydrazin-Reduktion kann die geometrische Anordnung von Doppelbindungen anhand der entstehenden Monoene bestimmt werden. Zur Identifizierung der Position der Doppelbindungen der an der Ag⁺-HPLC fraktionierten CAA und CLnA wurden diese komplett zur GC-MS-Analyse in ihre DMOX-Derivate überführt. Die in der Literatur beschriebenen Durchführungen der partiellen Hydrazin-Reduktion (BERDEAUX et al., 1998, LAVILLONNIÈRE et al., 1998) beziehen sich auf eingesetzte freie Fettsäuren. Nach HÜNIG et al. (1965) werden unsymmetrische Doppelbindungen wie –N=C< im DMOX-Derivat bei der Reduktion nicht angegriffen (siehe 3.1.4). Es wurde daher zur Ausnutzung der gesamten fraktionierten CLnA und CAA eine Modifikation dieser Methoden vorgenommen, wobei als Ausgangssubstanzen die DMOX-Derivate dienen sollten. Die entstandenen Eicosene wurden so hinsichtlich der Lage ihrer Doppelbindung direkt mittels GC-MS identifiziert. Die Konfiguration der Doppelbindung wurde anhand von Referenzsubstanzen (siehe Anhang 6.1.3) und ihrer Elutionsfolge identifiziert.

Anhand des DMOX-Derivates der Arachidonsäure wurden zunächst die Reaktionsparameter der Reduktion optimiert. Der Gehalt möglicher Zwischenprodukte wie Triene und Diene sowie die vollständige Reduktion zu Arachinsäure sollte gering gehalten bzw. vermieden werden. Es wurden dazu nach unterschiedlichen Reaktionszeiten Aliquote des Reaktionsgemisches abgenommen und gaschromatographisch (MS) untersucht. BERDEAUX et al. (1998) setzten zur Reduktion freier

Fettsäuren bei 40 °C 1 ml Hydrazin ein. Diese Parameter scheinen jedoch für die Reduktion von DMOX-Derivaten nicht auszureichen, da sogar nach 180 min nur sehr geringe Mengen an Eicosaensäuren (DMOX) entstanden waren, während ein deutlich höherer Anteil an Eicosadienen und –trienen nachweisbar war. Es erfolgte eine

Erhöhung der eingesetzten Menge an Hydrazin auf 2 ml. Die GC-MS-Analyse der Reaktionsprodukte ergab nach einer Reaktionszeit von 3 h bereits eine größere Menge entstandener Eicosenen, welche nach 5 h einen optimalen Anteil erreichten (siehe Abb. 4.11). Zur Verkürzung dieser Reaktionszeiten wurde in einem nächsten Modifizierungsschritt die Reaktionstemperatur auf 55 °C erhöht. Nach 3 h war die Arachidonsäure (DMOX) bereits vollständig zur Arachinsäure reduziert. Eine optimale Reaktionszeit konnte auf-



Abb. 4.11: Ausbeute der Eicosene bei der Reduktion von Arachidonsäure (DMOX)

grund der scharfen Reaktionsbedingungen nicht erfasst werden, da die Reduktionen unter diesen Bedingungen nicht reproduzierbar abliefen. Es wurde somit die Reaktionstemperatur wieder auf 40 °C zurückgesetzt. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind im Anhang unter 6.3.4 aufgeführt. Die Anwendung dieser entwickelten Methode auf die DMOX-Derivate der γ -Linolensäure, der all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure und der all-cis-11,14-Eicosadiensäure ergab eine direkte Übertragbarkeit. Es konnte diese Methode somit auch zur Reduktion der fraktionierten CLnA und CAA bzw. derer DMOX-Derivate eingesetzt werden.

Die Bestimmung der Konfiguration der CLA-Isomere erfolgte bisher häufig mittels GC-FTIR (FRITSCHE et al., 1997, LAVILLONNIÈRE et al., 1998a, SEHAT et al., 1998b). Diese Methode ist schnell mit wenig Analysenmaterial durchzuführen. Nachteilig ist jedoch, dass keine Unterscheidung zwischen cis,trans- und trans,cis-Isomeren möglich ist. Es wird nur unterschieden, ob cis- und/oder trans-Stellungen der

Doppelbindungen vorhanden sind. Über die Lage der entsprechenden Konfiguration kann keine Aussage getroffen werden. Schwierig wird die Auswertung der GC-FTIR-Ergebnisse weiterhin beim Auftreten mehrerer Doppelbindungen wie in den CLnA oder CAA. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit auf die partielle Hydrazin-Reduktion zur Bestimmung der Konfiguration zurückgegriffen und eine Methode nach BERDEAUX et al. (1998) modifiziert. CHRISTIE (1998) diskutierte in diesem Zusammenhang eine schlechtere Umsetzung der Methylester im Vergleich zu den freien Fettsäuren durch Hydrazin. Es werden Reaktionszeiten von einer bis zu sechs Stunden genannt (MIKOLAJCZAK und BAGBY, 1965, RATNAYAKE und PELLETIER, 1992). Diese Angaben sowie eine noch schlechtere Umsetzung der DMOX-Derivate als der FSME (CHRISTIE 1998) konnten durch die ermittelte optimale Reaktionszeit von 5 h zur Reduktion der DMOX-Derivate der Fettsäuren bestätigt werden. PRIVETT und NICKEL (1965) berichteten von einer optimalen Ausbeute der reduzierten Monoene von nur 50 %. Auch bei der hier entwickelten Methode liegt die Ausbeute der Monoene zusammen bei ca. 50 %, wodurch die Anwendbarkeit auf die DMOX-Derivate gestärkt wird.

Die Identifizierung der entstandenen Eicosene erwies sich trotz der Analyse mittels GC-MS als schwierig. Während die Bestimmung der aus der Arachidonsäure entstandenen Monoene aufgrund vorhandener Referenzsubstanzen (siehe Anhang 6.1.3) noch eindeutig war, erwies sich Anwendung der Methode auf fraktionierte CLnA und CAA als zu ungenau. Die Trennung der cis-Isomere von den trans-Isomeren war gaschromatographisch nicht immer ausreichend. RICKERT (2002) ermittelte zur Identifizierung bisher unbekannter CLA-Isomere folgende gaschromatographische Elutionsfolge der Octadecene: C18:1 t6/t7, t9, t11, t12/c6/c7, t13/c9, t15/c11, c12, c15. Auch hier wird eine Koelution von cis- und trans-Isomeren deutlich. Die Eicosene eluierten in der vorliegenden Untersuchung in der Reihenfolge C20:1 t11, c5, c8, c11 und c13 (siehe Chromatogramme Anhang 6.7, Abb. 6.2-6.4). Vermutet wird auch hier eine schlechte Trennung der höheren trans-Isomeren von den zuerst eluierenden cis-Isomeren. Dieses konnte jedoch aufgrund kommerziell nicht erhältlicher Referenzsubstanzen nicht überprüft und somit auch nicht optimiert werden. Es wurde daher eine weitere Methode zur Bestimmung der geometrischen Anordnung der Doppelbindungen in den CLnA und CAA entwickelt, welche im Abschnitt 4.1.5 beschrieben wird.

4.1.5 RP-HPLC DER REDUZIERTEN CLNA UND CAA

In der Literatur wird zur Trennung und Identifizierung der bei der Hydrazin-Reduktion entstehenden Monoene, sofern diese als FSME vorliegen, meist die Silberionen-Dünnschichtchromatographie genannt (BERDEAUX et al., 1998). Die Analyse der reduzierten DMOX-Derivate mittels Ag⁺-Dünnschichtchromatographie erweist sich aufgrund der stärkeren charge-transfer-Komplexe mit den Silberionen als schwierig. Es wurde daher eine Methode entwickelt, mit der die DMOX-Monoene der reduzierten CLnA und CAA mittels HPLC identifiziert werden. Die Ag⁺-HPLC fand hierbei keine Anwendung, da die stärkeren Elutionsmittel wie z.B. Dichlormethan nur unzureichend UV-durchlässig sind. Anlehnend an die Ergebnisse von GOISSET (1999) wurde daher die RP-HPLC zur Trennung und Identifizierung der Octaene und Eicosene herangezogen. Es wurden zunächst die Parameter wie Eluent und Fluss von GOISSET (1999) übernommen, detektiert wurden die Monoene jedoch bei einer Wellenlänge von 206 nm (genaue Beschreibung siehe Anhang 6.4.5). Durch die Erhöhung der Flussrate von 1 ml/min auf 2 ml/min wurde die Analysenzeit bei gleichbleibener Trennung der Eicosene von 1 h auf 40 min verkürzt. Die Stellungsisomere C20:1 c11 und c13 konnten jedoch auch nach Erhöhung des Wasseranteils im Eluenten (Acetonitril/Wasser 80:20, v/v) auf 30 % nicht getrennt werden. Folgende Elutionsfolge der Eicosene wurde bestimmt: C20:1 c11/c13, C20:1 c8, C20:1 t11, C20:1 c5. Die cis-Isomere eluieren vor den entstprechenden trans-Isomeren, und mit Verschiebung der Doppelbindung in Richtung Methylende eluieren die cis-Isomere später. Im Anhang 6.7 Abb. 6.4 ist ein Beispielchromatogramm eines gemischten Standards der Eicosene gezeigt.

Die beschriebenen Ergebnisse decken sich gut mit denen von GOISSET (1999). Er trennte die DMOX-Derivate eines CLA-Gemisches an der RP-HPLC in die drei Gruppen cis/trans, cis,cis und trans,trans. Allerdings war innerhalb dieser Gruppen keine Trennung der einzelnen Isomere zu erreichen. RP-HPLC wird in der Literatur bisher meist zur Analytik der FSME oder auch der freien Fettsäuren angewandt (BANNI et al., 1996). Andere Derivate fanden bisher nur Einsatz bei der Ag⁺-HPLC. NIKOLOVA-DAMYANOVA et al. (2000) berichten von der Verwendung von Phenacyl- und p-Methoxaphenacylestern bei der Ag⁺-HPLC. Obwohl hierbei die Trennung der

CLA-Isomeren im Vergleich zu den FSME besser ist, haben sich diese Derivate bisher nicht durchgesetzt.

Die Anwendung der hier entwickelten Methode ist bei der Identifizierung der fraktionierten CLnA und CAA aus Lebensmitteln oder Gewebeproben dennoch schwierig. Neben den konjugierten Isomeren der Linolensäure oder der Arachidonsäure tritt häufig auch die natürlich vorkommende α - oder γ -Linolensäure in den Fraktionen auf. Diese wird bei der Reaktion mit Hydrazin ebenfalls reduziert und deren entstehenden Monoene wiederum sind ebenfalls bei der RP-HPLC-Analyse detektierbar. Gerade im Hinblick auf die geringen Konzentrationen der CLnA und CAA ist eine direkte Identifizierung so schwierig. Es müsste vielmehr eine weitere Fraktionierung zur Isolierung der CLnA und CAA von ihren all-cis-Analogen durchgeführt werden.

4.1.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ANALYTIK DER CLNA UND CAA

Es wurden sowohl am GC-FID als auch an der Ag^+ -HPLC-DAD die Elutionsbereiche der isomerisierten γ -Linolensäure und der isomerisierten Arachidonsäure bzw. der CLnA und CAA bestimmt. Anhand dieser konnten im weiteren Verlauf der Arbeit in unterschiedlichen Lebensmitteln und Gewebeproben CLnA und CAA analysiert werden. Während bei der GC-FID-Analyse auch nicht-konjugierte Isomere von C18:3 und C20:4 erfasst wurden, wurden an der Ag⁺-HPLC-DAD spezifisch nur Isomere mit konjugierten Doppelbindungen detektiert. Die Identifizierung dieser CLnA und CAA erfolgte auch in den nachfolgenden Untersuchungen nach Fraktionierung und Derivatisierung mittels GC-MS. Die Isolierung von Vergleichssubstanzen aus der isomerisierten γ -Linolensäure und Arachidonsäure erwies sich als nicht praktikabel, da die DMOX-Derivate nicht sehr stabil sind.

Dennoch konnten aus der isomerisierten Arachidonsäure nach Fraktionierung an der Ag⁺-HPLC und Umwandlung der FSME zu DMOX-Derivaten mittels GC-MS folgende Isomere eindeutig identifiziert werden: C20:4 Δ 5,7,12,14 und C20:4 Δ 5,8,12,14. Weitere Isomere wurden anhand ihres Molekülions nachgewiesen, konnten jedoch aufgrund zu niedriger Konzentrationen und somit unzureichender Fragmentierung nicht identifiziert werden. Bei der alkalischen Isomerisierung entstanden demnach zwei

Hauptisomere, in denen lediglich eine bzw. zwei Doppelbindungen verschoben wurden. Die Identifizierung weiterer Isomere erwies sich insofern als schwierig, da aufgrund der nicht reproduzierbaren Trennung an der Ag⁺-HPLC aufgrund des sehr instabilen Eluenten bereits die Fraktionierung der nur in geringen Mengen entstandener Isomere ungenau war. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde daher zur Identifizierung der CLnA und CAA direkt aus den entsprechenden biologischen Matrices fraktioniert.

4.2 Untersuchung von Lebensmitteln

Zur Identifizierung und Bestimmung der CLnA und CAA in Lebensmitteln standen zum einen unterschiedliche Käseproben und zum anderen Filets von mit CLA gefütterten Karpfen zur Verfügung. Aufgrund des vermuteten Stoffwechsels von CLA wird in diesen Matrices ebenfalls die Anwesenheit von CLnA und CAA vermutet.

4.2.1 CLNA UND CAA IN KÄSEPROBEN

Es wurde zunächst das Isomerenmuster der CLnA und CAA in verschiedenen Käsegruppen bestimmt (siehe 2.2.1.1), um eventuelle Unterschiede durch Fettgehalt, Verarbeitung oder Lagerung festzustellen. Die Identifizierung einzelner CLnA- und CAA-Isomere sowie die Abschätzung deren Gehalte erfolgte anhand von Kugeledamer.

4.2.1.1 Isomerenmuster in unterschiedlichen Käsegruppen

Aus den Gruppen Hartkäse, Schnittkäse, Weichkäse und Frischkäse wurden jeweils zwei Sorten zur Untersuchung ausgewählt. Nach Fettextraktion und Umesterung (siehe Anhang 6.3.2.1 und 6.3.3.1) erfolgte die Analyse sowohl mittels GC-FID als auch mittels Ag⁺-HPLC. Die UV-Detektion von CLnA und CAA bei einer Wellenlänge von 234 nm ergab ein absolut identisches Isomerenmuster in den unterschiedlichen Käseproben. Die nachfolgende Identifizierung dieser Isomere beschränkte sich daher nur auf den Edamer-Käse.

4.2.1.2 Identifizierung der CLnA und CAA

Zur eindeutigen Identifizierung der einzelnen Isomere der CLnA und CAA war es notwendig, diese zuvor anzureichern und von anderen in größeren Konzentrationen auftretenden Fettsäuren zu separieren. Wie aus Abb. 3.1 ersichtlich, schloss sich nach der Methylierung der extrahierten Triacylglycerine bzw. der Fettsäuren zunächst die Vorfraktionierung an der präparativen RP-HPLC (siehe 6.4.3) zur Anreicherung der CLnA und CAA an. Die Gesamt-FSME des Käsefettes wurden in fünf Fraktionen getrennt (Abbildung 4.12).



Abb. 4.12: RP-HPLC-Chromatogramm der FSME aus Käsefett (Vorfraktionierung), λ = 208 nm

Die Zusammensetzung jeder einzelnen Fraktion wurde mittels GC-FID analysiert. Während Linolsäure zusammen mit CLA neben weiteren Fettsäuren der Kettenlängen C14 bis C18 sowie C20:3 ausschließlich in der 3. Fraktion enthalten war, eluierte sowohl Linolensäure als auch Arachidonsäure in der Fraktion 2. Aufgrund der festgestellten gaschromatographischen Elutionsbereiche der Isomere der Linolensäure und der Arachidonsäure, konnte ebenfalls die Anwesenheit dieser Isomere in der 2. Fraktion nachgewiesen werden. Die detaillierte Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen ist im Anhang unter 6.5.1 Tabelle 6.11 aufgeführt. Eine direkte Identifizierung der Isomere der Linolensäue und der Arachidonsäure war jedoch auch aus der Fraktion 2 nicht möglich. Eine weitere Fraktionierung mit Hilfe der Ag⁺-HPLC war notwendig. Eine Differenzierung zwischen CLnA und CAA war hier nicht möglich, da diese in einem großen Zeitraum koeluieren (siehe 4.1.3). In Abbildung 4.13 ist ein Ag⁺-HPLC-DAD Chromatogramm der RP-Fraktion 2 dargestellt.



Abb. 4.13: Ag⁺-HPLC-DAD-Chromatogramm der FSME der RP-Fraktion 2 des Käsefettes (Nachfraktionierung), Detektion bei 234 nm, fraktionierte Komponenten sind mit einem Pfeil ↓ gekennzeichnet

Die mit einem Pfeil \downarrow gekennzeichneten Komponenten wiesen entweder ein für konjugierte Diene spezifisches UV-Spektrum mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 234 nm oder aber ein für konjugierte Triene charakteristisches Spektrum (siehe 4.1.3) auf und wurden somit fraktioniert. Nicht markierte Komponenten zeigten diese typischen Spektren nicht; es handelte sich dabei nicht um konjugierte Diene oder Triene.

Der weitere Analysengang zur Identifizierung einzelner CLnA und CAA wird im Folgenden exemplarisch an der fraktionierten Komponente X beschrieben. Es schloss sich eine Überprüfung der Reinheit der an der Ag⁺-HPLC fraktionierten Verbindungen sowie eine erste Differenzierung zwischen CLnA und CAA mittels GC-FID an. Abbildung 4.14 zeigt das GC-FID-Chromatogramm der Fraktion X.



Abb. 4.14: GC-FID-Chromatogramm der Ag⁺-HPLC-Fraktion X

Im Elutionsbereich der isomerisierten γ -Linolensäure (siehe dazu 4.1.3) wurde in dem GC-FID-Chromatogramm der Ag⁺-HPLC-Fraktion X eine Verbindung Y detektiert, welche anhand des FSME-Standards (Anhang 6.1.1) keiner üblichen natürlich vorkommenden Fettsäure zugeordnet werden konnte. Es könnte sich somit um ein Isomer der CLnA handeln. Die GC-MS-Analyse des DMOX-Derivates der Ag⁺-HPLC-Fraktion X bestätigte diese Vermutung. Die mit Y gekennzeichnete Verbindung wurde anhand der spezifischen Massenfragmente als C18:3 Δ 9,11,15 identifiziert. Neben diesem CLnA-Isomer konnte auch ein Isomer der CAA, allerdings in sehr viel geringerer Konzentration (siehe GC-MS-Chromatogramm Anhang 6.7 Abb. 6.5), identifiziert werden. In den Abbildungen 4.15 und 4.16 sind beide Massenspektren aufgeführt.



Abb. 4.15: Massenspektrum des identifizierten CLnA-Isomers



Abb. 4.16: Massenspektrum des identifizierten CAA-Isomers

Charakteristisch für DMOX-Derivate sind die intensiven Massenfragmente bei m/z 113 und 126, welche durch McLafferty-Umlagerung bzw. eine kombinierte Zyklisierungs-/Eliminierungsreaktion zustande kommen, sowie ein lokales Minimum bei m/z 154 (SPITZER, 1997). Das Molekülion bei m/z 331 bzw. 357 gibt die Gesamtmasse des DMOX-Derivates an und lässt somit eine Unterscheidung zwischen C18:3-Derivaten und C20:4-Derivaten zu. Die regelmäßige Folge der 14 mu Einheiten der Methylgruppen ist an den Positionen der Doppelbindungen durch einen 12 mu Schritt unterbrochen. Diese 12 mu Einheiten waren ebenso wie die Molekülionen in beiden Massenspektren deutlich zu erkennen, weshalb eine eindeutige Identifizierung möglich war.

Anhand der GC-MS-Analyse und auch unter Berücksichtigung der UV-Spektren bei der Ag⁺-HPLC-Fraktionierung wurden folgende konjugierte Isomere der Linolensäure und der Arachidonsäure (siehe Tab. 4.1) im Fett des Edamer-Käses hinsichtlich der Position der Doppelbindungen identifiziert:

CLnA		CAA	
Anzahl der Isomere		Anzahl der Isomere	
1	∆ 7,9,14	1	∆ 5,9,12,14
1	∆ 8,10,13	1	∆ 5,9,13,15
1	∆ 8,12,15	1	∆ 6,8,11,14
1	∆ 9,11,13 *	4	∆ 8,12,14,17
3	∆ 9,11,15	1	∆ 8,12,15,17
1	∆ 9,12,14	3	∆ 9,11,14,17
1	Δ 10,12,15	5	∆ 9,12,14,17

Tab. 4.1: Identifizierte Isomere der CLnA und CAA in Käsefett

Einige der CLnA und CAA wurden in unterschiedlichen Ag⁺-HPLC-Fraktionen identifiziert. Dieses lässt vermuten, dass es sich dabei um geometrische Isomere der identifizierten Doppelbindungen handelt. Das mit dem * gekennzeichnete CLnA-Isomer weist eine konjugierte Trien-Struktur auf. Bereits das UV-Spektrum dieses Isomers zeigte bei der Ag⁺-HPLC-Fraktionierung das charakteristische Maximum bei einer Wellenlänge von 268 nm neben zwei kleineren Maxima (siehe 4.1.3). Die GC-MS-Analyse bestätigte dieses Ergebnis. In Tabelle 6.21 im Anhang unter 6.6.1 sind charakteristische Massenzahlen der identifizierten Isomere der CLnA und CAA aufgeführt (siehe dazu auch SPITZER, 1997). Die Bestimmung der geometrischen Anordnung der Doppelbindungen in den bisher identifizierten Isomeren der CLnA und CAA sollte über die partielle Hydrazin-Reduktion und der daraus entstehenden Monoenen erfolgen. Aufgrund der neben den Isomeren enthaltenen nicht konjugierten Fettsäuren, welche bei der Fraktionierung durch die UV-Detektion bei 234 nm nicht detektiert wurden, erwies sich die direkte Reduktion der Ag⁺-HPLC-Fraktionen jedoch als nicht auswertbar. So zeigte sich z.B. bereits im GC-FID-Chromatogramm der Fraktion X ein deutlicher Anteil an α -Linolensäure neben dem identifizierten CLnA-Isomer C18:3 Δ 9,11,15 (siehe Abb. 4.14). Nach der Hydrazin-Reduktion des DMOX-Derivates dieser Fraktion waren an der RP-HPLC nur die entstandenen Octadecene C18:1 c9, c12 und c15 nachweisbar (siehe Chromatogramm im Anhang 6.7 Abb. 6.6). Die Monoene aus dem CLnA-Isomer waren demnach in zu geringen Konzentrationen enthalten. Eine Isolierung und Anreicherung der einzelnen CLnA- und CAA-Isomere vor der Reduktion wäre somit vorteilhaft.

4.2.1.3 Abschätzung der Gehalte an CLnA und CAA im Käsefett

Eine genaue Bestimmung der CLnA-und CAA-Gehalte im Käse konnte aufgrund der fehlenden Referenzsubstanzen nicht erfolgen. Eine grobe Abschätzung unter Zugrundelegung der isomerisierten γ -Linolensäure und der Arachidonsäure wurde dennoch vorgenommen. Unter Berücksichtigung aller entstandener Isomere, auch der nicht konjugierten, wurde der Gehalt der C18:3-Isomere auf 0,5 % und der C20:4-Isomere auf 0,2 % bezogen auf die Gesamt-FSME des Käsefettes abgeschätzt (siehe Anhang 6.5.1 Tab. 6.12).

4.2.1.4 Diskussion

Untersuchungen hinsichtlich der Isomerenverteilung der CLA wurden bereits in den verschiedensten Lebensmitteln durchgeführt. LAVILLONNIERE et al. (1998a) bestimmten sowohl den Gehalt als auch die Verteilung einzelner CLA-Isomere in unterschiedlichen Französischen Käsesorten. Sie vermuteten eine Abhängigkeit des

CLA-Gehaltes im Käse von der Herkunft der Milch und in geringem Maße auch von den Herstellungsbedingungen. Da sie jedoch nur zwei der Hauptisomere der CLA identifizieren konnten, konnte eine genaue Bestimmung der Isomerenverteilung nicht vorgenommen werden. RICKERT (2002) untersuchte das Isomerenmuster der CLA bezogen auf 15 Einzelisomere ebenfalls in verschiedenen Käsesorten. Er stellte keinen Unterschied der Verteilung in Abhängigkeit von der Käsesorte fest. In der hier zugrundeliegenden Arbeit wurde erwartungsgemäß auch kein Unterschied im Isomerenmuster der CLnA und CAA in den unterschiedlichen Käsesorten festgestellt. Das Auftreten konjugierter Fettsäuren scheint in diesem Fall abhängig von der zur Käsebereitung eingesetzten Milch zu sein. GNÄDIG (2002) untersuchte weiterführend den Einfluss des Herstellungsprozesses von Käse auf die CLA-Isomerenverteilung und den CLA-Gehalt, indem sie verschiedene Propionibacterium sp. sowie unterschiedliche Temperaturen zur Käsebereitung einsetzte. Schließlich verwendete sie Emmentaler Käse zu Koch- und Bratprozessen sowie zur Herstellung von Schmelzkäse. Keiner der durchgeführten Prozesse führte zu einer Veränderung des Gehaltes und der Verteilung der CLA-Isomeren. Diese Herstellungsprozesse haben demnach keinen Einfluss auf den Gehalt und die Verteilung von CLA in diesen Lebensmitteln.

In dieser Arbeit wurden anhand des vorgestellten Analysenweges neun Isomere der CLnA und 16 Isomere der CAA hinsichtlich der Position der Doppelbindungen identifiziert. Durch die Vorfraktionierung an der präparativen RP-HPLC gelang es, die CLnA und CAA anzureichern und von anderen in höheren Konzentrationen enthaltenen Fettsäuren annähernd zu isolieren. Auffällig bei der GC-FID-Analyse der einzelnen RP-HPLC-Fraktionen war das Auftreten der Ölsäure C18:1 c9 in fast allen Fraktionen. Ölsäure ist mit ca. 25 % eine der Majorfettsäuren des Käsefettes (siehe dazu RICKERT, 2002, sowie eigene Ergebnisse im Anhang 6.5.1); eine deutliche Abtrennung von anderen Fettsäuren war aufgrund der unzureichenden Trennleistung der präparativen RP-HPLC-Säule nicht möglich. Die Fraktionierung der CLnA und CAA aus der RP-HPLC-Fraktion und deren anschließende Identifizierung mittels GC-MS war dennoch möglich. Die Bestimmung der Konfiguration der Doppelbindungen erwies sich aufgrund der niedrigen Konzentrationen einzelner Isomere sowie der Kontamination der Ag⁺-HPLC-Fraktionen mit nicht konjugierten und somit nicht bei

234 nm detektierbaren FSME als schwierig. Es sollte eine weitere Anreicherung und Isolierung stattfinden. Häufig in der Literatur beschrieben wird eine Anreicherung der zu identifizierenden Isomere über die Dünnschichtchromatographie (BERDEAUX et al., 1998).

Möglicher Mechanismus der Bildung der nachgewiesenen CLnA- und CAA-Isomere ist die Biohydrierung der Linolensäure und der Arachidonsäure durch Mikroorganismen oder die radikalische Isomerisierung dieser Fettsäuren. In 13 der identifizierten CAA wurde die letzte Doppelbindung jedoch an Position C17 identifiziert. Eine direkte Umwandlung der Arachidonsäure scheint daher unwahrscheinlich. Ebenso fraglich ist der Metabolismus von CLA zur Bildung dieser CAA-Isomeren, insbesondere unter Berücksichtigung des CLA-Hauptisomers C18:2 c9t11. Lediglich die CAA-Isomere mit der ersten Doppelbindung am C5 oder C6 könnten direkt aus dem CLA-Metabolismus stammen. GNÄDIG (2002) wies bereits in einer in-vitro-Studie an isolierten Rattenlebermikrosomen das Desaturierungs- und Elongationsprodukt des CLA-Isomers C18:2 c9t11 als C20:4 c5c8c11t13 nach. Die Entstehung von C20:4 c5c8t12c14 aus dem CLA-Isomer C18:2 t10c12 wird vermutet. SEBEDIO et al. (1999) identifizierten letzteres CAA-Isomer bereits in den Leberlipiden von mit CLA gefütter-C20:4 \triangle 5,9,13,15 und C20:4 \triangle 6,8,11,14 schon aus der Milch aufgrund der Verstoffwechselung der CLA in der Kuh. Zur Entstehung der anderen CAA-Isomere sowie der CLnA-Isomere könnte hingegen α -Linolensäue mit Doppelbindungen an den Positionen 9,12 und 15 als Ausgangssubstanz gedient haben. Elongation und Desaturierung würden somit die Doppelbindung an Positon 17 der CAA bzw. die Doppelbindungen zum Methylende hin der CLnA erklären. Käsefett enthält ca. 1 % α-Linolensäue und nur 0,02 % γ-Linolensäure (RICKERT, 2002). GRIINARI und BAUMAN (1999) berichteten von Experimenten mit radiomarkierten oder reinen Fettsäuren zur Ermittlung der Hauptstoffwechselwege der Biohydrierung im Rumen. Als Metabolit der α -Linolensäure nennen sie C18:3 c9t11c15. Drei Isomere der CLnA wurden in dem in dieser Arbeit untersuchten Käse mit den Doppelbindungen an den Positionen C9, C11 und C15 identifiziert. Allerdings scheinen diese Stoffwechselzwischenprodukte im Rumen nicht sehr stabil zu sein (JAHREIS und KRAFT, 2002). BANNI et al. (1996) wiesen geringe Gehalte an CLnA in den Leberlipiden von Lämmern nach und diskutierten deren Entstehung aus der Biohydrierung von Linolensäure. Eine Bildung der in dieser Arbeit identifizierten CLnA und CAA ist allerdings aufgrund der Ergebnisse von RICKERT (2002) und GNÄDIG (2002) vermutlich nicht auf den Herstellungsprozess des Käses zurückzuführen. Eine Isomerisierung der α -Linolensäure müsste schon vorher stattgefunden haben.

In den unterschiedlichen Käsesorten wurden mittlere CLA-Gehalte von 0,9-1,3 % (RICKERT, 2002, GNÄDIG, 2002) bestimmt. Die hier ermittelten Gehalte an CLnA und CAA lagen mit 0,5 bzw. 0,2 % bezogen auf den Fettgehalt im Käse etwas darunter. Zu berücksichtigen war außerdem, dass es sich bei den Isomeren aus der alkalischen Isomerisierung der y-Linolensäue und der Arachidonsäure, welche zur Quantifizierung herangezogen wurden, nicht ausschließlich um konjugierte Isomere handelte. Der hier abgeschätzte Gehalt der CLnA und CAA ist somit vermutlich etwas erhöht. Bisher wurden CLnA nur in italienischen Milchsorten und Milcherzeugnissen mit Gehalten von 0,58 mmol/mg Fett (Joghurt) bis 7,29 mmol/mg Fett (Ricotta) bestimmt (BANNI et al., 1996). Es wurden hierbei jedoch keine einzelnen Isomere identifiziert, die Auswertung erfolgte vielmehr als konjugiertes C18:3-Dien-System anhand isomerisierter Linolensäure, charakteristischer UV-Spektren sowie der Separation mittels RP-HPLC. BANNI et al. (1996) bestimmten weiterhin in den Leberlipiden von Lämmern die Konzentration von CLnA gefolgt von der der konjugierten Isomeren der Eicosatriensäure und der der CAA. In den Leberlipiden von mit CLA gefütterten Ratten ermittelten Sébédio et al. (1999) einen CAA-Gehalt von 0,2 % des Gesamtfettes.

4.2.2 CLNA UND CAA IN CLA-GEFÜTTERTEN KARPFEN

Zur Analyse der CLnA und CAA im Filet von mit CLA gefütterten Karpfen standen aus verschiedenen Fütterungsgruppen der Studie zum Einfluss der CLA auf das Lebensmittel Fisch jeweils das rechte Filet zur Verfügung. Die Identifizierung erfolgte dabei aus zwei Karpfenfilets der Fütterungsgruppe mit 1 % CLA-Zulage bei einem Fettgehalt des Futters von 9 % im Vergleich zu zwei entsprechenden Kontrollkarpfen ohne CLA-Zulage. Die Gehalte an CLnA und CAA wurden in jeweils drei Karpfen der unterschiedlichen Fütterungsgruppen mit 0 % und 1 % und in sechs Karpfen mit 3 % CLA-Zulagenöl ermittelt.
4.2.2.1 Identifizierung der CLnA und CAA

Zur Identifizierung der CLnA und CAA wurde derselbe Analysenweg gewählt wie bei der Identifizierung dieser Isomere aus Käsefett (siehe 4.2.1.2). Die Vorfraktionierung mittels präparativer RP-HPLC ergab eine vergleichbare Trennung, anhand derer auch hier fünf Fraktionen isoliert werden konnten. Ein Beispielchromatogramm sowie die FSME-Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen aus der GC-FID-Analyse sind im Anhang unter 6.7 Abb. 6.7 bzw. 6.5.2 Tab. 6.13 dargestellt. Nach weiterer Fraktionierung mittels Ag⁺-HPLC (Chromatogramm siehe Anhang 6.7 Abb. 6.8), Derivatisierung der FSME zu DMOX-Derivaten und anschließender GC-MS-Analyse wurden folgende Isomere der CLnA und CAA identifiziert:

CLnA		CAA	
Anzahl der Isomere		Anzahl der Isomere	
1	∆ 6,9,11	1	∆ 5,8,12,14
1	Δ 6,10,12	1	∆ 8,10,14,17
2	Δ 9,12,14	2	∆ 8,12,14,17
2	Δ 9,13,15	2	∆ 9,11,14,17
		1	∆ 9,12,14,17

Tab. 4.2: Identifizierte Isomere der CLnA und CAA in Karpfenfett (1 % CLA-Zulage)

Charakteristische Massenfragmente der identifizierten CLnA- und CAA-Isomere sind in Tabelle 6.22 im Anhang 6.6.2 aufgeführt.

Zur Ermittlung nativer CLnA- oder CAA-Isomere wurden weiterhin zwei Karpfen der Kontrollgruppe ohne CLA-Zulage untersucht. Die Ag⁺-HPLC-Analyse der Fraktion 2 einer Kontrollkarpfenprobe ergab jedoch im Gegensatz zu den Karpfenproben mit CLA-Zulage keine detektierbaren konjugierten Dien-Systeme (siehe Chromatogramm Anhang 6.7 Abb. 6.9).

4.2.2.2 CLnA- und CAA-Gehalte in unterschiedlichen Fütterungsgruppen

Analog zur Bestimmung der CLnA und CAA im Käsefett (4.2.1.3) erfolgte auch in den Karpfenproben eine Abschätzung der Gehalte dieser Fettsäuren. Ferner wurden die ermittelten Gehalte der unterschiedlichen Fütterungsgruppen verglichen. Dieses sollte neben der Identifizierung einen Hinweis darauf geben, ob und wie CLA aus einem Futter verstoffwechselt werden.

Von jeweils drei Karpfenfilets der Fütterungsgruppen mit 0 % und 1 % und sechs Karpfenfilets der Fütterungsgruppe mit 3 % CLA-Zulage der Fettgehaltstufe I (9 % Fett) wurde das Fett extrahiert, die Fettsäuern umgeestert und mittels GC-FID analysiert. Zur Auswertung wurde der FSME-Standard sowie der CLA-Standard neben der alkalisch isomerisierten γ -Linolensäure und der isomerisierten Arachidonsäure herangezogen. Die Bestimmung einzelner CLA-Isomere unterblieb in der vorliegenden Arbeit, da dieses das Ziel einer anderen Studie ist. In Abbildung 4.17 sind die prozentualen Gehalte der Linolsäure, der CLA, der γ -Linolensäure, der α -Linolensäure, der CLA, der GC-FID analy die Gesamt-FSME in den drei Fütterungsgruppen dargestellt. Einzelergebnisse der GC-FID-Analyse finden sich im Anhang 6.5.2 Tab. 6.14 und 6.15.



Abb. 4.17: Prozentuale Gehalte der CLA, CLnA und CAA sowie ihrer nicht konjugierten Homologe bezogen auf die Gesamt-FSME im Karpfenfett der unterschiedlichen Fütterungsgruppen (Kontrollkarpfen, mit 1 % und 3 % CLA gefütterte Karpfen) Aus dem Diagramm ist zum einen ein deutlicher Anstieg des CLA-Gehaltes von der Kontrollgruppe bis hin zur Fütterungsgruppe mit 3 % CLA-Zulage zu erkennen. Daneben ist gleichzeitig eine Abnahme der Konzentration an Linolsäure zu bemerken. Während auch der Gehalt an CLnA mit der Steigerung der CLA-Zulage stieg, so war dieser Verlauf bei der Konzentration an CAA im Karpfenfett nicht so deutlich zu verzeichnen. In der Fütterungsgruppe mit 3 % CLA lag der Gehalt wieder etwas unter dem der Gruppe mit 1 % CLA. Von der Kontrollgruppe hin zur Fütterungsgruppe mit 1 % CLA war jedoch ein deutlicher Anstieg im Gehalt an CAA. Die Konzentration an Arachidonsäure nahm, wie auch die der Linolsäure, mit Steigerung der CLA-Zulage ab. Eine Auswirkung der CLA-Gabe auf den Gehalt der γ -Linolensäure war nicht festzustellen; diese ungesättigte Fettsäure zählt jedoch mit einem durchschnittlichen Gehalt von 0,3 % der Gesamt-FSME auch zu den Minorfettsäuren. Der Gehalt der α -Linolensäure sank von der Kontrollgruppe zu den Karpfen mit 1 % CLA-Zulage, stieg jedoch in der Gruppe der Karpfen mit 3 % CLA-Zulage wieder an.

Da diese ermittelten Ergebnisse jedoch nur auf den Untersuchungen von jeweils drei bzw. sechs Karpfenproben basieren, sind statistische Aussagen nicht möglich. Weitere Bestimmungen sind notwendig. Eine Tendenz der Abhängigkeit der Gehalte an Linolsäure, α -Linolensäure, CLnA, Arachidonsäure sowie CAA von der Höhe der CLA-Gabe ist dennoch deutlich zu erkennen.

4.2.2.3 Diskussion

Die Identifizierung der CLnA und CAA im Fett der CLA-gefütterten Karpfen erwies sich schwieriger als die Durchführung bei dem untersuchten Käse. Dieses ließ sich vermutlich auf die zu unreinen Fraktionen sowohl aus der Isolierung an der präparativen RP-HPLC als auch an der Ag⁺-HPLC zurückführen. Karpfenfett enthält weit mehr ungesättigte Fettsäuren als Käse. Diese coeluieren mit den CLnA und CAA bei der Fraktionierung an der präparativen RP-HPLC. Bei der Analyse mittels Ag⁺-HPLC werden sie durch die UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 234 nm nicht erfasst; sie liegen "unter" den fraktionierten Komponenten mit einem konjugierten Dien-System. Im GC-FID-Chromatogramm der FSME einer Ag⁺-HPLC-Fraktion im Anhang

6.7 Abb. 6.10 wird dies deutlich. Die Verbindungen, bei denen es sich vermutlich um die fraktionierten Komponenten handelt, waren in weitaus geringerer Konzentration enthalten als ebenfalls vorhandene ungesättigte Fettsäuren. Als Folge dieser unreinen Fraktionen war eine unsaubere Fragmentierung der DMOX-Derivate bei der GC-MS-Analyse feststellbar.

Die Herkunft der identifizierten Isomere der CLnA und CAA lässt sich aufgrund der Positionen der Doppelbindungen vermutlich, wie schon bei den im Käsefett identifizierten CLnA und CAA, auf den recht hohen Gehalt an α -Linolensäure zurückführen. Eine Bildung aus den zugefütterten CLA-Isomeren scheint nur zum Teil nachgewiesen zu sein. So könnten die identifizierten Isomere der CLnA C18:3 Δ 6,9,11 und C18:3 Δ 6,10,12 durch Δ 6-Desaturierung aus dem CLA-Hauptisomer C18:2 c9t11 bzw. dem CLA-Isomer C18:2 t10c12 gebildet worden sein. Diesen Stoffwechselvorgang konnte GNÄDIG (2002) bereits in *in-vitro*-Versuchen an isolierten Rattenlebermikrosomen zeigen. Das CLA-Isomer C18:2 t10c12 wurde dabei vergleichbar mit Linolsäure von der Δ^6 -Desaturase umgesetzt, während C18:2 c9t11 nur etwa halb so gut verstoffwechselt wurde. Das identifizierte CAA-Isomer C20:4 Δ 5,8,12,14 scheint weiterhin ein Elongations- und Δ 5-Desaturationsprodukt von C18:3 Δ 6,10,12 zu sein.

Den Ergebnissen der Identifizierung gegenüber lassen die Bestimmungen der Gehalte an CLA, CLnA und CAA in den unterschiedlichen Fütterungsgruppen jedoch deutlich die Vermutung zu, dass die Gabe von CLA dennoch eine Auswirkung auf die Fettsäurezusammensetzung der gefütterten Karpfen hat. Die ermittelten Gehalte der Linolsäure, Linolensäure und der Arachidonsäure im Gesamtfett der Kontrollkarpfen waren dabei grundsätzlich mit den von OBERLE et al. (1998) bestimmten Gehalten vergleichbar. Lediglich der Gehalt an α -Linolensäure lag in den vorliegenden Karpfenfilets mit 15,5 % der Gesamt-FSME deutlich über dem von OBERLE et al. (1998) angegebenen Gehalt von 6 %. Dieses ist jedoch vermutlich auf den erhöhten Gehalt an α -Linolensäure in der Futterration der Karpfen zurückzuführen (Anhang 6.2.2), welche als essentielle Fettsäure einen Mindestanteil von 1 % der Ration ausmachen sollte.

Die Auswirkungen einer CLA-Gabe wurden bereits in den verschiedensten Studien an Tieren, die der menschlichen Ernährung dienen, untersucht. THIEL-COOPER et al. (2001) verabreichten Futter mit steigenden Zulagen eines CLA-Präparates, das 61 % CLA-Isomerengemisch enthielt, von 0,2 %, 0,4 %, 0,8 % und 1,7 % an Mastschweine im Lebendmassebereich 25-120 kg. Nach der Schlachtung beobachteten die Autoren eine dosisabhängige CLA-Anreicherung in der Rückenmuskulatur bei gleichzeitiger Erhöhung der Gehalte an gesättigten Fettsäuren (insbesondere C14 und C16) und einer Reduzierung der Gehalte an einfach ungesättigten Fettsäuren und PUFA, wobei hier vor allem Linolsäure und Arachidonsäure zu nennen sind. Auch RAMSAY et al. (2001) stellten eine Abnahme der Gehalte an Linol- und Linolensäure nach CLA-Fütterung fest. Sie substituierten in einer Mastschweinration Maisöl durch ein CLA-Präparat (mit 67 % CLA-Anteil) in Anteilen von 0,25 % bis 2,0 %. Nach der Schlachtung bei einem Versuchsendgewicht von 55 kg analysierten sie das Fettsäuremuster im Musculus longissimus dorsi. Auswirkungen auf längerkettige Fettsäuren waren hier nicht eindeutig. Ähnliche Studien wurden auch mit Broilern durchgeführt. SIMON et al. (2000) gaben über eine Mastperiode von sechs Wochen ein Futter mit 2,9 % CLA-Zulage (mit 70 % CLA-Isomerengemisch) an Broiler. Nach der Schlachtung ermittelten sie einen deutlichen Anstieg des CLA-Gehaltes im Muskelfett der Brust- und Schenkelmuskulatur, während eine nur unwesentliche Veränderung der Konzentration der PUFA festzustellen war. Der Gehalt an Linol- und Arachidonsäure war jedoch deutlich verringert im Muskelfett der Broiler mit CLA-Gabe. Dieselben Ergebnisse erzielten SZYMCZYK et al. (2001) ebenfalls durch CLA-Gaben an Mastgeflügel. TWIBELL et al. (2001) verfütterten CLA-haltiges Futter von 0 % bis 1,0 % (CLA-Isomerengemisch) über einen Zeitraum von neun Wochen an Gelbbarsche (Perca flavescens). Auch sie stellten eine Einlagerung der CLA bei gleichzeitiger Abnahme der Gehalte an ungesättigten Fettsäuren zugunsten der gesättigten Fettsäuren im Muskelfett fest. Sowohl die Konzentrationen an Linol- und Linolensäure als auch an Arachidonsäure nahmen im Muskelfett ab.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse stimmen gut mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten überein. Während der CLA-Gehalt mit gesteigerter Zulage im Fett der Karpfenfilets ebenfalls anstieg, nahmen gleichzeitig die Gehalte der ungesättigten Fettsäuren ab. Eine Aussage über CLA-Metaboliten wie CLnA oder CAA wurde in

65

den genannten Studien nicht gemacht. Eine Abnahme der Gehalte der ungesättigten Fettsäuren C18:3 und C20:4 könnte sich jedoch in einer Zunahme der CLnA- und CAA-Gehalte wiederspiegeln.

SIMON et al. (2000) berichteten weiterhin von einer geringeren Einlagerung des CLA-Isomers C18:2 t10c12 in das Muskelfett als C18:2 c9t11. Als Ursache dafür ist vermutlich, wie bereits von GNÄDIG (2002) diskutiert, die bessere Verstoffwechselung dieses Isomers zu nennen. Entsprechende Unterschiede der Verstoffwechslung konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch aufgrund fehlender Quantifizierung der einzelnen identifizierten Isomere der CLnA und CAA nicht ermittelt werden.

4.3 Untersuchung von humanen Gewebeproben

Die Untersuchung der Gewebeproben sollte zum einen der Identifizierung von CLA-Metaboliten dienen und zum anderen die Bestimmung der Gehalte dieser ermöglichen. Es wurde weiterhin der Unterschied in der Verteilung der CLnA- und CAA-Isomere im Tumorgewebe (TU), tumorfreien nahe dem Tumor gelegenen Gewebe (TF) sowie im Fettgewebe (FG) bestimmt.

4.3.1 IDENTIFIZIERUNG DER CLNA UND CAA

Zur Identifizierung der CLnA und CAA in humanem Gewebe stand ein großes Mammakarzinom mit einer Masse von 3,03 g zur Verfügung. Auch hier wurde zur Charakterisierung einzelner Isomere derselbe zuvor beschriebene Analysenweg gewählt (siehe 4.2.1.2). Bei der Vorfraktionierung mittels präparativer RP-HPLC wurden sechs Fraktionen isoliert (Chromatogramm siehe Anhang 6.7 Abb. 6.11), deren FSME-Zusammensetzung im Anhang unter 6.5.3 Tab. 6.16 aufgeführt ist. Nach viermaliger Fraktionierung mittels Ag⁺-HPLC (Chromatogramm siehe Anhang 6.7 Abb. 6.12), Derivatisierung der FSME zu DMOX-Derivaten und anschließender GC-MS-Analyse wurden folgende in Tabelle 4.3 aufgelisteten Isomere der CLnA und CAA anhand charakteristischer Massenfragmente identifiziert (Massenfragmente in Tabelle 6.23 im Anhang 6.6.3):

CLnA		CAA	
Anzahl der Isomere		Anzahl der Isomere	
2	∆ 9,12,14	1	∆ 5,8,11,13
2	∆ 9,13,15		
1	∆ 10,12,15		

Tab. 4.3: Identifizierte Isomere der CLnA und CAA im Fett eines Mammakarzinoms

In anderen Ag⁺-HPLC-Fraktionen wurden weitere Isomere der CLnA und CAA anhand ihres Molekülions bei der GC-MS-Analyse nachgewiesen. Eine Bestimmung der Position der Doppelbindungen war jedoch aufgrund der unzureichenden Fragmentierung nicht möglich. Dieses ist vermutlich zum einen auf den sehr geringen Fettgehalt in Tumorgewebe und zum anderen auf die geringe Probenmenge insgesamt zurückzuführen. Es war so keine ausreichend oft wiederholte Fraktionierung durchführbar.

4.3.3 UNTERSUCHUNG VON MAMMAKARZINOMEN

Zur Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung von Brustkrebsgewebe standen zwölf Mammakarzinome zur Verfügung. Es wurde analog zu der Abschätzung der Gehalte von CLnA und CAA im Käsefett (siehe 4.2.1.3) auch hier die Gesamtkonzentration von CLnA und CAA gaschromatographisch bestimmt. Auch bei der Bestimmung des CLA-Gehaltes wurde nur die Summe der einzelnen Isomere zur Auswertung und Diskussion herangezogen. In Abbildung 4.18 sind die ermittelten prozentualen Gehalte von Linolsäure, CLA, α - und γ -Linolensäure, CLnA, Arachidonsäure sowie CAA bezogen auf das Gesamfettsäuremuster dargestellt. Einzelwerte der GC-FID-Analyse sind im Anhang 6.5.3 in Tabelle 6.17 aufgeführt.



Abb. 4.18: Prozentuale Gehalte der CLA, CLnA und CAA sowie ihrer nicht konjugierten Homologe bezogen auf die Gesamt-FSME im Fett von Mammakarzinomen, n = 12

Deutlich erkennbar ist der weitaus größere Anteil von CAA (1,10 %) am Gesamtfettsäuremuster im Vergleich zu CLnA mit einem Gehalt von nur 0,03 %. Während γ -Linolensäure mit 0,02 % nur in Spuren enthalten ist, beträgt der Anteil von α -Linolensäure 0,52 %.

4.3.4 UNTERSUCHUNG VON PROSTATAKARZINOMEN

Die Untersuchung der Prostatagewebeproben umfasste ebenfalls die abschätzende Bestimmung der Gehalte von CLnA und CAA bezogen auf die Gesamtfettsäuren. Es standen dazu TU, TF sowie FG der Bauchdecke von 22 Patienten zur Verfügung. Abbildung 4.19 zeigt die ermittelten Gehalte an Linolsäure, CLA, α - und γ -Linolensäure, CLnA, Arachidonsäure sowie CAA bezogen auf das Gesamfettsäuremuster der unterschiedlichen Gewebearten. Einzelergebnisse der GC-FID-Untersuchungen finden sich im Anhang 6.5.3 in Tabelle 6.18.



Abb. 4.19: Prozentuale Gehalte der CLA, CLnA und CAA sowie ihrer nicht konjugierten Homologe bezogen auf die Gesamt-FSME im Tumorgewebe (TU), tumorfreien nahe dem Tumor gelegenen Gewebe (TF) und im Fettgewebe (FG), n = 22

Zwischen den unterschiedlichen Gewebearten ist in den Gehalten der CLA mit 0,40 % im TU, 0,32 % im TF und 0,34 % im FG kein Unterschied festzustellen. Bei den aufgeführten Fettsäuren bzw. Fettsäuregruppen unterscheiden sich weiterhin deren Gehalte im TU nicht oder nur kaum von denen im TF. Auffällig ist der hohe Anteil von Arachidonsäure mit annähernd 5 % und CAA mit etwa 4 % im TU und im TF, während im FG nur 0,42 % bzw. 0,76 % nachweisbar waren. Auch die Konzentration an CLnA ist gegenüber dem FG im TU und TF mit 0,9 % gegenüber 0,01 % sichtbar erhöht. Wie auch schon die Analyse der Mammakarzinome ergab, war γ -Linolensäure im Gegensatz zu α -Linolensäure nur in Spuren bestimmbar.

4.3.5 DISKUSSION

Die Identifizierung der CLnA und CAA aus dem Fett eines Mammakarzinoms erwies sich trotz der für ein Karzinom großen Masse des Untersuchungsmaterials als schwierig. Dieses ist mit Sicherheit auf den geringen Fettgehalt von Tumorgewebe zurückzuführen. Die Fraktionierung konnte nicht ausreichend oft durchgeführt werden, so dass zur massenspektroskopischen Untersuchung nicht genügend Substanz zur eindeutigen Fragmentierung vorlag. Da die Entstehung von Tumoren meist frühzeitig erkannt wird, ist es in der Humanmedizin nur in Ausnahmen möglich, genügend Material zur Verfügung zu haben. Es ist daher ratsam, einen Pool aus vielen Tumorgewebeproben zusammenzustellen, um so eine gewisse Grundzusammensetzung hinsichtlich des FSME-Musters zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Isomer der CAA identifiziert. Mit den Doppelbindungen an den Positionen 5,8,11,13 könnte dieses Isomer durch Desaturierung und Elongation aus dem CLA-Hauptisomer C18:2 c9t11 entstanden sein. Denkbar ist aber ebenso eine Isomerisierung der Arachidonsäure. Die drei identifizierten Isomere der CLnA sind vermutlich auf die Isomerisierung von α -Linolensäure zurückzuführen, welche in gleicher Konzentration wie Gesamt-CLA enthalten ist. Bisher wurden Metaboliten von CLA in tierischen Gewebe nur nach vorausgegangener CLA-Fütterung nachgewiesen (SÉBÉDIO et al., 1997, BANNI et al., 1999). Untersuchungen von humanem Gewebe hinsichtlich CLA-Metaboliten sind derzeit nicht bekannt.

Die in den Mamma- und Prostatageweben bestimmten prozentualen Gehalte der Linolsäure, der α - und γ -Linolensäure sowie der Arachidonsäure stimmen mit in der Literatur genannten Werten gut überein (GNÄDIG 1996, RICKERT, 2002). GNÄDIG (1996) untersuchte humanes substernales Fettgewebe von gesunden Männern und Frauen. Arachidonsäure bestimmte sie mit einem mittleren Gehalt von 0,32 % der Gesamtfettsäuren, während α -Linolensäure mit 0,64 % etwas höher lag. Das CLA-Hauptisomer C18:2 c9t11 war in einer mittleren Konzentration von 0,34 % enthalten. RICKERT (2002) bestimmte sowohl in zehn Mammakarzinomen und tumornahem und tumorfernem Fettgewebe als auch in sechs Ovarialkarzinomen und Fettgewebe aus der Bauchdecke die Gehalte an CLA sowie weiterer Fettsäuren. In allen Gewebearten lag der Gehalt der Arachidonsäure zwischen 0,4 und 0,8 % der Ge-

70

samtfettsäuren, mit Ausnahme der Ovarialkarzinome. Hier bestimmte RICKERT (2002) einen mittleren Gehalt von 6,35 %. In der vorliegenden Arbeit betrug die Konzentration der Arachidonsäure in den Mammakarzinomen und im Fettgewebe der Prostatapatienten im Mittel 0,73 % bzw. 0,42 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren. In den Prostatakarzinomen und in tumorfreien Geweben nahe des Tumors wurden hingegen Arachidonsäure-Gehalte von 4,71 % bzw. 5,66% ermittelt. Während im Brustgewebe und im Fettgewebe vorwiegend Triacylglycerine auftreten, enthält Tumorgewebe deutlich mehr Phospholipide als Triacylglycerine. Prostatakarzinome sind kleine Gewebeknoten, welche überwiegend aus Membranen bestehen. Dieses ist eine Erklärung für den deutlich erhöhten Gehalt an Arachidonsäure im Prostatatumorgewebe. Das Gewebe, welches in dieser Arbeit als tumorfreies Gewebe aber nahe dem Tumor gelegenes Gewebe behandelt wurde, war in seiner Zusammensetzung dem Tumorgewebe sehr ähnlich. Es wird daher vermutet, dass auch dieses Gewebe aus der Prostata überwiegend von Membranen durchzogen ist und kaum Triacylglycerine enthält. BANNI et al. (1996) detektierten konjugierte Dienstrukturen der Linolsäure, der Linolensäure und der Eicosatriensäure in den Neutralfetten von Lammlebern sowie im Fettgewebe von Lämmern. Konjugierte Diene der Arachidonsäure wiesen sie in den Phospholipiden der Lammlebern nach. Untersuchungen von CLA in humanem Blutplasma, Fettgewebe und roten Blutkörperchen zeigten ebenfalls eine Akkumulation in den Geweben, welche reich an Neutralfetten sind (BANNI et al., 1999). Konjugierte CLA-Metaboliten der Linolensäure und der Eicosatriensäure, aber nicht der Arachidonsäure, waren in diesen unterschiedlichen biologischen Matrices ebenfalls mit Gehalten von 0,12 µg/mg Fett bzw. 0,62 µg/mg Fett nachweisbar. Weitere Untersuchungen in humanen Geweben beschränkten sich bisher meist auf den Nachweis und die Bestimmung von CLA, ohne hier jedoch die einzelnen Isomere zu unterscheiden sondern vielmehr Gesamt-CLA zu berücksichtigen. LAVILLONNIERE et al. (1998b) untersuchten CLA in 261 Brusttumorgeweben und in Fettgeweben und stellten einen höheren CLA-Gehalt im Tumorgewebe als im Fettgewebe fest. Allerdings stammten die Gewebeproben von unterschiedlichen Frauen. Eine Untersuchung des Fettgewebes von 67 Männern mit Postatakrebs ergab im CLA-Gehalt keinen Unterschied zum Fettgewebe 29 gesunder Männer (GALLAGHER et al., 1998). Allerdings wurde hier subkutanes Fettgewebe und nicht direkt das Tumorgewebe zur Bestimmung herangezogen. PETREK et al. (1997) konnten einen

71

erhöhten Gehalt an Arachidonsäure in Mammakarzinomen von 161 Frauen feststellen, ohne jedoch genaue Werte zu nennen. Ein erhöhter Arachidonsäure-Gehalt kann direkt mit einem erhöhten Auftreten des Eicosanoids PGE₂, dem Mediator bei Entzündungsprozessen, in Verbindung gebracht werden. So bestimmten BENNETT et al. (1987) im Magenfett annähernd 50 ng PGE₂/g Gewebe, während sie im Magentumorgewebe 140-480 ng PGE₂ quantifizierten. RICKERT (2002) ermittelte in zehn Mammakarzinomen einen mittleren Gehalt von 160 ng PGE₂/g Gewebe gegenüber 15 ng PGE₂/g Fettgewebe. Ähnliche Verhältnisse bestimmte er auch in den Ovarialkarzinomen und den dazugehörigen Fettgeweben.

Auf den Einfluss der Ernährung auf die Fettsäurezusammensetzung der unterschiedlichen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebearten konnte nicht eingegangen werden, da zu den einzelnen Patienten keine Angaben über die Ernährungsgewohnheiten vorlagen. Während die Entstehung von Brustkrebs durch die Ernährung beeinflussbar ist (World Cancer Research Fund, 1997), wurde diese Wirkung im Verlauf der Prostataerkrankung bisher nicht nachgewiesen. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse deuten vielmehr auf die Abhängigkeit der Fettsäurezusammensetzung von der Art und der Entnahme des untersuchten Gewebes hin. So lag bei den Prostatakarzinomen tatsächlich nur der Gewebeknoten als Probe vor, während bei den Mammakarzinomen die Anwesenheit von umliegendem Gewebe meist nicht ausgeschlossen werden konnte. Dieses spiegelt sich auch in den Probeneinwaagen wieder (siehe Anhang 6.2.3 und 6.2.4).

4.4 Zusammenfassende Diskussion zur Analytik von CLnA und CAA in biologischen Matrices

Die Analytik der CLnA und der CAA unterteilt sich in die identifizierenden Untersuchungen und die quantifizierenden Bestimmungen.

Die Identifizierung einzelner Isomere der CLnA und CAA aus den untersuchten biologischen Matrices erwies sich als schwierig. Dieses ist zum einen auf die nur sehr geringen Mengen der interessierenden Isomere zurückzuführen und zum anderen durch die weiterhin auftretende Überlagerung durch andere Majorfettsäuren zu erklären. Aus dem Käsefett erwies sich die Identifizierung anhand des beschriebenen Analysenweges als gut durchführbar. Es stand genügend Probenmaterial zur Verfügung, so dass die Fraktionierungen ausreichend oft wiederholt werden konnten (fünfmalige Vorfraktionierung mittels präparativer RP-HPLC und 40malige Fraktionierung mittels Ag⁺-HPLC einer Probe). Aufgrund des Gesamtfettsäuremusters von Käse traten Coelutionen von CLnA und CAA mit anderen Fettsäuren nur in geringem Maße auf. Die Bestimmung der geometrischen Anordnung der identifizierten Doppelbindungen durch partielle Hydrazin-Reduktion zeigte dennoch keinen Erfolg. Die Ag⁺-HPLC-Fraktionen enthielten zu hohe Anteile an C18-Fettsäuren, wodurch die Auswertung der entstehenden Monoene nicht möglich war. Die Gehalte der entstandenen C20:1-Monoene waren hingegen so gering, dass sie nicht ausreichend gut detektiert wurden. Im weiteren Verlauf der Analytik der anderen Untersuchungsproben wurde auf die Bestimmung der Konfiguration der Doppelbindungen verzichtet. Das Fett von mit CLA-gefütterten Karpfen wies einen weitaus höheren Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Käse auf und es gab hier Überlagerungen mit den CLnA und CAA, was somit zu unreinen Ag⁺-HPLC-Fraktionen führte. Hier sollte entweder die Vorfraktionierung mittels präparativer RP-HPLC oder aber die Fraktionierung mittels Ag⁺-HPLC weiter optimiert werden. Die unzureichende Identifizierung der CLnA und CAA aus den humanen Gewebearten ist schließlich auf die zu geringe Probenmenge zurückzuführen. Wie bereits erwähnt wäre hier zunächst die Aufstellung eines Pools von mehreren gleichartigen Gewebeproben von Vorteil.

Die Quantifizierung der CLnA und CAA ist in der vorliegenden Arbeit nur als eine Abschätzung zu sehen. Als CLnA bzw. CAA wurden sämtliche im gaschromatographischen Elutionsbereich der bei der alkalischen Isomerisierung der γ-Linolensäure und der Arachidonsäure entstandenen Isomere detektierten Verbindungen ausgewertet. Hierbei handelt es sich fälschlicherweise nicht immer tatsächlich um Isomere dieser Fettsäuren mit einem konjugierten Dien- oder auch Triensystemen. Dennoch war eine Tendenz in den unterschiedlichen biologischen Matrices bestimmbar. Sowohl bei den untersuchten Karpfenfilets standen Proben zum direkten Vergleich, nämlich Karpfen mit CLA-Fütterung und ohne CLA-Gabe, zur Verfügung als auch bei den humanen Gewebeproben (Untersuchungsmaterial aus dem Tumor und Fettgewebe). Hier wurden deutliche Unterschiede im Gehalt der CLnA und CAA festgestellt.

5 Zusammenfassung

Die Analytik sowie die physiologischen Wirkungen von CLA sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung auf dem Gebiet der Fette und Fettsäuren. Die Untersuchung von CLA-Metaboliten und anderen konjugierten Fettsäuren beschränkte sich bisher fast ausschließlich auf biologische Matrices, die aus Untersuchungen mit vorheriger CLA-Gabe stammten.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Analysenweg zur Identifizierung konjugierter Isomere der Linolensäure und der Arachidonsäure aus Lebensmitteln und Gewebearten aufgestellt. Es konnte eine deutliche Anreicherung der CLnA und CAA und gleichzeitige Isolierung von Majorfettsäuren durch die Vorfraktionierung mittels präparativer RP-HPLC und nachfolgender Fraktionierung mittels Ag⁺-HPLC erreicht werden. Die Bestimmung der Doppelbindungspositionen der CLnA und CAA erfolgte anhand der DMOX-Derivate mittels GC-MS. Zur Identifizierung der Konfiguration der Doppelbindungen wurde anschließend eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, direkt die DMOX-Derivate zur partiellen Hydrazin-Reduktion einzusetzen. Die entstandenen Monoene wurden dann hinsichtlich der Position und der Konfiguration mittels RP-HPLC getrennt und identifiziert. Es konnte so die vollständige Ausnutzung der fraktionierten Komponenten erreicht werden

Anhand des beschriebenen Analysenweges wurden in der Käsesorte Edamer neun Isomere der CLnA und 16 Isomere der CAA hinsichtlich ihrer Doppelbindungspositionen identifiziert. Es wurde anhand des charakteristischen UV-Spektrums mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 268 nm und der nachfolgenden GC-MS-Analyse neben konjugierten Dienen auch ein konjugiertes Trien-Isomer der Linolensäure nachgewiesen. Die Anwendung der entwickelten Methode zur Bestimmung der Konfiguration der Doppelbindungen erwies sich aufgrund von Koelutionen bei der Fraktionierung und folglich unreiner Fraktionen als schwierig. Fast sämtliche identifizierten CLnA und CAA sind vermutlich aus der Isomerisierung der α -Linolensäure entstanden, welche in einer Konzentration bis zu 1 % im Käsefett enthalten ist. Eine Metabolisierung aus CLA war nur für drei der identifizierten Isomere der CAA denkbar.

Unterschiede im Isomerenmuster der CLnA und CAA zwischen den untersuchten Käsegruppen Hartkäse, Schnittkäse, Weichkäse und Frischkäse wurden durch die Analyse mittels GC-FID und Ag⁺-HPLC nicht festgestellt.

Die Gehalte von CLnA und CAA wurden in dem Käse Edamer mit 0,5 % bzw. 0,2 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren abgeschätzt.

Als Beitrag zur Klärung des CLA-Stoffwechsels konnten im Filet von Karpfen, die eine in unterschiedlichen Konzentrationen CLA-haltige Futterzulage erhielten, sechs Isomere der CLnA und sieben Isomere der CAA identifiziert werden. Die Verstoffwechselung der verabreichten CLA konnte anhand der CLnA-Isomere C18:3 Δ 6,9,11 und C18:3 Δ 6,10,12 und des CAA-Isomers C20:4 Δ 5,8,12,14 gezeigt werden. Weitere Isomere der CLnA und CAA sind vermutlich aus Isomerisierung von z.B. α -Linolensäure entstanden.

Auch die ermittelten Gehalte der CLnA und der CAA sprechen zum Teil für eine Metabolisierung der CLA. So wurde ein deutlicher Abfall der Konzentration von Arachidonsäure mit einem gleichzeitigen Anstieg des CAA-Gehaltes bei Erhöhung der CLA-Konzentration des Futters im Fett der Karpfenfilets nachgewiesen. Eine deutliche Abnahme wurde auch bei dem Gehalt an Linolsäure festgestellt, während die Konzentrationen an CLA und CLnA mit zunehmender Menge an CLA im Futter anstieg.

Schließlich gelang die Identifizierung von fünf CLnA-Isomeren und einem CAA-Isomer in einem Mammakarzinom. Weitere Isomere dieser Fettsäuren wurden anhand ihres Molekülions bei der GC-MS-Analyse nachgewiesen, ohne jedoch identifiziert werden zu können.

Die Untersuchung von zwölf Mammakarzinomen ergab einen mittleren Gehalt von 1,1 % CAA gegenüber einem Gehalt von 0,7 % Arachidonsäure bezogen auf das Gesamtfettsäuremuster.

Zur Untersuchung von Prostatagewebe standen sowohl Karzinome als auch Fettgewebe von 22 Patienten zur Verfügung. Hier wurde ein Unterschied im Gehalt an CLnA, CAA und Arachidonsäure in den unterschiedlichen Gewebeproben deutlich. Während im Tumorgewebe annähernd 5 % Arachidonsäure neben 4 % CAA und 0,8 % CLnA enthalten waren, so betrugen die Gehalte dieser Fettsäuren im Fettgewebe nur 0,4 %, 0,7 % und 0,01 %.

76

5 Summary

At present the analysis and physiological properties of CLA are a focus of intensive research in the field of fat and fatty acids. Investigations on CLA metabolites have been limited almost solely to biological tissues, which derived from studies with CLA-feeding.

In the present study, initially an analytical way to identify conjugated isomers of linolenic acid and arachidonic acid in food and human tissues was established. Because of the low concentration of CLnA and CAA, a prefractionation by RP-HPLC followed by fractionation by Ag⁺-HPLC was performed to enhance and to separate these isomers from CLA and other fatty acids common in food or tissue. The position of double bonds of CLnA and CAA was determined as DMOX derivatives by GC-MS. To identify the configuration of double bonds a method was developed, which allows the direct use of DMOX derivatives for partial reduction with hydrazine. The resulting monoenes could be separated and identified by RP-HPLC with regard to position and configuration of the double bond. In this way the full use of fractionated CLnA and CAA could be achieved.

By this analytical method nine isomers of CLnA and 16 isomers of CAA could be identified in cheese fat with regard to double bond positions. One conjugated triene could be detected because of the characteristic UV spectrum with a maximum at a wavelength of 268 nm. Subsequent analysis by GC-MS confirmed this structure. Nearly all of the identified CLnA and CAA presumably resulted in isomerisation of α -linolenic acid. Cheese fat contains α -linolenic acid in concentrations up to 1 %. Only three identified isomers of CAA could be metabolised from CLA.

There were no differences in the pattern of isomers between various cheese groups (e.g. Cheddar, Edam, Camembert, cream cheese) detectable by using GC-FID as well as Ag⁺-HPLC.

A rough appraisal based on the distribution of total fatty acid methylesters of cheese fat using GC-FID resulted in 0.5 % or 0.2 % isomers of linolenic acid or arachidonic acid in cheese fat, respectively.

A contribution to clarifying the metabolism of CLA was the identification of six isomers of CLnA and seven isomers of arachidonic acid in filets of carp, which had been fed with a diet containing CLA in different concentrations. The metabolism of CLA could be shown by the isomers C18:3 Δ 6,9,11 and C18:3 Δ 6,10,12 as well as C20:4 Δ 5,8,12,14. Further identified isomers could have arisen from biohydrogenation of α -linolenic acid.

The determined contents of CLnA and CAA also indicated the metabolism of CLA. Whereas an obvious decrease in the content of arachidonic acid was established in fat of carp filets, the content of CAA increased with an increase of CLA concentration in the diet. In addition, the concentration of linolenic acid decreased and the concentration of CLA and CLnA increased.

Finally we succeeded in identifying five CLnA isomers and one CAA isomer in human mammary carcinoma. Further isomers of these fatty acids could be detected by using GC-MS because of the prominent molecular ions, but they could not be identified. Investigation of twelve mammary carcinoma showed a content of 1.1 % and 0.7 % for CAA or arachidonic acid in total fat, respectively.

For determination of CLnA and CAA in prostate tissue, carcinoma as well as adipose tissue from 22 patients were available. Obvious differences in the content of CLnA, CAA and arachidonic acid in the different tissues were detectable. Whereas in carcinoma about 5 % arachidonic acid and 4 % CAA and 0.8 % CLnA were detectable, the contents of these fatty acid were only 0.4 %, 0.7 % and 0.01 %, respectively.

6 Anhang

6.1 Referenzsubstanzen

6.1.1 FSME-STANDARD

Der FSME-Standard wurde von Sigma Chemical Co., Deisenhofen bezogen. Entsprechend der Elutionsreihenfolge bei der GC-FID-Analyse sind die enthaltenen FSME in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

FSME	Name der Fettsäure		Konzentration
-	Systematischer Name	Trivialname	[mg/mL]
C 4:0	Butansäure	Buttersäure	0,2
C 6:0	Hexansäure	Capronsäure	0,2
C 8:0	Octansäure	Caprylsäure	0,2
C 10:0	Decansäure	Caprinsäure	0,2
C 11:0	Undecansäure		0,1
C 12:0	Dodecansäure	Laurinsäure	0,2
C 13:0	Tridecansäure		0,1
C 14:0	Tetradecansäure	Myristinsäure	0,2
C 14:1 c9	9-cis-Tetradecensäure	Myristoleinsäure	0,1
C 15:0	Pentadecansäure		0,1
C 15:1 c10	10-cis-Pentadecensäure		0,1
C 16:0	Hexadecansäure	Palmitinsäure	0,3
C 16:1 c9	9-cis-Hexadecensäure	Palmitoleinsäure	0,1
C 17:0	Heptadecansäure	Margarinsäure	0,1
C 17:1 c10	10-cis-Heptadecensäure		0,1
C 18:0	Octadecansäure	Stearinsäure	0,2
C 18:1 t9	9-trans-Octadecensäure	Elaidinsäure	0,1
C 18:1 c9	9-cis-Octadecensäure	Ölsäure	0,2
C 18:2 t9,t12	all-trans-9,12-Octadecadiensäure	Linolelaidinsäure	0,1
C 18:2 c9,c12	all-cis-9,12-Octadecadiensäure	Linolsäure	0,1
C 20:0	Eicosansäure	Arachinsäure	0,2
C 18:3 n6	all-cis-6,9,12-Octadecatriensäure	γ-Linolensäure	0,1
C 18:3 n3	all-cis-9,12,15-Octadecatriensäure	α -Linolensäure	0,1
C 20:1 c11	11-cis-Eicosensäure		0,1
C 21:0	Heneicosansäure		0,1
C 20:2 n6	all-cis-11,14-Eicosadiensäure		0,1
C 22:0	Docosansäure	Behensäure	0,2
C 20:3 n6	all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure		0,1
C 20:3 n3	all-cis-11,14,17-Eicosatriensäure		0,1
C 22:1 c13	13-cis-Docosensäure	Erucasäure	0,1
C 20:4 n6	all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure	Arachidonsäure	0,1
C 23:0	Tricosansäure		0,1
C 22:2 n6	all-cis-13,16-Docosadiensäure		0,1
C 20:5 n3	all-cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaen-säure		0,1
C 24:0	Tetracosansäure	Lignocerinsäure	0,2
C 24:1 c15	15-cis-Tetracosensäure	Nervonsäure	0,1
C 22:6 n3	all-cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure		0,1

Tab. 6.1: Zusammensetzung des FSME-Standards in der Reihenfolge der Elution, gelöst in n-Hexan

6.1.2 CLA-STANDARD

Das CLA-Isomerengemisch wurde ebenfalls von Sigma Chemical Co., Deisenhofen bezogen. Die als Methylester enthaltenen Isomere sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Tab. 6.2: Zusammensetzung des CLA-Standards, gelöst in n-Hexan

CLA-Isomer	Konzentration
	[mg/mL]
C 18:2 t12t14	0,017
C 18:2 t11t13	0,037
C 18:2 t10t12	0,073
C 18:2 t9t11	0,059
C 18:2 t8t10	0,021
C 18:2 t7t9	0,008
C 18:2 c/t12,14	0,006
C 18:2 c11t13	1,156
C 18:2 t10c12	1,471
C 18:2 c9t11	1,434
C 18:2 t8c10	0,617
C 18:2 c11c13	0,045
C 18:2 c10c12	0,026
C 18:2 c9c11	0,029
C 18:2 c8c10	0,004

6.1.3 FSME-EINZELSTANDARDS

Zur alkalischen Isomerisierung und zur Identifizierung der entstandenen Monoene aus der partiellen Hydrazinreduktion wurden folgende, ebenfalls von Sigma Chemical Co., Deisenhofen erworbenen Einzelstandards der FSME verwendet:

FSME	Name der Fettsäure	Konzentration
	Systematischer Name	[mg/mL]
C 18:1 c6	6-cis-Octadecensäure	1,0
C 18:1 t6	6-trans-Octadecensäure	1,0
C 18:1 c7	7-cis-Octadecensäure	1,0
C 18:1 t7	7-trans-Octadecensäure	1,0
C 18:1 c9	9-cis-Octadecensäure	1,0
C 18:1 t9	9-trans-Octadecensäure	1,0
C 18:1 c11	11-cis-Octadecensäure	1,0
C 18:1 t11	11-trans-Octadecensäure	1,0
C 18:1 c12	12-cis-Octadecensäure	1,0
C 18:1 t12	12-trans-Octadecensäure	1,0
C 18:1 c13	13-cis-Octadecensäure	1,0
C 18:1 t13	13-trans-Octadecensäure	1,0
C 18:1 c15	15-cis-Octadecensäure	1,0
C 18:1 t15	15-trans-Octadecensäure	1,0
C 18:3 n6	all-cis-6,9,12-Octadecatriensäure	1,0
C 20:0	Eicosansäure	2,7
C 20:1 c5	5-cis-Eicosensäure	2,5
C 20:1 c8	8-cis-Eicosensäure	2,5
C 20:1 c11	11-cis-Eicosensäure	2,5
C 20:1 t11	11-trans-Eicosensäure	2,5
C 20:1 c13	13-cis-Eicosensäure	2,5
C 20:2 n6	all-cis-11,14-Eicosadiensäure	2,5
C 20:3 n6	all-cis-8,11,14-Eicosatriensäure	2,5
C 20:3 n3	all-cis-11,14,17-Eicosatriensäure	2,5
C 20:4 n6	all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraensäure	5,0

Tab. 6.3: Einzelne verwendete FSME-Standards, gelöst in n-Hexan

6.2 Untersuchungsmaterial

6.2.1 KÄSEPROBEN

Die acht untersuchten Käseproben stammten aus einem Hamburger Supermarkt. Sie wurden nach dem Einkauf bei –18 °C tiefgekühlt gelagert.

Käsegruppe	Sorte	Fettgehalt
		[% Fett i.Tr.]
Hartkäse	Englischer Cheddar	50
	Feinster Irischer Cheddar	48
Schnittkäse	Kugeledamer	40
	Edamer Classic	40
Weichkäse	Deutscher Camembert	45
	Feiner Camembert – Rügener Badejunge	45
Frischkäse	Philadelphia	70
	Exquisa	70

6.2.2 KARPFENPROBEN

Die Schlachtung und das Filetieren der Karpfen (Spiegelkarpfen, *Cyprinus carpio* L.) wurden im Institut für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München durchgeführt (MAAß, 2002). Die Filets wurden tiefgefroren geliefert und sofort bei –80 °C gelagert. Es wurde jeweils das rechte Filet der Karpfen verwendet. Im Nachfolgenden sind die Futterrationen sowie die Nummerierungen der Karpfen aufgeführt.

CLA-Zulage [%]	Nummerier	ung	
0	K-K 1(18)	K-K 1(8)	K-K 1(11)	
1	1-K 1(41)	1-K 1(46)	1-K 1(48)	
3	3-K 5(3)	3-K 18(2)	3-K 18(8)	
	3-K 15(3)	3-K 18(7)	3-K 15(4)	

Tab. 6.5: Nummerierung der untersuchten Karpfen

Tab. 6.6: Zusammensetzung der Futterrationen [%] der untersuchten Karpfen (MAAß, 2002)

	Fettgehaltstufe I		
	Kontrolle	CLA 1 %	CLA 3 %
Maisquellstärke Eiweißkonzentrat	30,00	30,00	30,00
Sojaisolat	22,55	22,55	22,55
Fischmehl	17,00	17,00	17,00
Casein	10,00	10,00	10,00
Fettkonzentrat			
Sojaöl	2,00	2,00	2,00
Leinöl	2,00	2,00	2,00
Sonnenblumenöl	3,00	2,00	_
CLA - Zulage	-	1,00	3,00
Cellulose	9,00	9,00	9,00
Mineralstoffvormischung	3,50	3,50	3,50
Vitaminvormischung	0,70	0,70	0,70
Chromoxid	0,25	0,25	0,25
BHT	100mg	100mg	100mg

Fettsäure	Anteil [%]
C 16:0	5,54
C 18:0	3,15
C 18:1 c9	25,04
C 18:1 c11	0,71
C 18:2 c9c12	2,84
C 18:3 o3	0,16
CLA	62,71

Tab: 6.7: Zusammensetzung des CLA-Zulagenöls bezogen auf Gesamt-FSME mittels GC-FID (MAAß, 2002)

Tab: 6.8: Bestimmung des CLA-Isomerenmusters bezogen auf Gesamt-CLA mittels Ag⁺-HPLC (Maaß, 2002)

CLA-Isomer	Anteil [%]
C 18:2 t12,t14	0,19
C 18:2 t11,t13	0,82
C 18:2 t10,t12	3,19
C 18:2 t9,t11	3,00
C 18:2 t8,t10	0,77
C 18:2 t7,t9	0,33
C 18:2 c12,t14	0,26
C 18:2 c11,t13	16,19
C 18:2 t10,c12	29,51
C 18:2 c9,t11	25,46
C 18:2 t8,c10	13,99
C 18:2 c11,c13	0,65
C 18:2 c10,c12	2,71
C 18:2 c9,c11	2,32
C 18:2 c8,c10	0,61

6.2.3 BRUSTGEWEBEPROBEN

Die Brustgewebeproben wurden von Herrn Prof. Dr. H. T. Öney, Chefarzt der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Zentralkrankenhauses Links der Weser, Bremen, zur Verfügung gestellt. Von einer Patientin stand neben dem Karzinom auch Fettgewebe zur Untersuchung bereit. Diese Proben dienten der Identifizierung der CLnA und CAA in menschlichem Gewebe. Zwölf weitere Mammakarzinomgewebe wurden zur Abschätzung des Gehaltes an CLnA und CAA herangezogen. In der nachfolgenden Tabelle sind die Nummerierungen, z.T. die Geburtsjahrgänge der Patientinnen sowie die Massen der Karzinomgewebe aufgeführt:

Nummerierung	Laufende Nummer	Geburtsjahr	Masse [g]
M1	34341		1,3378
M2	34888/00		0,2828
M3	36948/00		1,2543
M4		1939	0,5108
M5	ENR 38244	1940	1,2193
M6	358449	1946	0,8105
M7	E: 35874	1925	0,9415
M8		1921	0,7961
M9			0,8156
M10		1937	0,7264
M11	34506 A/00	1934	0,4638
M12	36548/00	1901	0,3677

Tab. 6.9: Mammakarzinome

6.2.4 PROSTATAGEWEBEPROBEN

Die Prostatagewebeproben sowie die jeweiligen Fettgewebeproben desselben Patienten wurden von Herrn Prof. Dr. med. R. Tauber, Chefarzt der urologischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Barmbek, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Zur Untersuchung standen Prostatakarzinome (TU), Gewebe, welche nahe dem Tumor gelegen waren, aber keine Tumoranzeichen zeigten (TF) und Fettgewebe (FG) aus der Bauchdecke von 22 Patienten zur Verfügung. Die Massen der zur Untersuchung eingesetzten Proben sowie die Nummerierungen können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden:

Tab. 6.10: Prostatagewebeproben

Nummer	Art	Gewicht [g]
11675/00	TU	0,4342
	TF	0,4416
	FG	0,2397
11448	TU	0,2985
	IF	0,2069
11719/00		0,2327
117 13/00	TF	0.2452
	FG	0,1258
10419	TU	0,3882
	TF	0,5589
10251/00	FG	0,2171
10251/00		0,5217
	FG	0.3984
9155/00	TU	0,1037
	TF	0,1251
	FG	0,2749
11651	TU	0,1711
	IF FG	0,1479
11620	TU	0,1009
11020 11	TF	0.4935
	FG	0,1218
10174	TU	0,8638
	TF	1,3789
	FG	0,5159
9894	IU	0,6378
	FG	0,0090
12309	TU	0 1343
12000	TF	0,1575
	FG	0,1033
7657	TU	0,2133
	TF	0,7976
44774	FG	0,4143
11771	TO	0,5422
	FG	0.1476
8140	TU	0,1110
	TF	0,2571
	FG	0,2834
11501	TU	0,3497
	FG	0,3140
11692	TU	0,0900
	TF	0,2249
	FG	0,1367
9646	TU	0,8621
	IF FO	0,4566
12108		0,5455
12100	TF	0,3304
	FG	0,1831
8802	TU	0,2334
	TF	0,1473
0704	FG	0,4235
8761		0,1536
	FG	0,1014
11715	TU	0,1407
	TF	0,1306
	FG	0,1567
8710	TU	0,3376
	TF	0,1428
	FG	0,2002

6.3 Analysenmethoden

6.3.1 ALKALISCHE ISOMERISIERUNG

- 20 g Ethylenglykol und 3 g Natriumhydroxid in einen 250-ml-Dreihalsrundkolben geben
- unter Rühren im Ölbad erhitzen, bis sich das Natriumhydroxid gelöst hat
- Gemisch 10 Minuten bei 180 °C unter Rückfluß und Stickstoffzufuhr erhitzen
- 30-100 mg Fettsäuremethylester in den Rundkolben geben
- 30 Minuten bei 180 °C erhitzen
- nach dem Abkühlen mit konz. Schwefelsäure ansäuern
- die entstandenen freien Fettsäuren dreimal mit je 30 ml n-Hexan extrahieren
- vereinigte n-Hexan-Extrakte am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 200 mbar bis zur Trockene einengen
- isomerisierte Fettsäuren in 5 ml n-Hexan aufnehmen und mit Trimethylsilyldiazomethan verestern (siehe 6.3.3.2)

6.3.2 FETTEXTRAKTION

6.3.2.1 Käse

- Tiefgekühlte Käseprobe mit Hilfe eines Messers fein zerkleinern
- 10 g der zerkleinerten Probe in ein Zentrifugenglas einwiegen
- 20 g wasserfreies Natriumsulfat und 30 ml n-Hexan hinzufügen
- 90 Sekunden mit dem Ultra-Turrax unter Eiskühlung zerkleinern und extrahieren
- überstehendes n-Hexan durch ein Filter in einen 250-ml-Rundkolben dekantieren
- Rückstand noch zweimal mit je 30 ml n-Hexan verrühren und extrahieren
- Extrakte vereinigen und über wasserfreiem Natriumsulfat filtrieren
- vereinigte Extrakte am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 200 mbar bis zur Trockene einengen
- 50-100 mg extrahiertes Fett in 1 ml n-Hexan aufnehmen und zur Umesterung einsetzen (siehe 6.3.3.1)

6.3.2.2 Karpfen

- tiefgekühltes Karpfenfilet mit Hilfe eines Messers fein zerkleinern
- mittels einer Moulinette® weiter zerkleinern
- 15 g der zerkleinerten Probe in einen 100-ml-Rundkolben geben
- Proben über Nacht gefriertrocknen
- gefriergetrocknete Probe in ein 50-ml-Zentrifugenglas geben
- 20 ml Dichlormethan/Methanol (2:1; v/v) hinzufügen
- 2 Minuten mit dem Ultra-Turrax zerkleinern und extrahieren
- 10 Minuten zentrifugieren (5000 rpm)
- Überstand in einen 250-ml-Rundkolben dekantieren
- Extraktion des aufgelockerten Rückstandes zweimal mit 15 ml Dichlormethan/Methanol (2:1; v/v) und einmal mit 15 ml n-Hexan im Ultraschallbad für je 5 Minuten
- vereinigte Extrakte am Rotationsverdampfer bis zur Trockene einengen, Druck dabei stufenweise von 600 auf 40 mbar senken, Wasserbadtemperatur: 40 °C
- 50-100 mg extrahiertes Fett in 1 ml n-Hexan aufnehmen und zur Umesterung einsetzen (siehe 6.3.3.1)

6.3.2.3. Humangewebe

- tiefgekühlte Gewebeprobe mit einem Skalpell fein zerkleinern
- zur Unterstützung der Zerkleinerung der Zellen Seesand hinzugeben
- mit 3 ml Dichlormethan/Methanol (2:1; v/v) im Mörser extrahieren
- über wasserfreies Natriumsulfat in ein Schraubdeckelreagenzglas filtrieren
- Extraktion einmal mit Dichlormethan/Methanol (2:1; v/v) und einmal mit n-Hexan wiederholen
- Vereinigte Extrakte im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen
- Extrahiertes Fett in 500 µl n-Hexan aufnehmen und zur Umesterung einsetzen (siehe 6.3.3.1)

6.3.3 DERIVATISIERUNGEN

6.3.3.1 Umesterung mit methanolischer Kaliummethylatlösung zu FSME

- 50-100 mg des extrahierten Fettes (6.3.2) in ein Schraubdeckelreagenzglas einwiegen und in 1 ml n-Hexan lösen
- 1 ml 5%ige methanolische Kaliummethylatlösung hinzufügen und gut schütteln
- 15 Minuten bei 60 °C im Trockenschrank umestern
- 10 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- mit 2%iger Schwefelsäure gegen Phenolphthalein als Indikator neutralisieren und gut schütteln
- 10 Minuten zur Phasentrennung zentrifugieren (4000 rpm)
- die n-Hexanphase in ein Probenvial pipettieren und im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen
- Injektion von je 20 μl bzw. 50 μl (zur Fraktionierung) in die Ag⁺-HPLC, 2 ml in die präparative RP-HPLC und 1 μl in den GC-FID

6.3.3.2 Veresterung mit Trimethylsilydiazomethan

- 1 ml der in n-Hexan gelösten Fettsäuren (siehe 6.3.1) in ein Schraubdeckelreagenzglas überführen
- 2 ml Methanol hinzufügen und gut schütteln
- 500 µl 2 M Trimethylsilyldiazomethan-Lösung in Methanol hinzugeben
- 30 Minuten auf dem Magnetrührer rühren
- vorsichtig 3 Tropfen Eisessig hinzugeben (Stickstoff-Freisetzung)
- 2 ml n-Hexan und 5 ml dest. Wasser hinzugeben, schütteln und 10 Minuten zentrifugieren (4000 rpm)
- obere n-Hexan-Phase abnehmen, im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen und FSME in 500 µl n-Hexan aufnehmen
- Injektion von je 20 μl in die Ag⁺-HPLC bzw. 1 μl in den GC-FID

6.3.3.3 Synthese von DMOX-Derivaten aus FSME

- an der Ag⁺-HPLC fraktionierte FSME bzw. je 500 µl der FSME-Einzelstandards (siehe 6.1.3) in je ein Probenvial geben und im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen
- FSME in 500 µI AMP aufnehmen
- Probenvial gut verschließen und abdichten
- 18 Stunden im Edelstahlblock auf dem Magnetrührer bei 180 °C erhitzen
- 1 Stunde bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Reaktionsgemisch mit 5 ml Dichlormethan in ein Schraubdeckelreagenzglas überführen
- zweimal mit je 2 ml dest. Wasser ausschütteln
- 10 Minuten zentrifugieren (4000 rpm)
- wäßrige Phase abpipettieren
- Dichlormethanphase über wasserfreies Natriumsulfat in ein 10-ml-Probenglas filtrieren
- Filter mit 4 ml Dichlormethan nachspülen
- DMOX-Derivate im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen und in 50 µl (Fraktionen) bzw. 1 ml (FSME-Standards) n-Hexan aufnehmen
- Injektion von je 2 µl (Fraktionen) bzw. 1 µl (FSME-Standards) in den GC-FID und den GC-MS

6.3.4 PARTIELLE HYDRAZINREDUKTION

- DMOX-Derivate (siehe 6.3.3.3) im Stickstoffstrom bis zur Trockene einengen
- mit 2 ml Hydrazin in 30 ml Ethanol (96%ig) in einen 250-ml-Dreihalskolben überführen
- unter leichter Sauerstoffzufuhr bei 40 °C rühren
- nach 5 Stunden 120 ml dest. Wasser hinzufügen
- dreimal mit je 40 ml n-Hexan im Scheidetrichter ausschütteln
- die vereinigten n-Hexanphasen zweimal mit je 40 ml dest. Wasser waschen und anschließend durch wasserfreies Natriumsulfat in einen 250-ml-Rundkolben filtrieren
- n-Hexan am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 200 mbar bis zur Trockene abziehen
- die reduzierten DMOX-Derivate in 100 μl n-Hexan aufnehmen und 1-2 μl in den GC-MS bzw. 20 μl in die RP-HPLC injizieren

6.4 Geräte und Messparameter

6.4.1 GC-FID

Gerät:	Hewlett Packard 6890 Gas Chromatograph mit Autosampler					
	Hewlett Packard 6890 Series II; Waldbronn; Deutschland					
Auswertung:	HP-Chem Station Version A.04.02					
Säule:	CP-SIL 88, 100 m x 0,25 mm ID, 0,2µm Filmdicke, Fa.					
	Chrompack, Middelburg, Niederlande					
Trägergas:	Wasserstoff, 1,7 ml/min, 1,8 bar					
Make-up-Gas:	Stickstoff, 40 ml/min					
Brennergase:	Luft, 300 ml/min					
	Wasserstoff, 30 ml/min					
Injektortemperatur:	200 °C					
Injektionsvolumen:	1 µl					
Split:	1:20					
Detektortemperatur:	260 °C					
Temperaturprogramm:	75 °C, 2 Minuten isotherm					
	2 °C/min auf 175 °C, 20 Minuten isotherm					
	5 °C/min auf 200 °C, 15 Minuten isotherm					
	2 °C/min auf 235 °C, 5 Minuten isotherm					

6.4.2 GC-MS

Gerät:	Hewlett Packard 5890 Series II Gas Chromatograph, Wald-		
	bronn, Deutschland		
Auswertung:	MS Chem. Station G1034C 2.00,		
Säule:	CP-SIL 88, 50 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke		
Detektor:	Hewlett Packard 5971 A Mass Selective Detektor		
Trägergas:	Helium, 1,0 ml/min		
Injektortemperatur:	250 °C		
Injektionsvolumen:	1-2 μl		
Split:	1 Minute splitless, anschließend 1:10		
Detektortemperatur:	280 °C		
Ionisationsenergie:	Elektronenstoßionisation, 70 eV		
Temperaturprogramm:	120 °C, 2 Minuten isotherm		
	2 °C/min auf 175 °C, 20 Minuten isotherm		
	5 °C/min auf 200 °C, 15 Minuten isotherm		
	2 °C/min auf 260 °C, 5 Minuten isotherm		

6.4.3 PRÄPARATIVE RP-HPLC

Gerät:	NovaPrep _® 200 Merck, Darmstadt, Deutschland
Controller:	intern
Auswertung:	LC ReSponder Version 1.15, © 1998 R & S Technologies
Säule:	LiChrospher 100 RP18, 7 µm Partikelgröße, Merck, Hibar
	Pre-Packed Column RT 250-25 Customized Packing, Darm-
	stadt, Deutschland
Detektor:	Merck Hitachi UV Detektor L-7400, LaChrom
mobile Phase:	Acetonitril, isokratisch
Flussrate:	20 ml/min
Injektionsvolumen:	2 ml

6.4.4 AG⁺-HPLC

Gerät:	Merck Hitachi 655 A-12 Liquid Chromatograph			
Controller:	Merck Hitachi L-5000 LC Controller			
Auswertung: PC mit Auswertungssoftware				
	a) Chromstar Version 3.20			
	b) Millennium ³² Version 3.05.01, Chromatography Manager,			
	1998 Waters Corp.			
Säule:	a) 2 x ChromSpher 5 Lipids, 4,6 mm ID * 250 mm stainless			
	steel, 5 µm Partikelgröße, Fa. Chrompack, Middelburg,			
	Niederlande			
	b) ChromSpher 5 Lipids, 10 mm ID * 250 mm stainless steel,			
	5 µm Partikelgröße, Fa. Chrompack, Middelburg, Nieder-			
	lande			
Detektor:	a) Knaur Variable Wavelength Monitor, λ = 234 nm			
	b) Waters 996, Photodioden-Array-Detektor, λ = 200-400 nm			
mobile Phase:	0,1 % Acetonitril in n-Hexan, isokratisch			
Flussrate:	1 ml/min			
Injektionsvolumen:	20 μl (Analyse) bzw. 50 μl (Fraktionierung)			

6.4.5 RP-HPLC

Gerät:	Merck Hitachi 655 A-12 Liquid Chromatograph
Controller:	Merck Hitachi L-5000 LC Controller
Auswertung:	PC mit Auswertungssoftware Millennium ³² Chromatography
	Manager, 1998 Waters Corp.
Säule:	$LiChrospher_{\circledast}$ 100, RP 18, 4,6 mm ID * 250 mm, 5 μm
	Partikelgröße, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Detektor:	Knaur Variable Wavelength Monitor, , λ = 206 nm
mobile Phase:	Acetonitril / Wasser (80:20, v/v), isokratisch
Flussrate:	1 ml/min und 2 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl

6.4.6 SONSTIGE GERÄTE

Analysenwaage:	Typ 2842, Sartorius, Göttingen
Waage:	P1210, Mettler, Gießen
Rotationsverdampfer:	VV 2000, Heidolph, Schwabach
Trockenschrank:	BI 3645 E, Heraeus, Hanau
Magnetrührer:	Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
Zentrifuge:	Heraeus Christ Labofuge, Osterode/Harz
Ultraschallbad:	Bransonic 12, Elma, Singen
Ultra-Turrax:	Janke & Kunkel T 25, IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
Ethanolbad:	FOC-1 K40, Christ, Osterode/Harz
Gefriertrocknung:	LOC-2 Beta 1-16, Christ, Osterode/Harz

6.5 GC-FID-Ergebnisse

6.5.1 KÄSE

Tab. 6.11: Fettsäurezusammensetzung der RP-HPLC-Fraktionen des Käsefettes

Fraktion	Qualitative Fettsäurezusammensetzung
1	C10, C11, C14, C15, C16, C18:1 c9, C20:5 n3
2	C12, C14, C14:1 c9, C15, C16, C16:1 c9, C17, C18, C18:1 c9, C18:3 n3 und Iso- mere, C20:2 n6, C20:4 n6 und Isomere
3	C14, C14:1 c9, C15, C16, C16:1 c9, C17, C17:1 c10, C18:1 c9, C18:2 n6 und CLA, C20:3 n3
4	C18:1 c9
5	C16, C18, C18:1-Isomere

Tab. 6.12: Prozentuale Gehalte der Fettsäuren bezogen auf die Gesamt-FSME im Käsefett

FSME	Gehalt [%]
C 6:0	0,47
C 8:0	1,03
C 10:0	2,93
C 11:0	0,07
C 12:0	4,26
C 13:0	0,10
C 14:0	12,50
C 14:1 c9	1,14
C 15:0	1,28
C 16:0	33,16
C 16:1 c9	0,33
C 17:0	0,25
C 17:1 c10	0,31
C 18:0	12,81
C 18:1 (versch. Isomere)	27,21
C 18:2 c9,c12	0,38
C 20:0	0,21
C 18:3 n3 / 20:1 c11	0,87
C 22:0	0,08
C 20:3 n6	0,08
C 22:1 c13 / 20:3 n3	0,03
C 20:4 n6	0,10
C 20:5 n3	0,09
C 24:0	0,05
CLnA	0,51
САА	0,26

6.5.2 KARPFEN

Fraktion	Qualitative Fettsäurezusammensetzung
1	C18:1 c9, C20:5 n3
2	C14:1 c9, C16, C17:1 c10, C18:1 t9, C18:1 c9, C18:3 n3 und C18:3 n6 und Iso- mere, C20:1 c11, C20:4 n6 und Isomere, C20:5 n3, C22:6 n3
3	C14, C15, C16:1 c9, C17:1 c10, C18:2 n6 und CLA, C20:1 c11, C20:3 n3 und C20:3 n6, C22:6 n3
4	C12, C14, C15, C15:1 c10, C16, C16:1 c9, C18:1 c9, C20:2 n6, C22:6 n3
5	C12, C16, C17, C18:1 c9, C20:1 c11, C22:2 n6

Tab. 6.13: Fettsäurezusammensetzung der RP-HPLC-Fraktionen des Karpfenfettes (1 % CLA-Zulage)

	K-K 1 (18) K-K 1(8)	К	-K 1(11)	1-K 1(41)	1-K 1(46)	1-K 1(48)
C 4	0.00*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C 6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C 8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C 10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
C 11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C 12	0,05	0,07	0,07	0,09	0,10	0,08
C 13	0.01	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02
C 14	1,71	1,75	1,85	2,43	2,14	2,07
C 14:1 c9	0,10	0,13	0,10	0,10	0,14	0,17
C 15	0,18	0,17	0,22	0,23	0,20	0,21
C 15:1 c10	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,05
C 16	14,99	14,57	14,91	15,66	12,91	15,32
C 16:1 c9	4,02	4,28	3,72	3,98	4,00	5,84
C 17	0,35	0,28	0,34	0,16	0,15	0,15
C 17:1 c10	0,11	0,07	0,13	0,19	0,20	0,18
C 18	4,53	2,85	7,13	7,26	5,70	5,49
C 18:1 t9	0,00	0,00	0,00	0,27	0,29	0,23
C 18:1 c9	21,87	23,48	21,93	24,09	22,63	24,10
C 18:1 c11	2,69	3,55	1,09	2,15	2,01	2,26
C 18:2 t9,t12	0,00	0,08	0,00	0,09	0,09	0,09
C 18:2 c9,c12	21,80	21,82	21,05	20,26	21,21	18,07
C 20	0,04	0,04	0,05	0,11	0,09	0,09
C 18:3 n6	0,22	0,22	0,23	0,33	0,50	0,40
C 20:1	0,10	0,11	0,10	0,00	0,00	0,00
C 18:3 n3	15,03	15,99	14,93	8,22	9,64	8,36
C 18:2 c9,t11 / t8,c10	0,02	0,02	0,03	0,09	0,05	0,09
C 18:2 C11t13	0,01	0,00	0,03	1,03	1,10	0,93
C 18:2 t10,C12	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00
C 18:2 C8,C10 / C9,C11	0,00	0,01	0,01	0,45	0,43	0,43
C 18:2 C11,C13	0,00	0,00	0,00	0,12	0,53	0,47
	0,01	0,07	0,00	0,19	0,00	0,18
	0,00	0,00	0,00	0,04	0,14	0,00
C 18.2 C10,C12	0,00	0,00	0,00	0,51	0,00	0,12
CLIAZ CLIAZ	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
C 18:2 t11 t13	0,55	0,00	0,00	0,02	0,00	1.28
C 18:2 t12 t14	0,00	0,04	0,58	0,02	0,01	1,20
C 18:2 t8 t10 / t9 t11 / t10 t12	0,00	0,00	0,00	0.08	0.10	0,00
C 20:2 n6	0.92	0,07	0,07	0.08	0,10	0,00
CL nA4	0.01	0.01	0,01	0,00	0.04	0.05
C 22	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.03
C 20:3 n6	0.00	0.00	0.00	0.53	0.67	0.61
C 22:1 c13	1,27	1,29	1,32	0,47	0,43	0,43
C 20:3 n3	0,49	0,43	0,75	0,97	0,83	0,90
C 20:4 n6	0,69	0,69	0,72	0,46	0,60	0,54
CAA1	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
C 23	0,00	0,00	0,00	0,03	0,05	0,04
CAA2	0,03	0,04	0,03	0,46	0,54	0,50
CAA3	0,02	0,02	0,02	0,05	0,00	0,00
CAA4	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
C 22:2 c13,c16	0,05	0,05	0,06	0,00	0,00	0,00
C 20:5 n3	1,59	1,71	2,03	2,29	3,00	3,15
C 24	0,01	0,03	0,03	0,00	0,03	0,03
CLnA5	0,01	0,02	0,02	0,00	0,02	0,02
CLnA6	0,03	0,03	0,03	0,00	0,05	0,04
CLnA7	0,04	0,04	0,04	0,00	0,08	0,08
CLnA8	0,01	0,02	0,02	0,05	0,00	0,00
C 24:1 c15	0,07	0,07	0,07	0,04	0,04	0,04
CAA4a	0,07	0,00	0,12	0,12	0,16	0,02
CAA5	0,00	0,07	0,00	0,07	0,07	0,07
CAA6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,54	0,59	0,64
	0,55	0,48	0,57	0,01	0,01	0,01
C 22:0 N3	3,58	3,74	4,33	4,12	5,76	5,56
CAATU	0,17	0,10	0,18	0,04	0,04	0,03

Tab. 6.14: Prozentuale Gehalte der Fettsäuren bezogen auf die Gesamt-FSME im Fett der Kontrollkarpfen und der Karpfen mit 1 % CLA-Zulage

* 0,00 entspricht < 0,01 %
| | 3-K 5 (3) | 3-K 15 (3) | 3-K 18 (2) | 3-K 18 (7) | 3-K 18 (8) | 3-K 15 (4) |
|----------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| C 4 | 0,00* | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C 6 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C 8 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C 10 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C 11 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| C 12 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,08 | 0,06 | 0,07 |
| C 13 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,02 |
| | 1,80 | 1,67 | 1,67 | 2,06 | 1,51 | 1,72 |
| 0 14:1 09 | 0,07 | 0,05 | 0,08 | 0,08 | 0,04 | 0,07 |
| C 15
C 15:1 o10 | 0,19 | 0,10 | 0,20 | 0,21 | 0,17 | 0,18 |
| C 16 | 0,02 | 13.00 | 15 34 | 0,00 | 13.02 | 14.40 |
| C 16:1 c9 | 3.06 | 2 49 | 0.10 | 2.84 | 2.05 | 2 86 |
| C 17 | 0,00 | 0.19 | 0,13 | 0.20 | 0.16 | 0.15 |
| C 17:1 c10 | 0,15 | 0,13 | 0,17 | 0,20 | 0,10 | 0,13 |
| C 18 | 8 66 | 9 15 | 9.89 | 10 70 | 9.38 | 8 55 |
| C 18:1 t9 | 0.21 | 0.00 | 0.00 | 0.23 | 0.09 | 0.22 |
| C 18:1 c9 | 19.73 | 18.85 | 23.74 | 3.25 | 19.78 | 19.26 |
| C 18:1 c11 | 2,99 | 2,67 | 2,51 | 0,25 | 2,36 | 2,76 |
| C 18:2 t9,t12 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,11 | 0,17 | 0,06 |
| C 18:2 c9,c12 | 17,40 | 16,97 | 17,32 | 20,66 | 18,61 | 18,17 |
| C 20 | 0,06 | 0,10 | 0,11 | 0,10 | 0,09 | 0,11 |
| C 18:3 n6 | 0,15 | 0,14 | 0,15 | 0,16 | 0,14 | 0,13 |
| C 20:1 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,11 | 0,09 | 0,10 |
| C 18:3 n3 | 10,32 | 9,91 | 10,34 | 13,05 | 10,74 | 9,42 |
| C 18:2 c9,t11 / t8,c10 | 2,54 | 0,00 | 0,00 | 3,65 | 0,00 | 2,77 |
| C 18:2 c11t13 | 1,12 | 1,20 | 1,23 | 1,66 | 1,53 | 4,25 |
| C 18:2 t10,c12 | 0,00 | 2,59 | 2,74 | 0,00 | 3,26 | 1,26 |
| C 18:2 c8,c10 / c9,c11 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,27 |
| C 18:2 c11,c13 | 0,38 | 0,46 | 0,41 | 0,00 | 0,50 | 0,00 |
| C 21 | 3,80 | 3,97 | 0,00 | 5,53 | 0,00 | 0,00 |
| CLnA1 | 0,00 | 0,00 | 2,03 | 0,00 | 2,44 | 0,00 |
| C 18:2 c10,c12 | 0,24 | 0,27 | 0,26 | 0,35 | 0,30 | 0,00 |
| CLnA2 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,55 | 0,00 | 0,42 |
| C 19:2 +11 +12 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,03 |
| C 10.2 (11,113
C 19:2 +12 +14 | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,00 |
| C 18:2 t8 t10 / t0 t11 / t10 t12 | 0,08 | 0,09 | 0,08 | 0,09 | 0,08 | 0,08 |
| C 20:2 n6 | 0.74 | 0.76 | 0.71 | 0.85 | 0.73 | 0.71 |
| Cl nA4 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.05 | 0.02 | 0.03 |
| C 22 | 0.09 | 0.08 | 0.16 | 0.11 | 0.08 | 0.08 |
| C 20:3 n6 | 0.33 | 0.43 | 0.60 | 0.50 | 0.41 | 0.38 |
| C 22:1 c13 | 2,36 | 1,75 | 2,00 | 2,33 | 1,60 | 1,88 |
| C 20:3 n3 | 0,16 | 0,33 | 0,44 | 0,30 | 0,34 | 0,08 |
| C 20:4 n6 | 0,28 | 0,42 | 0,37 | 0,45 | 0,31 | 0,31 |
| CAA1 | 0,01 | 0,00 | 0,10 | 0,07 | 0,01 | 0,05 |
| C 23 | 0,04 | 0,08 | 0,15 | 0,08 | 0,06 | 0,07 |
| CAA2 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| CAA3 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |
| CAA4 | 0,33 | 0,35 | 0,35 | 0,34 | 0,29 | 0,33 |
| C 22:2 c13,c16 | 0,03 | 0,00 | 0,12 | 0,03 | 0,12 | 0,00 |
| C 20:5 n3 | 1,63 | 1,69 | 1,66 | 0,05 | 0,03 | 1,71 |
| C 24 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,21 | 3,95 | 0,00 |
| CLnA5 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| CLNA6 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| C 24:1 o15 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,02 |
| CAA4a | 0,07 | 0,07 | 0,00 | 0,09 | 0,07 | 0,07 |
| CAA5 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| CAA6 | 0,00 | 0,07 | 0,03 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| CAA7 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| CAA8 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| CAA9 | 0,41 | 0,62 | 0,47 | 0,52 | 0,41 | 0,51 |
| C 22:6 n3 | 4,08 | 6,19 | 2,57 | 4,53 | 3,05 | 3,97 |
| CAA10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,50 | 0,51 |

Tab. 6.15: Prozentuale Gehalte der Fettsäuren bezogen auf die Gesamt-FSME im Fett der Karpfen mit 3 % CLA-Zulage

* 0,00 entspricht < 0,01 %

6.5.3 HUMANGEWEBE

Tab. 6.16: Fettsäurezusammensetzung der RP-HPLC-Fraktionen des Fettes eines Mammakarzinoms

Fraktion	Qualitative Fettsäurezusammensetzung
1	C16, C18, C18:1 c9, C22, C22:2 n6, C24:1 c15
2	C18, C20:1, C20:5 n3, C24:1 c15
3	C14:1 c9, C16, C17:1 c10, C18, C18:1 c9, C18:3 n6 und C18:3 n3 und Isomere, C20:3 n3, C20:4 n6 und Isomere, C22:2 n6, C20:5 n3, C22:6 n3
4	C14, C17, C18:2 n6 und CLA, C20:2 n6, C21, C22:2 n6
5	C18:1 c9, C18:2 n6
6	C16, C18:1 c9 und Isomere

Tab. 6.17:	Prozentuale Geha	alte der Fettsäurer	n bezogen auf	die Gesamt-FS	SME im Fett o	ler Mamma-
	karzinome, Mittel	werte und Standar	dabweichunge	en, n = 12		

	MW	s
C 4	0,02	0,03
C 6	0.00*	0.00
C 8	0.00	0.01
C 10	0.04	0.03
C 11	0.00	0.00
C 12	0.74	0,30
C 13	0.01	0.01
C 14	2.84	0.46
C 14:1	0.50	0.23
C 15	0.28	0.06
C 15:1	0.01	0.01
C 16	22.14	1.97
C 16:1	3,36	1,38
C 17	0,23	0,10
C 17:1	0,23	0,07
C 18	8,74	4,57
C 18:1 t9	0,09	0,21
C 18:1 c9	39,20	4,13
C 18:1 c11	4,45	1,48
C 18:2 t,t	0,24	0,14
C 18:2 c,c	10,41	2,37
C 20	0,14	0,06
C 18:3 n6	0,02	0,03
C 20:1	1,33	0,73
C 18:3 n3	0,52	0,89
C 18:2 t9t11 t8c10	0,04	0,04
C 18:2 c11t13	0,00	0,00
C 18:2 t10c12	0,17	0,14
C 18:2 c8c10 c9c11	0,10	0,19
C 18:2 c10c12	0,03	0,11
C 18:2 c11c13	0,00	0,00
C 21	0,03	0,02
C 18:2 t12t14	0,00	0,00
C 18:2 t11t13	0,03	0,04
C 18:2 t8t10 t9t11 t10t12	0,05	0,04
C 20:2 n6	0,62	0,15
CLNA1	0,03	0,02
0.22	0,03	0,02
C 20:3 hb	0,71	0,36
C 22:1	0,13	0,07
C 20.3 113	0,06	0,07
C 20.4	0,73	0,35
C 23	0,11	0,13
C 23	0,01	0,04
CAA3	0.05	0,00
CAA4	0.01	0,07
C 22:2	0.03	0,00
C 20.5	0.06	0.04
C 24	0.02	0.04
CLnA2	0.01	0.01
CLnA3	0.00	0.00
CLnA4	0.00	0.00
C 24:1	0.02	0,01
CAA4a	0.37	0.24
CAA5	0.00	0,00
CAA6	0,06	0,03
CAA7	0.00	0,00
CAA8	0.47	0.30
CAA9	0.03	0,08
C 22:6	0,42	0,24
CAA10	0,00	0,00

* 0,00 entspricht < 0,01 %

	т	U	т	F	F	G
	MW	S	MW	S	MW	S
C 4	0,00*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
С 8	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C 10	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.03
C 11	0,00	0,00	0,00	0,00	0.00	0,00
C 12	0.24	0.39	0,30	0.54	0,67	0.59
C 13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C 14	1 70	1.06	2 30	1 13	2.08	0,00
C 14·1	0.10	0.18	0.19	0.30	2,30	0.26
C 15	0,10	0,10	0,13	0,50	0,+0	0,20
C 15	0,17	0,14	0,24	0,14	0,29	0,05
C 15.1	0,13	6.15	0,00	0,00	0,00	0,00
C 10 C 16:1	23,70	0,15	23,43	2,91	23,30	2,91
C 10.1	1,73	1,20	2,01	2,44	5,20	1,25
	0,10	0,13	0,20	0,12	0,23	0,07
	0,06	0,08	0,05	0,10	0,13	0,10
	16,44	4,50	14,71	3,71	10,70	2,69
C 18:1 t9	0,17	0,29	0,18	0,25	0,52	0,36
C 18:1 C9	28,39	7,21	27,71	6,96	40,23	2,77
C 18:1 c11	2,73	2,39	3,20	2,77	1,47	2,01
C 18:2 t,t	0,03	0,07	0,06	0,10	0,22	0,09
C 18:2 c,c	7,46	1,45	8,52	2,02	10,73	2,61
C 20	0,05	0,08	0,05	0,07	0,10	0,07
C 18:3 n6	0,02	0,07	0,01	0,02	0,04	0,06
C 20:1	0,86	0,72	0,96	0,80	1,48	0,81
C 18:3 n3	0,20	0,37	0,20	0,52	0,32	0,57
C 18:2 t9t11 t8c10	0,11	0,39	0,03	0,08	0,06	0,12
C 18:2 c11t13	0,02	0,04	0,03	0,07	0,07	0,09
C 18:2 t10c12	0,03	0,07	0,02	0,05	0,10	0,16
C 18:2 c8c10 c9c11	0,00	0,00	0,02	0,07	0,00	0,00
C 18:2 c10c12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C 18:2 c11c13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C 21	0,00	0,00	0,01	0,02	0,01	0,03
C 18:2 t12t14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C 18:2 t11t13	0,09	0,31	0,02	0.05	0,04	0,05
C 18:2 t8t10 t9t11 t10t12	0.15	0.16	0.21	0.23	0.07	0.07
C 20:2 n6	0.58	0.47	0.53	0.41	0.45	0.17
CLnA1	0.02	0.04	0.01	0.03	0.01	0.01
C 22	0.07	0.11	0.04	0.08	0.01	0.02
C 20:3 n6	1.98	1.61	1.23	1.14	0.41	0.19
C 22·1	0.03	0.06	0.05	0.16	0.05	0.06
C 20:3 n3	0.03	0.06	0.02	0.05	0.04	0.04
C 20:4	4 71	4 27	5.66	4 83	0.42	0.25
CAA1	0.03	0.08	0.04	0.14	0.00	0,00
C 23	0.04	0.11	0,01	0,00	0,00	0,00
	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CAA3	0,00	0.01	0,00	0.02	0.02	0.02
	0,00	0,01	0,00	0.01	0,02	0,02
C 23:3 c8c11t13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C 22:2	0,00	0,00	0,00	0.05	0,00	0,00
C 20:5	0,03	0,10	0,01	0,00	0,01	0,03
C 20.5	0,00	0,11	0,07	0,11	0,03	0,03
C 24	0,01	0,04	0,00	0,01	0,00	0,01
C 24 C n A 2	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,89	1,10	0,84	1,21	0,00	0,01
0 24:1	1,19	1,43	0,90	1,35	0,12	0,30
	0,58	0,48	0,62	0,50	0,23	0,18
	0,02	0,04	0,01	0,04	0,00	0,01
	0,14	0,27	0,03	0,08	0,02	0,03
CAA7	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00
CAA8	0,42	0,35	0,37	0,30	0,24	0,09
CAA9	2,79	2,09	2,54	2,19	0,22	0,59
C 22:6	1,19	1,23	1,21	1,18	0,28	0,24
CAA10	0,31	0,34	0,29	0,38	0,04	0,12

Tab. 6.18: Prozentuale Gehalte der Fettsäuren bezogen auf die Gesamt-FSME im Fett der Prostatakarzinome, des tumorfreien Gewebes und des Fettgewebes, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 22

* 0,00 entspricht < 0,01 %

6.6 GC-MS-Ergebnisse

6.6.1 KÄSE

Tab. 6.21: Charakteristische Massenfragmente der im Käsefett identifizierten CLnA- und CAA-Isomere

	Isomer	Molekülion	12 mu Schritte
C18:3	∆ 7,9,14	331	168/180; 196/208; 262/274
	∆ 8,10,13	331	182/194; 210/222; 250/262
	∆ 8,12,15	331	182/194; 236/248; 276/288
	∆ 9,11,13	331	196/208; 222/234; 250/262
	∆ 9,11,14	331	196/208; 222/234; 262/274
	∆ 9,11,15	331	196/208; 222/234; 276/288
	∆ 9,12,14	331	196/208; 236/248; 262/274
	∆ 10,12,15	331	210/222; 236/248; 276/288
	∆ 10,13,15	331	210/222; 250/262; 276/288
C20:4	∆ 5,9,12,14	357	140/152; 196/208; 236/248; 262/274
	∆ 5,9,13,15	357	140/152; 196/208; 250/262; 276/288
	∆ 6,8,11,14	357	154/166; 182/194; 222/234; 262/274
	∆ 8,12,14,17	357	182/194; 236/248; 262/274; 302/314
	∆ 8,12,15,17	357	182/194; 236/248; 276/288; 302/314
	∆ 9,11,14,17	357	196/208; 222/234; 262/274; 302/314
	Δ 9,12,14,17	357	196/208; 236/248; 262/274; 302/314

6.6.2 KARPFEN

	lsomer	Molekülion	12 mu Schritte
C18:3	∆ 6,9,11	331	154/166; 194/206; 222/234
	Δ 6,10,12	331	154/166; 208/220; 234/246
	Δ 9,12,14	331	196/208; 236/248; 262/274
	∆ 9,13,15	331	196/208; 250/262; 276/288
C20:4	Δ 5,8,12,14	357	140/152; 182/194; 236/248; 262/274
	Δ 8,10,14,17	357	182/194; 208/220; 262/274; 302/314
	Δ 8,12,14,17	357	182/194; 236/248; 262/274; 302/314
	Δ 9,11,14,17	357	196/208; 222/234; 262/274; 302/314
	∆ 9,12,14,17	357	196/208; 236/248; 262/274; 302/314

Tab. 6.22: Charakteristische Massenfragmente der im Karpfenfett identifizierten CLnA- und CAA-Isomere

6.6.3 HUMANGEWEBE

Tab. 6.23: Charakteristische Massenfragmente der im Fett eines Mammakarzinoms identifizierten CLnA- und CAA-Isomere

	lsomer	Molekülion	12 mu Schritte
C18:3	∆ 9,12,14	331	196/208; 236/248; 262/274
	∆ 9,13,15	331	196/208; 250/262; 276/288
	∆ 10,12,15	331	210/222; 236/248; 276/288
C20:4	∆ 6,8,11,15	357	154/166; 182/194; 222/234; 276/288

6.7 Chromatogramme



Abb. 6.1: Ag⁺-HPLC-DAD-Chromatogramm der FSME der isomerisierten Arachidonsäure, 0.1 % Acetonitril in n-Hexan, Flow 1.0 ml/min, zwei Säulen, Raumtemperatur, λ = 234 nm, fraktionierte Komponenten sind mit einem Pfeil ↓ gekennzeichnet



Abb. 6.2: GC-FID-Chromatogramm eines Eicosaen-cis-Mix-Standards, C20:1 c5, c8, c11, c13



Abb. 6.3: GC-FID-Chromatogramm eines Eicosaen-cis/trans-Standards, C20:1 t11 und c11



Abb. 6.4: RP-HPLC-DAD-Chromatogramm eines Eicosaen-Mix-Standard (C20:1 c5, c8, c11, c13, t11) (Ausschnitt)



Abb. 6.5: GC-MS-Chromatogramm der Ag⁺-HPLC-Fraktion X (DMOX)



Abb. 6.6: RP-HPLC-Chromatogramm der reduzierten Ag⁺-HPLC-Fraktion X (DMOX) aus Käsefett, C18:1 c9, c12 und c15, λ = 206 nm



Abb. 6.7: RP-HPLC-Chromatogramm (Vorfraktionierung) der FSME aus Karpfenfett (1 % CLA-Zulage), UV-Detektion bei 208 nm



Abb. 6.8: Ag⁺-HPLC-Chromatogramm (Nachfraktionierung) der FSME der RP-Fraktion 2 des Karpfenfettes (1 % CLA-Zulage), Detektion bei 234 nm, fraktionierte Komponenten sind mit einem Pfeil ↓ gekennzeichnet (Ausschnitt)



Abb. 6.9: Ag⁺-HPLC-Chromatogramm der RP-HPLC-Fraktion 2 der FSME eines Kontroll-Karpfens, Detektion bei 234 nm; keine detektierbaren Komponenten im Elutionsbereich der CLnA bzw. CAA von 40-180 min; unbekannte, nicht relevante Verbindungen im Bereich von 10-40 min



Abb. 6.10: GC-FID-Chromatogramm einer Ag⁺-HPLC-Fraktion aus Karpfenfett, bei den mit einem Pfeil ↓ gekennzeichneten Verbindungen könnte es sich um die fraktionierte Komponente handeln



Abb. 6.11: RP-HPLC-Chromatogramm (Vorfraktionierung) der FSME aus Tumorfett (Mammakarzinom), UV-Detektion bei 208 nm



Abb. 6.12: Ag⁺-HPLC-Chromatogramm (Nachfraktionierung) der FSME der RP-Fraktion 3 des Fettes eines Mammakarzinoms, Detektion bei 234 nm, fraktionierte Komponenten sind mit einem Pfeil ↓ gekennzeichnet

6.8 Chemikalien

Tab. 6.24: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze	MAK-Wert [mg/m ³]
Acetonitril	T, F	11-23/24/25	16-27-45	68
2-Amino-2-methyl-1-propanol	Xi	36/38	-	-
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25- 36/37	350
Eisessig	С	10-35	23.2-26-45	10
Ethanol	F	11	7-16	1900
Ethylenglykol	Xn	22	-	26
n-Hexan	F, Xn	11-48/20	9-16-24/25-29- 51	180
Hydrazin Monohydrat	Т	45-23/24/25-34- 43	53.1-26- 36/37/39-45	0,13
Kaliummethylat-Lösung	T, F	11-14-23/25-34	7-16-26-	270
(25%ig in Methanol)			36/37/39-45	
Methanol	T, F	11-23/25	7-16-24-45	270
Natriumhydroxid, fest	С	35	26-37/39-45	2
Natriumsulfat, wasserfrei	-	-	-	-
Schwefelsäure, 95-97 %ig	С	35	26-30-45	1
Trimethylsilyldiazomethan-Lösung (~ 2 M in n-Hexan)	F, Xn	11-36/37/38- 48/20	9-16-26-29-36- 51	-

7 Literatur

- Adlof, R.O.: Separation of cis and trans unsaturated fatty acid methyl esters by silver ion high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **659**: 95-99 (1994).
- Adlof, R.O., Copes, L.C., Emken, E.A.: Analysis of the monoenoic fatty acid distribution in hydrogenated vegetable oils by silver-ion high-performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**: 571-574 (1995).
- Anderson, B.A., Holmann, R.T.: Pyrrolidines for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids* **9**: 185-190 (1974).
- Azain, M.J., Hausman, D.B., Sisk, M.B., Flatt, W.P., Jewell, D.E.: Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J. Nutr.* 130: 1548-1554 (2000).
- Banni, S., Day, B.W., Evans, R.W., Coringiu, F.P., Lombardi, B.: Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed a choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipidperoxidation. *Nutr. Biochemistry* 6: 281-289 (1995).
- Banni, S., Carta, G., Contini, M.S., Angioni, E., Deiana, M., Dessì, M.A., Melis, M.P., Corongiu, F.P.: Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. *J. Nutr. Biochem.* **7**:150-155 (1996).
- Banni, S., Angioni, E., Carta, G., Casu, V., Deiana, M., Dessì, M.A., Lucchi, L., Melis, M.P., Rosa, A., Vargiolu, S., Corongiu, F.P.: Influence of dietary conjugated linoleic acid on lipid metabolism in relation to its anticarcinogenic activity. In: Advances in conjugated linoleic acid research Vol 1. Eds.: M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, G.J. Nelson *AOCS Press*, Champaign, Illinois:180-200 (1999a).
- Banni, S., Angioni, E., Casu, V., Melis, M.P., Carta, G., Corongiu, F.P., Thompson, H., Ip, C.: Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 20: 1019-1024 (1999b).
- Banni, S., Carta, G., Angioni, E., Murru, E., Scanu, P., Melis, M.P., Bauman, E., Fischer, S.M., Ip, C.: Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J. Lipid Res.* **42**: 1056-1061 (2001).
- Belury, M.A.: Conjugated dienoic linoleate: a polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutr. Rev.* **53**: 83-89 (1995).
- Belury, M.A., Kempa-Steczko, A.: Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* **32**: 199-204 (1997).

- Belury, M.A., Moya-Camarena, S.Y., Liu, K.L., Van den Heuvel, J.P.: Dietary conjugated linoleic acid induces peroxisome-specific enzyme accumulation and ornithine decarboxylase activity in mouse liver. *J. Nutr. Biochem.* 8: 579-584 (1997).
- Benito, P., Nelson, G.J., Kelley, D.S., Bartolini, G., Schmidt, P.C., Simon, V.: The effect of conjugated linoleic acid on platelet function, platelet fatty acid composition, and blood coagulation in humans. *Lipids* **36**: 221-227 (2001).
- Bennett, A., Civier, A., Hensby, C.N., Melhuish, P.B., Stamford, I.F.: Measurement of arachidonate and its metabolites extracted from human normal and malignant gastrointestinal tissues. *Gut* **28**: 315-318 (1987).
- Berdeaux, O., Voinot, L., Angioni, E., Juanéda, P., Sébédio, J.-L.: A simple method of preparation of methyl trans-10,cis-12 and cis-9, trans-11-octadecadienoates from methyl linoleat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 1749-1755 (1998).
- Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie. 9., neubearbeitete Auflage *Walter de Gruyter Verlag* Berlin, New York (1994).
- Bulgarella, J.A., Patton, D., Bull, A.W.: Modulation of prostaglandin H synthase activity by conjugated linoleic acid (CLA) and specific CLA isomers. *Lipids* **36**: 407-412 (2001).
- Chin, S.F., Liu, W., Storckson, J.M., Ha, Y.L., Pariza, M.W.: Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.* **5**: 185-197 (1992).
- Chipault, J.R., Hawkins, J.M.: The determination of conjugated cis-trans and transtrans methyl octadecadienoates by infrared spectrometry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **36**: 535-539 (1959).
- Christie, W.W.: A stable silver-loaded column for the separation of lipids by high performance liquid chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* **10**: 148-150 (1987).
- Christie, W.W.: Gas chromatography and lipids. *The Oily Press* Ed. 1, Glasgow (1989).
- Christie, W.W., Breckenbridge, G.H.: Separation of cis and trans isomers of unsaturated fatty acids by high-performance liquid chromatography in the silver ion mode. *J. Chromatogr.* **469**: 261-269 (1989).
- Christie, W.W.: Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**: 1231 (1997).
- Christie, W.W.: Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33**: 343-353 (1998).
- Christie, W.W., Sébédio, J.-L., Juanéda, P.: A practical guide to the analysis of conjugated linoleic aid. *Inform* **12**: 147-152 (2001).

- Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M.W.: Immune modulation by altered nutrient metabolism control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci.* **72**: 1301-1305 (1993).
- de Deckere, E.A.M., van Amelsvoort, J.M.M., McNeill, G.P., Jones, P.: Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr.* **82**: 309-317 (1999).
- Dobson, G., Christie, W.W., Nikolova-Damyanova, B.: Silver ion chromatography of lipids and fatty acids. *J. Chromatogr. B* **671**: 197-222 (1995).
- Dobson, G.: Identification of conjugated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry of 4-methyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione adducts. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 137-142 (1998).
- Dugan, M.E.R., Aaalhus, J.L., Schaefer, A.L., Kramer, J.K.G.: The effects of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **77**: 723-725 (1997).
- Durgam, V.R., Fernandes, G.: The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett.* **116**: 121-130 (1997).
- Fay, L., Richli, U.: Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethyloxazoline derivatization. *J. Chromatogr.* 541: 89-98 (1991).
- Firestone, D., Mossoba, M.M.: Newer methods for fat analysis. In: New techniques and applications in lipid analysis. Eds.: R.E. McDonald, M.M. Mossoba, 1. Auflage AOCS Press Champaign, Illinois **12**: 2-32 (1997).
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-505 (1957).
- Fritsche, J., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Sehat, N., Ku, Y., Steinhart, H.: Conjugated linoleic acid (CLA) isomers in human adipose tissue. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **205**: 415-418 (1997).
- Fritsche, J., Steinhart, H.: Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **206**: 77-82 (1998).
- Gallagher, P.A., Kohlmeier, M., Miranda, S., Godley, P.: Human adipose tissue levels of conjugated linoleic acid in a case-control study of prostate cancer. *FASEB J.* **12**: 387 Supplement (1998).
- Gavino, V.C., Gavino, G., Leblanc, M.J., Tuchweber, B.: An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9,trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J. Nutr.* **130**: 27-29 (2000).
- Gnädig, S.: Konjugierte Linolsäureisomere in Lebensmitteln, humanem Fettgewebe und humanem Blutplasma. *Diplomarbeit* Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie (1996).

- Gnädig, S.: Conjugated linoleic acid (CLA): Effect of processing on CLA in cheese and the impact of CLA on the arachidonic acid metabolism. *Dissertation* Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie (2002).
- Goisset, F.: Separation des isomers des conjugues del'acide linoleique par chromatographie liquide haute performance a phase inversée. *Diplôme d'Ingénieur*, Université de Bourgogne (1999).
- Grandgirard, A., Julliard, F., Prevost, J., Sébédio, J.-L.: Preparation of geometrical isomers of linolenic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**: 1434-1440 (1987).
- Grandgirard, A., Sébédio, J.-L., Fleury, J. : Geometrical isomerization of linolenic acid during heat treatment of vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**: 1563-1568 (1984).
- Griinari, J.M., Bauman, D.E.: Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Advances in conjugated linoleic acid research Vol 1. Eds.: M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, G.J. Nelson AOCS Press, Champaign, Illinois:180-200 (1999).
- Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V., Bauman, D.E.: Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* **130**: 2285-2291 (2000).
- Ha, Y.L., Grimm, N.K., Pariza, M.W.: Anticarcinogen from fried ground beef: Heataltered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* **8**: 1881-1887 (1987).
- Hashimoto, N., Aoyama, T., Shioiri, T.: New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chem. Pharm. Bull.* **29**: 1475-1478 (1981).
- Hayek, M.G., Han, S.N., Wu, D., Watkins, B.A., Meydani, M., Dorsey, J.L., Smith, D.E., Meydani, S.N.: Dietary conjugated linoleic acid influence immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice. *J. Nutr.* **129**: 32-38 (1999).
- Houseknecht, K.L., Van den Heuvel, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P., Peck, L.W., Nickel, K.P., Belury, M.A.: Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 244: 678-682 (1998).
- Hünig, S., Müller, H.R., Thier, W.: Zur Chemie des Diimins. *Angew. Chem.* **77**: 368-377 (1965).
- Ip, C., Singh, M., Thompson, H.J., Scimeca, J.A.: Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54: 1212-1215 (1994).

- Ip, C., Briggs, S.P., Haegele, A.D., Thompson, H.J., Storkson, J., Scimeca, J.A.: The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level and type of fat in the diet. *Carcinogenesis* **17**: 1045-1050 (1996).
- Ip, C., Banni, S., Angioni, E., Carta, G., McGinley, J., Thompson, H.J., Barbano, D., Bauman, D.: Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* **129**: 2135-2142 (1999).
- Ip, C., Ip, M.M., Loftus, T., Shoemaker, S., Shea-Eaton, W.: Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesons of the rat mammary gland. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.* **9**: 689-696 (2000).
- Jackson, J.E., Paschke, R.F., Tolberg, W., Boyd, H.M., Wheeler, D.H.: Isomers of linoleic acid. Infrared and ultraviolet properties of methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **6**: 229-234 (1952).
- Jahreis, G., Kraft, J.: Sources of conjugated linoleic acid in the human diet. *Lipid Technol.* **3**: 29-32 (2002).
- Juanéda, P., Sébédio, J.-L.: Combined silver-ion and reversed-phase highperformance liquid chromatography for the separation and identification of C₂₀ metabolites of conjugated linoleic acid isomers in rat liver lipids. *J. Chromatogr. B* 724: 213-219 (1999).
- Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J., Tove, S.B.: Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 241: 1350-1354 (1966).
- Kepler, C.R., Tucker, W.P., Tove, S.B.: Biohydrogeantion of unsaturated fatty acids.
 IV. Substrate specifity and inhibition of linoleate C¹²-cis, C¹¹-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. J. Biol. Chem. 245: 3612-3620 (1970).
- Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M.E.R., Sauer, F.D., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P.: Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* **32**: 1219-1227 (1997).
- Kramer, J.K.G., Cruz-Hernandez, C., Zhou, J.: Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**: 600-609 (2001).
- Kramer, J.K.G., Sehat, N., Dugan, M.E.R., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Aalhus, J.L., Schaefer, A.L. Ku, Y.: Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver-ion high performance liquid chromatography. *Lipids* **33**: 549-558 (1998).
- Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Wright, S., Tso, P., Czarnecki, S.K.: Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**: 472S-477S (2000).

- Lavillonnière, F., Martin, J.C., Bougnoux, P., Sébédio, J.-L. : Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 343-352 (1998a).
- Lavillonnière, F., Riboli, E., Martin, J.C., Lhuillery, C.: High conjugated linoleic acids (CLA) content in breast adipose tissue protects against breast cancer. *Abstract Tagungsband* Dundee-Meeting, Mai (1998b).
- Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W.: Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **108**: 19-25 (1994).
- Lehmann, L.: Identifizierung und stereoselektive Synthesen ungesättigter Signalstoffe. *Dissertation* Universität Hamburg, Institut für Organische Chemie (2001).
- Liu, K.-L., Belury, M.A.: Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE₂ synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Letters* **127**: 15-22 (1998).
- Ma, D.W.L., Wierzbicki, A.A., Field, C.J., Clandinin, M.T.: Conjugated linoleic acid in Canadian dairy and beef products. *J. Agri. Food Chem.* **47**: 1956-1960 (1999).
- Maaß, D.: Zum Einfluss konjugierter Linolsäureisomere auf zootechnische Parameter und das Lebensmittel Fisch am Beispiel von Karpfen und Forellen. *Dissertation* Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Department für Tierwissenschaften, Bereich Tierernährung (2002).
- Marx, F., Classen, E.: Analysis of epoxy fatty acids by GC-MS of their 4,4dimethyloxazoline derivatives. *Fat Sci. Technol.* **96**: 207-211 (1994).
- Medina, E.A., Horn, W.F., Keim, N.L., Havel, P.J., Benito, P., Kelley, D.S., Nelson, G.J., Erickson, K.L.: Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids* **35**: 783-788 (2000).
- Mikolajczak, K.L., Bagby, M.O.: Partial reduction of α-elestearic acid with hydrazine. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**: 43-45 (1965).
- Moya-Camarena, S.Y., Belury, M.A.: Species differences in the metabolism and regulation of gene expression by conjugated linoleic acid. *Nutr. Rev.* **57**: 336-340 (1999).
- Moya-Camarena, S.Y., Van den Heuvel, J.P., Belury, M.A.: Conjugated linoleic acid activates peroxisome prolierator-activated receptor α and β subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-dawley rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**: 331-342 (1999).
- Munday, J.S., Thompson, K.G., James, K.A.C.: Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br. J. Nutr.* **81**: 251-255 (1999).
- Nikolova-Damyanova, B., Christie, W.W., Herslöf, B.G.: Retention properties of triacylglycerols on silver ion high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr. A* **694**: 375-380 (1995).

- Nikolova-Damyanova, B., Momchilova, S., Christie, W.W.: Silver ion highperformance liquid chromatographic separation of conjugated linoleic acid isomers, and other fatty acids, after conversion to p-methoxyphenacyl derivatives. *J. High Resol. Chromatogr.* **23**: 348-352 (2000).
- Nugteren, D.H., Christ-Hazelhof, E.: Naturally occuring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* **33**: 403-417 (1987).
- Nugteren, D.H.: Inhibition of prostaglandin biosythesis by 8cis,12trans,14ciseicosatrienoic acid and 5cis,8cis,12trans,14cis-eicosatetraenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **121**:171-176 (1970).
- Oberle, M., Schwarz, F.J., Kirchgessner, M.: Schlachtkörper- und Fleischqualität von Karpfen mit unterschiedlichem Fettgehalt und Fettsäuremuster. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* **7**: 32-35 (1998).
- Pariza, M.W., Park, Y., Cook, M.E.: Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc. Soc. Biol. Med.* **223**: 8-13 (2000).
- Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E., Pariza, M.W.: Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* **32**: 543-549 (1997).
- Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, W.W.: Evidence that the trans-10,cis12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* **34**: 235-241 (1999).
- Park, Y., Albright, K.J., Cai, Z.Y., Pariza, M.W.: Comparision of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 1158-1164 (2001).
- Parodi, P.W.: Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* **60**: 1550-1553 (1977).
- Petrek, J.A., Hudgins, L.C., Ho, M.N., Bajoruns, D.R., Hirsch, J.: Fatty acid composition of adipose tissue, an indication of dietary acids, and breast cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* **15**: 1377-1384 (1997).
- Pfalzgraf, A.: Veränderung der Fettsäuremuster unserer Nahrung Notwendigkeit, Möglichkeiten und Konsequenzen. *Dissertation* Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie (1995).
- Privett, O.S., Nickell, E.C.: Determination of the specific positions of cis and trans double bonds in polyenes. *Lipids* **1**: 98-103 (1965).
- Ramsay, T.G., Evock-Clover, C.M., Steele, N.C., Azain, M.J.: Dietary conjugated linoleic acid alters fatty acid composition of pig skeletal muscle and fat. *J. Anim. Sci.* **79**: 2152-2161 (2001).
- Ratnayake, W.M.N., Pelletier, G.: Positional and geometric isomers of linoleic acid in partially hydrogenated oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**: 95-105 (1992).

- Rickert, R., Steinhart, H., Fritsche, J., Sehat, N., Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Ku, Y., Kramer, J.K.G.: Enhanced resolution of conjugated linoleic acid isomers by tandem-column silver-ion high performance liquid chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* **22**: 144-148 (1999).
- Rickert, R.: Konjugierte Linolsäureisomere (CLA) in biologischen Matrices. *Dissertation* Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie (2002).
- Ryder, J.W., Portocarrero, C.P., Song, X.M., Cui, L., Yu, M., Combatsiaris, T., Galuska, D., Bauman, D.E., Barbano, D.M., Charron, M.J., Zierath, J.R., Houseknecht, K.L.: Isomer-specific antdiabetic properties of conjugated linoleic acid Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 50: 1149-1157 (2001).
- Ryhage, R., Stenhagen, E.: Mass spectrometry in lipid research. *J. Lipid Res.* **1**: 361-390 (1960).
- Schrör, K. (Hrsg.): Dictionary of prostaglandins and related compounds. *Medikon Verlag* München (1990).
- Sébédio, J.-L., Juanéda, P., Dobson, G., Ramilison, I., Martin, J.C., Chardigny, J.M., Christie, W.W. : Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1345**: 5-10 (1997).
- Sébédio, J.-L., Juanéda, P., Grégiore, S., Chardigny, K.M., Martin, J.C., Ginies, C.: Geometry of conjugated double bonds of CLA isomers in a commercial mixture and their hepatic 20:4 metabolites. *Lipids* **34**: 1319-1325 (1999).
- Sébédio, J.-L., Angioni, E., Chardigny, J.M., Gregoire, S., Juanéda, P., Berdeaux, O.: The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. *Lipids* **36**: 575-582 (2001).
- Sehat, N., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Ku, Y.: Silver-ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* **33**: 217-221 (1998a).
- Sehat, N., Kramer, J.K.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K., Morehouse, K.M., Ku, Y.: Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparision of chromatographic elution sequences. *Lipids* **33**: 963-971 (1998b).
- Sehat, N., Rickert, R., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Adlof, R.O., Morehouse, K.M., Fritsche, J., Eulitz, K., Steinhart, H., Ku, Y.: Improved separation of conjugated fatty acid methyl esters by silver ion-highperformance liquid chromatography. *Lipids* **34**: 407-413 (1999).

- Shanta, N.C., Ram, L.N., O'Leary, J., Hicks, C.L., Decker, E.A.: Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *J. Food Sci.* **60**: 695-697 (1995).
- Sheppard, A.J., Iverson, J.L.: Esterification of fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. Sci.* **13**: 448-452 (1975).
- Simon, O., Männer, K., Sagredos, A., Eder, K.: Effects of conjugated linoleic acids on protein to fat proportions, fatty acids, and plasma lipids in broilers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **102**: 402-410 (2000).
- Spitzer, V., Marx, F., Pfeilsticker, K.: Electron impact mass spectra of the oxazoline derivatives of some conjugated diene and triene C₁₈ fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**: 873-876 (1994).
- Spitzer, V.: Structure analysis of fatty acids by gas chromatography-low resolution electron impact mass spectrometry of their 4,4-dimethyloxazoline derivatives a review. *Lipid Res.* **35**: 387-408 (1997).
- Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M., Yamada, K.: Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* **33**: 521-527 (1998).
- Szymczyk, B., Pisulewski, P, Szczurek, W., Hanczakowski, P.: Effects of conjugated linoleic acid on growth performance, feed conversion efficiency, and subsequent carcass quality in broiler chickens. *Brit. J. Nutr.* **85**: 465-473 (2001).
- Thiel-Cooper, R.L., Parrish, F.C., Sparks, J.C., Wiegand, B.R., Ewan, R.C.: Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* **79**: 1821-1828 (2001)
- Truitt, A., McNeill, G., Vanderhoek, J.Y.: Antiplatelet effects of conjugated linoleic acid isomers. *Biochim. Biophys. Acta* **1438**: 239-246 (1999).
- Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H.J., Tsuyoshi, T., Okuyama, H., Kasai, M., Ikemoto, S., Ezaki, O.: Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* **49**: 1534-1542 (2000).
- Turek, J.J., Li, Y., Schoenlein, I.A., Allen, G.D., Watkins, B.A.: Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acids is influenced by the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio. *J. Nutr. Biochem.* **9**: 258-266 (1998).
- Twibell, R., Watkins, B., Rogers, L., Brown, P.: Dietary conjugated linoleic acid and lipid source alter fatty acid composition of juvenile yellow perch, (Perca flavescens). J. Nutr. 131: 2322-2328 (2001).
- West, D.B., Delany, J.P., Camet, P.M., Blohm, F., Truett, A.A., Scimeca, J.: Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.* **275**: R667-R672 (1998).

- Whigham, L.D., Cook, E.B., Stahl, J.L., Saban, R., Bjorling, D.E., Pariza, M.W., Cook, M.E.: CLA reduce antigen-induced histamine and PGE₂ release from sensitised guinea pig tracheae. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* **280**: R908-R912 (2001).
- Whigham, L.D., Cook, M.E., Atkinson, R.L.: Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol. Res.* **42**: 503-510 (2000).
- Wolff, R.L., Bayard, C.C.: Improvement in the resolution of the individual trans 18:1 isomers by capillary gas-liquid chromatography: Use of a 100-m CP-Sil 88 column. J. Am. Oil Chem. Soc. 10: 1197-1201 (1995).
- World Cancer Research Fund / American Institute for cancer research: Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective (1997).
- Yu, Q.T., Liu, B.N., Zhang, J.Y., Huang, Z.N.: Location of double bonds in fatty acids in fish, oil and rat testis lipids, gas chromatography-mass spectrometry of the oxazoline derivatives. *Lipids* **24**: 79-83 (1989).
- Yurawecz, M.P., Molina, A.A., Mossoba, M.M., Ku, Y.: Estimation of conjugated octadecatrienes in edible fats and oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 70: 1093-1099 (1993).
- Yurawecz, M.P., Morehouse, K.M.: Silver-ion HPLC of conjugated linoleic acid isomers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**: 609-613 (2001).
- Zambell, K.L., Keim. N.L., Van Loan, M.D., Gale, B., Benito, P., Kelley, D.S., Nelson, G.J.: Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on body composition and energy expenditure. *Lipids* **35**: 777-782 (2000).
- Zhang, J.Y., Yu, Q.T., Liu, B.N., Huang, Z.N.: Chemical modification in mass spectrometry IV-2-alkenyl-4,4-dimethyloxazolines as derivatives for the double bond location of long-chain olefinic acids. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **15**: 33-44 (1988).

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Geboren am: Familienstand:	Kirstin Winkler 17.02.1970 in Kiel ledig
	SCHULAUSBILDUNG
August 1980 – Juni 1989 Abschluss:	Friedrich-Schiller-Gymnasium, Preetz Allgemeine Hochschulreife
	BERUFSAUSBILDUNG
August 1989 – Oktober 1991	Ausbildung zur landwirtschaftlich-technischen Assistentin, Fachrichtung Milchwirtschaft, Bundesanstalt für Milchfor- schung, Kiel
	Hochschulausbildung
April 1992 – Oktober 1996	Studium der Lebensmittelchemie (mit Diplom), Universität Hamburg
Abschluss:	Erste Lebensmittelchemische Staatsprüfung (12.11.1996) Zweite Lebensmittelchemische Staatsprüfung (13.03.1998)
	BERUFLICHE TÄTIGKEITEN
Oktober 1991 – März 1992	Landwirtschaftlich-technische Assistentin, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt, Neumünster
November 1996 – April 1997	praktische Ausbildungsleistung, Institut für Qualitätssiche- rung GmbH, Hamburg
Mai 1997 – Oktober 1997	praktische Ausbildungsleistung, Hygiene Institut, Hamburg
Juni 2001 – Januar 2002	Leiterin des Chemischen Untersuchungsamtes, Universität Hamburg
seit April 1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg