

Institut für Molekulare Zellbiologie  
Zentrum für Experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Beisiegel

# **Lipidklassenseparation von Humanplasma zur Fettsäureanalyse**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Cheryl Maureen Behrens**  
aus Hamburg

**Hamburg, 2005**

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende:  
Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Beisiegel

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter:

MEINEN LIEBEN GROSSELTERN  
ADELINE UND HORST OTTO  
GEYER

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1	Stoffgruppe der Lipide	2
2.2	Der exogene Lipidstoffwechsel und Lipoproteine	5
2.3	Stoffwechsel der Lipidklassen	8
2.4	Lipidstoffwechselstörungen	13
2.4.1	<i>Primäre Lipidstoffwechselstörungen</i>	13
2.4.2	<i>Sekundäre Lipidstoffwechselstörungen</i>	15
2.5	Einführung in die Separation von Lipidklassen	16
2.6	Prinzip der Festphasenextraktion auf Kieselgelsäulen zur Lipidklassenseparation	18
2.7	Prinzip des Gaschromatographen	21
2.8	Prinzip der Lipidderivatisierung	24
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Materialien	26
3.1.1	<i>Geräte</i>	26
3.1.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	28
3.1.3	<i>Chemikalien</i>	29
3.1.4	<i>Standards</i>	30
3.1.5	<i>Probenmaterial</i>	30
3.2	Methoden - Kapazitätstests und Elutionsprofile	31
3.2.1	<i>Grundsätze der Separation auf Kieselgelsäulen</i>	31
	Waschen und Konditionieren	31
	Versuchsbedingungen	31
3.2.2	<i>Triglyceride</i>	32
	Kapazität der Triglyceride	32
	Kapazität der Triglyceride unter Phospholipidbelastung	33
3.2.3	<i>Cholesterinester</i>	34
	Elutionsprofil der Cholesterinester	34
	Cholesterinesterelution bei Phospholipidbelastung	35
3.2.4	<i>Freie Fettsäuren</i>	36
	Elutionsprofil der freien Fettsäuren	36
3.2.5	<i>Phospholipide</i>	37
	Kapazität der Phospholipide	37
3.3	Methoden – Probenvorbereitung und Lipidextraktion	38
3.3.1	<i>Die Extraktion nach Folch</i>	38
3.3.2	<i>Die Extraktion nach Hara und Radin</i>	39

<b>3.4</b>	<b>Methode – Probenderivatisierung nach Roy und Lepage</b>	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Methoden – Separationen von Modellgemischen</b>	<b>42</b>
<b>3.5.1</b>	<i>Separation von Triglyceriden und Cholesterinestern</i>	<b>42</b>
<b>3.5.2</b>	<i>Separation von Triglyceriden und Cholesterinestern, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von Cholesterin</i>	<b>45</b>
<b>3.5.3</b>	<i>Separation von Triglyceriden und Cholesterinestern, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipidklasseninternen Standards unter Einfluss von Cholesterin</i>	<b>46</b>
<b>3.5.4</b>	<i>Separation nach Extraktion von Triglyceriden und Cholesterinestern, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipidklasseninternen Standards unter Einfluss von Cholesterin</i>	<b>48</b>
<b>3.6</b>	<b>Methode - Plasmalipidklassenseparation</b>	<b>49</b>
<b>3.7</b>	<b>Methoden - Wiederfindungsraten der Standards und Modellsubstanzen</b>	<b>50</b>
<b>3.8</b>	<b>Methoden - Kalibrierung des Gaschromatographen</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Kapazitätstests und Elutionsprofile</b>	<b>54</b>
<b>4.1.1</b>	<i>Triglyceride</i>	<b>54</b>
	Kapazität der Triglyceride	<b>54</b>
	Kapazität der Triglyceride unter Phospholipidbelastung	<b>56</b>
<b>4.1.2</b>	<i>Cholesterinester</i>	<b>58</b>
	Elutionsprofil der Cholesterinester	<b>58</b>
	Cholesterinesterelution bei Phospholipidbelastung	<b>59</b>
<b>4.1.3</b>	<i>Freie Fettsäuren</i>	<b>59</b>
	Elutionsprofil der freien Fettsäuren	<b>60</b>
<b>4.1.4</b>	<i>Phospholipide</i>	<b>61</b>
	Kapazität der Phospholipide	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Probenvorbereitung und Lipidextraktion</b>	<b>61</b>
<b>4.2.1</b>	<i>Die Extraktion nach Folch</i>	<b>61</b>
<b>3.2.2</b>	<i>Die Extraktion nach Hara und Radin</i>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Separationen von Modellgemischen</b>	<b>64</b>
<b>4.3.1</b>	<i>Separation von Triglyceriden und Cholesterinestern</i>	<b>64</b>
<b>4.3.2</b>	<i>Separation von Triglyceriden und Cholesterinestern, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von Cholesterin</i>	<b>68</b>
<b>4.3.3</b>	<i>Separation von Triglyceriden und Cholesterinestern, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit</i>	

	<i>lipidklasseninternen Standards unter Einfluss von Cholesterin</i>	70
4.3.4	<i>Separation nach Extraktion von Triglyceriden und Cholesterinestern, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipidklasseninternen Standards unter Einfluss von Cholesterin</i>	73
4.4	<b>Plasmalipidklassenseparation</b>	75
4.5	<b>Derivatisierung und Wiederfindungsraten</b>	77
4.6	<b>Kalibrierung des Gaschromatographen</b>	80
4.7	<b>Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	83
5	<b>Diskussion</b>	84
5.1	<b>Säuleneigenschaften und Separation</b>	84
5.2	<b>Lipidextraktion</b>	91
5.3	<b>Lipidderivatisierung</b>	94
5.4	<b>Plasmalipidklassenseparation</b>	96
6	<b>Zusammenfassung</b>	97
7	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	98
8	<b>Anhang</b>	99
9	<b>Literaturverzeichnis</b>	106
10	<b>Danksagung</b>	115
11	<b>Lebenslauf</b>	116
12	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	117

# 1 Fragestellung

Festphasenextraktion auf Kieselgelsäulen ist eine häufig genutzte Methode zur Lipidklassenseparation in den unterschiedlichsten Disziplinen. Eine Separation der Plasmalipide in Cholesterinester, Triglyceride, freie Fettsäuren und Phospholipide dient der Analyse der Fettsäurekomposition dieser Lipidklassen. Gaschromatographisch können die enthaltenen Fettsäuren genau identifiziert werden. Fettstoffwechselstörungen, aber auch zahlreiche andere Erkrankungen, können so untersucht werden, ihre Pathogenese erforscht werden.

Bisherige Methoden der Festphasenextraktion zur Lipidklassenseparation waren meist sehr zeitaufwendig, benötigen große Proben- und Lösungsmittelvolumina oder waren recht kompliziert in der Handhabung.

Ziel meiner Arbeit war es daher, eine Methode zu entwickeln, die vor allem an Lösungsmitteln und Probenvolumen spart und so schnell, effizient und auch einfach durchzuführen ist. In Anlehnung an eine bekannte Methode von Hamilton und Comai [Hamilton JG, Comai K; 1988] sollte nun die Separation auf sehr kleinen Säulen von 100mg Kieselgel stattfinden, so dass nur ein Probenvolumen von 50µl benötigt wird. Die Idee eines lipidklasseninternen Standards, ein Mehrfachstandard, der den für die gaschromatographische Analyse notwendigen Standard für jede Lipidklasse enthält, sollte die Methode zugänglich machen für größere Studien und den klinischen Alltag. So ein Standard erlaubt, da er an allen notwendigen Arbeitsschritten wie Extraktion, Separation und Derivatisierung teilnimmt, in einem Schritt die Qualitätssicherung der Separation und weiteren Probenverarbeitung und die Quantifizierung der Fettsäuren in der gaschromatographischen Analyse ohne lästige Korrekturen.

Die notwendigen Methoden zur Lipidextraktion, Lipidklassenseparation, Fettsäureanalyse und Derivatisierung der Lipidklassen in ihre Methylester werden im Anschluß diskutiert, Alternativen vorgestellt und untersucht.

## 2 Einleitung

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung einer Methode zur Lipidklassenseparation von Plasma auf Kieselgelsäulen. Getrennt werden Cholesterinester, Triglyceride, freie Fettsäuren und Phospholipide.

Auf der Basis einer Methode von Hamilton und Comai [Hamilton JG, Comai K; 1988] entstand eine Trennungsmethode, die hohen Probendurchsatz bei wenig Materialaufwand ermöglichen sollte. Ziel war es, die Lipidklassen nach Separation direkt der gaschromatographischen Analyse zuzuführen, um ihren spezifischen Fettsäuregehalt qualitativ und quantitativ darstellen zu können. Bevor ich auf die Methode selbst eingehe, möchte ich zunächst die Lipidklassen des Plasmas, ihr Vorkommen, ihre Aufgaben und ihren Stoffwechsel darstellen.

### 2.1 Stoffgruppe der Lipide

#### Fettsäuren

Fettsäuren sind Carbonsäuren. Ihre natürlich vorkommenden Derivate besitzen meist eine geradzählige Kohlenstoffkette, die unverzweigt ist. Man unterscheidet zwischen gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Erstere besitzen keine Doppelbindungen, die beiden anderen enthalten eine oder mehrere Doppelbindungen. Das Vorkommen einer Doppelbindung macht zwei Isomere einer Fettsäure möglich: Die cis Form, bei der die Kohlenstoffreste auf einer Seite stehen und die trans Form, hier liegen sich die Reste gegenüber. Die Position der Doppelbindungen wird in der Regel vom letzten Kohlenstoffatom (C-Atom), dem  $\omega$ -C-Atom angegeben. Man teilt sie in drei, metabolisch nicht ineinander überführbare Gruppen:  $\omega$ -3-Fettsäuren,  $\omega$ -6-Fettsäuren und  $\omega$ -9-Fettsäuren. Auch ungesättigte Fettsäuren können vom Menschen synthetisiert werden, allerdings wird der maximale Abstand der Doppelbindung vom Carboxyl-C-Atom neun Kohlenstoffatome nicht überschreiten. Daher sind die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure(18:2,  $\omega$ -6), Linolensäure(18:3,  $\omega$ -3), Arachidonsäure(20:4,  $\omega$ -6) und Eicosapentaensäure(20:5,  $\omega$ -3) für den menschlichen Organismus essentiell, sie spielen eine besondere Rolle in der Leukotrien und Prostaglandinsynthese (siehe endogener Lipidstoffwechsel unten), und so müssen sie mit der Nahrung zugeführt werden [S.:687; Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L,



Biochemie, 5. Auflage, 2003]. Fettsäuren kommen im menschlichen Organismus in Cholesterinestern, Triglyceriden und Phospholipiden verestert vor, aber auch in freier, unveresterter Form.

Im menschlichen Körper findet man freie Fettsäuren zum Beispiel im Plasma, hier sind sie an Albumin gebunden und dienen unter anderem als Energielieferant für die Muskelzellen.

### Triglyceride

Triglyceride sind Ester des Glycerols und dreier, in der Natur meist unterschiedlicher, Fettsäuren. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren finden sich häufig in Position 2 des Glycerols. Je länger die Fettsäuren, desto apolarer das Triglycerid. In der Nahrung stellen Triglyceride den größten Anteil der Lipide. Sie sind die Hauptenergieserven des Körpers und werden vor allem im Fettgewebe gespeichert.

### Cholesterin und Cholesterinester

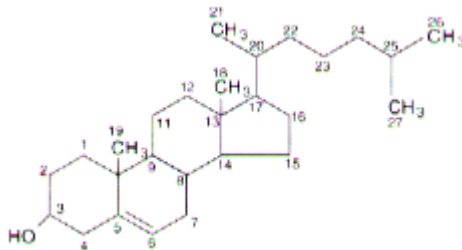


Abbildung 1: VC  
Strukturformel des Cholesterins

Cholesterin besteht aus 27 Kohlenstoffatomen (Abbildung 1) und ist ein einwertiger, sekundärer Alkohol. Im Wasser ist es nicht löslich. Es kommt in fast allen Zellen des menschlichen Körpers in freier oder mit Fettsäuren veresterter Form vor und kann vom Menschen auch selbst synthetisiert werden. Cholesterin ist

essentieller Bestandteil der Zellmembranen, mit Ausnahme der mitochondrialen Innenmembran. Es ist Vorläufer der Steroidhormone und Ausgangspunkt der D-Hormon Synthese, ebenso der Gallensäurensynthese (siehe unten).

Das nicht verstoffwechselte Cholesterin wird in Form von Cholesterinestern gespeichert [S.:802; Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Biochemie, 5. Auflage, 2003].

### Phospholipide

Phospholipide sind phosphathaltige Lipide, sie leiten sich entweder vom Glycerol oder vom Sphingosin, einem einfach ungesättigten Aminoalkohol, ab.

### **Glycerinphospholipide**

Glycerinphospholipide sind Derivate des Glycerin-3-phosphats, die erste und zweite Hydroxylgruppe ist jeweils mit einer langkettigen Fettsäuren verestert, das verleiht ihnen amphipathische Eigenschaften: Der Glycerolteil ist hydrophil, der Fettsäurenanteil hydrophob. Glycerinphospholipide sind mengenmäßig größter Bestandteil tierischer Membranen. Ihr häufigster Vertreter ist dort das Phosphatidylcholin, bei dem die Phosphosäure mit dem Aminoalkohol Cholin verestert ist. Seine Eigenschaften und die seiner Fettsäuren bestimmen letztendlich die Membraneigenschaften wie Fluidität und Stabilität. Trägt die Phosphosäure einen Serin, Ethanolamin oder Inositolrest, entstehen analog Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol. Phosphatidylinositol ist von erheblicher Bedeutung im Stoffwechselgeschehen im Rahmen der Signaltransduktion. Phosphatidylinositole dienen ferner der Verankerung von Enzymen (z.B. Acetylcholinesterase, alkalische Phosphatase) in der Zellmembran.

### **Etherphospholipide**

Bei den Etherphospholipiden ist eine Acylgruppe in Form eines Ethers gebunden, sie spielen eine Rolle als Plasmalogene und machen mehr als 10% der Phospholipide in Gehirn und Muskel aus. Auch der plättchenaktivierende Faktor, der von basophilen Leukozyten abgegeben wird ist ein Plasmalogen. Er bringt Thrombozyten zur Aggregation, wirkt auf Leber, glatte Muskulatur, Herz, Uterus und Lunge.

### **Sphingosinlipide**

In Ceramiden ist der Aminoalkohol Sphingosin säureamidartig mit einer langkettigen Fettsäure verbunden, häufig Sphingosinsäure oder Nervonsäure. Bei den Sphingomyelinen trägt die endständige Hydroxylgruppe des Ceramids einen Phosphorylcholinrest. Diese Stoffgruppe findet sich besonders häufig in den Myelinscheiden des menschlichen Nervensystems. Die Gruppe der Sphingosinlipide ist in unterschiedliche zelluläre Ereignisse involviert, wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose[Hannun YA, 1996 und 1998; Spiegel S, Merrill A, 1996; Riboni L et al. ,1997; Igarashi J, 1997; Gomez-Munoz A, 1998; Ariga T et al. , 1998]

## 2.2 Der exogene Lipidstoffwechsel und Lipoproteine

### Verdauung

Den Hauptteil der Nahrungsfette bilden die Triglyceride, gefolgt von Phospholipiden und Cholesterinestern. Lipide werden zu 95% im Dünndarm resorbiert. Da Lipide schlecht wasserlöslich sind und nur in gespaltener Form aufgenommen werden können, bedarf ihre Verdauung und Absorption im wässrigen Milieu des Magen-Darm-Traktes besondere Vorbereitungen: Diese beginnen schon in der Mundhöhle. Der Speichel enthält Lipasen, die im sauren Milieu des Magens aktiviert werden und zusammen mit den Magenlipasen bereits 10-30% der Nahrungsfette spalten. Eine effiziente Spaltung der Fette kann aber erst nach Emulsion derselben erfolgen, da diese die Angriffsfläche für die Lipasen vergrößert. Emulgiert werden die Fette mechanisch bereits im distalen Teil des Magens durch seine Peristaltik. In Duodenum und Jejunum werden sie durch die Pankreaslipase in Monoacylglyceride und freie Fettsäuren gespalten. Die Aktivierung der Pankreaslipase erfolgt hierbei durch ebenfalls im Pankreassaft enthaltene Colipasen, die ihrerseits wiederum aus Procolipasen durch Trypsin, beide aus dem Pankreassaft, unter Calciumaktivierung entstehen. Ebenfalls im Pankreassaft enthalten ist eine unspezifische Carboxylesterase, die Cholesterinester zu spalten vermag. Mit Hilfe der Gallensalze findet im Duodenum eine weitere Emulsion mit Mizellenbildung der Monoacylglyceride, Phospholipide und freien Fettsäuren statt. Die Phospholipide spaltet nach Mizellenbildung die Phospholipase A2 aus dem Pankreassaft, nach Aktivierung durch Trypsin und im Beisein von Calcium und Gallensalzen.

Die Mizellen besitzen ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, so dass ihnen starker Kontakt mit der Dünndarmwand möglich ist und ständig die Fettsäuren carriervermittelt resorbiert werden können. Die sich im Inneren der Mizellen befindenden unpolaren Lipide (Cholesterinester) können durch das lipophile Kontinuum bestehend aus Bürstensaummembran und Mizelle ebenfalls resorbiert werden. Kurzkettige Fettsäuren sind so polar, dass sie zur Resorption keine Mizellenbildung benötigen. Im terminalen Jejunum ist die Fettresorption abgeschlossen und die freigewordenen Gallensalze aus den Mizellen können im terminalen Ileum zur Wiederverwertung absorbiert werden.

In den Mucosazellen werden die Spaltprodukte der Triglyceride im glatten endoplasmatischen Retikulum erneut zu Triglyceriden zusammengefügt. Die

Triglyceride werden durch das Triglycerid-Transfer-Protein in das raue endoplasmatische Retikulum der Mucosazelle transportiert. Im rauhen endoplasmatischen Retikulum findet eine Assemblierung der Triglyceride, Phospholipide und Cholesterinester mit dem Apolipoprotein B48 zu Lipoproteinpartikeln statt, so dass kleine, unreife Chylomikronen entstehen. Durch Aufnahme weiterer Apolipoproteine AI, AII, von Cholesterin und von Phospholipiden erreichen die Chylomikronen ihren triglyceridreichen Endzustand und gelangen schließlich in den Golgi-Apparat. Von dort werden sie durch Exozytose ins Lymphsystem entlassen. Über den Ductus thoracicus und den linken Venenwinkel erreichen die Chylomikronen die Blutbahn. Gleichzeitig, wenn auch im geringen Umfang, ist die Darmmucosa fähig very low density lipoproteins (VLDL) zu bilden. Sie sind ebenfalls sehr triglyceridreich, enthalten aber auch Cholesterin, Cholesterinester und Phospholipide. Ihr Apolipoproteinmuster ist different: CI-III, B<sub>100</sub> und E sind enthalten. Im großen Maße werden die VLDL von der Leber gebildet. Der Abbau beider triglyceridreicher Lipoproteine findet im extrahepatischen Gewebe statt.

## Lipoproteine

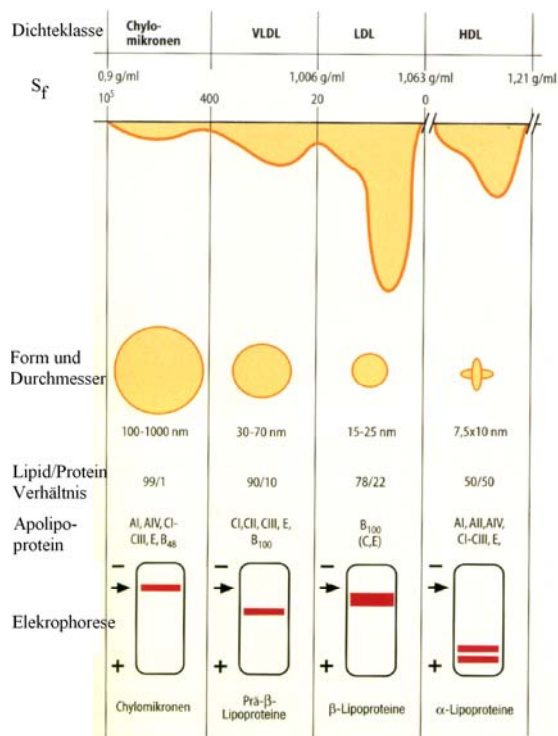


Abbildung 2: Übersicht zur Einteilung der Lipoproteine; aus Löffler u. Petrides Biochemie & Pathobiochemie 7. Auflage 2003; S.:617

Neben den Chylomikronen gehören VLDL, intermediate density lipoproteins (IDL), high density lipoproteins (HDL) und low density lipoproteins (LDL) zu den Lipoproteinen. Sie stellen letztendlich die Transportform der wasserunlöslichen Lipide in der wässrigen Lösung des Blutes da. Ihre Emulsion im Plasma ermöglicht ihr spezieller Aufbau: In ihrem Kern sind unpolare Lipide, wie Triglyceride und Cholesterinester enthalten, während der Mantel die Wasserlöslichkeit ermöglicht und die Phospholipide sowie Apoproteine enthält. Ihre Einteilung kann nach ihrer Dichte

durch Ultrazentrifugation erfolgen (siehe Abbildung 2), aber auch durch Elektrophorese, da sie sich durch die Zusammensetzung ihrer Apoproteine unterscheiden.

Sobald die Chylomikronen das Blut erreicht haben, erhalten sie von den im Blut zirkulierenden HDL (siehe unten) die Apolipoproteine C und E im Austausch für Apolipoprotein AI und II.

Apolipoprotein CII ist ein Cofaktor der endothelständigen Lipoproteinlipase, die sich auch an der Zellmembran sämtlicher extrahepatischer Gewebe, insbesondere Fett- und Muskelgewebe, befindet. Dieses Enzym spaltet die Triglyceride in Glycerin und Fettsäuren. Die Fettsäuren werden vom Gewebe aufgenommen und gespeichert oder verstoffwechselt. Glycerin kann erst in der Leber verstoffwechselt werden. Die Chylomikronen haben nun bis zu 80% ihrer Triglyceride verloren und geben außerdem noch Cholesterin und Apolipoprotein AI und II an die HDL ab. Zurück bleiben "Remnants" (Überbleibsel), die die Leber erreichen, über Apolipoprotein B und E Rezeptoren aufgenommen werden und im Hepatozyten abgebaut werden [S.:800; JM Berg, JL Tymoczko, L Stryer, Biochemie, 5. Auflage, 2003]. Wie oben bereits erläutert, werden VLDL in der Leber synthetisiert. Ihre Synthese unterscheidet sich nicht wesentlich von der der Chylomikronen. Ihre Lipide werden von der Leber im glatten endoplasmatischen Retikulum hergestellt. VLDL enthalten Apolipoproteine C, B<sub>100</sub> und E, nehmen aber nach ihrer Sekretion in die Blutbahn Apolipoproteine E und C, besonders CII von den HDL auf. Der Cofaktor CII macht ihren Abbau durch die Lipoproteinlipase (siehe oben) möglich. So entstehen aus ihnen IDL, die wiederum in die Leber aufgenommen werden oder im Plasma mit Hilfe der Lipoproteinlipase zu LDL abgebaut werden [S.:800-801; Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Biochemie, 5. Auflage, 2003]. Zusammenfassend also, transportieren die Chylomikronen Nahrungstriglyceride zu den Geweben und liefern Bestandteile für die HDL; VLDL beliefern extrahepatisches Gewebe mit Triglyceriden aus der Leber, aus ihrem stufenweisen Abbau entstehen LDL. LDL enthalten von allen Plasmalipoproteinen am meisten Cholesterin und Cholesterinester.

LDL transportieren Cholesterin an alle extrahepatischen Gewebe. In den Zielzellen erfolgt die Aufnahme über den LDL-Rezeptor an der Plasmamembran, dessen Ligand das Apolipoprotein B<sub>100</sub> ist. Die Bindung löst die Endozytose der LDL aus. Die Endosomen mit den incorporierten LDL assoziieren mit Lysosomen, nun können die LDL abgebaut werden: Apolipoprotein B<sub>100</sub> wird durch Proteasen gespalten, die Cholesterinester durch die lysosomale saure Lipase hydrolysiert. Das freie Cholesterin verlässt

das Lysosom und hemmt zum einen die Transkription der HMG-CoA-Reduktase und damit eine weitere Cholesterinproduktion, sowie die Transkription für den LDL-Rezeptor. Zum anderen aktiviert es die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase und stimuliert damit seine eigene Veresterung und Speicherung. Weitergehend ist also der LDL-Rezeptor für eine Senkung des Plasmacholesterin verantwortlich [Kunnert B 1986] und verhindert gleichzeitig eine Überladung der Zellen mit Cholesterin. Der LDL-Rezeptor wird im rauhen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat synthetisiert, kann aber auch aus den Endosomen recycled werden.

HDL hat eine dem LDL genau entgegengesetzte Aufgabe, es übernimmt den Cholesterintransport vom peripheren Gewebe zur Leber. Hierfür von Bedeutung ist der Gehalt an Apolipoprotein AI, welches die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase zu binden vermag. Dieses Enzym katalysiert die Cholesterinesterbildung aus Cholesterin und Phosphatidylcholin, dabei wird Lysophosphatidylcholin frei und diffundiert aus den HDL Partikeln. Die HDL Partikel können so Cholesterin aus extrahepatischen Zellen aufnehmen und werden auf ihrem Weg immer reicher an Cholesterinestern, bei einem Verlust von Phospholipiden. Die cholesterintragenden HDL werden von der Leber aufgenommen. An dieser Stelle findet sich die einzige Möglichkeit Cholesterin in Form von Gallensalzen auszuscheiden.

## 2.3 Stoffwechsel der Lipidklassen

### Fettsäuren

Die Synthese der Fettsäuren erfolgt im Cytosol der Körperzellen mit Hilfe der Fettsäuresynthase, einem multifunktionellem Enzym. Chemisch handelt es sich bei der Synthesereaktion um eine Kondensation von C<sub>2</sub>-Einheiten, nämlich Acetyl-CoA, unter der Hydrolyse von Adenosintrisphosphat(ATP) als Energielieferant. Maximal acht C<sub>2</sub>-Gruppen können am Fettsäure-Synthase-Komplex zusammengefügt werden, so dass Palmitat(16:0) entsteht. Aus Palmitat als Vorstufe können mit Hilfe von Elongasen und Desaturasen auch längere und ungesättigte Fettsäuren vom menschlichen Körper synthetisiert werden. Syntheseort ist hier das endoplasmatische Retikulum, Verlängerungen finden auch im Mitochondrium statt. Allerdings können Doppelbindungen nicht oberhalb von Kohlenstoffatom 9 eingefügt werden und so müssen die so genannten essentiellen, ungesättigten Fettsäuren mit der

Nahrung zugeführt werden. Die Energie fordernde Fettsäuresynthese wird mehrfach kontrolliert. Kurzfristig findet eine retrograde Hemmung statt: Palmitoyl-CoA inhibiert den vorbereitenden Schritt der Fettsäurebiosynthese durch Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase. Ebenso hemmt eine durch Glucagon hervorgerufene cAMP(cyclisches Adenosinmonophosphat) abhängige Phosphorylierung dieses Enzym, während es durch Citrat und insulinabhängige Dephosphorylierung aktiviert wird. Längerfristig wird die Synthese ebenfalls durch Insulin über eine Induktion der Enzymsynthese der Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthese reguliert.

Zur Energiegewinnung werden Fettsäuren, nach Aktivierung durch Coenzym A, oxidativ abgebaut. Dieser Vorgang heißt  $\beta$ -Oxidation, weil bei jeder Stufe des Abbaus das  $\beta$ -Kohlenstoffatom oxidiert wird, dies führt zur Abspaltung von Acetyl-CoA. Der Vorgang wiederholt sich bis das gesamte Kohlenstoffgerüst abgebaut ist. Das Acetyl-CoA wird in den Citratzyklus eingebracht. Bei ungeradzahligen Fettsäuren endet der Abbau in Propionyl-CoA, welches mit Hilfe von Biotin und Vitamin B12 in Succinyl-CoA umgewandelt werden kann und so auch in den Citratzyklus einfließt. Der Fettsäureabbau findet in der mitochondrialen Matrix statt. Im Gegensatz zur Synthese benötigt der Abbau zahlreiche Enzyme und ist ein hochexogener Vorgang. Bei der  $\beta$ -Oxidation der Palmitinsäure zum Beispiel werden 7 FADH<sub>2</sub>, 7 NADH und 8 Acetyl-CoA freigesetzt, die weitere Verstoffwechslung ergibt eine Bilanz von 129 ATP!

Auch die Regulation der  $\beta$ -Oxidation unterliegt hormonellen Stimuli: Adrenalin, Noradrenalin und das oben bereits genannte Glucagon sind ihre Aktivatoren. Zusammenfassend bestimmt das Insulin/Glucagon Verhältnis den Fettsäuremetabolismus. Glucagon, Adrenalin und Noradrenalin aktivieren über einen Anstieg des cAMP die hormonsensitive Lipoproteinlipase im Fettgewebe und fördern so die Freisetzung von freien Fettsäuren ins Blut. In Leber und Muskel regen sie die  $\beta$ -Oxidation an, so dass die Fettsäuren zur Energiegewinnung genutzt werden. Ferner produziert die Leber unter ihrem Einfluss Ketonkörper aus Acetyl-CoA, die in der Peripherie als alternative Energieträger zur Glucose verstoffwechselt werden können. Die Acetyl-CoA-Carboxylase wird zeitgleich über eine cAMP abhängige Proteinkinase gehemmt. Insulin hat den gegenteiligen Effekt: Mit Senkung des cAMP-Spiegels wird die Lipolyse der hormonsensitiven Lipoproteinlipase im Fettgewebe gebremst, die Acetyl-CoA-Carboxylase als Initiator der Fettsäuresynthese aktiviert.

Fettsäuren dienen allerdings längst nicht nur dem Energiestoffwechsel des Körpers, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure bilden die Vorstufen der Gewebshormone:

**Eikosanoide und Prostananoide**

Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene entstehen in vielen Geweben aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere der Arachidonsäure. Sie modulieren hormonelle und andere Stimuli, sind darüber hinaus in Nierenfunktion und Gefäßtonus involviert und spielen eine große Rolle bei Entzündungs- und Überempfindlichkeitsreaktionen [Ruiz-Gutierrez V, Perez-Camino MC; 2000]. Zur Prostaglandin- und Thromboxansynthese wird Arachidonsäure über die Phospholipase A2 aus den Phospholipiden der Zellmembranen gespalten, anschließend mit Hilfe der Cyclooxygenase zu Prostaglandin G2 oxidiert. Es folgt eine Reduktion der Peroxidase zu Prostaglandin H2, der Muttersubstanz aller Thromboxane und Prostaglandine (Abb. 3, oben).

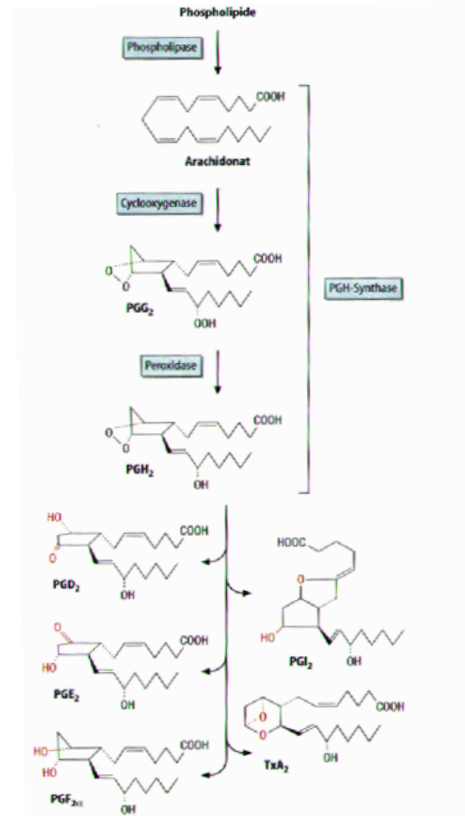


Abbildung 3: Synthese der Prostaglandine und Thromboxane; aus Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 7. Auflage 2003; S.:451

Prostaglandine wirken als Gewebshormone para- und autokrin. Ihr Wirkungsprofil hängt dabei von den entsprechenden Prostaglandinrezeptoren in der Nachbarschaft ab.

Die untenstehende Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der biologischen Wirkungen der Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane:

TABELLE 1: BIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER PROSTAGLANDINE, LEUKOTRIENE UND THROMBOXANE

Eicosanoide der Arachidonsäure	Eicosanoide der Eicosapentaensäure
THROMBOZYTEN	
<b>Thromboxan A<sub>2</sub>:</b> proaggregatorisch vasokonstriktorisch	<b>Thromboxan A<sub>3</sub>:</b> nicht proaggregatorisch nicht vasokonstriktorisch



ENDOTHEL	
<b>Prostaglandin I<sub>2</sub> :</b> antiaggregatorisch vasodilateratorisch	<b>Prostaglandin I<sub>3</sub> :</b> antiaggregatorisch vasodilateratorisch
MAKROPHAGEN, PERIPHERE GRANULOZYTEN	
<b>Leukotrien B<sub>4</sub> :</b> stark chemotaktisch	<b>Leukotrien B<sub>5</sub> :</b> wenig chemotaktisch

Tabelle 1 aus Biesalski, Ernährungsmedizin; Thieme Verlag 1995; S.:285

### Triglyceride

Triglyceride, ins Besondere im Fettgewebe, stellen mengenmäßig den bedeutendsten Energiespeicher des menschlichen Körpers da. Um ihre Fettsäuren der Energiegewinnung und damit der  $\beta$ -Oxidation zugänglich zu machen, müssen sie hydrolysiert werden. Diesen Vorgang übernehmen Lipasen. Die hormonsensitive Lipase kommt im Fettgewebe, Hirn, Herz, Skelettmuskel, Nebennieren etc. vor und macht, wie der Name schon sagt, eine regulierte, hormongesteuerte Lipolyse möglich. Weiterhin lässt sich in Fettgewebe und Leber eine lysosomale Lipase nachweisen, auch in anderen Geweben finden sich unterschiedliche Lipasen. Das in der Lipolyse freigesetzte Glycerin kann in der Leber als Glycerophosphat in die Glycolyse eingeschleust werden.

Die Biosynthese von Triglyceriden erfordert ATP, aktivierte Fettsäuren und aktiviertes Glycerin. Glycerophosphat entsteht in den meisten Geweben bei der Glycolyse; Leber, Niere, Darmmucosa und Milchdrüse enthalten Glycerokinase und können Glycerophosphat direkt synthetisieren. Die Aktivierung der Fettsäuren erfolgt über die Acyl-CoA-Synthetase, in drei Schritten und durch drei unterschiedliche Acyltransferasen kann nun das Triglycerid synthetisiert werden.

### Phospholipide

Die Biosynthese der Phospholipide entspricht in den Anfängen der Synthese der Triglyceride. An die nach zwei Acylierungen aus Glycerophosphat und zwei Fettsäuren entstandene Phosphatidsäure werden die Alkohole Cholin, Colamin, Inosit oder Serin nach Aktivierung eingeführt.

Phospholipide werden durch Phospholipasen gespalten, sie haben sehr unterschiedliche Funktionen:

Die Phospholipase des Pankreassekrets im Lipidverdau(siehe oben).

Phospholipase A2 steuert die Eikosanoid- und Prostanoidsynthese (siehe oben).

G-Protein vermittelt spaltet die Phospholipase C das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in 1,2-diacylglycerin(DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat(IP3) als second messenger mit folgenden Wirkungen:

Kontraktion glatter Muskeln, Glycogenolyse in Hepatozyten, Histaminsekretion durch Mastzellen, Serotoninfreisetzung durch Thrombozyten, ihre Aggregation und Insulinsekretion der Langerhansschen B-Zellen.

DAG und IP3 werden von Adrenalin, Vasopressin, Angiotensin II, und durch den muscarinischen Acetylcholinrezeptor als second messenger genutzt.

### **Cholesterin und seine Ester**

Cholesterin kann von allen menschlichen Zellen synthetisiert werden. Es wird ausschließlich aus Acetyl-CoA und zum größten Teil im endoplasmatischen Retikulum hergestellt. Da Cholesterin nicht abgebaut werden kann, ist die einzige Möglichkeit der Reduzierung die Modifikation zu Gallensäuren und deren Ausscheidung über die Faeces. Um eine Cholesterinüberladung zu vermeiden, muss die Neusynthese sehr fein auf das Nahrungsangebot des Cholesterins abgestimmt werden. Da beim Menschen die extrahepatische Cholesterinproduktion weit überwiegt, ist die Cholesterinreduktion durch LDLCholesterin(siehe oben) bedeutend. Der Cholesterinplasmaspiegel jedoch lässt sich maßgeblich mit der Aufnahme über die Nahrung beeinflussen.

Cholesterin ist nicht nur wichtiger Membranbaustein, sondern Muttersubstanz von Steroidhormonen: Nämlich Sexualhormonen, Glucocorticoiden(Cortisol) und Mineralocorticoiden(Aldosteron). Außerdem kann der menschliche Körper mit Hilfe des Sonnenlichtes Cholesterin in Vitamin D umwandeln.

Nicht sofort verstoffwechseltes Cholesterin wird in Esterform gespeichert. Cholesterinester repräsentieren noch wochenlang die Fettsäuren, die mit der Nahrung aufgenommen wurden [Hoving EB, 1988]. 75% der Cholesterinester im Plasma enthalten langkettige Fettsäuren[Duncan I et al. , 1979; van Doormaal JJ et al. , 1984]. Synthetisiert werden Cholesterinester intrazellulär mit Hilfe der Acyl-CoA:Cholesteryl-Acyltransferase, die durch freies Cholesterin stimuliert wird. Im Plasma findet die Veresterung mit Hilfe der Lecithin-cholesteryl-transferase, die Fettsäuren vom Phosphatidylcholin auf Cholesterin überträgt, statt. Eine Veresterung des intrazellulären Cholesterins ist unbedingt notwendig, da eine hohe Konzentration an freien Cholesterin die Struktur der zellulären Membran stört[S.:802; Berg JM, Tymoczko JL, Stryer

L, Biochemie, 5. Auflage, 2003]. Im Plasma spiegeln die Cholesterinester indirekt die Fettsäurenkomposition des Phosphatidylcholins als wichtigstes Lipid der Zellmembranen wieder [Hoving EB, 1988].

## **2.4 Lipidstoffwechselstörungen**

Man unterscheidet zwischen primären, erblichen und sekundären, durch eine andere Grundkrankheit erworbene, Hyper- und Hypolipoproteinämien. Ihnen gemeinsam ist eine Störung des Lipoproteinmusters im Plasma.

### ***2.4.1 Primäre Lipidstoffwechselstörungen***

#### **Polygene Hypercholesterinämien**

Umfassen alle Lipidstoffwechselstörungen, die sich durch ein erhöhtes LDL-Cholesterin im Plasma aus nicht näher bekannter Ursache auszeichnen.

Pathogenetisch findet man bei den Betroffenen geringe, genetische Abweichungen der Norm an Apolipoproteinen, ihren Rezeptoren und anderen Faktoren, die den Cholesterinstoffwechsel beeinflussen. In ihrer Kombination führen diese Abweichungen zu einem erhöhten LDL-Spiegel. Meist manifestiert sich diese Art der Hypercholesterinämie erst durch Fehlernährung; ins Besondere mit gesättigten Fettsäuren, Cholesterin oder zu geringer Zufuhr an Ballaststoffen. Die Erkrankung, die ein erhöhtes Arterioskleroserisiko mit sich bringt, lässt sich daher mit Ernährungsumstellung beeinflussen.

#### **Familiäre Hypercholesterinämie**

Diese Erkrankung geht mit einem stark erhöhten Serumcholesterinspiegel der LDL-Fraktion einher und ist autosomal dominant vererblich, heterozygote Träger(1:500) fallen häufig als unter 60 jährige Herzinfarktpatienten auf. Homozygote Träger (1:1000000) leiden schon in frühesten Kindheit an Arterio- und Cerebralsklerose und koronarer Herzerkrankung(KHK). Die Ursache der Erkrankung ist ein LDL-Rezeptordefekt, z.B. wird dieser nicht ausreichend oder so fehlerhaft synthetisiert, dass er nicht in die Membran eingebaut werden kann, oder seine LDL-Bindungsdomäne unterliegt einer Mutation. Im Gesamten führt dies zu einer Hemmung der LDL-Aufnahme in die Zellen und

das Serumcholesterin steigt, weiterhin entfällt die Hemmung der zelleigenen Cholesterinsynthese durch LDL-Aufnahme (siehe oben), so dass außerdem noch die endogene Cholesterinsynthese zu einem Anstieg des Serumcholesterins beiträgt.

### **Familiäre Dysbetalipoproteinämie**

Diese polygene Erkrankung beschreibt eine Aufnahmestörung der Leber von Remnants und VLDL. Ursache ist eine Mutation des Apolipoproteins E. Die VLDL können so nur mangelhaft abgebaut werden, es folgt ein erhöhter Triglycerid- und Cholesterinspiegel.

Die Patienten zeigen ein hohes Arterioskleroserisiko und Cholesterinablagerungen in der Haut.

### **Kombinierte Hyperlipidämie**

Bei der kombinierten Hyperlipidämie findet sich in Abhängigkeit der Ernährung eine Hypertriglyceridämie und später eine Hypercholesterinämie. VLDL oder LDL oder beide sind erhöht. Die vermehrte Synthese von Apolipoprotein B100 führt bei diesen Patienten zum erhöhten Serum-VLDL, dessen Konversion bringt die LDL-Erhöhung mit sich. Arteriosklerose, bis zum Myokardinfarkt, zeichnet das klinische Bild.

### **Familiäre Hypertriglyceridämie**

Eine polygene Erkrankung, der meist eine Überproduktion der Triglyceride durch die Leber zu Grunde liegt, bei normaler Apolipoprotein B-Synthese. Es kann auch der intraplasmatische VLDL Metabolismus gestört sein. Es folgt eine Erhöhung der VLDL im Serum. Diese Erkrankung kann mit einer exogenen oder genetischen Störung des Chylomikronenabbaus vergesellschaftet sein. Im Zusammenhang findet sich eine Senkung der HDL, womit das Arterioskleroserisiko dieser Patienten steigt. Selektives Problem der Hypertriglyceridämie ist die Gefahr Pankreatiden zu entwickeln.

### **Hyperlipoproteinämie**

Lipoproteinlipase- und Apolipoprotein CII- Mangel führen zu einer Hypertriglyceridämie durch Anhäufung der Chylomikronen. Bei excessiv hohen Triglyceridwerten steigt auch das Gesamtcholesterin mit an. Da HDL und LDL

erniedrigt sind, besteht kein erhöhtes Arterioskleroserisiko, wohl aber der Hang zu Pankreatiden.

### **A- $\beta$ -Lipoproteinämie**

Diese Erkrankung ist autosomal-rezessiv vererbbar, es kann kein Apolipoprotein B gebildet werden und somit auch keine Lipoproteine, die es enthalten: Postprandial bleibt die Bildung von Chylomikronen aus, auch VLDL und LDL können nicht gebildet werden. Es kommt zur Fettablagerung in Darmmucosa und Leber, da diese zur Triglyceridsynthese fähig sind.

### **Hypo-bzw. A- $\alpha$ -Hypolipoproteinämie**

Die HDL- und Cholesterinspiegel sind im Serum stark erniedrigt, denn es liegt ein Defekt des ABC-Transporter-I, welcher Cholesterin aus den Zellen transportiert und auf HDL überträgt, vor. Mit dem Mangel an HDL steigt das Risiko für die koronare Herzkrankheit. Außerdem weisen diese Patienten eine vergrößerte Milz und vergrößerte Tonsillen auf.

## ***2.4.2 Sekundäre Lipidstoffwechselstörungen***

Viele systemische Erkrankungen können die Manifestation einer primären Lipidstoffwechselstörung fördern oder sie hervorrufen. Angeführt einige Beispiele:

Diabetis: Durch Insulinmangel fehlt die Hemmung der Lipolyse. Es kommt zur Freisetzung von Fettsäuren und im weiteren Stoffwechselgeschehen zur Hypertriglyceridämie. Adipositas und Lipoproteinlipasemangel verstärken das Bild. Reaktiv sinkt das HDL.

Hypothyreose: Hypothyreose vermindert die Anzahl der LDL-Rezeptoren. Es kommt durch Akkumulation von LDL zur Hypercholesteriämie.

Cholestase: Phospholipide und Cholesterin der Galle reichern sich im Blut an. Es bilden sich Lipoproteine, eine massive Cholesterinerhöhung ist die Folge.

## 2.5 Einführung in die Separation von Lipidklassen aus Plasma

Die koronare Herzkrankheit stellt eine der häufigsten Todesursachen der westlichen Welt [Hoving EB, 1988] da. Ihre Ursache findet sich meist in primären und sekundären Lipidstoffwechselstörungen, nämlich erhöhten Cholesterin in den LDL [Hoving EB, 1988] und den damit verbundenen Gefäßveränderungen der Atherosklerose. Volkskrankheiten wie erhöhter Blutdruck, auch der apoplektische Insult basieren oft auf solchen Störungen des Lipidstoffwechsels. Auch Übergewicht tritt zunehmend häufiger auf und mündet in derartige Beschwerden. Um diese Krankheiten besser beherrschen zu können, ist nicht nur ein exaktes Wissen ihrer Ursachen, sondern auch ihrer Auswirkungen von Interesse. Hier rückt die Lipidklassenseparation ins Zentrum vieler Studien. Gerade bei den Lipoproteinstoffwechselstörungen kann die Analyse ihre Lipidklassenzusammensetzung und ferner ihrer Fettsäuren Aufschluss bringen.

Es gab bereits Studien, die mit unterschiedlicher Intention die Lipidklassenzusammensetzung von Lipoproteinen analysierten [Schmitz G et al. ,1984; Nara C, 1984; Tvorogova MG et al. ,1998]. Die Lipidklassenseparation erfolgte hier mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, eine Oxidation der Lipide an der Luft wurde in Kauf genommen (siehe unten).

Es ist bisher bewiesen, dass bestimmte Fettsäuren, die über die Nahrung zugeführt werden, zum Teil starken Einfluss auf Entstehung und Weiterentwicklung von Herzkreislauferkrankungen nehmen: Gesättigte Fettsäuren erhöhen z.B. den LDL- und freien Cholesterinspiegel und somit das KHK-Risiko. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren allerdings haben genau den entgegen gesetzten Effekt. Auch trans- Fettsäuren erhöhen den Cholesterinspiegel und fördern stark das KHK-Risiko. Tierexperimente an Primaten haben gezeigt, dass das Atheroskleroserisiko weit zunimmt, ersetzt man mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch einfach ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren. Auch ein Blutdrucksenkender Effekt von einfach ungesättigten Fettsäuren ist nachgewiesen worden [alles: Wolfram G, 2003; Kris-Etherton P, 2001, Kongress]. Lipidklassenuntersuchungen und Analyse ihrer Fettsäuren erlauben also eine Abschätzung des Erkrankungsrisikos der KHK am Patienten, ebenso geben sie einen Einblick in die diätetische Compliance des Patienten [Hoving EB, 1988; Arab L, Akbar J, 2002], nicht nur

in Bezug auf Fettaufnahme, sondern auch Alkohol- oder Kohlenhydratgenuß[Kuksis et al. ,1992].

Auch in der Krebsforschung gibt es Studien, die sich mit dem Zusammenhang von Ernährungsgewohnheiten, ins Besondere Nahrungsfetten[Zock PL, 2001], und Krebs auseinandersetzen. Das Brustkrebsrisiko steigt wahrscheinlich mit der Aufnahme von trans-Fettsäuren; Prostatakrebs zeigt eine Korrelation zur Ernährung mit gesättigten Fettsäuren[Zock PL, 2001; Kris-Etherton P, 2001, Kongress].

Sogar psychiatrische Erkrankungen könnten durch Fettsäureuntersuchungen in Abhängigkeit ihrer Lipidklassen Aufklärung erfahren. Es gibt z.B. Untersuchung zur Depression, die einen verringerten  $\omega$ -3-Status in den Plasmalipiden feststellten und eine veränderte Zusammensetzung der Serumphospholipide der Patienten[van West D, Maes M, 2003]. Auch Schizophreniepatienten weisen Veränderungen im Fettsäuremuster auf[Horrobin et al. ,2002].

Es bedarf also eine Lipidklassenseparation mit anschließender Fettsäureanalyse und Quantifizierung in den unterschiedlichsten Disziplinen der Medizin.

### **Die Lipidklassenseparation im Plasma**

Um den Ansprüchen des klinischen Alltags und größerer experimenteller Studien entsprechen zu können, sollte eine Methode zur Lipidklassenseparation im Plasma schnell, zuverlässig, von geringen Personal- und Zeitaufwand sein und ein möglichst geringes Probenvolumen benötigen. Diese Parameter verfolgend, habe ich mich an einer Methode von Hamilton und Comai[Hamilton JG, Comai K, 1988] orientiert. Diese Methode bedient sich vorgepackter Kieselgelsäulen und erreicht die Trennung von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden. Eine Separation dieser Klassen sowie Trennung von Mono-, Di- und Triglyceriden wurde schon Kaluzny et al.(1985) auf Aminopropyl-Kieselgel-Säulen entwickelt. Doch benötigte deren Methode eine zweite Säule um Cholesterinester und Triglyceride zu trennen, und kommt daher meinem Anspruch an eine schnelle und einfache Separation nicht entgegen. Auch wenn es schon bald Kritik an der Reproduzierbarkeit der Methode von Comai und Hamilton gab[Christie WW, 1992], habe ich sie dennoch gewählt, denn sie bietet hohen Probendurchsatz, bei günstigem Equipment, wenn man den Vergleich zur Lipidklassenseparation durch HPLC [Christie WW, 1985] wählt und ist sehr viel einfacher zu händeln, als die Dünnschichtchromatographie.

Ferner besteht bei der Dünnschichtchromatographie durch die lange Exposition der Lipide an Luft ein hohes Risiko der Autooxidation [Burdge et al. , 2000; Agren et al. , 1992]. In meiner speziell für Plasmaproben entwickelten Modifikation, die vor allem an Probenvolumen und Lösungsmitteln spart und sehr viel kleinere Säulen benötigt, konnte ich trotz unterschiedlichster Umgebungsbedingungen, ins Besondere der Temperatur, eine hohe Reproduzierbarkeit erreichen. Denn die Reproduzierbarkeit der Separation auf Kieselgelsäulen obliegt vor allem der Handhabung der Säulen. Ruiz-Gutierrez und Perez-Camino [Ruiz-Gutierrez V, Perez-Camino MC; 2000] fanden in ihren Literaturrecherchen heraus, dass vor allem die Eigenschaft der Kieselgelsäulen Wasser zu ziehen ihre Separationsfähigkeit ändert. Demnach kann eine geeignete Verpackung der Säulen Probleme dieser Art vollständig beheben.

Trotz allem bedarf es eine sehr gewissenhafte Auswahl der Säulen, denn ihr Material darf während der Elution besonders im sauren Bereich keine Kontaminationen abgeben [Prasad et al. , 1988].

Für die anschließende Fettsäureanalyse der Plasmalipidklassen stand der im Kapitel 3.1.1 ausführlich beschriebene Gaschromatograph zur Verfügung. Seine Eigenschaften und Funktionsweise werden ebenso wie das Prinzip der Festphasenseparation auf Kieselgelsäulen nachfolgend beschrieben.

## 2.6 Prinzip der Festphasenextraktion auf Kieselgelsäulen zur Lipidklassenseparation

Festphasenextraktion stellt eine chemisch-physikalische Form der Separation von Substanzgemischen da, welche eine feste und eine mobile Phase nutzt.

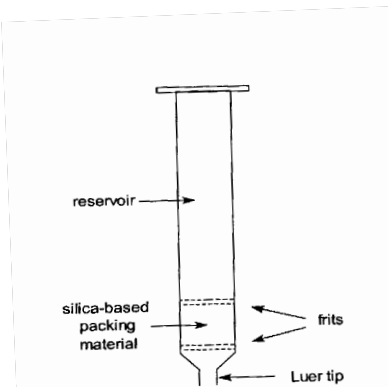


Abbildung 4: Kieselgelsäule zur Festphasenseparation aus [Christie WW, 1992]

Die unterschiedliche Affinität der Substanzen zur festen oder mobilen Phase ermöglicht eine Separation. Die feste Phase, in diesem Fall Kieselgel, liegt in Partikeln bestimmter Größe vor und ist in einer Säule mit definierter Dichte gepackt. Die verwendeten Säulen sind maschinell gefertigt und bieten daher gleichbleibende Packdichte, was die Reproduzierbarkeit der Versuche von Charge zu Charge gewährleisten soll [Christie WW, 1991]. Sie haben die Form von Spritzen (siehe



Abbildung 4), in deren unteren Ende sich das Kieselgel befindet, hier 100mg. Darüber verbleibt ein Lösungsmittelreservoir, in diesem Fall 3ml. Am unteren Ende verengt sich die Säule und kann in die Licrolutvorrichtung (siehe Kapitel 3.1.1 Geräte) eingebracht werden. So wird eine Verbindung zu einem Auffanggefäß, als auch der Anschluss von Vakuum, notwendig um einen gleichbleibenden Durchfluss der mobilen Phase zu gewährleisten, ermöglicht. Die mobile Phase wird fraktionsweise aufgegeben und ebenso aufgefangen. In jeder Fraktion einer Separation werden unterschiedliche Lösungsmittel verwendet, so dass jeweils nur die Substanzen eluiert werden, die in ihren Eigenschaften dem spezifischen Lösungsmittel entsprechen. Kieselgel selbst ist polar, daher werden die polaren Komponenten eines Substanzgemisches am stärksten retiniert, und es wird mit der Elution der unpolaren Substanzen begonnen.

Die Kräfte, die das Zurückhalten der Substanzen bewirken sind unterschiedlicher Natur und hängen von der Substanz ab. Die polaren Sialolgruppen des Kieselgels interagieren mit Wasserstoffbrückenbindung oder Ionenbindung.

### **Ablauf einer Lipidklassenseparation nach Hamilton und Comai [Hamilton JG, Comai K; 1988]**

In der Vorbereitung werden die Säulen gewaschen, d.h. es wird erst eine Fraktion Hexan/MTBE 96:4 aufgegeben und vollständig eluiert. Anschließend folgt eine Fraktion Hexan/MTBE 200:3, hier wird nur soviel eluiert, als dass noch ein Restvolumen über dem Packmaterial erhalten bleibt. Dieser Vorgang hat zwei Funktionen: Zum einen wird die Säule von Verunreinigungen befreit, die die anschließende Analyse stören könnten. Zum anderen ist die Säule mit dem Elutionsmittel befeuchtet, welches die nachfolgende Trennung anführt und erhält so alle Eigenschaften zur Elution der ersten Lipidklasse.

Die Lipidmischung wird in Hexan/MTBE 200:3 aufgegeben. Die erste Fraktion wird ebenfalls mit Hexan/MTBE 200:3 eluiert und enthält die Cholesterinester, die Fraktion der Triglyceride wird mit Hexan/MTBE 94:4 eluiert. Nach dem Ansäuern der Säule folgt die Fraktion der freien Fettsäuren mit Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2 und die Elution von Cholesterin mit MTBE/Eisessig 100:0,2. Die polaren Phospholipide sind während des ganzen Procedere auf der Säule verblieben und werden mit MTBE/Methanol/Ammoniumacetat (pH 8,6) in verschiedenen Volumenverhältnissen in den Gruppen der Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylcholine eluiert.

## **Beschreibung einer neuen Methode zur Lipidklassenseparation aus Plasma in Anlehnung an Hamilton und Comai**

Comai und Hamilton [Hamilton JG, Comai K; 1988] nutzten verhältnismäßig große Säulen mit 600mg Kieselgel und große Lösungsmittelmengen, mind. 12ml pro Fraktion. Aus oben genannten Gründen habe ich mich entschlossen sehr kleine Volumina der Plasmaproben zu nutzen und daher versucht auch das Säulenmaterial zu reduzieren und nutzte 100mg Kieselgelsäulen. Die Lösungsmittel sollten dementsprechend auch reduziert werden, um immer noch einen hohen Probendurchsatz zu erlauben.

Ferner sollte die Methode genau auf Plasmaproben zugeschnitten sein, ich habe so versucht eine Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden zu erreichen und mich dabei an humanen Normallipidplasmawerten nach Geigy [S.:112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] orientiert und alle meine Vorversuche mit diesen oder vielfachen Konzentrationen durchgeführt. Ferner habe ich versucht interne Standards für jede Lipidklasse einzuführen, die die Separation mit durchlaufen und bei der späteren gaschromatographischen Analyse als Erfolgsparameter für die erfolgte Separation, aber auch als Bezug für die Identifizierung und Quantifizierung der Fettsäuren einer Lipidklasse dienen sollten (siehe auch Prinzip des Gaschromatographen).

Bei jeder Separation mit Modelllipiden ist es notwendig, dass jede Lipidklasse nur eine Fettsäure enthält und sich durch ihre Fettsäuren von jeder anderen am Versuch beteiligten Lipidklasse unterscheidet. Nur so kann das Gaschromatogramm in der Analyse an Hand der Fettsäurenkomposition Aufschluss darüber geben, welche Lipidklassen in der ausgewerteten Fraktion eluiert worden sind und Gelingen und Versagen der Separation beschreiben.

### **Prinzip der lipidklasseninternen Standards**

Ein lipidklasseninterner Standard ist eine Substanz, die in ihren Eigenschaften denen der jeweiligen Lipidklasse entspricht, also auch ein Lipid, genauer ein Cholesterinlester, Triglycerid, eine freie Fettsäure oder ein Phospholipid, welche aber ausschließlich eine in der Natur nicht vorkommende Fettsäure enthält und zwar jedes Lipid, bzw. jede Klasse ihre eigene.

Der interne Standard jeder Klasse wird dem Lipidgemisch oder dem natürlichen Probe bereits vor eventueller Extraktion oder Separation in bekannter Menge seiner Fettsäure zugesetzt. In der gaschromatographischen Analyse jeder Fraktion zeigt der lipidklasseninterne Standard dann vor allem an, ob die Separation sauber verlaufen ist, d.h. er nur in der für seine

Lipidklasse vorgesehenen Fraktion zu finden ist. Separationen bei denen dieses nicht der Fall ist gelten als erfolglos, denn da der interne Standard die gleichen Eigenschaften wie andere Lipide seiner Klasse besitzt, muss in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass auch die Analyten sich nicht sauber aufgetrennt haben.

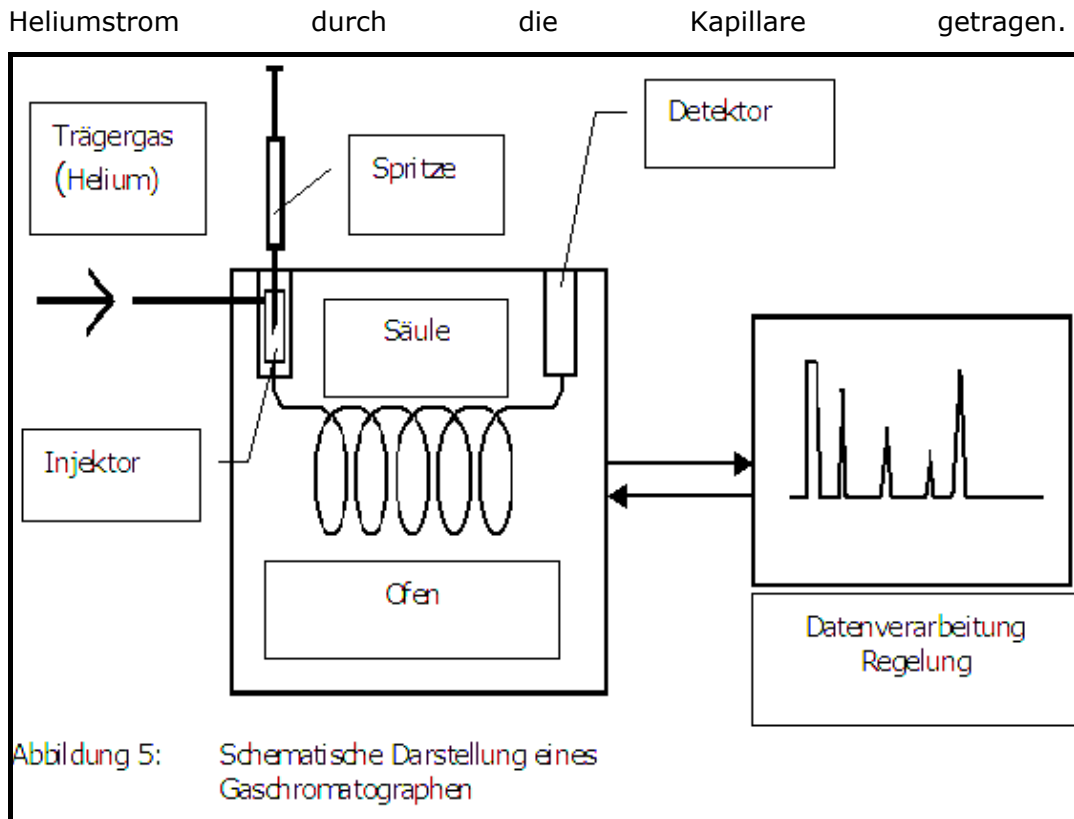
Ferner erlaubt eine Betrachtung der Peakfläche des jeweiligen internen Standards im Chromatogramm eine Abschätzung der Menge, welche letztendlich die Analyse erreicht hat. So lassen sich Verluste des Standards durch die Extraktion, Separation oder auch durch ungenügende Derivatisierung feststellen. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Verluste des Standards denen der anderen Lipide der Klasse entsprechen. Deswegen sollte er trotz allem noch eine korrekte Quantifizierung der Lipide seiner Klasse in der gaschromatographischen Analyse erlauben; Genaueres im folgenden Kapitel "Prinzip des Gaschromatographen".

## 2.7 Prinzip des Gaschromatographen

### Technische Grundlagen

Der Gaschromatograph erlaubt es, flüchtige Substanzen wie zum Beispiel die Methylester der Fettsäuren nach Polarität, Form und Größe aufzutrennen und schlussendlich zu identifizieren und zu quantifizieren.

Die wichtigste Funktionseinheit des Chromatographen ist die Säule, hier findet die Trennung der Substanzen statt. Die Säule ist eine 30m lange Quarzkapillare mit einem Innendurchmesser von 0,25mm und außen durch einen Plastiküberzug stabilisiert. Nach innen ist die Oberfläche des Quarzes mit einem Polymer, das sehr polare Cyanopropylgruppen und wenig polare Trimethylgruppen zu gleichen Anteilen enthält beschichtet. Diese Oberfläche bildet die stationäre Phase. Die Säule wird vom Trägergas Helium (mobile Phase) durchströmt. Die Verteilung der Substanzen zwischen beiden Phasen macht ihre Auftrennung möglich. Es können nur Substanzen getrennt werden, die einen unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten haben. Die Probe wird dafür mit einer Mikroliterspritze in den Injektor des Gaschromatographen überführt. Dort wird die Probe auf etwa 260°C erhitzt und verdampft und gelangt auf die Säule. Die unterschiedlichen Substanzen der Probe werden je nach Siedepunkt und Polarität mit verschiedener Geschwindigkeit im



So erreichen sie nach unterschiedlicher Zeit das Ende der Säule und damit den Flammenionisationsdetektor. Hier wird die Substanz verbrannt, dabei bilden sich Ionen, deren elektrischer Strom detektiert wird. Die Stromstärke ist proportional zur Menge der Ionen und so auch zur Menge der verbrannten Substanz. Das erzeugte elektrische Signal wird vom Auswertungsprogramm in Form eines Peaks dargestellt, seine Fläche proportional zur Substanzkonzentration. Die Darstellung erfolgt in Abhängigkeit zur Zeit, so dass im Chromatogramm auch die Retentionszeit der Substanz deutlich wird. Die Quantifizierung und Identifizierung der Substanz kann nur mit Hilfe eines Standards und nach Kalibrierung des Detektors und des Auswertungsprogramms für die spezifische Substanz erfolgen.

Der für diese Arbeit genutzte Gaschromatograph ist, wie oben beschrieben, mit einer sehr polaren Säule ausgestattet. Fettsäurenmethylester können hier nicht nur nach Kettenlänge, sondern auch nach Anzahl der Doppelbindung aufgetrennt werden. Hierbei ist es sogar möglich Fettsäuren mit gleicher Anzahl, aber unterschiedlicher Lokalisation der Doppelbindung, ja sogar die cis und trans Form der Fettsäuren aufzutrennen.

Dabei verlängert jedes zusätzliche C-Atom einer Fettsäure die Retentionszeit, ebenso wie jede Doppelbindung.

Es kann so vorkommen dass eine Kürzere aber mehrfach ungesättigte Fettsäure nach einer längeren gesättigten eluiert wird. [Eder K, 1995, review].

## **Identifizierung und Quantifizierung der Proben**

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Fettsäuremethylester(FAME) einer Probe muss diese einen Standard in bekannter Menge enthalten, zum Beispiel Heptadecansäuremethylester. Der Gaschromatograph, bzw. Auswertungsprogramm und Detektor, muß für diesen Standard und sämtliche zu analysierende FAME kalibriert werden, d.h. heißt es werden bekannte Mengen Standard und FAME gaschromatisch vermessen, ihre Detektorsignale bzw. Peakflächen erfasst und Retentionszeiten bestimmt (siehe unten). Bei jeder Auftrennung einer Probe identifiziert das Auswertungsprogramm alle kalibrierten FAME, indem ihre Retentionszeiten im Verhältnis zur aktuellen Standardretentionszeit gesetzt werden. Ihre Menge bzw. Konzentration (pro  $\mu$ l) wird aus der Peakflächen des FAMES im Verhältnis zur Peakfläche des Standards, dessen Menge bekannt ist und mit der fettsäuremethylesterspezifischen Eichkurve berechnet.

## **Kalibrierung des Gaschromatographen für die Fettsäureanalyse mit unterschiedlichen internen Standards**

### **Prinzip Kalibrierung**

Die Kalibrierung des Gaschromatographen erfolgt als Zweipunkteichung. D.h. jeder FAME wird in zwei Konzentrationen in Bezug auf eine feste Konzentration des internen Standards vermessen. Der interne Standard sollte ähnlich der Analyten und stabil sein, seine Retentionszeit sollte sich von allen Analyten und Lösungsmittelpeaks unterscheiden, ebenso von der sämtlicher Komponenten, die in Proben vorkommen, die später analysiert werden sollen. Bei der Fettsäureanalyse eignet sich daher besonders der Methylester einer Fettsäure mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen, da diese Säuren in der Natur so gut wie nicht vorkommen. Man wählt Lösungen der FAME mit einer Konzentration von 20 $\mu$ g/ml FAME als Level 1 der Kalibrierung und eine Konzentration von 100 $\mu$ g/ml als Level 2. In beiden Lösungen ist die Konzentration des internen Standards, z.B. Heptadecansäuremethylester bei 100 $\mu$ g/ml. Jede Lösung wird 3-mal gaschromatographisch vermessen und von der Auswertungssoftware folgende Daten erfasst: Die Fläche des Standards-, sowie des Analytenpeaks und ihre Retentionszeiten. Es ist möglich mehrere FAME gleichzeitig zu kalibrieren, doch sollte man hierbei darauf achten, dass

sie sich in ihrer Retentionszeit so stark unterscheiden, dass sie auch in den hohen Kalibrierungskonzentrationen sauber getrennt werden.

Manuell eingefügt werden: Die reale Konzentration von Standard und FAME der Kalibrierungslösung.

Aus beiden Angaben berechnet das Programm bei der Kalibrierung nun die Menge FAME pro Peakfläche, den Response-Faktor, für beide Konzentrationen, auch für die Standardkonzentration. Für jeden Analyten wird mit Hilfe des Responsefaktors eine Eichgerade erstellt. Im Eichdiagramm repräsentiert die Abszisse die Fettsäuremethylesterkonzentrationen und die Ordinate die mit Hilfe des Responsefaktors ermittelte, substanzspezifische Detektorantwort. Da drei Messungen erfolgen, wird bei Erstellung der Eichgerade gemittelt.

Bei jeder Analyse einer unbekannt Probe kann das Programm nun die Menge einer Komponente Y durch

**Y = X \* aktueller Standardmenge** mit

**X = (Peakfläche Y/ Peakfläche interner Standard) \* (Response Faktor Y/Response Faktor int.Standard)**

berechnen.

## 2.8 Prinzip der Lipidderivatisierung

Um die Fettsäuren der Lipidklassen für die gaschromatographische Analyse zugänglich zu machen, müssen sie zum einen aus ihre Verbindung des Lipids gelöst werden, zum anderen in eine flüchtige Verbindung überführt werden(siehe auch: 2.7 "Prinzip des Gaschromatographen"). Als flüchtige Verbindung eignen sich besonders Ethyl- oder Methylester der Fettsäuren.

Formal müssen die Lipide also verseift werden und in einer zweiten Reaktion mit einem Alkohol neu verestert werden. Da die Verseifung der Lipide aber sehr zeitaufwendig[Eder K, 1995] ist, und zudem mit jeder neuen Reaktion, jedem neuen Reaktionsgefäß und neuen Reaktionslösungen das Risiko des Lipidverlustes gegeben ist, ist man im Allgemeinen[Lepage G und Roy CC, 1986; Garces R und Mancha M, 1992; Shimasaki et al.,1977; Segura R, 1988] dazu übergegangen eine direkte Umesterung der Lipide mit einem Alkohol, die so genannte Alkoholyse, durchzuführen. Die Vorteile sind, dass nur ein Reagenz notwendig ist und somit die Reaktion in einem Gefäß und ohne

Verluste ablaufen kann; die Reaktionsdauer zeigt aber meist keine Vorteile[Eder K 1995, review].

Die direkte Umesterung benötigt einen Katalysator, generell ist sowohl Basen-, als auch Säurenkatalyse möglich und beides auch mit Erfolg angewandt worden. Allerdings benötigen säurenkatalysierte Umesterung Hitze, das stellt besondere Ansprüche an das verwendete Material, auch die Gefahr des Probenverlustes durch Verdampfen muss ständig im Auge behalten werden. Die von Eder[Eder K 1995, review] beschriebenen basischen Umesterungsreaktionen arbeiten alle bei Umgebungstemperatur sind aber z.T. nicht für alle Lipidklassen praktikabel.

Unerheblich davon für welche Umesterungsreaktion man sich entscheidet, müssen folgende Fehlerquellen für eine exakte Analyse ausgeschlossen werden:

- Erfolgt eine inkomplette Umesterung der Lipide? Jede Umesterungsreaktion sollte zuvor an Modellsubstanzen getestet werden.
- Sämtliche verwendete Chemikalien dürfen in der gaschromatographischen Analyse nicht mit den Peaks der Fettsäuremethylester interferieren, ebenso muss eine Verwechslung der Chemikalien mit den Fettsäuremethylester im Chromatogramm ausgeschlossen werden.
- Konnten die umgeesterten Lipide komplett extrahiert werden und in die Gaschromatographie Probe überführt werden?
- Verluste der sehr flüchtigen Fettsäuremethylester während der Bearbeitung müssen ausgeschlossen werden[Eder K, 1995, review]
- Die Fettsäuren dürfen sich während der Umesterung nicht verändern, d.h. mehrfach ungesättigte Fettsäuren müssen vor Oxidation geschützt werden, dieses ist mit der Zugabe von BHT zu erreichen.

[Eder K, 1995, review; Christie WW,1985]

Können alle diese Anforderungen eingehalten werden, steht einer gaschromatographischen Analyse mit korrekter Identifikation und Quantifizierung der Fettsäuren nichts im Wege.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Gaschromatograph :

Series II 5890 (Hewlett Packard) (Agilent Technologies) mit

HP 7673 B Autosampler (Agilent Technologies)

HP 3356 ChemStation

Chromatographische Bedingungen:

- Injektionsvolumen 1  $\mu$ l
- Injector, 250° C, purge off 1,5 min,
- Septum Purge 1 ml/min; split 1:20
- Säule DB–225; 30 m x 0,25 mm; 0,25  $\mu$ m Filmdicke (J & W, Agilent)
- Constant Flow, Trägergas: Helium, 37m/s bei 70°C
- T<sub>0</sub> 70° 1 min; 20° C/min bis 180° C; 3° C/min bis 238° C; 22,57 min hold, Gesamtanalysenzeit 57 min (hold Zeit kann bei Analysen ohne Cholesterin verkürzt werden)
- Detektor: Flammenionisationsdetektor FID 300°, Helium make up Gas, 30ml/min C
- Verarbeitende Software und Personal Computer

Die Einstellungen des Gaschromatographen werden in allen Versuchen beibehalten!



Licrolut Vorrichtung:

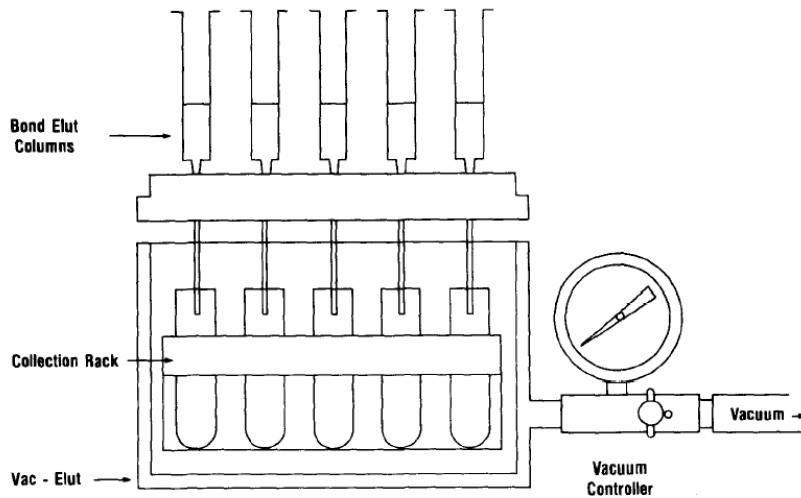


Abbildung 6: Vac Elut Apparat aus [Kaluzny et al., 1985]

Die Licrolut Vorrichtung (der Firma Merck) besteht maßgeblich aus einer nach oben offenen Glaskammer in der sich Kunststoffhalterungen für 12 Reagenzgläser befinden.

Über ein Ventil mit Barometer ist es möglich ein Vakuum mit Hilfe einer elektrischen oder Wasserstrahlpumpe anzulegen.

Die obere Öffnung wird vollständig von einem Kunststofftischchen verschlossen, welches 12 Ventile mit langen metallenen Auslassrohren enthält.

Auf die Ventile können sowohl Kunststoffkieselgelsäulen gesetzt werden, als auch Filter unterschiedlicher Porengröße. Wird nun die Vakuumpumpe betrieben entwickelt sich ein Sog, der Filtration und Elution möglich macht und über das Ventil am Barometer, sowie über jedes der 12 Ventile reguliert werden kann.

Stickstoffbegasungseinrichtung:

Mit Hilfe des Wasserbades können hier Lösungsmittel aus bis zu 12 Gefäßen parallel abgedampft werden. Die Stickstoffzuleitung ist mit einem Ventil versehen, so dass der Zustrom reguliert werden kann. Über ein Glasrohrsystem wird der Strom auf 12 Ausgänge gelenkt, die alle in einem Gummischlauch enden. Hier kann eine Pasteurpipette angeschlossen werden, über die das Reagenz im Wasserbad direkt erreicht wird.

Trockenschrank:

Temperatur regulierbar, hier 80 bis 100°C

Ultraschallbad: Bondelin

Vakuumpumpe: MZ2C Vacuubrand

Vortexer

Waage: Satorius LA120S

Wasserbad:

Wasserbad mit regulierbarer Temperatur, für sämtliche Versuche 50°C

Zentrifuge: ( Laboratory Centrifuges 6 K 15 (Sigma)  
- Rotor Nr. 13127; 306g; 299/01 (Sigma)

### **3.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Einmalspritzen 10 ml: B. Braun Melsungen

Filter: E. Filterhalter MULOCLEAR; 0,45µm PTFE 25mm; Farbcode blau; Art.-  
Nr.: 390802; bezogen bei:  
CS-Chromatographie Service GmbH

Gaschromatographievials für Autosampler:

Vial: Flasche R1, braun 62mm BF, Art-Nr.: 301128  
mit Mikroeingang: G301s, 6mm WR6100, Art.-Nr.: 301407  
und Bördelkappe: R11-1.0/HP WE6260, Art.-Nr.: 301114  
alles bezogen bei:  
CS-Chromatographie Service GmbH

Glasflaschen, dunkel  
5ml, 10ml, 50ml

Pasteurpipetten

Pipetten  
100-1000µl, 10-100µl, 10-200µl

Reagenzgläser mit Cap und Teflondichtung

Pyrex oder

Schott ,hier musste die Dichtung durch eine extern bezogene Teflondichtung ersetzt werden.

Kieselgelsäulen:

Isolute SI

100mg Kieselgel, 3ml Gesamtvolumen

Part No. 460-0010-B

### **3.1.3 Chemikalien**

Aceton: p.a.-Qualität, Merck

Acetylchlorid: FLUKA

Ammoniumacetat: p.a.-Qualität, Merck

Arachidonsäuremethylester: Sigma

BHT, 2,6 –di-tert-butyl-p-cresol: FLUKA

Chloroform: p.a.-Qualität, Merck

Cholesterylheptadecanoat: Sigma

Cholesteryllinolat: Sigma

Cholesteryloleat: Sigma

Dipalmitoylphosphatidylcholin: Sigma

Docosahexaensäuremethylester: Sigma

Docosapentaensäuremethylester: Matreya

Eicosapentaensäuremethylester: Sigma

Eisessig: p.a.-Qualität, Merck

Erucasäuremethylester: Sigma

Ethanol: 80% mit Ethylketon vergällt, Apotheke Universitätsklinikum  
Hamburg- Eppendorf

Heptadecansäure: FLUKA

Hexan: p.a.-Qualität, Merck

Isopropanol: HPLC-grade, Aldrich

Isotonische Natriumchloridlösung: 0,9% Braun Melsungen AG

Kaliumdihydrogenphosphat: p.a.-Qualität, Merck

Linolatmethylester: Sigma

Linolensäure: Sigma

Linolensäuremethylester: Sigma

Methanol: p.a.-Qualität, Merck  
MTBE, tert-butylmethylether: p.a.-Qualität, Merck  
Myristatmethylester: Sigma  
Myristölsäuremethylester: Sigma  
Natriumcarbonat: p.a.-Qualität, Merck  
Natronlauge: 0,1M, Merck  
Ölsäuremethylester: Sigma  
Palmitatmethylester: Sigma  
Palmitölsäuremethylester: Sigma  
Pentadecansäuremethylester: Sigma  
Phosphatidylcholindipentadecanoyl: Sigma  
Salzsäure: unterschiedliche Konzentrationen, Merck  
Stearatmethylester: Sigma  
Toluol: p.a.-Qualität, Merck  
Tridecansäuremethylester: Sigma  
Tridecanoin: Sigma  
Triolein: Sigma  
Undecansäure: Sigma  
Undecansäuremethylester: Sigma

### **3.1.4 Standards**

Heptadecansäurestandard: Heptadecansäure in Ethanol 200µg/ml  
Pentadecansäurestandard: Pentadecanat in Chloroform 200µg/ml  
Tridecansäurestandard: Tridecanat in Chloroform 200µg/ml  
Undecansäurestandard: Undecanat in Chloroform 200µg/ml  
Mehrfachstandard:

Undecansäure 200µg/ml, Tritridecanoin 211,8µg/ml,  
Dipentadecanoylphosphatidylcholin 291,2µg/ml und  
Cholesterinheptadecansäure 465,4µg/ml in Chloroform,  
entspricht einem Gehalt jeder Fettsäure von 200µg/ml.

### **3.1.5 Probenmaterial**

EDTA Plasma eines freiwilligen Probanden  
Triglyceride: 122mg/dl; Gesamtcholesterin: 242mg/dl; HDL: 60mg/dl; VLDL  
24,4mg/dl; LDL 162mg/dl

## 3.2 Methoden- Kapazitätstests und Elutionsprofile

### 3.2.1 Grundsätze der Separation auf Kieselgelsäulen

#### Waschen und Konditionieren

Alle Kieselgelsäulen müssen vor jedem der nachfolgenden Versuche gleichbleibend gewaschen und konditioniert werden! Dieses wird vorausgesetzt und in den folgenden Methoden nicht mehr erwähnt!

#### Geräte:

Licrolut-Vorrichtung mit Vakuumpumpe

#### Material:

3 ISOLUTE 3ml Säulen, gepackt mit 100mg SI

3 Pyrexreagenzgläser

#### Chemikalien:

Hexan/MTBE 200:3

Hexan/MTBE 96:4

#### Ablauf:

Säulen und Gläser werden in die Licrolut-Vorrichtung eingebracht.

**Konditionieren der Säule:** 1ml Hexan/MTBE 96:4 wird auf jede Säule aufgegeben, nachdem keine Luftblasen mehr auszumachen sind, werden die drei entsprechenden Ventile leicht geöffnet, so dass sich die Säule langsam und vollständig leert. Die Ventile werden fest verschlossen, nun können zum anschließenden

**Waschen der Säule** 2-5 ml Hexan/MTBE 200:3 aufgegeben werden. Diesmal werden die Säulen unter Anlegen des Vakuums nur in soweit geleert, als dass noch ein Restvolumen von ca. 100µl über der Säulenfüllung zu sehen ist. Der jetzige Inhalt der Pyrexreagenzgläser kann verworfen werden. Die Gläser werden im nachfolgenden Versuch nicht verwendet!

#### Versuchsbedingungen

Jeder Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung. Es werden also immer drei gewaschene und konditionierte Kieselgelsäulen benötigt. Alle weiteren

Materialien und Chemikalien sind in der jeweiligen Versuchsbeschreibung aufgeführt.

Eluiert wird immer mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,1ml/min bei einem Vakuum von 60kPa und der Durchlauf bei einem Restvolumen von 100 $\mu$ l beendet. In der letzten Fraktion wird die Säule vollständig entleert. Jede Fraktion wird separat im Pyrexreagenzglas aufgefangen und verschlossen zur weiteren Verarbeitung beiseite gestellt.

### **3.2.2 Triglyceride**

#### **Kapazität der Triglyceride**

##### **Geräte:**

Gaschromatograph: Series II 5890 (Hewlett Packard)

Licrolut-Vorrichtung mit Vakuumpumpe

Stickstoff- Abdampfvorrichtung mit Wasserbad (50°C)

##### **Material:**

ISOLUTE 3ml Säulen, gepackt mit 100mg SI

Pyrexreagenzgläser, mit Gewinde und Cap

##### **Chemikalien:**

Acetylchlorid

BHT, 0,1M in Ethanol

Heptadecansäurestandard

Methanol/Toluol 4:1

Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösung:

Triolein, 0,25mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

##### **Elutionsschema:**

6 Fraktionen mit je 2ml der Triolein-Lösung (entspricht 500 $\mu$ g Triolein)

**Auswertung:** Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methylester der Ölsäure, dessen Menge gaschromatographisch bestimmt

werden kann. So kann auf die Menge der in der Säule zurückgehaltenen Triglyceride geschlossen werden.

### **Kapazität von Triglyceriden unter Phospholipidbelastung**

#### **Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride  
Ultraschallbad

#### **Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

#### **Chemikalien:**

Acetylchlorid  
BHT, 0,1M in Ethanol  
Heptadecansäurestandard  
Methanol/Toluol 4:1  
Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

#### **Lipidlösungen:**

Dipalmitoylphosphatidylcholin, 0,25mg/ml in Hexan/MTBE 200:3  
und  
300µl Hexan/Isopropanol 3:1  
Triolein, 0,25mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

#### **Versuchsvorbereitung:**

Der Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung. Es werden daher drei Versuchslösungen in Pyrexreagenzgläser angesetzt. Je 0,5ml der Dipalmitoylphosphatidylcholin Lösung werden unter Stickstoffbegasung eingedampft und der Rückstand mit Hilfe des Ultraschallbades(10sec.) erneut in 2ml der Triolein-Lösung gelöst.

#### **Elutionschema:**

- 1.Fraktion: Versuchslösungen aus der Versuchsvorbereitung (2ml,entspricht 0,125mg Dipalmitoylphosphatidylcholin 0,5mg Triolein)
- 2.Fraktion: 2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3
- 3.Fraktion: 2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3
- 4.Fraktion: 2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3
- 5.Fraktion: 2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3

6.Fraktion: 2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3

**Auswertung:** Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4) es entsteht der Methyl ester der Palmitinsäure, sowie der Ölsäure, deren Mengen gaschromatographisch bestimmt werden können. So wird aufgezeigt, wie die Phospholipide die Menge der zurückgehaltenen Triglyceride beeinflussen.

### ***3.2.3 Cholesterinester***

#### **Elutionsprofil der Cholesterinester**

**Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Chemikalien:**

Acetylchlorid

BHT, 0,1M in Ethanol

Heptadecansäurestandard

Hexan/MTBE 200:3

Methanol/Toluol 4:1

Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösung:

Cholesterinoleat, 0,252mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

**Elutionsschema:**

1.Fraktion: 2ml 0,252mg/ml Cholesterinoleat in Hexan/MTBE 200:3

2.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3

3.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3

4.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3

5.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3

6.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3



**Auswertung:** Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methyl ester der Ölsäure, dessen Menge gaschromatographisch bestimmt werden kann. So kann auf die Menge der eluierten Cholesterinester geschlossen werden.

### **Cholesterinesterelution bei Phospholipidbelastung**

#### **Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride  
Ultraschallbad

#### **Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

#### **Chemikalien:**

Acetylchlorid  
BHT, 0,1M in Ethanol  
Heptadecansäurestandard  
Hexan/MTBE 200: 3  
Methanol/Toluol 4: 1  
Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösungen:

Cholesterinoleat, 0,25mg/ml in Hexan/MTBE 200: 3

Dipalmitoylphosphatidylcholin, 0,25mg/ml in Hexan/MTBE 200: 3

und

300µl Hexan/Isopropanol 3: 1

#### **Versuchsvorbereitung:**

Der Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung. Es werden daher drei Versuchslösungen in Pyrexreagenzgläser angesetzt, dazu werden je 0,5ml der Dipalmitoylphosphatidylcholin Lösungen unter Stickstoffbegasung eingedampft und das verbleibende Dipalmitoylphosphatidylcholin erneut in 2ml der Cholesterinoleat-Lösung gelöst. 10 sec. im Ultraschallbad unterstützen den Lösungsvorgang.

#### **Elutionsschema:**

1.Fraktion: Versuchslösungen aus der Versuchsvorbereitung (2ml entspricht 0,125mg Dipalmitoylphosphatidylcholin, 0,5mg Triolein)

- 2.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3
- 3.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3
- 4.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3
- 5.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3
- 6.Fraktion: 2ml Hexan/MTBE 200:3

**Auswertung:** Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methyl ester der Palmitinsäure, sowie der Ölsäure, deren Mengen gaschromatographisch bestimmt werden können. So wird aufgezeigt, wie die Phospholipide die Menge der zurückgehaltenen Cholesterinester beeinflussen.

### **3.2.4 Freie Fettsäuren**

#### ***Elutionsprofil der freien Fettsäuren***

**Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Chemikalien:**

Acetylchlorid

BHT, 0,1M in Ethanol

Heptadecansäurestandard

Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2

Methanol/Toluol 4:1

Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösung:

Linolensäure, 0,3mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

**Elutionsschema:**

- 1.Fraktion: 1ml der Linolensäure-Lösung (entspricht 300µg Linolensäure) nach Elution 3 mal 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 2.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2
- 3.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2
- 4.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2

5.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2

6.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2

**Auswertung:**

Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methylester der Linolensäure, dessen Menge gaschromatographisch bestimmt werden kann. So wird verdeutlicht in welcher Fraktion und Menge die freien Fettsäuren eluiert werden.

### **3.2.5 Phospholipide**

#### **Kapazität der Phospholipide**

**Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Chemikalien:**

Acetylchlorid

BHT, 0,1M in Ethanol

Heptadecansäurestandard

Methanol/Toluol 4:1

Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösung:

Dipalmitoylphosphatidylcholin, 0,25mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

und

300µl Hexan/Isopropanol 3:1

**Elutionsschema:**

5 Fraktionen mit je 2ml Dipalmitoylphosphatidylcholin-Lösung  
(entspricht 500µg Dipalmitoylphosphatidylcholin)

**Auswertung:** Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methylester der Palmitinsäure, dessen Menge gaschromatographisch

bestimmt werden kann. So kann auf die Menge der in der Säule zurückgehaltenen Phospholipide geschlossen werden.

### **3.3 Methoden - Probenvorbereitung und Lipidextraktionen**

#### ***3.3.1 Die Folch-Extraktion [Folch et al., 1957]***

##### **Geräte:**

Pipette 10- 200µl

Pipette 100-1000µl

Stickstoff- Abdampfvorrichtung mit Wasserbad (50°C)

Vortex

Zentrifuge

##### **Material:**

Pasteurpipetten

Reagenzgläser mit Gewinde und Cap

##### **Chemikalien:**

Interner Standard: Heptadecansäurestandard bzw. Mehrfachstandard

NaCl-Lösung, isotonisch

BHT, 0,1M in Ethanol

Chloroform/Methanol 3:1

Kaliumdihydrogenphosphat in H<sub>2</sub>O, 0,5M (Puffer)

##### **Proben:**

a.)Für die Modellversuche: Lipidlösungen verschiedener Zusammensetzung werden in Pyrexreagenzgläsern mit Standardlösung versetzt und eingedampft. Danach erneut gelöst in 50µl NaCl, um dem Plasma ähnliche Verhältnisse zu schaffen. Als Antioxidans werden 50µl der BHT Lösung hinzugefügt.

b.)Für die Plasmauntersuchungen: 50µl Plasma im Pyrexreagenzglas werden 50µl BHT-Lösung als Oxidationsschutz zugegeben

##### **Extraktion:**

Zu den vorbereiteten Proben werden 1000µl Chloroform/Methanol 3:1, als Extraktionsmittel und

150µl Phosphatpuffer, um das Milieu der Lösung sauer zu halten und so die Extraktion der anionischen Lipide zu gewährleisten, pipettiert.

Das Gemisch wird 2min gevortext.

1000µl Chloroform/Methanol 3:1 werden erneut zur Lösung pipettiert, maßgeblich um die organische Phase zu vergrößern und nachfolgende Arbeitsschritte zu erleichtern.

Das Gemisch wird 3min bei 3000U zentrifugiert. Die untere organische Phase(1850ml) wird weitestgehend mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein zweites Reagenzglas pipettiert, davon exakt 1500µl abgenommen und unter Stickstoffbegasung eingedampft. Diese Fraktion enthält 81% der ursprünglichen Lipidmenge zur weiteren Verarbeitung

### ***3.3.2 Die Hexan/Isopropanol Extraktion nach Hara & Radin [Hara A und Radin NS, 1978]***

#### **Geräte:**

Pipette 1000µl

Pipette 10-100µl

Stickstoff- Abdampfvorrichtung mit Wasserbad (50°C)

Vortex

#### **Material:**

Einmalspritzen, 10ml

Licrolut Vorrichtung

Licrolut-Filter

Reagenzgläser mit Gewinde und Cap

#### **Chemikalien:**

BHT, 0,1M in Ethanol

Chloroform

Hexan/Isopropanol 3:2

#### **Proben:**

siehe oben

#### **Extraktion:**

Zu den vorbereiteten Proben werden 1000µl Hexan/Isopropanol 3:2, als Extraktionsmittel pipettiert

Das Gemisch wird 2min gevortext.

Saubere Reagenzgläser und Filter mit Einmalspritzen bestückt werden in die Licrolut Anlage eingebracht und ein Vakuum wird angelegt. Das gesamte Extraktionsgemisch wird in die 10ml Einmalspritzen überführt, die Ventile geöffnet und die Plasmaproteine abfiltriert. Der Filter wird mit 0,5ml Hexan/Isopropanol und 1ml Chloroform nachgespült. Nun wird das gesamte Extraktionsmittel unter Stickstoffbegasung abgedampft, der Rückstand enthält die Lipide zur weiteren Verarbeitung.

### **3.4 Methode - Probenderivatisierung nach Roy und Lepage**

#### **Geräte:**

Stickstoff- Abdampfvorrichtung mit Wasserbad (50°C)

Trockenschrank

Zentrifuge

#### **Material:**

Gaschromatographievials mit Bördelkappe

Pipette 10-200µl

Pyrexreagenzgläser mit Cap

#### **Chemikalien:**

Acetylchlorid

BHT, 0,1M in Ethanol

Heptadecansäurestandard

Mehrfachstandard

Methanol/Toluol 4:1

NaCl- Lösung, isotonisch

Natriumcarbonat; ca. 0,5M in H<sub>2</sub>O

Pentadecansäurestandard

Tridecansäurestandard

Undecansäurestandard

#### **Durchführung:**

**Für Proben aus Extraktion, Wiederfindungsraten und sämtlichen Versuchen der Separation auf Kieselgelsäulen:**

**1. Abdampfen des Lösungsmittels:**

Das Lösungsmittel wird im 50°C warmen Wasserbad unter Stickstoffbegasung komplett abgedampft.

In jedes Probengefäß werden pipettiert:

50µl NaCl- Lösung, um sämtliche Ergebnisse vergleichbar für Plasmaproben zu machen.

**Für Plasmaproben ohne vorangegangene Extraktion und zur Weiterverarbeitung der oben genannten Proben:**

In jedes Probengefäß werden pipettiert:

100µl Standardlösung als interner Standard bei der gaschromatischen Bestimmung von Fettsäuren. Die Zugabe unterbleibt, wenn der Probe in der vorangegangenen Verarbeitung schon Standard zugeführt wurde.

25µl BHT-Lösung als Antioxidans.

2ml Methanol-Toluol 4: 1

200µl Acetylchlorid

Die Probengefäße werden sehr gut verschlossen und für eine Stunde in einen 80°C heißen Trockenschrank gestellt. Anschließend lässt man sie auf Raumtemperatur abkühlen.

6ml Natriumcarbonatlösung(6%) werden zum Neutralisieren der Proben dazugegeben.

Die verschlossenen Gefäße werden bei 3000 U/min für 5min zentrifugiert.

**3. Vorbereitung zur Vermessung der Proben :**

Aus der oberen Phase werden jetzt ca. 200µl in ein Autosamplervial pipettiert und mit einer Bördelkappe versehen. Die Proben können nun sofort gaschromatisch vermessen oder bei minus 80°C gelagert werden.

## 3.5 Methoden - Separationen von Modellgemischen

### *3.5.1 Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden*

#### **Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden unter Einfluss von Phospholipiden**

**Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride  
Ultraschallbad

**Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Chemikalien:**

Acetylchlorid  
BHT, 0,1M in Ethanol  
Heptadecansäurestandard  
Hexan/MTBE 200:3  
Hexan/MTBE 96:4  
Methanol/Toluol 4:1  
Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösungen:

Cholesterinlinolat, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3  
Dipalmitoylphosphatidylcholin, 2,5mg/ml in Hexan/Isopropanol 3:1  
Triolein, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

**Versuchsvorbereitung:**

Der Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung. Es werden daher drei Versuchslösungen in Pyrexreagenzgläser angesetzt. Dazu werden je 40µl, 50µl, bzw.75µl aller Lipidlösungen zusammen pipettiert und anschließend das Lösungsmittel unter Stickstoffbegasung abgedampft. Das Volumen der Lipidlösungen ist zwischen 40 und 75µl variiert worden, um die Separationsfähigkeit der Säule unter unterschiedlichen Belastungen testen zu können. Nach dem Eindampfen werden die Lipide erneut in 1ml Hexan/MTBE 200:3 gelöst. Der Lösungsvorgang wird mit einem 10 sekundigen Ultraschallbad unterstützt.



**Elutionsschema:**

Die Probengefäße werden vor jeder Fraktion mit der Elutionslösung gespült.

- 1.Fraktion: 1ml Versuchslösung aus der Vorbereitung;
- 2.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 3.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 4.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 5.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4
- 6.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4
- 7.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4
- 8.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4

**Auswertung:**

Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methylester der Palmitinsäure, der Ölsäure und Linolsäure, deren Mengen gaschromatographisch bestimmt werden können. So kann die erfolgte Trennung von Cholesterinestern und Triglyceriden beurteilt werden und ebenso untersucht werden, ob die Bindung der Phospholipide an die Säule der Elution beider Lipidklassen standhält.

**Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden unter Einfluss von Phospholipiden, Cholesterin und freien Fettsäuren**

**Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride  
Ultraschallbad

**Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

**Chemikalien:**

Acetylchlorid  
BHT, 0,1M in Ethanol  
Heptadecansäurestandard  
Hexan/MTBE 200:3  
Hexan/MTBE 96:4  
Methanol/Toluol 4:1  
Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösungen:

Cholesterin, 0.6mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Cholesterinlinolat, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Dipalmitoylphosphatidylcholin, 2,5mg/ml in Hexan/Isopropanol 3:1

Linolensäure, 0,3mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Triolein, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

### **Versuchsvorbereitung:**

Der Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung. Es werden daher drei Versuchslösungen in Pyrexreagenzgläser angesetzt, dazu werden je 40µl, 50µl bzw.75µl aller Lipidlösungen zusammen pipettiert und anschließend das Lösungsmittel unter Stickstoffbegasung abgedampft. Das Volumen der Stammlösungen ist zwischen 40 und 75µl variiert worden, um die Separationsfähigkeit der Säule unter unterschiedlichen Belastungen testen zu können. Nach dem Eindampfen werden die Lipide erneut in 1ml Hexan/MTBE 200:3 gelöst. Der Lösungsvorgang wird mit einem 10 sekündigen Ultraschallbad unterstützt.

### **Elutionsschema:**

Die Probengefäße werden vor jeder Fraktion mit der Elutionslösung gespült.

- 1.Fraktion: 1ml Versuchslösung aus der Vorbereitung;
- 2.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 3.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 4.Fraktion: 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 5.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4
- 6.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4
- 7.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4
- 8.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4

### **Auswertung:**

Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methylester der Palmitinsäure, der Ölsäure, Linolen- und Linolsäure, deren Mengen gaschromatographisch bestimmt werden können. So kann die erfolgte Trennung von Cholesterinestern und Triglyceriden beurteilt werden und ebenso untersucht werden, wie Cholesterin und freie Fettsäuren die Kapazität und Elution von Triglyceriden beeinflussen und ob die Retention der Phospholipide und freien Fettsäuren trotz der vorangegangene Elution von Cholesterinestern und Triglyceriden gesichert ist.

### ***3.5.2 Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von Cholesterin***

#### **Geräte:**

siehe Kapazität der Triglyceride  
Ultraschallbad

#### **Material:**

siehe Kapazität der Triglyceride

#### **Chemikalien:**

Acetylchlorid  
BHT, 0,1M in Ethanol  
Heptadecansäurestandard  
Hexan/ Eisessig 100: 0,2  
Hexan/MTBE 200:3  
Hexan/MTBE 96:4  
Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2  
Methanol/Toluol 4:1  
MTBE/Methanol/Ammoniumacetat 5:8:2  
Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

#### **Lipidlösungen:**

Cholesterin, 0,6mg/ml in Hexan/MTBE 200:3  
Cholesterinlinolat, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3  
Dipalmitoylphosphatidylcholin, 2,5mg/ml in Hexan/Isopropanol 3:1  
Linolensäure, 0,3mg/ml in Hexan/MTBE 200:3  
Triolein, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

#### **Versuchsvorbereitung:**

Der Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung .Es werden daher drei Proben angesetzt, dazu werden je 75µl der Lipidlösungen (entspricht 150µg Dipalmitoylphosphatidylcholin und Triolein sowie 187,5µg Cholesterinlinolat, 22,5µg Linolensäure und 45µg Cholesterin) in Pyrexreagenzgläser pipettiert und unter Stickstoffbegasung ihre Lösungsmittel abgedampft. Hierbei ist es möglich das pipettierte Volumen der Stammlösungen zu variieren um die

Säulen mit unterschiedlicher Belastung testen zu können. Die Lipide werden nun erneut in 1ml Hexan/MTBE 200:3 gelöst, 10sec. im Ultraschallbad unterstützen den Lösungsvorgang.

**Elutionsschema:**

Die Probengefäße werden vor jeder Fraktion mit der Elutionslösung gespült.

- 1.Fraktion: 1ml Versuchslösung aus der Vorbereitung;  
3 mal 1ml Hexan/MTBE 200:3
- 2.Fraktion: 2 ml Hexan/MTBE 96:4
- 3.Fraktion: Ansäuern (kein Spülen des Probengefäßes;  
Verwerfen des Eluats) 1ml Hexan/Eisessig 100:0,2
- 4.Fraktion: 3 mal 2ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2
- 5.Fraktion: 2 mal 2ml MTBE/Methanol/Ammoniumacacetat 5:8:2

**Auswertung:**

Die Proben werden derivatisiert (siehe 3.4). Es entsteht der Methylester der Palmitinsäure, der Ölsäure, der Linol- und Linolensäure, deren Mengen gaschromatographisch bestimmt werden können. So können die erfolgte Trennung, sowie die Wiederfindungsraten beurteilt werden.

***3.5.3 Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipidklasseninternen Standard unter Einfluss von Cholesterin***

Dieser Versuch gleicht der oben stehenden Separation mit der einzigen Ausnahme, dass 100µl eines alle Lipidklassen enthaltenen Standards vor dem Eindampfen zu der Versuchslösung gegeben werden.

**Ausnahmen:**

**Chemikalien:**

- Acetylchlorid
- BHT, 0,1M in Ethanol
- Hexan/ Eisessig 100: 0,2
- Hexan/MTBE 200:3
- Hexan/MTBE 96:4
- Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2

Mehrfachstandard

Methanol/Toluol 4:1

MTBE/Methanol/Ammoniumacetat 5:8:2

Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösungen:

Cholesterin, 0,6mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Cholesterinlinolat, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Dipalmitoylphosphatidylcholin, 2,5mg/ml in Hexan/Isopropanol 3:1

Linolensäure, 0,3mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Triolein, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

**Versuchsvorbereitung:**

Der Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung .Es werden daher drei Proben angesetzt. Dazu werden je 75µl der Modelllipidlösungen (entspricht 150µg Dipalmitoylphosphatidylcholin und Triolein sowie 187,5µg Cholesterinlinolat, 22,5µg Linolensäure und 45µg Cholesterin) und 100µl Mehrfachstandard in ein Pyrexreagenzglas pipettiert und unter Stickstoffbegasung ihre Lösungsmittel abgedampft. Hierbei ist es möglich das pipettierte Volumen der Lipidlösungen (nicht des Standards) zu variieren, um die Säulen mit unterschiedlicher Belastung testen zu können. Die Lipide werden nun erneut in 1ml Hexan/MTBE 200:3 gelöst, 10sec. im Ultraschallbad unterstützen den Lösungsvorgang.

**Auswertung:**

Die Proben werden derivatisiert(siehe 3.4), es wird bei der Derivatisierung kein Heptadecansäurestandard zugegeben. Es entsteht der Methylester der Palmitinsäure, der Ölsäure, der Linol- und Linolensäure, deren Mengen gaschromatographisch bestimmt werden können. So kann die erfolgte Trennung der Lipidklassen beurteilt werden und das Separationsverhalten des lipidklasseninternen Standards studiert werden.

***3.5.4 Separation nach Extraktion von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipidklasseninternen Standard unter Einfluss von Cholesterin***

Auch hier verläuft die Separation wie im vorausgegangenen Versuch: 3.3.2 "Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von Cholesterin", die Probenvorbereitung ist different(siehe 3.2.1).

**Ausnahmen:**

**Geräte:**

Pipette 1000µl

Pipette 10-100µl

Stickstoff- Abdampfvorrichtung mit Wasserbad (50°C)

Vortex

Zentrifuge

**Material:**

Einmalspritzen, 10ml

Licrolut Vorrichtung

Licrolut-Filter

Pasteurpipetten

Reagenzgläser mit Gewinde und Cap

Stickstoff- Abdampfvorrichtung mit Wasserbad (50°C)

**Chemikalien:**

Acetylchlorid

BHT, 0,1M in Ethanol

Chloroform

Chloroform/Methanol 3:1

Hexan/ Eisessig 100: 0,2

Hexan/Isopropanol 3:2

Hexan/MTBE 200:3

Hexan/MTBE 96:4

Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2

Interner Standard: Mehrfachstandard

Kaliumdihydrogenphosphat in H<sub>2</sub>O, 0,5M

Methanol/Toluol 4:1

MTBE/Methanol/Ammoniumacetat 5:8:2

NaCl-Lösung, isotonisch

Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösungen:

Cholesterin, 0,6mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Cholesterinlinolat, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Dipalmitoylphosphatidylcholin, 2,5mg/ml in Hexan/Isopropanol 3:1

Linolensäure, 0,3mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Triolein, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

### **Versuchsvorbereitung:**

Der Versuch erfolgt in Dreifachbestimmung. Es werden daher drei Proben angesetzt. Dazu werden je 75µl der Modelllipidlösungen (entspricht 150µg Dipalmitoylphosphatidylcholin und Triolein sowie 187,5µg Cholesterinlinolat, 22,5µg Linolensäure und 45µg Cholesterin) und 100µl Mehrfachstandard in ein Pyrexreagenzglas pipettiert und unter Stickstoffbegasung ihre Lösungsmittel abgedampft. Hierbei ist es möglich das pipettierte Volumen der Stammlösungen zu variieren, um die Säulen mit unterschiedlicher Belastung testen zu können. Nun folgt die Extraktion der Lipide nach Folch(3.2.1) oder Hara&Radin(3.2.2).

Erst nach Abdampfen der Extraktionsmittel werden die Lipide in 1ml Hexan/MTBE 200:3 mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst und die Separation wird begonnen.

### **Auswertung:**

Die Proben werden derivatisiert(siehe 3.4), es wird bei der Derivatisierung kein Heptadecansäurestandard zugegeben. Es entsteht der Methylester der Palmitinsäure, der Ölsäure, der Linol- und Linolensäure, deren Mengen gaschromatographisch bestimmt werden können. So kann die erfolgte Trennung der Lipidklassen beurteilt werden und die Auswirkung der Extraktion auf Separation und Analyse studiert werden.

## **3.6 Methoden – Lipidklassenseparation von Plasma**

Nach Zugabe von 100µl lipidklasseninternen Mehrfachstandards erfolgt zunächst die Extraktion des Plasmas(siehe 3.2.1 und 3.2.2).

Wenn nach Eindampfen des Extraktionsmittels die Lipide pur vorliegen, werden sie mit Hilfe eines 10sekündigen Ultraschallbades in 1ml Hexan/MTBE 200:3 gelöst und auf die Säule aufgegeben. Die Separation und Derivatisierung unterscheidet sich nicht von der oben stehenden.

### **3.7 Methoden - Wiederfindungsraten der Standards und Modellsubstanzen**

#### **Modellsubstanzen mit Heptadecansäurestandard oder Mehrfachstandard**

##### **Geräte:**

Gaschromatograph: Series II 5890 (Hewlett Packard)

Stickstoff- Abdampfvorrichtung

##### **Material:**

Pyrexreagenzgläser, mit Gewinde und Cap

##### **Chemikalien:**

Acetylchlorid

BHT, 0,1M in Ethanol

Heptadecansäurestandard

Mehrfachstandard:

Methanol/Toluol 4:1

NaCl-Lösung

Natriumcarbonat; ca. 0,5M (in Wasser)

Lipidlösungen:

Cholesterin, 0.6mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Cholesterinlinolat, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Dipalmitoylphosphatidylcholin, 2,5mg/ml in Hexan/Isopropanol 3:1

Linolensäure, 0,3mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

Triolein, 2,0mg/ml in Hexan/MTBE 200:3

##### **Durchführung:**

Jeder Versuch wird in Dreifachbestimmung durchgeführt. Es werden 100µl der Mehrfachstandardlösung oder Heptadecansäurestandardlösung in jedes von drei Pyrexreagenzgläsern pipettiert. Dazu werden 75µl jeder Lipidlösung



pipettiert, das entspricht eine Menge von 187,5µg Cholesterinlinolat, 150µg Triolein, 150µg Dipalmitoylphosphatidylcholin, 22,5µg Linolensäure und 45µg Cholesterin. Es folgt das Derivatisieren(siehe 3.4) der Proben mit einer

**Ausnahme:** Es wird kein weiterer Standard zugefügt.

Um verdünnte Proben zu erhalten und die Auswirkung von Verdünnung auf Vollständigkeit der Umesterung, sowie Wiederfindung der Lipide zu studieren, werden bei der Derivatisierung Anteile der Methanol/Toluol Lösung abgenommen(250µl oder 500µl) und in einem neuen Pyrexreagenzglas wieder mit Methanol/Toluol auf 2ml aufgefüllt. Die Derivatisierung wird mit Zugabe von Acetylchlorid wie gehabt fortgesetzt.

**Auswertung:**

Die Peakfläche jedes einzelnen Standards bei der gaschromatographischen Vermessung gilt als Maßstab für die Beurteilung der Standardwiederfindung in Separationsversuchen. Ebenso bieten Peakflächen der Modelllipide und ihre vom Gaschromatographen berechnete Menge einen Anhaltspunkt. Sind die Peakflächen nach Verdünnung verhältnismäßig größer, spricht das für eine konzentrationsabhängige Abnahme der Umesterung.

**Variation der Derivatisierung**

Alle Versuche zur Wiederfindung werden auch mit einer Derivatisierung(siehe 3.4) bei 100°C Ofentemperatur und 1Std. Reaktionszeit durchgeführt. Auch die Reaktionszeit wurde variiert, bis maximal 3Std.

**Auswertung:**

Durch Erhöhung der Reaktionszeit und Temperatur wird in der folgenden gaschromatographischen Analyse deutlich, ob die Reaktion bisher überhaupt vor der Analyse zu einen Ende gekommen war. Größere Peakflächen der Analyten im Chromatogramm im Vergleich zu den Vorversuchen weisen auf eine größere Menge Methylester des Analyten hin und verdeutlichen daher die notwendige Erhöhung von Reaktionstemperatur und Dauer, um die Umesterung zu einem Abschluss zu bringen.

### 3.8 Methoden - Kalibrierung des Gaschromatographen

#### **Geräte:**

Waage

#### **Material:**

Gaschromatographievials mit Bördelkappe

Lichtundurchlässige Glasflaschen mit Deckel

Messkolben, 10ml und 250ml

Pipetten 1000 $\mu$ l und 2000 $\mu$ l

#### **Chemikalien:**

Fettsäuremethylester, der Analyten und des internen Standards

Hexan

#### **Stammlösungen:**

Von jedem Fettsäuremethylester wird eine Lösung mit der Konzentration 1mg/ml in Hexan und von 10ml Volumen hergestellt. Vom internen Standard wird eine Lösung gleicher Art und 250ml Lösung mit der Konzentration 100 $\mu$ g/ml hergestellt.

#### **Level2:**

Standardkonzentration 100 $\mu$ g/ml, Konzentration der Analyten 100 $\mu$ g/ml

#### **Durchführung:**

Je 1ml der Fettsäuremethylester-Lösungen werden in einen 10ml Kolben pipettiert, bis zu neun unterschiedliche sind möglich, sollten sich aber in ihrem chemischen Verhalten und somit in ihrer Retentionszeit so unterscheiden, dass eine saubere gaschromatische Trennung möglich ist. 1ml Standardlösung wird hinzugefügt und, wenn nötig, auf 10ml mit Hexan aufgefüllt. Aufbewahrung der Kalbrierlösung kann in einer dunklen Glasflasche bei minus 20°C erfolgen.

Resultierende Konzentrationen der Komponenten sind:

Interner Standard 100 $\mu$ g/ml

Fettsäuremethylester(Analyten) 100 $\mu$ g/ml

**Level1:**

Standardkonzentration 100µg/ml, Konzentration der Analyten 20µg/ml

**Durchführung:**

Je 2ml Kalibrierlösungen aus Level2 werden in einen 10ml Kolben pipettiert und der Kolben auf 10 ml mit der Standardlösung, Konzentration 100µg/ml aufgefüllt. Auch hier kann die Aufbewahrung in einer dunklen Glasflasche bei minus 20°C erfolgen.

Resultierende Konzentrationen der Komponenten sind:

Interner Standard 100µg/ml

Fettsäuremethylester(Analyten) 20µg/ml

Ca. 1,5ml der Kalibrierlösungen werden in Gaschromatographievials mit Bördekkappe pipettiert und via Autosampler gaschromatographisch vermessen, anschließend erfolgt die Auswertung bzw. Kalibrierung(siehe oben: 2.7 Prinzip des Gaschromatographen).

## 4 Ergebnisse

Ziel meiner Versuche sollte eine Methode sein, die es ermöglicht schnell und sicher die Lipide aus einer Plasmaprobe von nur 50µl auf einer 100mg Kieselgelsäule in ihre Klassen, Cholesterinester, Triglyceride, freie Fettsäuren und Phospholipide, zu trennen. Dafür waren zunächst Kapazitätstests der Triglyceride und Phospholipide notwendig, die aufzeigen welche Menge die Säule retenieren kann. Aus diesen Daten ließ sich abschätzen, ob eine kleine 100mg Kieselgelsäule überhaupt die Möglichkeit zur Lipidklassenseparation von 50µl Plasma bietet, d.h. die maximal vorstellbare Menge von Triglyceriden und Phospholipiden in dieser Plasmaprobe binden kann. Ferner musste untersucht werden, welches Volumen Lösungsmittel notwendig ist, eine dem Plasma äquivalente Menge Cholesterinester vollständig von der Säule zu eluieren, da die Cholesterinester in der Plasmatrennung die erste Fraktion sein würden. Nach dem gleichen Prinzip ist das Verhalten der freien Fettsäuren studiert worden, so dass der Zeitpunkt ihrer Elution bestimmt werden konnte. Natürlich musste auch der Einfluss der Lipidklassen untereinander auf Kapazität und Elutionsverhalten geprüft werden, bevor eine erste Trennung von Modellsubstanzen vorgenommen werden konnte und den Weg zur letztendlich entstandenen Methode wies.

Die Analyse der Versuche erfolgte durch den Gaschromatographen, detektiert wurden die Fettsäuren, bzw. ihre durch eine Umesterungsreaktion hergestellten Methylester. Demnach musste bei Versuchen mit mehreren Modelllipidklassen darauf geachtet werden, dass sie durch unterschiedliche Fettsäuren repräsentiert wurden.

### 4.1 Kapazitätstests und Elutionsprofile

#### 4.1.1 Triglyceride

##### **Kapazität der Triglyceride**

Die Kapazität einer Säule für die Triglyceride bezeichnet die Menge Triglyceride, die eine Säule retenieren kann, bis diese schließlich im Eluat nachzuweisen sind. Als Modellsubstanz wurde Triolein gewählt; zwar ein im Plasma nicht vorkommendes Lipid, aber von der Kettenlänge seiner

Fettsäuren(C18, Oleat), durchaus ein guter Vertreter für die Plasmatriglyceride mit ihren Fettsäuren im ähnlichen Längen Bereich[S.:118, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] und somit ähnlichen physikalischen Eigenschaften. Die Bedingungen waren dem Ziel angeglichen, d.h. dieselben wie in der Separation nach Hamilton und Comai. Da weitaus kleinere Säulen verwendet wurden, wurde das Volumen einer Fraktion auf 2ml festgelegt, also 1/6 der Fraktion der Ursprungsmethode, ebenso wie auch die Säulenfüllung 1/6 der Ursprungsmenge betrug. Die Säulen wurden zunächst ebenfalls gewaschen. Als Lösungsmittel des letzten Waschens und Elutionsmittel für die Triglyceridmodellsubstanz Triolein wurde Hexan/MTBE 200:3 genutzt. Genau die Lösung, die später die den Triglyceriden vorausgehende Fraktion, nämlich die Cholesterinester eluieren sollte und so im Idealfall die Menge der retenierten Triglyceride nicht beeinflussen würde.

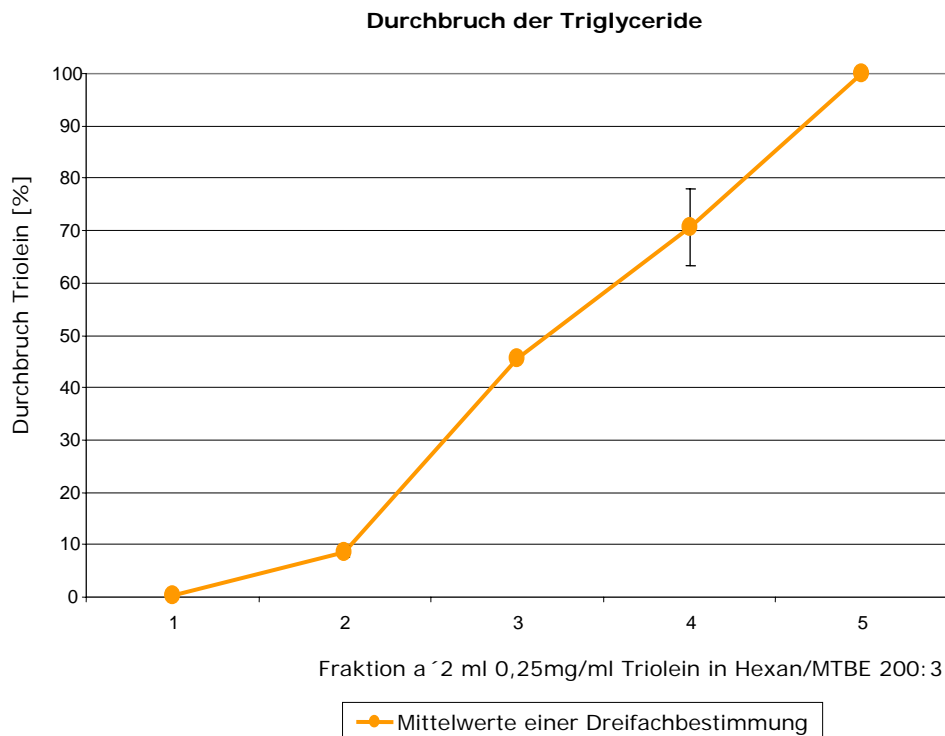


Abbildung 7: Durchbruch der Triglyceride in % der aufgegebenen Trioleinmenge. Aufgegeben wurden je 500 $\mu$ g Triolein in Hexan/MTBE 200:3 in 5 Fraktionen. Das Diagramm zeigt eine vollständige Retention des Trioleins der ersten Fraktion, der Durchbruch erfolgt in der zweiten Fraktion mit 8% der neu aufgegebenen Menge Triolein. n = 3

Die Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse einer Dreifachbestimmung. Wie in der Abbildung dargestellt, konnten die in der ersten Fraktion aufgegebenen 500 $\mu$ g Triolein vollständig zurückgehalten werden. Erst in der zweiten Fraktion, nach Aufgabe von weiteren 500 $\mu$ g Triolein und weiteren 2ml Elutionsmittel, ist ein Durchbruch von ca.8 % der aufgegebenen Menge zu erkennen. Nach 4 ml Hexan/MTBE 200:3 also retenierte jede Kieselgelsäule durchschnittlich 950 $\mu$ g

von 1000 $\mu$ g Triolein. Definitiv erlauben diese Ergebnisse eine Belastung der Säule von 500 $\mu$ g und eine Elution mit 2 ml Hexan/MTBE 200:3, bevor der Durchbruch erfolgt. 500 $\mu$ g Triglyceride entsprechen ungefähr dem fünffachen der Menge Triglyceride in 50 $\mu$ l normolipidämischen Plasma nach Geigy[S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985].

### Kapazität der Triglyceride unter Phospholipidbelastug

In diesem Versuch wurde ein Gemisch aus Phospholipid und Triglycerid auf die Säule gegeben, als Modellsubstanzen wurden Triolein und Dipalmitoylphosphatidylcholin gewählt. Da Phosphatidylcholine die häufigsten aller Phospholipide sind, schien mir Dipalmitoylphosphatidylcholin als Repräsentant der Gruppe der Phospholipide besonders geeignet. Das Gemisch enthielt 125 $\mu$ g Phospholipid, entspricht dem Gehalt von 50 $\mu$ l normolipidämischen Plasma, und 500 $\mu$ g Triglycerid und entsprach ansonsten den Bedingungen des Triglyceridkapazitätstests.

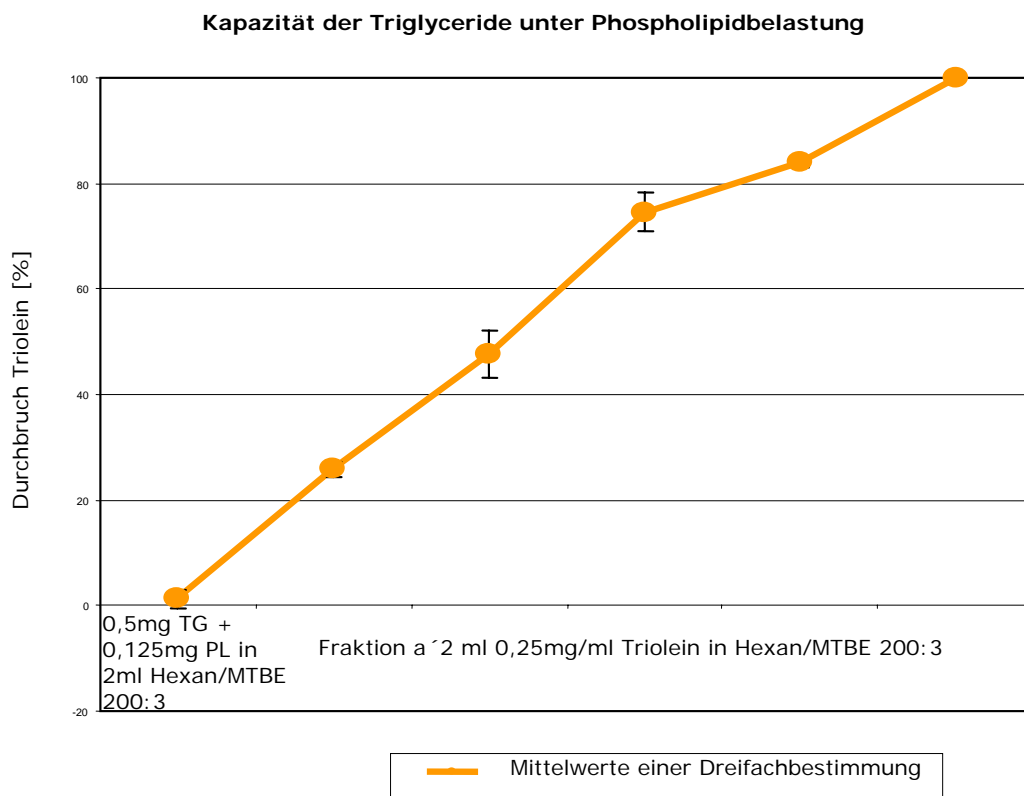


Abbildung 8: Säulenkapazität der Triglyceride unter Phospholipidbelastung, dargestellt % des eluierten Trioleins in Bezug auf die in der jeweiligen Fraktion aufgegebene Menge Triolein. In der ersten Fraktion wurde die Säule mit 500 $\mu$ g Triolein und 125 $\mu$ g Dipalmitoylphosphatidylcholin in 2ml Hexan/MTBE 200:3 gelöst, belastet. Während die Phospholipide in allen Fraktionen an der Säule gebunden waren, wurde die Kapazität der Triglyceride negativ beeinflusst: Die 500 $\mu$ g Triolein der ersten Fraktion konnten vollständig gebunden werden. Doch erfolgt in der zweiten Fraktion ein Durchbruch von 14% der erneut aufgegebenen Trioleinmenge (500 $\mu$ g). Auch in den folgenden Fraktionen ist ein stärkerer Durchbruch im Vergleich zum ersten Versuch zu verzeichnen. n=3

Die Abbildung 8 zeigt, dass die Phospholipide die Kapazität der Kieselgelsäule für Triglyceride in der ersten Fraktion nicht negativ beeinflussten. Auch hier erfolgte der Durchbruch erst nach der ersten Fraktion, in den folgenden Fraktionen dafür aber umso stärker, was der Vergleich mit dem vorausgehenden Versuch zeigt. Von aufgegebenen 1000µg konnten in der zweiten Fraktion ca. 14% des Trioleins nicht reteniert werden, im Vergleich dazu gab es in der zweiten Fraktion des ersten Versuchs nur einen Durchbruch von 4% bezogen auf die bis dahin aufgegebenen 1000µg. Die Phospholipide können in allen 6 Fraktionen, also auch noch nach 12ml Hexan/MTBE 200:3 vollständig auf der Säule gehalten werden. Der Versuch entsprach in dieser Beziehung allen Erwartungen, denn die Phospholipide sollten in der angestrebten Separation erst in der letzten Fraktion eluiert werden. Kritisch zu betrachten war nach wie vor die Retention der Triglyceride, würde sie wirklich der geplanten vorausgehenden Elution der Cholesterinester standhalten? Erste Separationsversuche würden darüber Aufschluss geben.

TABELLE 2 KAPAZITÄT DER TRIGLYCERIDE BEI PHOSPHOLIPIDBELASTUNG, Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse

		FRAKTION					
		1	2	3	4	5	6
	ELUTIONS-MITTEL	0,25mg/ml Triolein + 0,125mg PL in 2ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/ MTBE 200:3				
TG	Oleat						
	MESSWERT1	*	64,4	140,1	197,4	227,1	270,4
	MESSWERT2	*	64,5	139,9	197,5	227,2	270,3
	MITTELWERT	*	64,4	140,0	197,5	227,2	270,4
	Triolein µg/ml		64,1	139,4	196,5	226,1	269,1
	%	0,0	23,8	51,8	73,0	84,0	100,0
PL	Palmitat						
	MESSWERT1	*	*	*	*	*	*
	MESSWERT2	*	*	*	*	*	*

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt als Beispiel die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse einer Kieselgelsäule aus dem obenstehenden Versuch „Kapazität der Triglyceride bei Phospholipidbelastung“. \* bedeutet : nur in Spuren detektierbar. Diese Rohdaten wurden anschließend mit den Daten zweier weiterer Säulen im obenstehenden Diagramm zusammengefasst.

Die obenstehende Tabelle zeigt als Beispiel die Ergebnisse einer Kieselgelsäule, mit \* gekennzeichnet, bedeutet dass die betreffende Substanz vom Gaschromatographen nur in Spuren detektierbar war. Deutlich wird die totale Retention der Phospholipide über 12ml Hexan/MTBE 200:3 sowie die triglyceridfreie erste Fraktion:

#### 4.1.2 Cholesterinester

##### Elutionsprofil der Cholesterinester

Die Cholesterinester stellten in der angestrebten Plasmaseparation die erste Fraktion da. Ziel war es sie möglichst vollständig mit einem geringen Volumen Lösungsmittel zu eluieren, um später die Retention der Triglyceride nicht zu gefährden. Für diesen Zweck musste ihr Elutionsverhalten studiert werden. Dafür wurden 500 µg Cholesterinoleat, entspricht ungefähr dem fünffachen der Cholesterinestermenge in 50µl normolipidämischen Humanplasma[S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985], in 2ml Hexan/MTBE 200:3 dem Elutionsmittel für die Cholesterinester nach Hamilton und Comai [Hamilton JG und Comai K, 1988] auf die Säule aufgegeben. Nun folgte die schrittweise Elution mit je 2ml Hexan/MTBE in jeder der 5 weiteren Fraktionen. Die gaschromatographische Vermessung des Eluats von drei Versuchsreihen ergab eine ca. 74prozentige Elution der Cholesterinester in der ersten Fraktion, nach 4 ml Hexan/MTBE konnten die Cholesterinester vollständig eluiert werden, untenstehend die Illustration der Ergebnisse:

Elutionsprofil der Cholesterinester

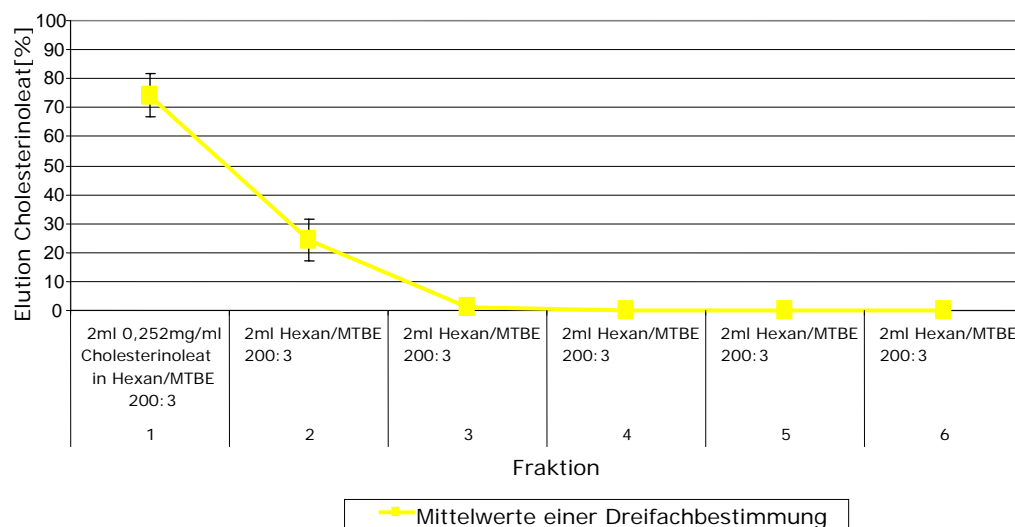


Abbildung 9: Elutionsprofil der Cholesterinester ,dargestellt ist der Anteil des eluierten Cholesterinoleats jeder Fraktion in % der in der ersten Fraktion aufgegebenen Gesamtmenge von ca. 500µg Cholesterinoleat. Bereits in der ersten Fraktion fanden sich zwischen 70 und 80% des Cholesterinoleats im Eluat, doch bedurfte es einer weiteren Elution mit 2ml Hexan/MTBE 200:3 um den verbliebenen Rest von den Säulen zu lösen. n = 3



Diese Ergebnisse zusammen mit denen des Kapazitätstests für Triglyceride zeigten eine Diskrepanz zwischen dem Bedarf an Elutionsmittel für eine vollständige Cholesterinesterelution und der totalen Retention der Triglyceride unter Belastung mit dem selben auf. Nach 4ml Hexan/MTBE 200:3 erschienen nämlich schon ca.8% der in der zweiten Fraktion zusätzlich aufgegebenen 500µg Triolein im Eluat über 20% waren es sogar, wenn Phospholipide mit aufgegeben worden. Für die Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden galt es nun einen Kompromiss zu finden. Dabei sollte an dieser Stelle noch einmal erwähnt werden, dass Kapazitätstest und vor allem Elutionsprofil mit extremen Werten, nämlich dem fünffachen des Normalen durchgeführt worden.

Auch das Elutionsverhalten der Cholesterinester bei Phospholipidbelastung wurde genauer untersucht:

### **Elutionsverhalten der Cholesterinester bei Phospholipidbelastung**

Es wurden 125µg Dipalmitoylphosphatidylcholin und 500µg Cholesterinoleat in 2ml Hexan/MTBE 200:3 aufgegeben und analog zum ersten Versuch eluiert. Das Elutionsverhalten der Cholesterinester änderte sich unter der Belastung der Säule mit Phospholipiden kaum, die Phospholipide konnten auch hier komplett auf der Säule zurückgehalten werden.

#### **4.1.3 Freie Fettsäuren**

Freie Fettsäuren finden sich mit unterschiedlichster Kettenlänge zu ca.300µg/ml [S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] in humanem Normalplasma. Ziel war es die freien Fettsäuren in der dritten Fraktion, nach Cholesterinestern und Triglyceriden, komplett zu eluieren, dabei die Menge von Elutionsmitteln möglichst gering zu halten, um die Bindung der Phospholipide an das Kieselgel der Säule nicht zu gefährden. Als Vertreter für die Gruppe der freien Fettsäuren wurde Linolensäure C18:3 gewählt, Hauptvertreter der freien Fettsäuren im Plasma sind Palmitin- und Ölsäure(C16 und C18:1) [S.: 118, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985]. Linolensäure ist durch seine Kettenlänge ein guter Repräsentant, kommt aber in natura als freie Fettsäure im Plasma in der Regel nur in geringer Menge vor. Die größere Anzahl ihrer Doppelbindungen verleiht Linolensäure stärkere

Polarität als den beiden Hauptvertretern, dieses schränkt die Aussagekraft etwas ein.

### Elutionsprofil der freien Fettsäuren

Ich habe mit den von Hamilton und Comai entwickelten Lösungsmittel für die Fraktion der freien Fettsäuren gearbeitet: Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2. Mit 300µg Linolensäure in 2ml Hexan/MTBE 200:3 wurde jede der drei Kieselgelsäulen zunächst beschickt, anschließend wurde in vier Fraktionen mit je 2ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2 eluiert. Untenstehend eine Graphik, die das Elutionsverhalten der freien Fettsäure Linolensäure auf jeder der drei Säulen separat verdeutlicht. Deutlich wird hier in Anbetracht der ersten Säule auch, dass es schnell zu Unterschieden im Verhalten der Säulen kommen kann. Ursache ist hier meist ein inkorrektes Arbeiten, z.B. ein Trockenlaufenlassen der Säule oder eine falsche Aufbewahrung derselben.

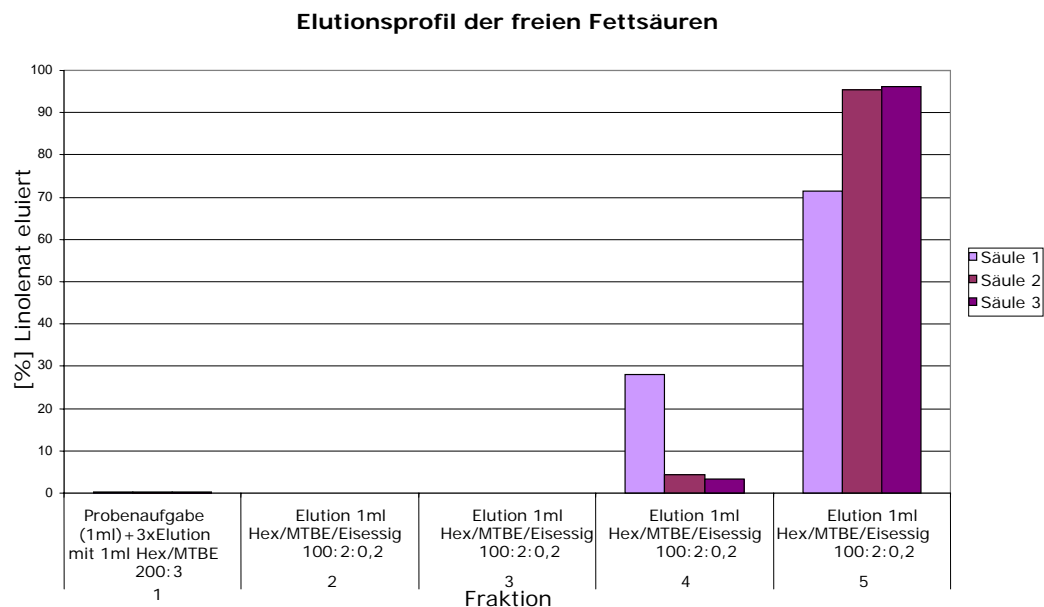


Abbildung 10: Elutionsprofil der freien Fettsäuren, in % der Anteil Linolensäure, welcher von der Gesamtmenge eluierter Linolensäure in der Fraktion erscheint. Nach freien drei Fraktionen erscheint Linolensäure erst in der vierten Fraktion, deutlich wird auch das unterschiedliche Elutionsverhalten der Linolensäure auf Säule 1; Gründe hierfür können falsche Lagerung oder ungründliches Konditionieren sein. n = 3

Die ersten drei Fraktionen zeigten keinen Durchbruch der Linolensäure, das lässt erwarten, dass sie weder bei der Elution der Cholesterinester noch der Triglyceride erscheinen sollten. Über die Bindungsfähigkeit der Phospholipide in Bezug auf die Elution der freien Fettsäuren konnte hier noch keine Aussage gemacht werden. Ein erster Trennungsversuch aller vier Substanzklassen konnte darüber Klarheit verschaffen.

#### **4.1.4 Phospholipide**

Phospholipide kommen laut Geigy [S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] in humanen Normalplasma mit einer Konzentration von ca. 2mg/ml, das sind 100µg in dem von mir angestrebten Plasmaprobenvolumen von 50µl, vor. Phospholipide sind polar. Man findet sie im Plasma zusammen mit den Proteinen im Mantel der Lipoproteine, sie verleihen ihnen ihren hydrophilen Charakter. Bei Hyperlipoproteinämien, insbesondere der HDL und LDL, ist also auch der Phospholipidanteil im Plasma stark erhöht [Camus MC et al., 1988; Gomo Z, 1993]. Phospholipide binden aufgrund ihrer Polarität sehr stark an das Kieselgel [Christie WW, 1992] der Säule. Es stellt sich hier also zunächst weniger die Frage ihrer Elution, sondern ob ihre Bindung Kapazität und Elution der anderen Lipidklassen beeinflusst, was bereits geprüft wurde. Ferner, welche Menge Phospholipide die 100mg Kieselgelsäule zu binden vermag, die Kapazität der Säule.

#### **Kapazität der Phospholipide**

Als Modellsubstanz wurde aus oben bereits genannten Gründen Dipalmitoylphosphatidylcholin gewählt. Dieses wurde mit Hilfe von Hexan/Isopropanol 3:1 in Hexan/MTBE 200:3 gelöst und nach entsprechender Vorbereitung der Säulen in sechs Fraktionen zu 2ml mit einem Gehalt von 500µg auf die Säulen gegeben. Tatsächlich wurde jede Fraktion vollständig retiniert, die Säule konnte also einer Beladung von 3000µg Dipalmitoylphosphatidylcholin standhalten. Diese große Menge ließ den Schluss zu, dass es die 100mg Kieselgelsäule in jedem Fall ermöglicht die Phospholipide aus 50µl Plasma zurückzuhalten.

### **4.2 Probenvorbereitung und Lipidextraktionen**

#### **4.2.1 Die Folch Extraktion [Folch et al. , 1957]**

Die Folch-Extraktion [Folch et al. , 1957] ist eines der häufigsten und bekanntesten Extraktionsverfahren, erfordert aber einen hohen Zeitaufwand, da nicht nur ein gründliches Durchmischen der Analytenlösung mit dem Extraktionsmittel notwendig ist, sondern auch Zugabe von Puffer und letztendlich eine Zentrifugation, um die zwei entstehenden Phasen sauber

voneinander zu trennen. Die Lipide befinden sich in der unteren Phase. Um eine exakte Menge der Analyten bestimmen zu können, bedarf es der gesamten unteren Phase, deren Abpipettieren im Gesamten in der Regel nicht möglich ist. Es ist also ein weitere Zwischenschritt nötig, von dem gewonnen Volumen der unteren Phase ein Exaktes abzupipettieren. Dieser letzte Schritt lässt sich vermeiden, wenn man mit internen Standards arbeitet, die an der Extraktion teilnehmen und dann zum selben Anteil wie die Analyten in die weitere Verarbeitung und gaschromatographische Analyse eingehen. Der Gaschromatograph vermag dann mit Kenntnis der ursprünglichen Menge des Standards die Ausgangsmenge der Analyten zu berechnen. Erfolgt die Zugabe des Standards erst vor Separation oder gaschromatographischen Analyse, sind zur Berechnung der exakten Mengen der Analyten Korrekturfaktoren nötig, die sich aus dem gewonnenen Anteil der unteren Phase und der gesamten unteren Phase ergeben. Trotz allem hat sich die Folch-Extraktion etabliert und vor allen Dingen bewährt[Lepage et al. ,1989]. Die Ergebnisse zur Lipidklassenseparation finden sich in den Teilen „Lipidklassenseparation nach Extraktion“(4.3.4) und „Plasmalipidklassenseparationen“(4.4).

#### ***4.2.2 Die Hexan/Isopropanol Extraktion nach Hara & Radin [Hara A, Radin NS, 1978]***

Die Hexan/Isopropanol Extraktion ist eine sehr leicht zu händelne Lipidextraktion aus Flüssigkeiten oder Emulsionen.

Vorteil dieser Extraktion ist, dass sie keiner Phasenbildung unterliegt und damit auch keiner Zentrifugation bedarf. Man erhält die Lipide nach gründlichen Vortexen im Hexan/Isopropanol, während die Proteine ausfallen. Die Prozedur ist also sehr schnell und zu dem nicht so gesundheitsschädlich wie eine Extraktion mit Chloroform und Methanol. Chloroform wurde als kanzerogene Substanz im Tierversuch beschrieben, Methanol zerstört das visuelle System [Hara A, Radin NS, 1978].

Dennoch zeigen sich Nachteile: So müssen die Proteine abfiltriert werden, was zum einen einen Probenverlust bedeutet, da immer etwas der Lipidlösung im Filter verbleibt. Dieses Problem konnte mit Nachspülen des Filters minimiert werden. Nachgespült wurde mit Hexan/Isopropanol, aber auch mit Chloroform, was die oben genannten Vorteile relativiert.

Wesentliche Probleme ergaben sich nach der gaschromatographischen Analyse mit Hexan/Isopropanol extrahierte Modellsubstanzen: Zahlreiche und große Störpeaks zeigten sich im Chromatogramm, nach Separation ins

besondere in der Fraktion der Phospholipide. Diese Störpeaks interferierten leider mit zahlreichen Fettsäuremethylestern bei der Plasmabearbeitung, insbesondere Ölsäure ließ sich nicht mehr separieren.

Die Abbildung 11 zeigt das Chromatogramm der Phospholipidfraktion nach Separation eines Modellgemisches, welches ca. 80% der Plasmanormalwerte [S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] aller Lipidklassen enthielt. Neben den benannten Peaks des BHTs, des Pentadecansäuremethylesters (hier Standard) und des Palmitinsäuremethylesters (aus Dipalmitoylphosphatidylcholin), sollten keine weiteren Peaks enthalten sein. Sämtliche darüber hinaus zu sehenden Peaks weisen auf Störsubstanzen hin, die während der Bearbeitung in die Modellprobe gelangt sind.

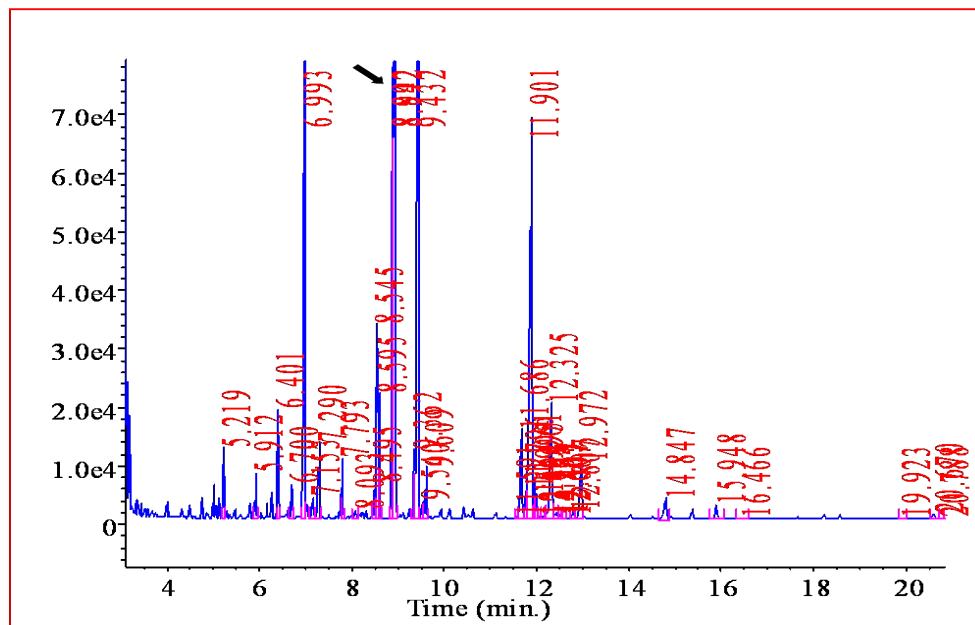


Abbildung 11: Gaschromatogramm der Phospholipidfraktion; Methylpalmitat 9,432 min, Methylpentadecanoat durch Pfeil gekennzeichnet. Bis auf einen Toluolpeak, stellen alle weiteren Peaks Verschmutzungen oder herausgelöste Substanzen des Filters da, der bei der Lipidextraktion mit Hexan/Isopropanol verwendet wurde.

Die Ursache der Fremdsubstanzen konnte gefunden werden. Während Hexan/Isopropanol allein eingedampft und derivatisiert keinerlei Störpeaks im Chromatogramm zeigte, stellten sich nach Filtration desselben nach der oben genannten Methode mit Nachspülen des Filters sämtliche Peaks in der gaschromatographischen Analyse ein. Selbst wenn der Filter zuvor mit 1ml Chloroform gereinigt wurde, fand sich ein nahezu identisches Peakmuster im Chromatogramm. Dass die Verschmutzungen aus dem Chloroform herrührten, konnte ausgeschlossen werden. Die verwendeten Filter sind ergo für diese Extraktion nicht zu verwenden. Leider stellte die Extraktion von Modellsubstanzen als Voruntersuchung zur Plasmaextraktion und Separation bereits nahezu den Abschluss meiner Arbeit da, so dass es mir zeitlich in

diesem Rahmen nicht möglich war nach Alternativen für die Filtrierung oder Alternativen zu diesen beiden Extraktionen im Allgemeinen zu suchen. Trotzdem erschien die Extraktion nach Hara&Radin[Hara A, Radin NS; 1978] als solche für die Lipidklassenseparation in humanem Plasma als geeignet. Denn eine mit Modellsubstanzen jeder Lipidklasse durchgeführte Separation nach Hara& Radins Extraktion, auch mit internem Standard (siehe unten), der vor der Extraktion hinzu gegeben worden war, erlaubte eine gute Wiederfindung aller Modellsubstanzen, mit Ausnahme des Trioleins. Das allerdings ist ausschließlich ein Problem der Derivatisierung und wird an anderer Stelle behandelt.

Die Ergebnisse sind unten in den jeweiligen Kapiteln dargestellt.

Erwähnt sei hier, dass die gaschromatographische Auswertung der Separation auf Grund dessen möglich war, weil die ausgewählten Modellsubstanzen in ihren Fraktionen, ins Besondere das Dipalmitoylphosphatidylcholin, und Standards nicht mit den Störpeaks überlappten und ferner aus Vorversuchen ohne Extraktion(siehe unten) bekannt war, dass die Separation der Modellsubstanzen und gleichen Standards exakt möglich war.

(Beide Extraktionen sind nicht parallel zu verwenden, denn sie bieten unterschiedliche Eigenschaften und lassen sich so zielgerichtet einsetzen. Die Extraktion nach Hara&Radin[Hara A, Radin NS; 1978] weißt eine größere Extraktionskraft im Bereich der Phospholipide auf [Eder K et al. ,1993] denn Phospholipide sind in Isopropanol besonders gut löslich [Jensen et al. ,2003])

### **4.3 Separationen von Modellgemischen**

#### ***4.3.1 Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden unter Einfluss von Phospholipiden***

Da in den Versuchen die Kapazität der Triglyceride durch die Phospholipide negativ beeinflusst wurde und eine Elution ihrer bereits in der zweiten Fraktion erfolgte, sollte jetzt bewiesen werden, dass trotzdem einer Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden unter dem Einfluss von Phospholipiden nichts entgegenstand. Die Versuche wurden mit 80-150% der Plasmanormalwerte aller Substanzen nach Geigy[S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] in Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Modellsubstanzen wurden Cholesterinlinolat, Triolein und

Dipalmitoylphosphatidylcholin ausgewählt. Alle Lipide wurden in 1ml Hexan/MTBE 200:3 gelöst und aufgegeben, noch dreimal wurde mit 1ml Hexan/MTBE 200:3 eluiert alle vier Fraktionen einzeln analysiert. Die Reduktion von 2ml auf 1ml sollte das genaue Elutionsverhalten der Cholesterinester in den ersten vier Fraktionen darstellen und ermöglichen, eventuell das Elutionsmittel um 1ml zu verringern. So könnte letztendlich, falls Überlappungen beider Klassen auftauchen sollten, nur eine Fraktion und damit nur ein relativ geringer Anteil beider Klassen verworfen werden. Die weitere Elution erfolgte mit vier Fraktionen zu je 2ml Hexan/MTBE 200:3.

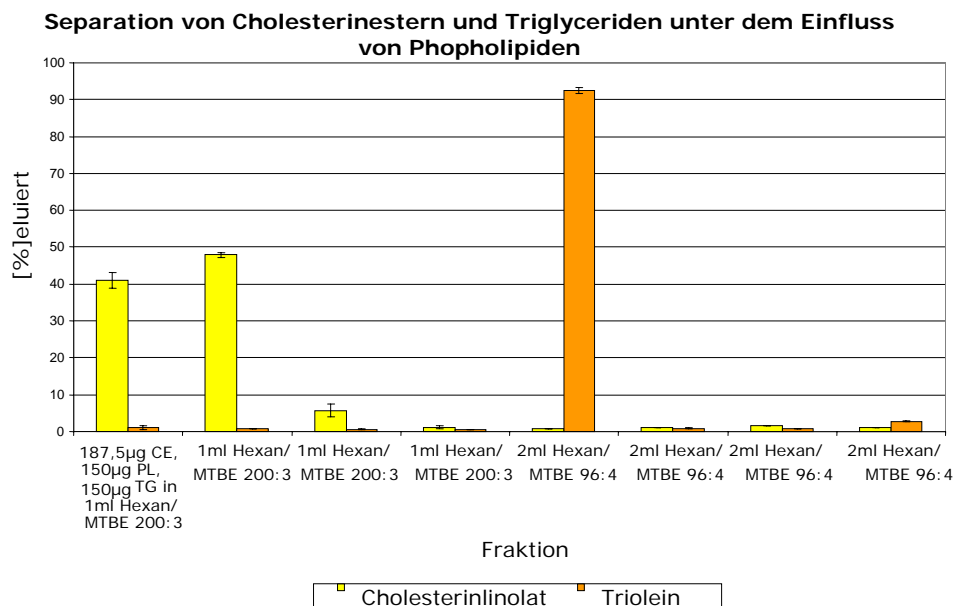


Abbildung 12: Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden, in Prozent der Anteil des Cholesterinlinolats bzw. Trioleins, welcher in der jeweiligen Fraktion von der detektierten Gesamtmenge eluiert wurde. Deutlich zu sehen: Die klare Separation von Cholesterinlinolat und Triolein. Mit 4ml Hexan/MTBE 200:3 können 96% des Cholesterinesters in den ersten Fraktionen eluiert werden, das Triglycerid erscheint mit 96% der aufgegebenen Menge in den letzten Fraktionen, eluiert mit Hexan/MTBE 96:4. Allein 93% des Triglycerids finden sich in der fünften Fraktion. n = 3

Die Separation, selbst mit 150% der Plasmanormalwerte(siehe Diagramm), gelang sauber. Die Cholesterinester erschienen mit zu durchschnittlich 96% in den ersten vier Fraktionen. Es gab leichte Verunreinigungen durch Triolein in diesen ersten Fraktionen, die sich aber auf insgesamt nur 4% beliefen, ebenfalls 4% des Cholesterinlinolats wurden in den letzten vier Fraktionen detektiert. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei diesen Triolein- und Cholesterinlinolatanteile, da ihre Mengen in einer Fraktion so gering waren, um Verschmutzungen der Reagenzgläser oder der Gaschromatographie Säule handelte, dagegen spricht, dass ihr Anteil nicht wesentlich streute. Die Triglyceride erschienen zu durchschnittlich ca.93% in der fünften Fraktion, der Rest folgte in den letzten drei.

Palmitat als Marker für die Phospholipide wurde in keiner Fraktion in nennenswertem Ausmaß detektiert.

Zusammenfassend für alle Versuche mit unterschiedlichen Mengen der Modellsubstanzen lässt sich sagen, dass eine erste Fraktion von 4ml Hexan/MTBE 200:3 und eine zweite Fraktion von 2ml Hexan/MTBE 96:4 ausreichen sollte, um eine gute Separation und Wiederfindung von Cholesterinestern und nachfolgend Triglyceriden zu erhalten. Die Notwendigkeit das Volumen der Elutionsmittel möglichst gering zu halten, ergibt sich aus dem Bestreben die später anschließend zu eluierenden freien Fettsäuren möglichst unangetastet auf der Säule zu lassen.

Die gaschromatographische Gesamtwiederfindung belief sich in diesem Versuch auf durchschnittlich 108% für Cholesterinlinolat und 95,5% der Einwaage für Triolein. In diese Werte fließen sowohl Pipettierfehler der Standardlösung, sowie der in Lösung vorliegenden Modellsubstanzen ein, ebenso wie Einwaagefehler beider, Verluste bei der Verarbeitung, sowie Verschmutzungen der Reagenzgläser, Reagenzien oder des Gaschromatographen, etc. Die Aussagekraft ist also sehr begrenzt, von Fehlern kann erst bei sehr starken Abweichungen von der Ursprungsmenge gesprochen werden. Die prozentualen Angaben jeder Fraktion beziehen sich auf die gaschromatographische Gesamtwiederfindung des Modelllipids und helfen die Separation qualitativ, in der Reinheit der einzelnen Fraktion, zu betrachten. Dies gilt ebenso für alle folgenden Versuche.

### **Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden *unter Einfluss von Phospholipiden, Cholesterin und freien Fettsäuren***

Die, wie oben beschrieben, erworbene Methode zur Trennung von Cholesterinestern und Triglyceriden galt es nun unter der Natur des Plasmas näheren Bedingungen zu testen. Es wurden daher eine freie Fettsäure (Linolensäure) und Cholesterin zur Versuchslösung gegeben. Die Separation erfolgte sonst unter oben genannten Voraussetzungen, es wurde mit 150% der Plasmanormalwerte(nach[S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985]) aller Komponenten gearbeitet.



### Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden und freien Fettsäuren unter dem Einfluss von Phospholipiden und Cholesterin

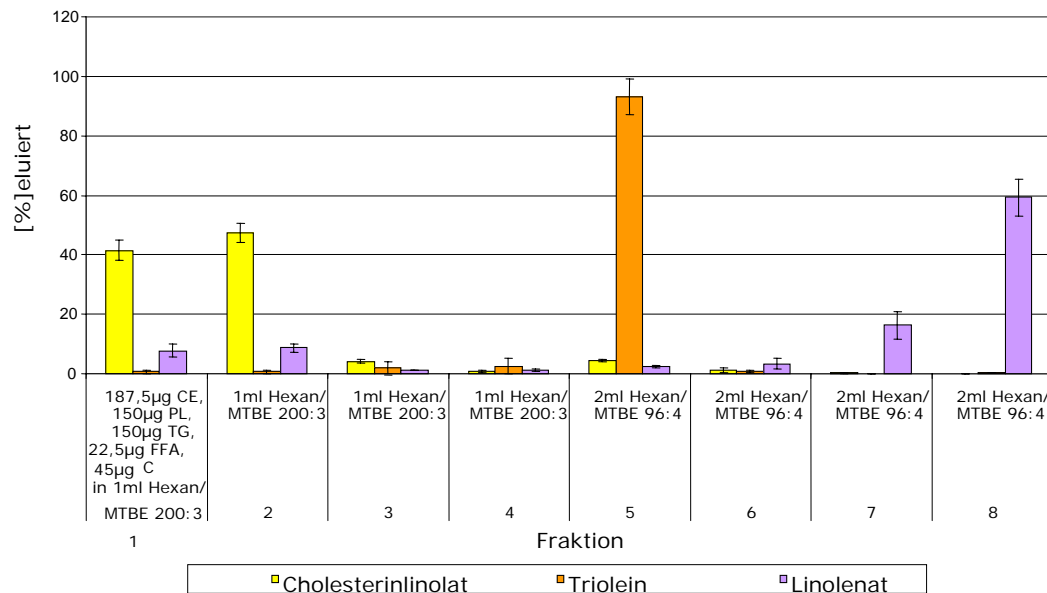


Abbildung 13: Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden und freien Fettsäuren unter dem Einfluss von Phospholipiden und Cholesterin. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die im Gesamteluat erschienenen Mengen Triolein, Cholesterinlinolat und Linolensäure. Deutlich wurde hier die dem Vorversuch entsprechende Auftrennung des Cholesterinesters und des Triglycerids. Die Linolensäure konnte im Großteil deutlich getrennt vom Triolein schon mit Hexan/MTBE 96:4 eluiert werden. Das Auftreten von Linolensäure in den ersten beiden Fraktionen war einmalig und stellt einen Fehler außerhalb der Separation da. Das Phospholipid konnte nahezu vollständig auf der Säule gehalten werden. n = 3

Die Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden gelang mit Erfolg und gleichen Ergebnissen wie oben beschrieben, die freien Fettsäuren erschienen mit einem Anteil von ca.60% ihrer Einwaage in Gesamteluat, alle prozentualen Angaben im Diagramm beziehen sich auf diese 60%. Das Diagramm zeigt ein deutliches Auftreten der freien Fettsäure Linolensäure schon in der sechsten Fraktion und verdeutlicht hier noch einmal, dass das Lösungsmittelvolumen der Fraktion der Triglyceride möglichst gering gehalten werden muss, um einer Verunreinigung dieser mit freien Fettsäuren entgegenzuwirken. Es darf 2ml Hexan/MTBE 96:4 nicht überschreiten. Der geringe Verlust von Triglyceriden in die Fraktion der Fettsäuren muss in Kauf genommen werden. Die Palmitinsäure aus Dipalmitoylphosphatidylcholin wurde nur in Spuren detektiert, somit also gut reteniert.

Das Erscheinen freier Fettsäuren in den ersten beiden Fraktionen lässt den Erfolg der Trennung bezweifeln, ist aber in folgenden Versuchen nie wieder aufgetreten und stellt so wahrscheinlich einen Fehler außerhalb der Separation da.

### 4.3.2 Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von Cholesterin

Die Separation aller Lipidklassen galt es nun zu erreichen. Es wurden mehrere Versuche mit unterschiedlichen Vielfachen der Plasmanormalwerte [S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] von Cholesterinestern, Triglyceriden, Phospholipiden, freien Fettsäuren und Cholesterin mit Hilfe von Modellsubstanzen für jede dieser Klassen durchgeführt. Als Modellsubstanzen standen Cholesterinlinolat, Triolein, Linolensäure und Dipalmitoylphosphatidylcholin zur Verfügung. Wie im Laufe der Arbeit entwickelt, wurden die Cholesterinester mit 4ml Hexan/MTBE 200:3 eluiert, gefolgt von den Triglyceriden, die mit nur 2ml Hexan/MTBE 96:4 eluiert wurden. In Annäherung an Comai und Hamilton [Hamilton JG, Comai K; 1988] wurde die Säule anschließend mit 1ml Hexan/Eisessig 100:0,2 beschickt. Die Funktion dieser Fraktion beschränkt sich darauf die Säule anzusäuern. Der

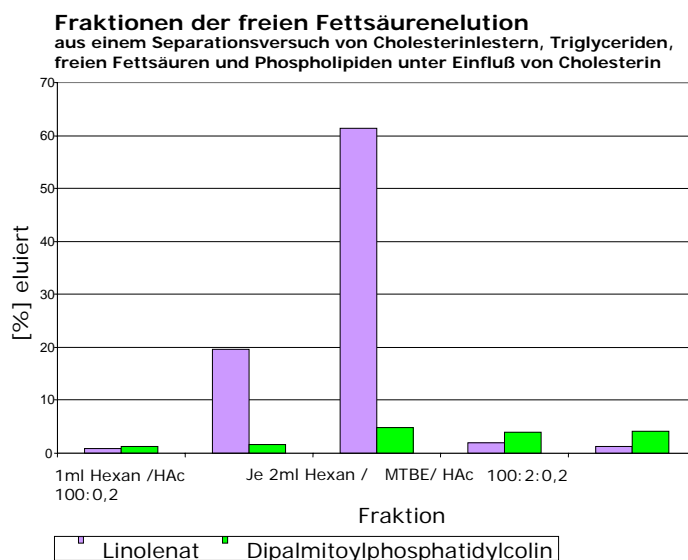


Abbildung 14: Elution der freien Fettsäuren, in % Anteil der Linolensäure am Gesamteluat. Es wird deutlich, dass die Elution der freien Fettsäuren nicht die Retention der Phospholipide (grün) gefährdete, sie erschienen nur in Spuren im Eluat. Vor Allem zeigt das Diagramm, dass 6ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2 ausreichend waren, um die freien Fettsäuren vollständig zu eluieren. n = 3

und so nicht in die gaschromatographische Analyse einfließen muss.

Für die Elution der Fettsäuren wurden 6ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2 veranschlagt. Zum einen ist dieses Volumen aus dem Elutionsprofil der Fettsäuren abgeschätzt wurden, ergab sich aber auch aus einer vorangegangenen Lipidklassenseparation, bei der 8ml zum eluieren der

Eisessig in dieser und nachfolgender Fraktion erleichtert die Elution der freien Fettsäuren, da sie unter seiner Wirkung als weniger polare Dimere vorliegen.

Nach mehreren dutzend gaschromatographischen Analysen der Ansäuerungsfraktion

kann ich sicher sagen, dass diese keine signifikante Menge der Lipidklassen enthält

Fettsäuren genutzt wurden. Dieses Volumen gefährdete, wie in Abbildung 14 ersichtlich, zwar nicht die Retention der Phospholipide, das Erscheinen von Palmitat ist hier nur in Spuren nachgewiesen, aber war für die vollständige Elution der freien Fettsäuren nicht notwendig. Somit konnte bei der endgültigen Methode aus Zeitgründen auf 2 ml Hexan/MTBE/Eisessig 100:2:0,2 verzichtet werden. Nach mehreren Modifikation der Separation konnte ich herausfinden, dass 4ml Methanol/MTBE/Ammoniumacetat 5:8:2 ausreichten, um die Phospholipide vollständig von der Säule zu entfernen. Für jede Fraktion wird das Elutionsmittel in 2ml Schritten aufgegeben, so habe ich die Trennung als sauber und reproduzierbar erlebt. Das untenstehende Diagramm präsentiert nun das Ergebnis der abschließenden Modifikation der Methode. Die Separation dort erfolgte mit 150%igen Konzentrationen der Plasmanormalwerte [S.: 112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] einer 50µl Plasmprobe für alle Modellsubstanzen.

### Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von Cholesterin

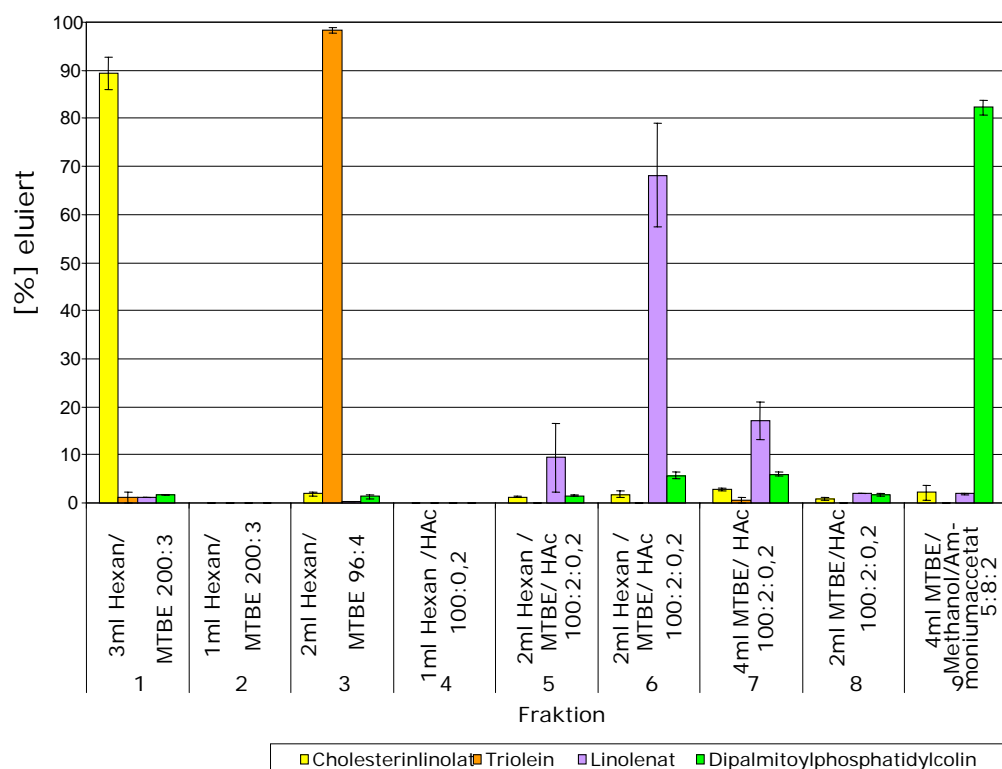


Abbildung 15: Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter dem Einfluss von Cholesterin. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die im Gesamteluat erschienenen Mengen Triolein, Cholesterinlinolat, Dipalmitoylphosphatidylcholin und Linolensäure. Die Abbildung stellt eine deutliche Separation aller vier Lipidklassen da, die Cholesterolester erschienen zu 89% in ihrer Fraktion, Triglyceride eluierten mit 98% in der vorgesehenen Fraktion. Die freien Fettsäuren erreichten 95% die Phospholipide 84%. n = 3

Die Separation erfolgte deutlich mit Gesamtwiederfindungsraten des Gaschromatographen über alle Fraktionen von 88-93 % Cholesterinlinolat, 67-78% Triolein, 98-110 % Linolensäure und 93% Dipalmitoylphosphatidylcholin. Die Werte ergeben sich aus zwei Versuchsreihen mit je drei Separationen. Das Diagramm zeigt von oben genannten Werten ca. 89% des Cholesterinlinolats in der Fraktion der Cholesterinester, das Triolein erschien in seiner Fraktion mit über 98%, die Linolensäure in den Fraktion der freien Fettsäuren mit 95%, 84% des Dipalmitoylphosphatidylcholins erschien in den letzten beiden Fraktionen. Eine weitere Separation, ebenfalls eine Dreifachbestimmung erbrachte ähnliche Ergebnisse.

### 4.3.3 Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipidklasseninternen Standard unter Einfluss von Cholesterin

Für jede Lipidklasse wurde ein interner Standard in die zu trennende Mischung der Modellsubstanzen gegeben, nämlich Undecansäure für die Klasse der freien Fettsäuren, Cholesterinheptadecanoat für die Cholesterinester, Tritridecanoin für die Triglyceride und Dipentadecanoylphosphatidylcholin für die Klasse der Phospholipide.

**Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von Cholesterin**

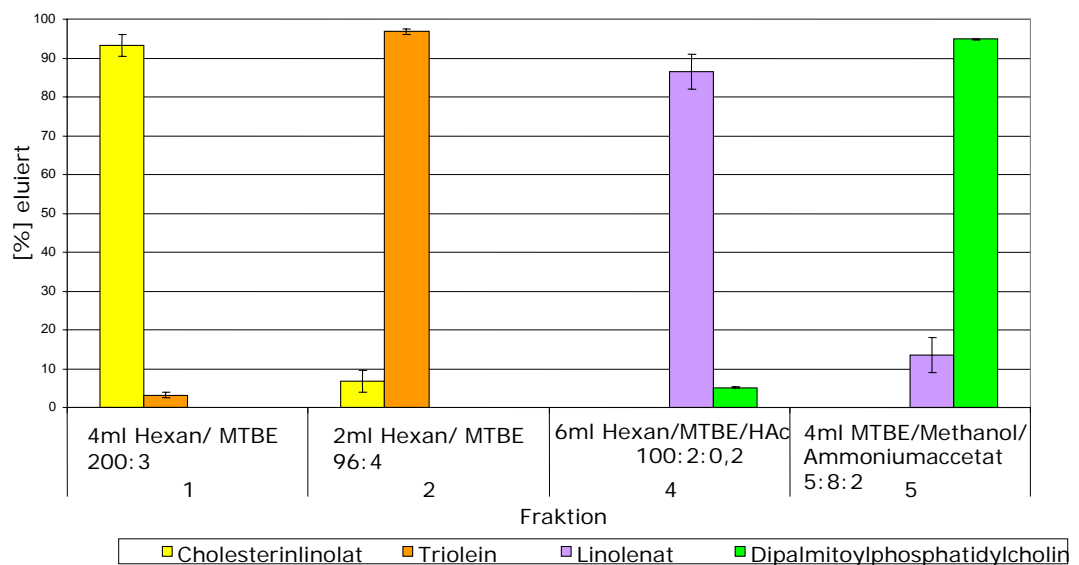


Abbildung 16: Separation mit lipidklasseninternen Standard von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter dem Einfluss Cholesterin, die prozentualen Angaben beziehen sich auf die im Gesamteluat erschienenen Mengen Triolein, Cholesterinlinolat, Dipalmitoylphosphatidylcholin und Linolensäure. Die Separation der Lipidklassen erfolgt deutlich unbeeinflusst vom Standard, mit der dem Vorversuch ebenbürtiger Qualität. n = 2

Die Konzentration der spezifischen Fettsäure in den Standards war 200µg/ml. Diese Menge hatte sich bei der gaschromatographischen Analyse von Fettsäuren im erwarteten Konzentrationsbereich bewährt.

Wie das obenstehende Diagramm verdeutlicht, gelang die Separation der Lipidklassen unbeeinflusst von den neuen Standards.

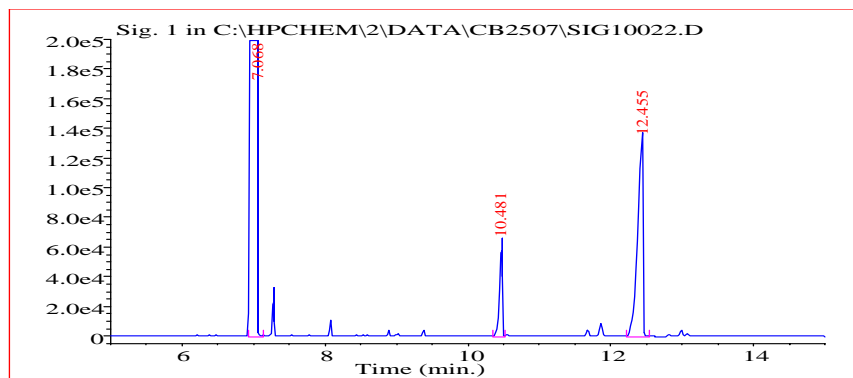
Die Auftrennung der Standards gelang ebenso wie die, der Modellsubstanzen. Die unten aufgeführte Gaschromatogramme jeder Fraktion zeigen Standards und Modelllipide sauber separiert.

### Abbildung 17: Gaschromatogramme einer Lipidklassenseparation von Modelllipiden mit lipidklasseninternen Standard

#### 1. Fraktion:

##### Cholesterinester

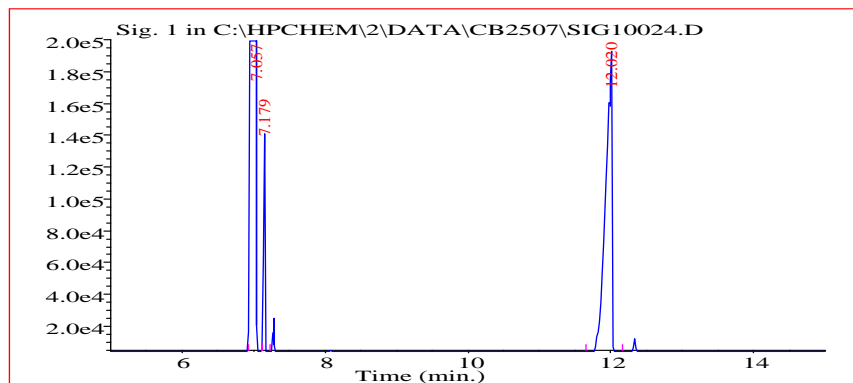
10.481min.  
Heptadecansäure-  
methylester aus  
Cholesterin-  
heptadecanoat,  
lipidklasseninterner  
Standard.  
12.455min.  
Linolsäure-  
methylester aus  
Cholesterin-  
linolat.



#### 2. Fraktion:

##### Triglyceride

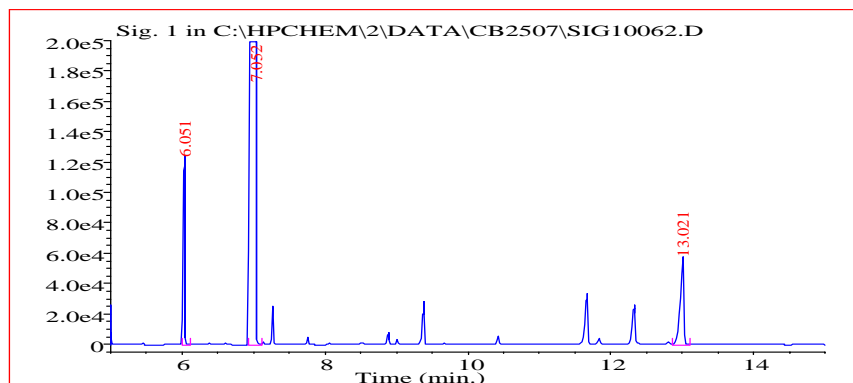
7.179min.  
Tridecansäure-  
methylester aus  
Tritridecanoin,  
lipidklasseninterner  
Standard.  
12.020 min.  
Ölsäuremethylester  
aus Triolein.



#### 4. Fraktion:

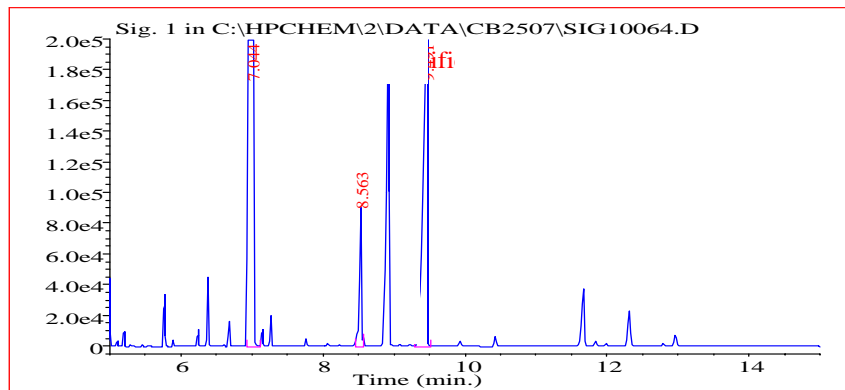
##### Freie Fettsäuren

6.051min.  
Undecansäure-  
methylester aus  
Undecansäure,  
lipidklasseninterner  
Standard.  
13.021min.  
Linolensäure-  
methylester aus  
Linolensäure.



**5. Fraktion:****Phospholipide**

8.563min.  
 Pentadecansäure-  
 methylester aus  
 Phosphatidylcholin-  
 dipentadecanoyl,  
 lipidklasseninterner  
 Standard.  
 9.491min.  
 Palmitinsäure-  
 methylester aus  
 Dipalmitoyl-  
 phosphatidylcholin.



Betrachtet man allerdings die Quantifizierung, welche durch den Gaschromatographen mit Hilfe der bekannten Standardmenge berechnet wurde, fällt auf, dass im Gesamten eine zu geringe Menge des Trioleins gefunden wurde. Nur ca. 74% der zur Separation aufgegeben Menge erscheinen im offensichtlich im Eluat. Da Triolein weder im Probenreagenzglas noch auf der Säule verblieb, wie Untersuchungen beider zeigten, ergibt sich dieser Verlust nicht durch einen Fehler der Separation. Sondern es wurde nach Betrachtung der vorherigen Separationen deutlich, dass auch schon beim Gebrauch eines externen Standards (Heptadecansäure bei der Derivatisierung) eine verminderte Menge des Trioleins gefunden wurde. Offenbar verstärkt der Gebrauch von Tritridecanoin als lipidklasseninterner Standard dieses Phänomen. Nach weiteren Versuchen zur Triolein und Tridecanoin Wiederfindung (siehe auch "Wiederfindungsraten" Kapitel 4.5) konnte das Problem als unzureichende Umesterung definiert werden. Insbesondere in Anwesenheit eines anderen Triglycerides, nämlich dem Standard Tridecanoin, ließ sich Triolein nicht im gleichen Maße wiederfinden, wie beim Gebrauch von Heptadecansäure als Standard.

Das Trennungsprinzip hatte sich nun auch mit der Zugabe von lipidklasseninternen Standard bewährt. Wie schon oben beschrieben ließ sich dieser nun als Erfolgsparameter für die Trennung unbekannter Lipidgemische, sowohl, änderte oder optimierte man die Derivatisierung, auch sofort zur Quantifizierung der aufgetrennten Lipide nutzen.

Da mein Ziel aber die Lipidklassenseparation aus Plasma war, waren noch weitere Vorversuche notwendig.

Denn um die Lipide im Plasma der Separation zugänglich zu machen, müssen sie aus dem Verband der Lipoproteine und des Albumins extrahiert werden. Es bedurfte also noch einem Versuch der Trennung eines Modellgemisches mit

lipidklasseninternen Standard nach vorheriger Extraktion, um deren Einwirkung auf die Lipide und Separation, sowie gaschromatischen Analyse beurteilen zu können.

#### 4.3.4 Separation nach Extraktion von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipidklasseninternen Standard *unter Einfluss von Cholesterin*

Dieser letzte Vorversuch zur Plasmaseparation umfasste zwei Versuchsreihen. Identische Modellgemische aller Lipidklassen zusammen mit internen Standard jeder Lipidklasse in isotonischer Kochsalzlösung gelöst, wurden einer Extraktion nach Folch bzw. Hara&Radin[Hara A, Radin NS; 1978] unterzogen. Anschließend folgte die Separation über der Kieselgelsäule. Bei beiden Extraktionen wurde in der Analyse nach erfolgter Separation wieder die unzureichende Umesterung der Triglyceride deutlich. Ihre Wiederfindung blieb bei höchstens 80%.

Die Tabelle unten zeigt eine unbeeinflusst deutliche Separation nach Folch-Extraktion.

TABELLE 3 MODELLLIPIDSEPARATION NACH FOLCH-EXTRAKTION

FRAKTION		1	2	3	4	5
ELUTIONSMITTEL		4ml	2ml	1ml	6ml	4ml
Sollwerte µg		Hexan/ MTBE 200:3	Hexan/ MTBE 96:4	Hexan /HAc 100:0,2	Hexan / MTBE/HAc 100:2:0,2	MTBE/ Methanol/Amoniumacacetat 5:8:2
CE 187,5	<b>Cholesterin- linolat</b> µg	181,0				
TG 150	<b>Triolein</b> µg		111,4			
PL 150	<b>Dipalmitoyl- phosphatidyl- cholin</b> µg					153,4
FFA 22,5	<b>Linolensäure</b> µg				89,3	

Deutlich tritt eine unverhältnismäßig große, durch den Gaschromatographen berechnete Menge von Linolensäure zu Tage. Nach Analyse der Peakfläche der Methyl ester dieser freien Fettsäure und ihres internen Standards Undecansäure, fiel auf, dass die Fläche des Standards und damit die vom Gaschromatographen detektierte Menge meist viel zu gering ausfiel im Vergleich zur Separation ohne Extraktion oder nach der Extraktion von Hara&Radin[Hara A, Radin NS; 1978]. Während der Prozedur von der Folch-Extraktion bis zur Separation gab es also einen selektiven Verlust der Undecansäure, der zudem trotz gleichgehaltener Bedingungen auch noch großen Schwankungen unterlag, wie spätere Versuche zur Folch-Extraktion offenbarten. Lepage und Roy beschreiben in [Lepage G und Roy CC, 1984 und 1988] ebenfalls einen Verlust von freien Fettsäuren bei der Folch-Extraktion im Zusammenhang mit Dünnschichtchromatographie. Der übermäßige Verlust von Undecansäure im Vergleich zu Linolensäure ließ dem Gaschromatographen aus der vermeintlich bekannten Standardmenge weit zu hohe Werte für die Linolensäure berechnen.

Auch das Literaturstudium brachte mich in der Problemfindung nicht weiter, so dass ich die Folch Extraktion zum Zwecke der Separation nicht empfehlen kann.

Die Extraktion nach Hara & Radin[Hara A, Radin NS; 1978] war diesbezüglich erfolgsversprechender, die Wiederfindung aller Modellsubstanzen war erwartungsgemäß.

Doch gab es, wie oben beschrieben, im Gaschromatogramm zahlreiche Störpeaks, insbesondere in der Fraktion der Phospholipide, aber auch bei den freien Fettsäuren. Ihr Muster war stets gleich bleibend, so dass die Ursache im Verarbeitungsweg der Extraktion zu suchen war und nicht etwa bei Verschmutzungen in den Reagenzgläsern oder der Gaschromatographie Säule. Letztendlich konnte, wie bereits erwähnt, die Ursache in der für diese Extraktion notwendigen Filtrierung gefunden werden.

Da die Geisterpeaks zwar in ihren Retentionszeiten mit bekannten Fettsäuren übereinstimmten, aber in den Fraktionen auftauchten, in denen sie nicht mit Modellsubstanzen interferierten, konnte dieser Versuch trotzdem ausgewertet werden:



TABELLE 4 MODELLLIPIDSEPARATION NACH HARA&amp;RADIN-EXTRAKTION

FRAKTION		1	2	3	4	5
ELUTIONSMITTEL		4ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	6ml Hexan / MTBE/HAC 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/ Amoniumacacetat 5:8:2
Sollwerte µg						
<b>CE 187,5</b>	<b>Cholesterinlinolat µg</b>	178,1				
<b>TG 150</b>	<b>Triolein µg</b>		106,0			
<b>PL 150</b>	<b>Dipalmitoyl- phosphatidyl- cholin µg</b>					161,6
<b>FFA 22,5</b>	<b>Linolensäure µg</b>				23,6	

Leider konnte aus diesen Vorversuchen keine definierte Konzentration der Störsubstanzen bestimmt werden, um sie in der anschließenden Plasma Separation nach Hexan/Isopropanol-Extraktion von der Konzentration jeder Fettsäure mit gleicher Retentionszeit subtrahieren zu können. Die Konzentration der Störsubstanzen war nämlich entgegen ihres festen Musters variabel. Dennoch empfehle ich die Extraktion nach Hara&Radin, die Vorteile sind nicht nur in der Quantifizierung zu finden, sondern gerade in der schnellen, einfachen und, wenn das Filtersystem gut ist, gesunden Handhabung, denn ein Benutzen von Chloroform ist dann nicht notwendig. Auf Filter E mit Filterhalter MULOCLEAR; 0,45µm PTFE 25mm; Farbcode blau; Art.-Nr.: 390802; bezogen bei: CS-Chromatographie Service GmbH ist also zu verzichten, ferner sollte jedes Filtersystem durch Spülen mit der Extraktionslösung, anschließendes Derivatisieren des abgedampften Restes und gaschromatographischer Analyse auf ein Herauslösen von Störsubstanzen überprüft werden.

#### 4.4 Plasmalipidklassenseparation

Wie oben beschrieben bedarf es vor der Lipidklassenseparation aus natürlichen Geweben oder Flüssigkeiten zunächst einer Extraktion der Lipide. Aus Gründen der Quantifizierung der freien Fettsäuren bietet sich, wie oben beschrieben, dafür die Extraktion von Hara& Radin[Hara A, Radin NS; 1978] an! Um beidem, den Fehlern bei der Quantifizierung nach Folch Extraktion und

den zahlreichen Störpeaks nach Hara&Radin[Hara A, Radin NS; 1978] Extraktion zu entgehen, habe ich Plasma ohne lipidklasseninternen Standard nach Folch extrahiert und einen Standard erst nach Separation hinzugefügt. Das erlaubte mir Aussagen über das Fettsäuremuster in jeder Lipidklasse zu machen und ferner die Menge der Fettsäuremethylester jeder Lipidklasse zu quantifizieren, die Ergebnisse möchte ich hier vorstellen:

TABELLE 5 LIPIDKSEPARATION AUS HUMANEN PLASMA

Plasmafettsäuren in Lipidklassen	nach Separation				nach Separation	ohne Separation
	CE	TG	FFA	PL	SUMME	SUMME
PLASMAFETTSÄUREN- methylester in µg/ml						
Palmitinsäure 16:0	8,6 +/- 0,8	10,5 +/- 0,4	116,2 +/- 3,8	454,8 +/- 13,6	590	686,49
Stearinsäure 18:0	39,1 +/- 6,9	43,8 +/- 2,5	118,7 +/- 4,8	305,1 +/- 10	507	204,45
Ölsäure 18:1	139,3 +/- 4,9	213,91 +/- 6,9	44,7 +/- 1,2	96,9 +/- 2,8	495	479,93
Linolsäure 18:2	594,8 +/- 45,8	153,2 +/- 9,3	0,0	292,9 +/- 19,9	1041	899,91
Arachidonsäure 20:4	58,4 +/- 3,2	11,1 +/- 1,6	0,0	99,2 +/- 4,8	169	172,37

Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der Fettsäuremethylester jeder Lipidklasse nach Folch-Extraktion. Gegenübergestellt ist die Konzentration der Fettsäuremethylester der gleichen Folch-extrahierten Plasmaprobe, die keiner Separation unterlag.

Ich habe hier nur eine Auswahl von Fettsäuremethylesterkonzentrationen dargestellt, selbstverständlich ist es möglich die Konzentration jedes gaschromatographisch eingeeichten Esters für jede Lipidklasse zu bestimmen. Deutlich hervorgehoben ist die Diskrepanz zwischen gemessener Stearinsäure im Gesamtplasma und in der Summe der einzelnen Fraktionen der Separation. Wie schon häufiger erwähnt, gab es während der gesamten Versuche Probleme die Lipide vollständig in die Methylester ihrer Fettsäuren umzuestern. Dieses Problem könnte auch hier Ursache ein, denn, wie im nächsten Kapitel noch ausführlich beschrieben, ist die vollständige Umesterung der Triglyceride gerade in Anwesenheit anderer Lipide nicht gewährleistet. Geringer gemessene Konzentrationen bei der Gesamtplasmaanalyse im Vergleich zu den separat umgeesterten Fraktionen finden unter Umständen dort ihren Ursprung.

Dennoch hoffe ich sehr, dass mir die Möglichkeit und Zeit während meines anschließenden klinischen Teil des Medizinstudiums bleibt, noch einmal ein neues Filtersystem zu testen und die Lipidklassenseparation nach vorheriger Extraktion nach Hara & Radin [Hara A, Radin NS; 1978] durchzuführen und so eine Lipidklassenseparation aus Plasma bieten zu können die beides, Kontrolle der Separation und exakte Quantifizierung der Fettsäuremethylester, in einem Schritt bietet.

#### 4.5 Derivatisierung und Wiederfindungsraten

Wiederfindungsraten beschreiben die gaschromatographisch berechneten Konzentration eines Lipids als Anteil seiner ursprünglich im Versuch eingesetzten Konzentration. Die Wiederfindungsrate eines Fettsäuremethylesters in einer zur Gaschromatographie geeigneten Lösung beträgt also 100% und wird zur Eichung des Gaschromatographen eingesetzt. Soll ein Lipid analysiert werden, muss es zunächst derivatisiert werden, d.h. seine Fettsäuren in den Methylester überführt werden, denn nur so ist die gaschromatographische Analyse möglich. Handelt es sich um eine bekannte Lipidklasse mit nur einer enthaltenen Fettsäure, ist eine exakte Berechnung der eingesetzten Lipidkonzentration möglich. Diskrepanzen die sich zwischen eingesetzter Lipidmenge und detektierter Lipidmenge finden, haben bei korrekter Eichung des Gaschromatographen ihre Ursache in einer unzureichenden Umesterung. Liegen zwischen dem Abmessen der Lipidmenge und der Derivatisierung noch weitere Versuche, wie eine Extraktion oder Separation, ist auch ein Probenverlust in die benötigten Materialien zur Extraktion (Filter), eine ungenügende Extraktion einer bestimmten Lipidklasse oder ein unvollständiges Eluieren von der Säule denkbar. Deshalb muss bei unzureichender Wiederfindung jeder dieser Schritte separat untersucht werden, um einen Fehler ausfindig zu machen.

Ferner ist die Wiederfindungsrate eines Lipids auch in Abhängigkeit des für die Gaschromatographie nötigen Standards zu betrachten: Sämtliche Berechnungen zur Konzentration eines Lipids erfolgen durch die Software, indem das detektierte Signal seines Fettsäuremethylesters in Vergleich zum Signal des Standards gesetzt wird. Die Standardmenge ist bekannt, die Menge des unbekanntes Fettsäuremethylesters wird als vielfaches oder Anteil dieser kalkuliert (siehe auch Kapitel 2.7 Prinzip des Gaschromatographen). Wird als Standard kein Fettsäuremethylester eingesetzt, unterliegt auch er der

Umesterungsreaktion. Ist diese unvollständig, entsteht eine zu geringe Menge des Standardmethylesters, ergo wird eine zu hohe Menge des unbekanntes Fettsäuremethylesters kalkuliert. Durchläuft der Standard auch die Extraktion und Separation können hier verschiedenste Verluste erfolgen. Wählt man nun einen Standard, der in seinen Eigenschaften der zu analysierenden Lipidklasse entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass die Verluste bei beiden sich entsprechen, somit kann die Kalkulation des Gaschromatographen trotzdem fehlerfrei ablaufen. Aber auch dieses will geprüft sein.

Untenstehende Tabellen zeigen die Wiederfindung der Modelllipide vor und nach Extraktion bzw. Separation, jeweils drei Proben wurden untersucht. Dargestellt sind die Peakflächen. Die letzte Zeile zeigt die Vergleichswerte, hier sind sämtliche Modelllipide nur derivatisiert worden. Standards sind die lipidklasseninternen Standards, sie unterliegen auch der Derivatisierung. Schon hier wird die ungenügende Wiederfindung der Triglyceride deutlich, die erste Spalte zeigt die vom Gaschromatograph detektierte Menge in  $\mu\text{g}$ .

Der Vergleich der Peakflächen nach Derivatisierung, mit denen der Lipidklassen, die zunächst auf der Kieselgelsäule separiert worden (vorletzte Zeile), zeigt keinen Verlust durch die Separation. Es ist also versichert, dass eine vollständige Elution der Modelllipide sowie ihrer Standards stattgefunden hat. Verluste beider ergeben sich wie in den ersten beiden Zeilen sichtbar erst bei der Extraktion. Die Wiederfindung nach der Hara&Radin-Extraktion bewegen sich allerdings noch im korrekten Bereich, die kleineren Peakflächen spiegeln Probenverlust im Filter oder beim Umfüllen der Gläser wieder, betreffen aber Standard und Modelllipid in gleichen Maßen, so dass die korrekte Berechnung der Menge durch den Gaschromatographen noch möglich ist. Die Folch-Extraktion bietet, wie im Kapitel Extraktionen(4.2), erwähnt diese Möglichkeit nicht. Ein Verlust der Undecansäure als Standard für die freie Fettsäure Linolensäure, hier durch die Unverhältnismäßig kleine Peakfläche (AREAs) zu erkennen, lässt den Gaschromatographen weit zu große Mengen der Linolensäure errechnen, ein ähnliches Problem zeigt die Wiederfindung der Cholesterinester.

TABELLE 6 WIEDERFINDUNGSRATEN IM VERGLEICH

Lipidklasse und eingesetzte Menge		Cholesterinlinolat 187,5µg IS: Cholesterinheptadecanoat				Triolein 150µg IS: Tritridecanoïn			
	nach Separation	GCµg	AREA is	AREA	AREA korr	GCµg	AREA is	AREA	Area korr
Art der Extraktion	Folch	212	120414	606776	749106	100	130492	796745	983635
	Hara&Radin	178	166013	701549		106	179821	1166133	
	Keine	185	166267	731992		107,5	182741	1205106	
	Keine, ohne Separation	166	166882	656630		114,5	177510	1226925	

Lipidklasse und eingesetzte Menge		Linolensäure 22,5µg IS: Undecanoat				Dipalmitoylphosphatidylcholin 150µg IS: Dipentadecanoylphosphatidylcholin			
	nach Separation	GCµg	AREA is	AREA	Area korr	GCµg	AREA is	AREA	Area korr
Art der Extraktion	Folch	35	79290	154823	191139	148	124791	649971	802433
	Hara&Radin	24	147409	189976		162	155663	860917	
	Keine	24	168373	219566		159	180231	992974	
	Keine, ohne Separation	21,6	159625	188272		144,6	157926	800424	

IS= interner Standard; GCµg= berechnete Menge Modelllipid in µg; **AREA**is= Peakfläche des internen Standards; **AREA**= Peakfläche des Modelllipids; **AREA**korr= korrigierte Peakfläche des Modelllipids, errechnet durch den bekannten Verlust von 29% bei der Folch-Extraktion n=3

Um den Verlust der Triglyceride zu verstehen und eventuell beseitigen zu können, wurde die Umesterungsreaktion näher untersucht:

Die verwendete Methode zur Probenderivatisierung ist eine abgewandelte Form der Methode zur direkten Umesterung aller Lipidklassen in einer Einschrittreaktion entwickelt von Lepage und Roy[Lepage G, Roy CC, 1986].

Aufgrund seiner kanzerogenen Wirkung wurde das Benzen, welches in der Ursprungsmethode dazu diente die Lipide in Lösung zu halten, durch Toluol ersetzt. Ferner ist die Reaktionstemperatur von 100°C auf 80°C herabgesetzt worden, was als ausreichend für die totale Umesterung aller Lipidklassen mit Heptadecansäurestandard erschien und bereits vor Beginn meiner Arbeit festgelegt wurde.

Während sämtliche Umesterungsraten ähnlich wie von Lepage und Roy[Lepage G, Roy CC, 1986] beschrieben ausfielen, siedelte sich die Wiederfindungsrate der Triglyceride bei nur ca.75% an, wenn Tridecanoïn als

Standard verwendet wurde. Auch beim Nutzen von Heptadecansäure als Standard war die Wiederfindung der Triglyceride mit nur ca. 80% immer geringer als die von Roy und Lepage beschriebenen nahezu 100%. Versuche, die Wiederfindungsrate durch Verdünnen der Lipidlösungen zu steigern, scheiterten ebenso, wie eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 100°C oder Erneuerung sämtlicher Reagenzien.

Daraus ist zu schließen, dass die unvollständige Umesterung des Trioleins in der schlechten Löslichkeit der Triglyceride und der damit verminderten Zugänglichkeit des Reagenten (Methanol) zum Triglycerid liegt. Da Roy und Lepage von solchen Problemen nicht berichteten, ist es wahrscheinlich, dass die Löslichkeit von Triglyceriden in Benzen besser ist, als in dem hier eingesetzten Toluol. Die Optimierung der Derivatisierung, trotz Verzicht auf Benzen, musste aus Zeitgründen leider unterbleiben.

## 4.6 Kalibrierung des Gaschromatographen

Es wurden 30 Fettsäuremethylester kalibriert, alle mindestens vier mal, denn für jeden Standard bedarf es einer eigenen Kalibrierung, schließlich berechnet der Gaschromatograph die Konzentration eines Fettsäuremethylesters indem er sein Signal des Flammenionisationsdetektors mit dem des Standards bekannter Menge vergleicht. Da das Signal des Flammenionisationsdetektors substanzspezifisch ist, unterscheidet es sich für jeden Standard, auch gleicher Menge. Die unbekannte Substanzmenge wird unter anderem durch den Vergleich der Detektorantworten von Substanz und Standard ermittelt. Dieser Faktor ist für jede Substanz in Bezug auf jeden Standard unterschiedlich und wird in der Kalibrierung ermittelt. In der Tabelle befinden sich diese so genannten Responsefaktoren für Standards und Fettsäuremethylester. Ebenso abzulesen sind die Retentionszeiten der Fettsäuremethylester, die im Chromatogramm einer unbekanntem Lipidmischung die Identifikation der Fettsäuren des Gemisches erlauben. Die Retentionszeiten sind spezifisch für die Säule und verändern sich mit Abnutzung derselben, sie werden kürzer. Insofern bieten sie für die Identifizierung nur einen Anhaltspunkt. Da das Verhältnis der Retentionszeiten zueinander aber gleich bleibt, erlauben sie bei mehreren bekannten Peaks im Chromatogramm eine genaue Einordnung auch recht seltener Fettsäuremethylester. Die Tabelle zeigt als Beispiel die Kalibrierung für den Standard Undecansäure, im ersten Level der Zweipunkteichung, welches, wie im Kapitel "Kalibrierung des

Gaschromatographen“ (3.8) bereits geschildert, den Konzentrationsbereich der Fettsäuremethylester von ca. 20 µg/ml abdeckt. Jede Kalibrierlösung wird dreimal gaschromatographisch vermessen, die Response Faktoren sind also vom Kalibrierungsprogramm berechnete Mittelwerte dieser Dreifachbestimmung.

Die Tabelle verdeutlicht den massiven Einfluss der Doppelbindungen auf die Retentionszeit eines Fettsäuremethylesters (FAME). So liegt zwischen der Elution des Methylesters der Stearinsäure, 18 Kohlenstoffatome, und der Linolensäure, ebenfalls 18 Kohlenstoffatome aber drei Doppelbindungen, mehr als eine Minute. Ebenfalls wird deutlich, dass alle FAME in diesem niedrigen Konzentrationsbereich unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen, bei Proben in diesem Konzentrationsbereich also, ist es möglich sogar cis und trans Fettsäuren der gleichen Kohlenstoffkettlänge zu trennen.

TABELLE 7 KALIBRIERUNG DES GASCHROMATOGRAPHEN  
FÜR UNDECANSÄURE

Kalibrierung für Fames Level 1 Standard Methylundecanoat Konzentration der Fames ca. 20 µg/ml					
C-Atome der FS	Fame		Retentions- zeit [min]	Konz. Stammlsg. [µg/ml]	Responsefaktor
C8:0	Methyl	Caprylat Octanoat	4,248	20	3.4669e-004
C10:0	Methyl	Caprinat Decanoat	5,525	22	2.896e-004
C11:0	Methyl	Undecanoat	6,108	103,2	3.2041e-004
C12:0	Methyl	Laurat	6,660	20,6	3.1275e-004
C14:0	Methyl	Myristat	7,885	20	2.9347e-004
C14:1	Methyl	Myristoleat	8,099	23,36	2.999e-004
C16:0	Methyl	Palmitat	9,537	20	2.885e-004
C16:1	Methyl	Palmitoleat	9,748	20	2.7016e-004
C16:Me4	Methyl	Phytanoat	10,875	20	1.9911e-004
C18:0	Methyl	Stearat	11,893	20	2.5951e-004
tC18:1	Methyl	Elaidonat	12,230	20,12	2.9782e-005
tC18:1	Methyl	t-11-Octadecenoat t-Vaccenat	12,040	20,32	3.8631e-004
C18:1	Methyl	Cis-6-Octadecenoat Petrosilinat	12,000	20,32	3.3903e-004
C18:1	Methyl	Cis-7-Octadecenoat	11,987	20,2	3.1427e-004
C18:1	Methyl	Ricinoleat	19,684	21,8	4.0609e-004

C18:1	Methyl	Oleat	12,048	20	2.625e-004
C18:2	Methyl	Linoleat	12,549	20	3.1231e-004
C18:3	Methyl	Linolensäure	13,205	20	3.7988e-004
C18:3n	Methyl	g-Linolensäure	12,787	21	3.1893e-004
C20:1	Methyl	Eicosaenoat	15,086	20	2.6994e-004
C20:2	Methyl	Eicosadienoat	15,669	21,2	4.9437e-004
C20:4	Methyl	Arachidonat	16,104	20,86	3.9446e-004
C20:5	Methyl	Eicosapentaenoat	16,909	19,8	4.3758e-004
C22:0	Methyl	Behenat	18,294	20	4.8496e-004
C22:1	Methyl	Erucat	18,582	20	3.0406e-004
C22:5	Methyl	Docosapentaenoat	20.661	20	5.3195e-004
C22:6	Methyl	Docosahexaenoat	20,853	20,2	5.597e-004
C24:0	Methyl	Nervonat	22,296	21,68	3.8811e-004
C26:0	Methyl	Hexacosanoat	25,636	20,2	5.5461e-004
C28:0	Methyl	Octacosanoat	29,937	20	8.3801e-004

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine Zweipunkteichgerade des FAME der Stearinsäure zur Kalibrierung des Standards Undecansäure. Die Abszisse des Diagramms ist den Konzentrationen zugeordnet. Im Fall der Zweipunkt Kalibrierung Level 1 und 2 wird der Responsefaktor für die Stearinsäuremethylesterkonzentrationen von ca. 20µg/ml(Level1) und ca. 100µg/ml(Level2) errechnet und gegen die Ordinate(Response) abgetragen, die entstehende Eichgerade macht die automatische Berechnung jeder Konzentration dieser Fettsäure an Hand der Detektorantwort in Bezug auf den internen Standard (Response) möglich. Die Eichgerade repräsentiert wieder das Mittel dreier gaschromatographischen Vermessungen für jede der beiden Konzentrationen(Level 1 und 2)

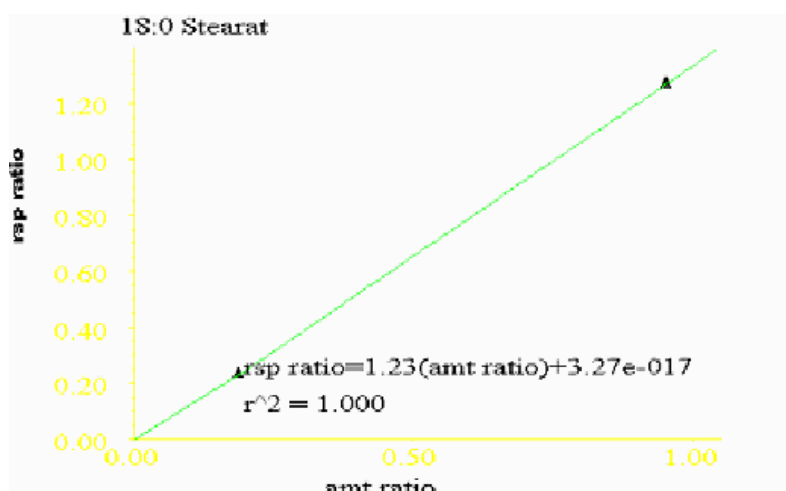


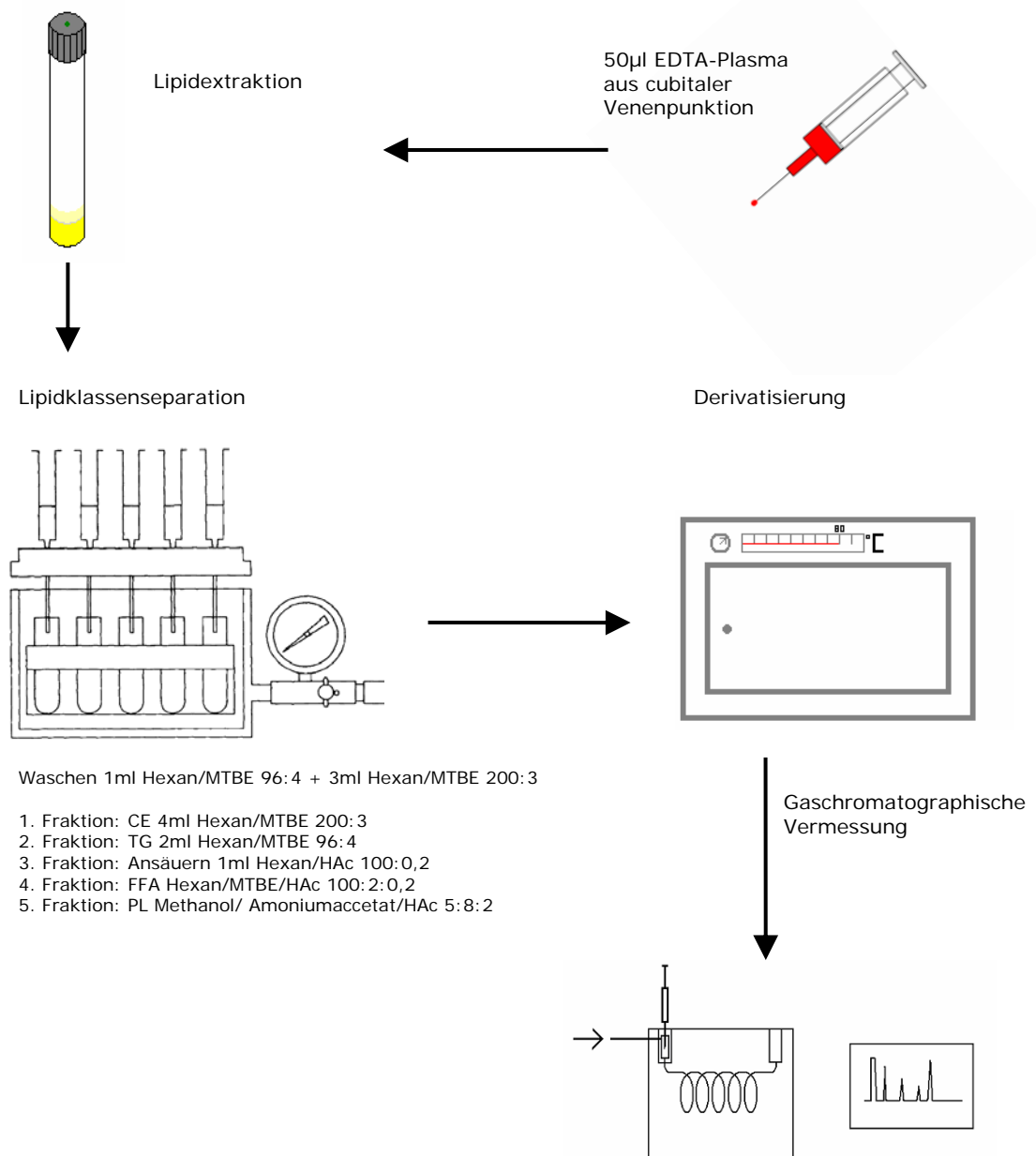
Abbildung 18:  
Eichgerade des  
Gaschromatographen  
für  
Stearinsäuremethylester,  
interner Standard ist  
Undecansäure-  
methylester.  
Die Abszisse stellt die  
Konzentration des  
Stearinsäuremethylesters  
da, die Ordinate den  
Responsefaktor in  
Bezug.  
n = 3



## 4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend ist die Lipidklassenseparation aus Plasma mit allen Vorversuchen und Nachbearbeitungen schematisch dargestellt.

### Schema einer Lipidklassenseparation aus Plasma



## 5 Diskussion

Lipidklassenseparation durch Festphasenextraktion auf Kieselgelsäulen oder deren Derivaten schien mir, wie Eingangs verdeutlicht, der richtige Weg zu meinem Ziel! Doch gibt es seit den Achtzigern verschiedenste Ansätze, so dass es nicht leicht war, sich für eine Methode zu entscheiden.

### 5.1 Säuleneigenschaften und Separation

#### Säulen

Lipidklassenseparationen in der Festphasenextraktion wurden in der Vergangenheit maßgeblich auf reinen Kieselgelsäulen oder Aminopropylsäulen durchgeführt. Welche von beiden bietet nun die Möglichkeit eine Lipidklassenseparation nach meinen Ansprüchen durchzuführen, d.h. schnell, einfach reproduzierbar und kostengünstig?

Für beide stellte sich die Frage selbstgepackte Säulen herzustellen oder maschinell gepackte zu beziehen. Ferner, welchen Ansprüchen das Säulenmaterial zu genügen hat. Um das vorweg zu nehmen, eine Glassäule ist vorteilhafter als eine Kunststoffsäule. Kunststoffsäulen sollten vor Gebrauch geprüft werden, ob sie, besonders gegenüber den sauren Lösungsmitteln, inert sind. Denn häufig lösen sich so genannte Weichmacher aus den Säulen, die dann in der gaschromatischen Analyse als zusätzliche Peaks irritieren können. Dennoch habe ich mit den Kunststoffsäulen der Firma Isolute diesbezüglich keine negativen Erfahrungen gemacht.

Die Verwendung einer maschinell gepackten Säule bietet Zeitersparnis und Reproduzierbarkeit durch gleich bleibende Packeigenschaften, ferner gewährleistet die Fabrikpackung einen Ausschluss der Luftfeuchtigkeit, welche die Kapazität und Separationsfähigkeit der Säule gefährdet[Christie WW, 1992], bei durchaus wirtschaftlicher Preislage[Christie WW, 1991].

Welche Vorteile bietet eine reine Kieselgelsäule in der Lipidklassenseparation im Vergleich zur ebenfalls vorgefertigt lieferbaren Säule mit an Kieselgel gebundenen Aminopropyl Gruppen?

Zum einen, einen entschiedenen Preisvorteil; allerdings besteht bei beiden die Möglichkeit sie zu waschen und wieder zu verwenden, was die Kosten reduziert[Kaluzny et al., 1985]. Die Arbeit mit Kieselgelsäulen, die Gruppen gebundenen haben, stellt den Benutzer vor viele Schwierigkeiten: Jeder Arbeit mit so einer Säule benötigt einen gründlichen und gleich bleibenden Vorlauf

der Konditionierung und Befeuchtung, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Vorstellung dieses Ablaufes ist, eine geordnete Ausrichtung der gebundenen Reste zu erhalten[Christie WW,1992]. Um eine Hydrolyse der Reste vom Kieselgel und damit eine Änderung der Eigenschaften der Säule zu vermeiden, darf nur mit Elutionsmitteln im vorgegebenen pH Bereich gearbeitet werden[Christie WW,1992] , zumindest wenn die Säule wieder verwendet werden soll oder die Elution noch nicht abgeschlossen ist[Christie WW,1992]. Eine Anfeuchtung der Säule ist bei beiden Arten notwendig und zwar mit dem Elutionsmittel der ersten Fraktion, ebenso sollten beide gewaschen werden um Verunreinigungen zu entfernen[Christie WW,1992]. Zum Waschen können unterschiedliche Lösungsmittel verwendet werden[Hamilton JG, Comai K, 1988]. Ziel ist es sämtliche Verunreinigungen, die die Analyse gefährden könnten, auch mit unterschiedlichem chemisch-physikalischem Charakter, zu entfernen. Im Anschluß erfolgt das Befeuchten der Säule erfolgt mit dem Lösungsmittel der ersten Fraktion und dient dazu der Säule immer gleich bleibend den erwünschten Charakter zu verleihen. An Hand der Kieselgelsäulen lässt sich dieses gut erklären: Kieselgel selbst bindet über Wasserstoffbrückenbindungen, unter Einfluss wässriger Verbindungen bekommt Kieselgel einen sauren Charakter und geht Ionenbindungen ein [Christie WW,1992] , nun werden Stoffe ganz anderer Eigenschaften retiniert.

### **Separation**

Die Methoden zur Lipidklassenseparation durch Festphasenextraktion teilen sich seit Mitte der Achtziger in zwei Strömungen. Zum einen auf der Methode von Kaluzny et al. [Kaluzny et al. ;1985] basierende unterschiedlichste Lipidklassenseparationen auf Aminopropylsäulen, zum anderen auf reinen Kieselgelsäulen, wie sie damals Hamilton und Comai beschrieben[Hamilton JG, Comai K; 1988].

Kritik wurde der Nutzung von reinen Kieselgelsäulen zur Lipidklassenseparation z.B. von Kaluzny et al. [Kaluzny et al. ;1985] schon entgegengebracht, bevor Hamilton und Comai[Hamilton JG, Comai K; 1988] ihre endgültige Methode entwickelten: Kieselgelsäulen könnten keine hohe Reinheit der Fraktionen erreichen, es käme zum Überlappen der Lipidklassen; ferner seien sehr große Mengen an Lösungsmitteln notwendig und somit ein hoher Zeitaufwand. Tatsächlich benötigten Hamilton und Comai auf einer vergleichbar großen Säule(600mg) weitaus mehr Elutionsmittel(siehe Kapitel 2.6 "Prinzip der Festphasenextraktion auf Kieselgelsäulen zur Lipidklassenseparation") als Kaluzny et al. [Kaluzny et al. ;1985] auf der 500mg Aminopropylsäule. Allerdings brauchten Kaluzny et al. [Kaluzny et al.

;1985] zwei ihrer Säulen, um die Triglyceride von den Cholesterinestern zu trennen, konnten dafür aber auch Mono-, Di- und Triglyceride separieren. Hamilton und Comai gelang die Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden auf nur einer Säule, außerdem konnte ihre Methode im Gegensatz zu der von Kaluzny et al. [Kaluzny et al. ;1985] ganz auf den Gebrauch des gesundheitsschädlichen Chloroforms verzichten. Neben dem sichereren und angenehmeren Arbeiten bei Hamiltons und Comais[Hamilton JG, Comai K; 1988] Methode, bietet sich also auch eine leichtere Handhabung.

Ferner lässt sich die von Kaluzny et al. [Kaluzny et al. ;1985] geäußerte Kritik, es käme zu einer unsaubereren Trennung limitieren, Hamilton und Comai[Hamilton JG, Comai K; 1988] die Lipide aus 100µl Plasma trennten, erwähnten derartiges nicht. Christie äußerte 1992[Christie WW, 1992] ,dass sich solche Probleme einer unsaubereren Separation meist aus dem Überladen der Säule ergeben: Eine so kleine Säule habe nicht viele theoretische Böden und muss mit Vorsicht genutzt werden. Vortests zur Kapazität einer Säule machen, meiner Meinung nach, solche Probleme kalkulierbar und sie können durch Verdünnung der Probe oder Reduzierung des Probenvolumens minimiert werden. Schwerwiegender war da die Kritik Christies[Christie WW, 1992] an der Methode von Kaluzny et al. [Kaluzny et al. ;1985], er beschreibt einen Fehler in der Wiederfindung der Phospholipide: Ins Besondere die sauren Phospholipide würden so stark vom sehr polaren Aminopropylrest retiniert[Egberts J, Bulskool R, 1988], dass stärkere Lösungsmittel als das von Kaluzny et al.(1985) zu Elution des Phosphatidylcholin benutzte Methanol von Nöten wären, ebenso äußerten sich Kim et al. 1990 [Kim HY, Salem N Jr, 1990].

Seit damals ist mit beiden Methoden häufig gearbeitet wurden und beide sind ebenso häufig modifiziert und kritisiert wurden. 1988 versuchten Hoving et al. [Hoving et al. 1988] eine Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden des Plasmas, um ihre Fettsäuren gaschromatographisch analysieren zu können und so Nahrungsfettaufnahme und Umsatz prüfen zu können. Sie arbeiteten in Anlehnung an Kaluzny et al. mit Aminopropylsäulen und entwickelten zwar eine abgekürzte, aber dennoch identische Modifikation der Methode von Kaluzny et al., indem sie Cholesterinester und Triglyceride direkt aus einem auf die Säule aufgegebenen künstlichen Lipidgemisch mit von Kaluzny et. al.[Kaluzny et al. ;1985] vorgeschlagenen Lösungsmitteln eluierten. Der Umweg der vorausgehenden Elution aller neutralen Lipide und folgendem Auftrennen von Cholesterinestern und Triglyceriden auf einer zweiten Säule blieb aus. Diese Modifikation war für die gestellten Ansprüche

zwar schnell und praktikabel, führte aber zu einer Verschmutzung beider Fraktionen durch freie Fettsäuren. Sie lösten dieses Problem durch Zugabe interner Standards während der Separation und kalkulierten mit Hilfe derer den Anteil an freien Fettsäuren in den beiden Fraktionen. In sofern stellte diese Modifikation für mich keinen Ansatz zur Lipidklassenseparation auf nur einer Säule dar.

1992 haben Agren et al.[Agren et al., 1992] eine Methode entwickelt, die es ermöglicht hat eine Lipidmischung, mit Lipidkonzentration doppelt so hoch wie in normalen humanen Plasma, aus Cholesterinestern, Mono-und Diglyceride, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phosphatidylcholin auf nur einer 500mg Aminopropylsäule zu trennen. Leider konnte diese zugegeben schnelle und praktische Methode von anderen[Burdge et al., 2000] nicht reproduziert werden.

Burdge et al. [Burdge et al., 2000] konnten ihrerseits wieder eine Methode zu Lipidklassenseparation auf Aminopropylsäulen zur Verfügung stellen, die der Agren et al. Methode in der Auftrennung nicht nachstand, aber wieder den Gebrauch zweier Säulen notwendig machte. Dafür aber konnte mit sehr kleinen Säulen mit einer Füllung von nur 100mg gearbeitet werden. Auch das Lösungsmittelvolumen konnte erheblich reduziert werden. Leider konnte keine der erwähnten Trennungen auf Aminopropylsäulen auf Chloroform als Lösungsmittel verzichten.

Trotz der hier zahlreich aufgeführten Beispiele für Lipidklassenseparation auf Aminopropylsäulen, habe ich mich dennoch dafür entschieden den Weg von Hamilton und Comai einzuschlagen und meine Methode als Modifikation ihrer, auf reinen Kieselgelsäulen, zu entwickeln. Grund dafür waren zum einen die oben genannten Vorteile der Säule selbst. Ferner die einfache Handhabung, die sich durch Arbeiten mit nur einer Säule ergibt. Bei der Methode von Kaluzny et al. war es sogar nötig das zuerst erhaltene Eluat einzudampfen, neu zu lösen und erst dann auf die zweite Säule aufzugeben. Jeder dieser Arbeitsschritte kann einen Verlust der Lipide der betreffenden Klassen, neutrale Lipide, bedeuten. Diesen Schritt wollte ich vermeiden. Reizvoll erschien mir an der Methode von Hamilton und Comai auch gänzlich auf Chloroform verzichten zu können, welches schließlich als kanzerogene Substanz im Tierversuch beschrieben wurde[Zock PL, 2001]. Ausschlaggebend war schließlich, dass im Literaturstudium keine Kritik an der Reproduzierbarkeit dieser Methode geäußert wurde, mit Ausnahme dem oben genannten Problem der Überladung der Säulen. Dieses schreckte mich nicht ab, erwartete es doch nur ein gründliches Studium der Kapazitäten sämtlicher Lipidklassen der 100mg Säulen die ich verwenden wollte.

### **Kritische Betrachtung der Ergebnisse zu Studien der Säulen Eigenschaften und Separationen**

Zunächst möchte ich meine Ergebnisse aus den Kapazitätstests der 100mg Kieselgelsäule näher betrachten, beginnend mit der Kapazität der Triglyceride. Meine Zielmethode beschreibt eine Elution mit 4ml Hexan/MTBE zur vollständigen Elution der Cholesterinester, während dieser müssen die Triglyceride gänzlich auf der Säule retiniert werden. Belastet man die Säule mit 150% der Plasmanormalwerte aller Lipidklassen, gelingt die Retention der Triglyceride während der ersten Fraktion nahezu vollständig (siehe Ergebnisse 4.3.1 – 4.3.3). Die Konzentration der Triglyceride im Plasma allerdings, ist sehr variabel und kann weit höhere Werte annehmen als 150% der von Geigy [S.:112, Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1985] als normal angegebenen 1-1,3mg/ml; so ist der Erfolg der Separation von 50µl Plasma mit sehr hohen Werten zunächst einmal nicht bewiesen. Im Vorfeld der Separation wurde die Kapazität, also die mögliche Beladung der Säule mit Triglyceriden, geprüft, auch unter dem Einfluss von Phospholipiden. Die Ergebnisse zeigen auf, dass die 100mg Kieselgelsäule problemlos 500µg Triolein trotz Elution mit 2ml Hexan/MTBE 200:3 halten kann, nach einer zweiten Aufgabe von 500µg Triolein und ebenso Elution mit 2ml Hexan/MTBE 200:3, vermag die Säule immer noch zwischen 95-96% der aufgegeben 1000µg zu retinieren. Das entspricht bei einem verwendeten Volumen von 50µl Plasma einer Konzentration von ca. 20mg/ml, die zu 95-96% retiniert werden kann. Unter einer Phospholipidbelastung mit Dipalmitoylphosphatidylcholin, die Normalplasma entspricht, sinkt dieser Wert auf 86-87%. Ein Konzentration von 20mg/ml im Nüchternplasma hat bereits Krankheitswert und ist dementsprechend in der Bevölkerung selten, es gibt allerdings Fettstoffwechselstörungen mit weit höheren Triglyceridkonzentrationen. Einige Beispiele aus Schwandt und Richter „Handbuch der Stoffwechselstörungen“ [Schwandt, Richter, Parhofer; Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2001] sein hier angeführt: So wurden bei dem Krankheitsbild der Dysbetalipoproteiämie (Typ III) Triglyceridwerte von bis zu 70mg/ml festgestellt (S.:99; Steinmetz und Kaffernik), bei einem Patienten mit so genannter Apo-C-II-Defizienz sogar Werte bis 300mg/ml (S.:130 Beisiegel und Patch). Bei bekannter Hypertriglyceridämie mit Werten von mehr als 15-17mg/ml oder einer sichtbaren Trübung des Plasmas sollte nach meinen Erkenntnissen eine Verdünnung der Plasmaprobe vor der Separation stattfinden, bzw. nur ein Anteil des Lipidextraktes genutzt werden, um die saubere Auftrennung der Komponenten nicht zu gefährden und eine exakte

Analyse der Lipidklassen zugehörigen Fettsäuren zu sichern. Selbstverständlich gehen all diese Betrachtungen von Nüchternplasma aus.

Die Elution der Cholesterinester ließ sich durch Anwesenheit von Phospholipiden fast nicht beeinflussen. In sofern entsprachen die Versuche zur Cholesterinesterelution ganz meinen Vorstellungen, allerdings, wie im Ergebnisteil schon erwähnt, benötigte es ein Volumen von 4ml Hexan/MTBE 200:3, um die Menge von 500µg Cholesterinoleat vollständig von der Kieselgelsäule zu entfernen. Kritisch, bedenkt man, dass bei diesem Volumen und unter Einfluss von Phospholipiden bereits über 20% von 1000µg Triolein nicht mehr reteniert wurden. Wie oben schon verdeutlicht, stellt die Konzentration von 1000µg Triglyceride pro 50µl Plasma(20mg/ml) bereits einen Fall mit Krankheitswert da, und auch die Menge der Cholesterinester bewegt sich im Bereich des Fünffachen des Normalen(Ausgangspunkt 50µl Plasma). Cholesterinester machen ca. 75% des Gesamtcholesterins des Plasmas aus [Duncan IW et al. ,1979]. Bei Patienten mit bekannten Cholesterinwerten sollte die Konzentration der Cholesterinester zunächst abgeschätzt werden, um zu Prüfen, ob die Separation unverdünnt möglich ist. 10mg/ml Cholesterinester sollten absolutes Limit sein, nachgewiesen habe ich eine saubere Separation mit ca. der Hälfte dieses Wertes. Ein Gesamtserumcholesterin von 20mg/ml im Serum gilt als Dyslipoproteinämie, Konzentrationen von bis zu 40mg/ml Gesamtcholesterin sind bei familiärer Hypercholesterinämie(S.:76; Keller und Zollner) und sogar 120mg/ml Gesamtcholesterin bei familiären Apo-B100-Defekt(S.:84; Keller und Zollner) gemessen worden; aus Schwandt und Richter „Handbuch der Fettstoffwechselstörungen“ [Schwandt, Richter, Parhofer; Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2001]. Auch hier sollte nur ein Anteil des Lipidextraktes aus der 50µl Plasmaprobe verwendet werden.

Dennoch dient die Methode der Lipidklassenseparation aus Plasma nicht dazu Lipidstoffwechselstörungen aufzudecken, sondern vielmehr zur Analyse ihrer Auswirkungen und Ursachen, durch Nachweis des lipidklasseninternen Fettsäuremusters. Oben gemachte Ausführungen sollen vielmehr die Notwendigkeit zur genauen Studie der vorliegenden Plasmaprobe aufzeigen. Trotz beschriebener Limitierungen erlaubt die Methode doch einen weiten Bereich der Lipidkonzentrationen abzudecken, ohne jegliche Vorbearbeitung des Plasmas, ins Besondere ist dies durch das kleine Probenvolumen möglich. Für die Phospholipidbelastung der Säule vermag ich keine Limitierung anzugeben, die Kapazität war im getesteten Bereich unbegrenzt. Das Problem der Phospholipidbelastung liegt auch nicht in der Kapazität, sondern eher in

der Beeinflussung der Retention anderer Lipidklassen durch die Phospholipide und die vollständige Elution ihrer selbst.

Hohe Phospholipidkonzentration können bei Hyperlipoproteinämien, insbesondere der LDL vorkommen, da Phospholipide einen Anteil von 21% an ihrem Trockengewicht ausmachen [(S.:10; Kostner&März)Schwandt, Richter, Parhofer; Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, 2001]. Reicher an Phospholipiden sind die HDL, hier wird eher ein Mangel ihrer den Patienten zum Arzt führen, denn ein Mangel korreliert z.B. mit einem erhöhten KHK Risiko. In diesem Fall werden an die Separation also eher geringere Ansprüche als getestet gestellt. Bei Zweifeln an der vollständigen Elution der Phospholipide ist es möglich das Volumen der letzten Fraktion zu erhöhen, was nur geringen zusätzlichen Zeitaufwand bedeutet.

Die Separationen wurden mit bis zu 150% der Plasmanormalwerte aller Modellsubstanzen durchgeführt und gelangen wie im Ergebnis(4.3.2-4.3.4) zu sehen sauber, auch als lipidklasseninterne Standards hinzugefügt wurden.

Wiederfindungsraten der Modellsubstanzen als Anteil ihrer Einwaage möchte ich an dieser Stelle nicht diskutieren, da ihre Aussagekraft meiner Meinung von begrenztem Wert ist. Meine Ergebnisse zeigen zwar selbige vor und nach Separation, sowie mit und ohne Extraktion, dennoch schließen solche Raten Pipettierfehler von Modellsubstanz und Standard, unvollständige Derivatisierung etc. ein und sind so bei der begrenzten Anzahl der Versuche kaum von großer Bedeutung für die Qualität der Separation, solange sie sich im groben Bereich der aufgegebenen Menge befinden. Qualitativ kann eine Separation beurteilt werden, prüft man die Reinheit der einzelnen Fraktionen, d.h erscheinen die Lipidklassen und internen Standards überlappungsfrei, ferner ist die Säule vollständig substanzfrei. Treffen diese Parameter zu, ist die Trennung gelungen und die Qualität prozentual für jede Fraktion von der Gesamtwiederfindung anzugeben. Als Beispiel: 90% aller detektierten Triglyceride befinden sich in der zweiten Fraktion.

Weicht die Wiederfindung allerdings sehr stark von der aufgegebenen Menge des Modelllipids ab, liegt ein Fehler vor. In meiner Arbeit erfuhr ich eine unverhältnismäßig zu große Wiederfindung der Modellsubstanz der freien Fettsäuren beim Gebrauch von lipidklasseninternen Standard und nach Folch Extraktion. Da der Erfolg der Separation gesichert war, nämlich Undecansäure als interner Standard der freien Fettsäuren und Linolensäure als Modelllipid im wesentlichen nur in der zugeordneten Fraktion eluiert worden waren, konnte nur die Derivatisierung oder Extraktion Ursache dieses Fehlers, der sich als zu geringer Anteil Standard im Eluat entpuppte, sein. Separation mit lipidklasseninternen Standard ohne vorangegangene Extraktion, aber



selbstverständlich mit anschließender notwendiger Derivatisierung zeigten keine fehlerhaften Wiederfindungen. Das Problem schien also die Folch-Extraktion hervorzurufen, was eine kritische Betrachtung dieser und der parallel verwendeten Extraktion nach Hara&Radin[Hara A, Radin NS, 1978]. an dieser Stelle notwendig macht.

## 5.2 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion aus Plasma vor der Lipidklassenseparation ist unbedingt notwendig, denn, wie bereits ausgeführt, liegen die Lipide im Plasma in Lipoproteinen vor oder, wie die freien Fettsäuren, an Albumin gebunden. Die Lipidseparation erfolgt aber nach ihren physikochemischen Eigenschaften, z.B. auf Grund des apolaren, hydrophoben Charakters von Triglyceriden, diese liegen im inneren der hydrophilen Lipoproteine und müssen der Separation erst zugänglich gemacht werden, sie müssen extrahiert werden.

Die Folch-Extraktion hat sich in vielen Studien bewährt und bietet oft die Bezugswerte bei neu entwickelten Extraktionen, selten gelang es sie zu übertreffen. Kritik blieb so meist nur am gesundheitsschädlichen Chloroform, welches diese Methode nutzt [Hara&Radin, 1978], oder an der umständlichen Handhabung(siehe3.3.1). Nur Lepage und Roy äußerten [Lepage&Roy 1984, 1988] einen Verlust freier Fettsäuren bei der Folch-Extraktion im Gegensatz zu der von ihnen entwickelten, allerdings im Zusammenhang mit Dünnschichtchromatographie. Der Verlust der Fettsäuren schien in Lepage und Roys[Lepage&Roy 1984, 1988] Darstellung nicht mit der Kettenlänge der Fettsäuren zu korrelieren und ich konnte auch sonst keine Gesetzmäßigkeiten an den dargestellten Werten ableiten, die mir eine Korrektur meiner Ergebnisse zur Linolensäurewiederfindung erlaubt hätten; im Gegenteil auch ich musste sehr unterschiedliche Wiederfindungen des Undecansäurestandards feststellen.

Fraglich bleibt, warum derartiges bei der Fülle an Studien die Fettsäuren analysierten und sich der Folch-Extraktion bedienten, nie beschrieben worden war. Ohne jedoch diese Problem einer Gesetzmäßigkeit unterordnen zu können, kann ich die Folch-Extraktion zumindest im Zusammenhang der Lipidklassenseparation mit lipidklasseninternen Standard nicht empfehlen, auch bei sonstigen Analysen sollte die Wiederfindung der Fettsäuren kritisch betrachtet werden. Als Alternative bietet sich die Extraktion nach Hara&Radin[Hara A, Radin NS, 1978] an. Sie ist sehr einfach durchzuführen, für die meisten Belange genügt der Vorgang der Extraktion mit dem

Hexan/Isopropanol Gemisch und anschließende Filtration. Auf einen Waschvorgang kann verzichtet werden. So entstehen keine zwei Phasen, wie während der Folch-Extraktion. Zentrifugieren und das umständliche abpipettieren einer Phase entfallen. So bietet die Extraktion nach Hara&Radin eine Material und Zeitersparnis. Hara&Radin[Hara A, Radin NS, 1978]. entwickelten ihre Methode größtenteils um eine gesundheitsverträgliche Extraktion zu erreichen, denn viele Lösungsmittel, auch das von Folch et al.(1957) verwendete Chloroform haben sich im Tierversuch als kanzerogen dargestellt. Das Methanol der Folch-Extraktion schädigt zu dem das visuelle System. Zwar ist Hexan in hohen Konzentrationen ein Neurotoxin, aber eine schädigende Wirkung im Laborgebrauch unter dem Abzug nicht bekannt und kaum vorstellbar. Allerdings kommt es beim Gebrauch von Hexan als Extraktionsmittel zur Umwandlung einiger Fettsäuren in ihre trans-Form[Moreno et al.,2003], das ursprüngliche Fettsäuremuster wird also verändert, dies scheint aber nicht im größeren Maße zu geschehen. Im Vergleich beider Extraktionen stellen Hara&Radin einen größeren Anteil von Proteolipiden im Folch Extrakt fest, während ihrer gänzlich frei davon war, die Extraktionskraft beider Methoden erschien ihnen im untersuchten Mäusehirn gleich[alles Hara A, Radin NS, 1978]. Andere Quellen aber decken auf, dass eine Extraktion mit Hexan/Isopropanol eine weitaus stärkere Extraktionskraft im Bereich der Phospholipide hat[Eder K et al 1993], das ist auf ihre Löslichkeit im Isopropanol zurückzuführen [Jensen et al.,2003]. Man sollte sich also vor Extraktion und Separation aus Plasma über das Ziel der Analyse im Klaren sein. Will man zum Beispiel länger zurückliegendes diätetisches Verhalten oder die Aufnahme schädlicher Fettsäuren durch einen Patienten zurückverfolgen, bietet sich eine starke Extraktion der Phospholipide an. Wie im Ergebnisteil verdeutlicht, ist dann besonders gründliche Auswahl und Vorbereitung der Filter, die für die Extraktion mit Hexan/Isopropanol benötigt werden, wichtig. Denn Substanzen, die sich aus den Filtern lösen und bei der Separation in der Fraktion der Phospholipide eluieren, können bei der gaschromatographischen Analyse zu fatalen Fehleinschätzungen führen. Besteht der Anspruch der genaueren Phospholipidanalyse nicht, und möchte man trotzdem den Problemen und Gesundheitsrisiken der Folch-Extraktion aus dem Weg gehen, bietet die Literatur zahlreiche Alternativen: Basierend auf einer Methode von McFarlane, die Ether nutzt aber nur schlechte Extraktionsergebnisse lieferte[McFarlane 1942], sind viele Extraktionsmethoden entwickelt worden. Scanu et al.[Scanu A, 1966; Scanu A, Schiano N, 1954] nutzten Ethanol/Ether 3:1 und erzielten damit gute Ergebnisse bei der Lipidextraktion aus Lipoproteinen, aber auch aus

Gesamtserum [Scanu A, Schiano N, 1954]. Nachteile dieser Methode aber sind lange Extraktionszeiten, große Lösungsmittelmengen und niedrige Arbeitstemperatur. Cham und Knowles [Cham BE, Knowles BR, 1976] haben ebenfalls eine Methode zur Lipidextraktion aus Plasma entwickelt, die zudem die Plasmaproteine unbeschadet lässt, ein Ansatz der für bestimmte Studien relevant ist. Extraktionsmittel ist Butanol/Diisopropylether 4:6, der Zeitaufwand beträgt 30min. Albouz et al. [Albouz S et al. ,1979] arbeiteten mit dieser Methode, die sie leicht modifizierten und bestätigten eine mit der Folch-Extraktion vergleichbare Extraktionskraft im Plasma. Neuere Methoden bedienen sich Mikrowellenstrahlung zur Lipidextraktion und wurden bereits kritisch betrachtet[Carrapiso AI, Garcia C, 2000; Moreno et al. ,2003]. Besonders in Kombination mit herkömmlichen Extraktionsmitteln scheinen diese Methoden exzellente Extraktionsergebnisse zu bieten[Moreno et al. ,2003]. Die Entscheidung für eine dieser Methoden liegt bei jedem selbst und sollte von der Fragestellung der Versuche, persönlichen Kenntnissen und Erfahrungen abhängen. Gründliche Vorversuche mit Modellsubstanzen scheinen mir unumgänglich, besonders im Hinblick auf mögliche Störpeaks der Lösungsmittel im Gaschromatogramm.

Ebenso wie die Lipidextraktion stellt auch die Derivatisierung, also die Umesterung der Fettsäuren der Lipidklassen in ihre Methylester, einen unumgänglichen Zwischenschritt der gaschromatographischen Fettsäureanalyse der Lipidklassen nach Festphasenseparation aus Plasma da. Wenn auch nur ein Zwischenschritt und völlig unabhängig von der Methode der Lipidklassenseparation, stellt die Derivatisierung doch mit den wichtigsten Schritt des Versuches da, denn nur eine vollständige Umesterung der Lipide ohne Probenverlust kann die begehrten Werte liefern. Jeder Fehler in der Derivatisierung macht eine quantitative Aussage des Fettsäuremusters in der gaschromatographischen Analyse unmöglich( näheres dazu auch im Ergebnisteil(4.5) und in "Prinzip der Lipidderivatisierung"(2.8)). Die Derivatisierung stellt also höchste Ansprüche an die Methode, den Durchführenden und das Material. Das Literaturstudium offenbart auch hier zahlreiche und unterschiedlichste Methoden zur Lipidumesterung in Methylester, z.T. bieten diese Methoden sogar parallel eine Extraktion der Lipide, wie die von mir verwendete Modifikation der Methode nach Lepage und Roy[Lepage und Roy,1986]. Notwendig ist für die Umesterung nach Separation der Lipidklassen nur eine schnelle, vollständige und möglichst einfache Methode zur Umesterung aller Klassen, da die Lipide bereits zuvor extrahiert worden; ferner sollte sie auch in Anwesenheit von Kieselgel

funktionieren. Das nächste Kapitel wird solche Methoden vorstellen, im Vergleich zu eigenen Ergebnissen der Umesterung.

### 5.3 Lipidderivatisierung

In den Ergebnissen schilderte ich bereits, dass die von mir genutzt Umesterungsmethode keine vollständige Umesterung der Lipide, nämlich der Triglyceride gewährleistet.

Die Methode stellt eine Modifikation einer kombinierten Extraktion und Umesterungsmethode nach Lepage und Roy da [Lepage und Roy,1986]. Lepage und Roy nutzten Benzen, um die Lipide natürlicher Lipidsuspensionen in Lösung zu halten und sie der chemischen Reaktion, nämlich der säurekatalysierten Umesterung mit Methanol, zugänglich zu machen. Aus gesundheitlichen Gründen wurde in der Modifikation der Methode das Benzen durch Toluol ersetzt, alsdann kam es nur noch zur ungenügenden Umesterung der Triglyceride. Weil Lepage und Roy nicht von solcher Problematik berichteten und weil ich selbst erfolglose Versuche unternommen habe bestimmte Triglyceride(z.B. Trtricosanoin) in Toluol zu lösen, bin ich zu dem Entschluss gekommen, dass die Ursache der unvollständigen Umesterung der Triglyceride in ihrer verminderten Löslichkeit in Toluol gegenüber Benzen liegt. Da ich die Gesundheitsrisiken durch den Gebrauch von Benzen nicht eingehen wollte, blieb mir nur die Möglichkeit nach einem anderen Lösungsmittel oder einer anderen Methode zu suchen. Aus Zeitgründen konnte ich keine eigenen Untersuchungen durchführen, kann aber an dieser Stelle einige bekannte Methoden vorstellen und Alternativen diskutieren. Die Methoden lassen sich wie in Kapitel "Prinzip der Lipidderivatisierung"(2.8) beschrieben in Säuren- und Basenkatalysierte einteilen, ferner in solche die einen Zwischenschritt der Verseifung benötigen und solche der direkten Umesterung. Methoden, die einen Zwischenschritt der Verseifung benötigen, möchte ich nicht näher beschreiben, denn Einschrittmethoden sind in der Regel einfacher und schneller [Eder K,1995]. Ebenso habe ich nur Methoden ausgewählt, die auf den Gebrauch von Benzen verzichten, um keine weiteren gesundheitlichen Einschränkungen hinzunehmen.

1977 haben Shimasaki et al.[Shimasaki et al. ,1977] bereits eine Einschrittmethode zur Extraktion und Umesterung von Lipiden zu ihren Methylestern für Säugergewebe entwickelt und diese auch an Plasma untersucht. Qualitativ zeigte ihre Methode keine Einschränkungen, verlangte aber mehr als eine Reaktionslösung. Das Gewebe wurde zunächst mit

Dimethoxypropan(DMP) 20min. entwässert, was eine bessere Umesterung der apolaren Lipide gewährleisten sollte. Erst nach Abdampfen des DMP wurde die eigentliche Umesterung mit einem Gemisch von HCl und Methanol bei 85°C in einer Stunde durchgeführt. Nachteil dieser Methode ist die zeitlich aufwendige und umständliche vorangegangene Entwässerung. 1993 aber gelang es Garcés und Manchas eine ähnliche Methode ohne den störenden Zwischenschritt zu entwickeln[Garcés R, Mancha M, 1993], allerdings nutzten sie ihre Methode nur für pflanzliches Gewebe und Samen. Sie untersuchten Extraktionskraft und Umesterungsvermögen unterschiedlichster Reaktionsgemische, allen gemeinsam war der Inhalt von Methanol, Heptan, 2,2-dimethoxypropan und Schwefelsäure. Dieser Grundmischung wurde entweder Benzen, Toluol oder Tetrahydrofuran zugegeben, um die Lipide in Lösung zu halten. Gleich welche Mischung angewandt wurde, es zeigte sich kein Unterschied im Ergebnis. DMP war auch hier wieder notwendig, um das wässrige Pflanzengewebe zu dehydrieren und so eine Umesterung der wasserunlöslichen Lipide zu ermöglichen. Eine zweite und für mich besonders interessante Aufgabe des DMP ist die Reaktion mit dem Glycerol der Glycerolipide, z.B. Triglyceride, welche eine vollständige Umesterung dieser gewährleisten. Vielleicht ist dies die Lösung des oben geschilderten Problems. Wenn auch diese Methode für Pflanzen entwickelt wurde, vermag eine Modifikation womöglich die vollständige Umesterung von Plasmalipiden zu leisten, denn neben den Vorzügen des DMP ist die Reaktionsdauer von 1h und Temperatur von 80°C genau in dem für meine Ansprüche vertretbaren Bereich. Zu letzt möchte ich noch einen ganz anderen Ansatz von Segura [Segura R, 1988] vorstellen. Bei seiner Methode ist die Lipidextraktion nicht eingeschlossen, was für die Umesterung nach Lipidklassenseparation auch nicht von Belang ist. Die Umesterung findet hier in einer Lösung aus Aluminiumchlorid und Methanol statt, die entstehenden Ester müssen aber mit Petroleum extrahiert werden, welches schließlich vor der gaschromatographischen Analyse wieder abgedampft werden muss. Auch direkte Umesterung ohne vorangegangene Extraktion von Humanplasma wurde versucht. Die Reaktionsdauer unterscheidet sich nicht von den oben genannten Methoden, der Zeitaufwand im Gesamten dürfte aber durch das Abdampfen vor der Analyse größer sein. Gleich welche Methode man nutzt, es muss immer darauf geachtet werden, dass die verwendeten Chemikalien nicht als Peaks im Chromatogramm mit den Methylestern der Fettsäuren interferieren, die Reaktion muss genau durchdacht und analysiert werden. Es kann vorkommen, dass sich während der Derivatisierung Ethylester der Fettsäuren bilden, wenn in vorausgegangenen Arbeitsschritten Chloroform,

welches durch Ethanol stabilisiert wurde, angewendet wurde [Johnsen et al. 1976]. Probleme wie diese müssen durch Derivatisierung von Leerproben und den verwendeten Chemikalien kontrollierbar gemacht werden.

#### **5.4 Plasmalipidklassenseparation**

Wie oben beschrieben, erlaubt meine Methode zur Lipidklassenseparation die Trennung der Plasmalipide in einem weiten Bereich ihrer Konzentrationen. Die Methode stellt sich als einfach zu Handhaben dar, der Lösungsmittelverbrauch konnte gering gehalten werden. Für die Separation selbst, Extraktion, Abdampfen der Lösungsmittel und Probenderivatisierung nicht eingeschlossen, ist ein Zeitaufkommen von 2,5 bis 3 Stunden von Nöten, ein recht langer Zeitraum im Vergleich zu Aminopropylsäulen, aber auch der größeren 500mg Kieselgelsäule [ Kaluzny et al. ,1985; Hamilton JG, Comai K, 1988] . Die Materialersparnis einer solch kleinen Säule erzwingt, egal ob reine Kieselgelsäule oder Aminopropylsäule, langsame Durchlaufzeiten, um die Retention der Lipide nicht zu gefährden. Die Licrolut-Vorrichtung erlaubt allerdings eine parallele Bearbeitung von 12 Proben, welches den Zeitaufwand relativiert und, neben der Methodik, die nur eine einzige Säule pro Probe benötigt, ein effizientes Arbeiten ermöglicht. Schon die oben genannten Vorteile der Kieselgelsäule ermöglichen diese Methode in Studien und klinischen Alltag zu nutzen.

## 5 Zusammenfassung

Störungen im menschlichen Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel oder der Lipidspeicherung stellen die Basis zahlreicher Erkrankungen da, von denen viele zur Atherosklerose führen. Sie zu Verstehen, Diagnostizieren und Behandeln erfordert auch einen genauen Einblick in die Fettsäurezusammensetzung der Lipidklassen im Plasma und verlangt eine schnelle und effiziente Methode ihrer Identifikation und Quantifizierung. Bisherige Methoden zur Separation der Lipidklassen, z.B. die Säulenchromatographie, erforderten großen Material-, Lösungsmittel- oder Zeitaufwand, oder riskierten wie die Dünnschichtchromatographie eine Oxidation der Lipide.

Die entwickelte Methode auf 100mg Kieselgelsäulen bietet günstige, lösungsmittelarme und schnelle Separation der extrahierten Lipide in die vier Gruppen Cholesterinester, Triglygeride, freie Fettsäuren und Phospholipide. Sie ist einfach durchzuführen und steht trotz geringen Lösungsmittelverbrauch bisherigen Methoden nicht nach. Sie erweist sich im Gegensatz zur häufigen Problematik der Säulenchromatographie als gut reproduzierbar. Die Idee eines lipidklasseninternen Mehrfachstandards, der jede beteiligte Lipidklasse enthält und an Extraktion, Separation und letztendlich Derivatisierung (Umesterung der Fettsäuren der Lipide zu Methylestern zur gaschromatographischen Analyse) teilnimmt, bietet im Chromatogramm eine Qualitätssicherung aller Schritte. Dieser Standard ermöglicht in der Theorie auch eine schnelle Quantifizierung der Fettsäuren des separierten Lipidgemisches, denn eventuelle Teilverluste der Probe, z.B. bei der Extraktion, betreffen den Standard gleichermaßen, so dass das Verhältnis Standard:Probe nicht verändert wird und die Quantifizierung ohne lästige Umrechnung immer exakt erfolgen kann. Leider zeigte sich diese Möglichkeit in der Praxis nicht, dennoch konnte der Fehler als Problem der Derivatisierung eingegrenzt werden.

Die Arbeit bietet den Vergleich zweier Extraktionsmethoden, zeigt ihre unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten und Fehlerquellen auf.

Zusammenfassend zeigt sich die Lipidklassenseparation auf 100mg Kieselgelsäulen als reproduzierbar und schnell. Im Zusammenhang mit einem lipidklasseninternen Standard könnte, durch die einfache Quantifizierung der Fettsäuren in der Analyse mit gleichzeitiger Qualitätssicherung, diese einfache Methode einen hohen Probendurchsatz gewährleisten.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintrisphosphat
BHT	2,6-di-tert-butyl-p-cresol
C	Cholesterin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CE	Cholesterinester
DAG	1,2 Diacylglycerin
DMP	Dimethoxypropan
FAME	Fettsäuremethylester
FFA	free fatty acids(Freie Fettsäuren)
HDL	High Density Lipoprotein(Lipoprotein hoher Dichte)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IDL	Intermediate Density Lipoprotein(Lipoprotein mittlerer Dichte)
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein(Lipoprotein geringer Dichte)
MTBE	tert-butyl-methylether
NaCl	Natriumchlorid
PL	Phospholipide
TG	Triglyceride
VLDL	Very Low Density Lipoprotein(Lipoprotein sehr niedriger Dichte)



## 8 Anhang

Durchbruch der Triglyceride					
	FRAKTIONEN				
	1	2	3	4	5
<b>OLEAT<math>\mu</math>g/ml</b>	je 2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3				
Mittelwerte zweier Messungen					
SÄULE A	0,696	19,208	120,584	205,141	262,551
SÄULE B	0,665	25,054	118,131	154,248	253,857
SÄULE C	1,436	22,913	116,378	191,355	261,342
MITTELWERT(A,B,C)	0,932	22,392	118,364	183,581	259,250
MITTELWERT(A,B,C)					
Triolein in $\mu$ g	1,855	44,577	235,637	365,470	516,109
% eluiert *	0,359	8,651	45,664	70,705	100,000
Standardabw.%	0,135	1,046	0,839	7,312	0,000
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen					
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen.					

Kapazität der Triglyceride bei Phospholipidbelastung						
	FRAKTIONEN					
	1	2	3	4	5	6
<b>OLEAT<math>\mu</math>g/ml</b>	0,25mg/ml Triolein + 0,125mg PL in 2ml Hexan/MTBE 200:3	2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3	2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3	2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3	2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3	2ml 0,25mg/ml Triolein in Hexan/MTBE 200:3
Mittelwerte zweier Messungen						
SÄULE A	0,000	64,449	140,023	197,465	227,158	270,350
SÄULE B	0,000	64,400	140,000	197,500	227,200	270,400
SÄULE C	9,989	72,621	112,511	192,452	224,339	270,439
MITTELWERT(A,B,C)	3,330	67,156	130,845	195,806	226,232	270,396
MITTELWERT(A,B,C)						
Triolein in $\mu$ g	6,628	133,686	260,468	389,783	450,353	538,269
% eluiert *	1,231	25,849	47,634	74,611	84,041	100,000
Standardabw.%	1,741	1,422	4,366	3,630	0,895	0,000
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen						
PL= Dipalmitoylphosphatidylcholin						
Palmitat aus dem Phospholipid war nicht detektierbar						
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen						

Elutionsprofil der Cholesterinester						
	FRAKTIONEN					
	1	2	3	4	5	6
<b>OLEATµg/ml</b>	2ml 0,252mg/ml Cholesterin- oleat in Hexan/MTBE 200:3	2ml Hexan/MTBE 200:3	2ml Hexan/MTBE 200:3	2ml Hexan/MTBE 200:3	2ml Hexan/MTBE 200:3	2ml Hexan/MTBE 200:3
Mittelwerte zweier Messungen						
SÄULE A	92,485	13,980	2,075	0,000	0,000	0,000
SÄULE B	V	31,552	1,349	0,193	0,000	0,000
SÄULE C	81,233	32,210	1,171	0,203	0,000	0,000
MITTELWERT(A,B,C)	86,859	25,914	1,531	0,132	0,000	0,000
MITTELWERT(A,B,C)						
Cholesterinoleat in µg	391,038	127,408	6,894	0,902	0,000	0,000
% eluiert *	74,308	24,211	1,310	0,171	0,000	0,000
Standardabw.%	7,229	7,235	0,383	0,002	0,000	0,000
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen						
V= Verlust der Probe						
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen						

Elutionsverhalten der Cholesterinester bei Phospholipidbelastung						
	FRAKTIONEN					
	1	2	3	4	5	6
<b>OLEATµg/ml</b>	0,5mg Cholesterin- oleat + 0,125mgPL in 2ml Hexan/MTB E 200:3	2ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 200:4
Mittelwerte zweier Messungen						
SÄULE A	70,269	33,226	0,000	0,000	0,000	0,000
SÄULE B	74,178	29,562	0,000	1,489	0,000	0,000
SÄULE C	81,538	30,261	0,000	0,000	0,000	0,000
MITTELWERT(A,B,C)	75,328	31,016	0,000	0,496	0,000	0,000
Standardabw.	4,672	1,588	0,000	0,702	0,000	0,000
MITTELWERT(A,B,C)						
Cholesterinoleat in µg	338,975	139,571	0,000	6,701	0,000	0,000
% eluiert *	69,856	28,763	0,000	1,381	0,000	0,000
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen						
PL= Dipalmitoylphosphatidylcholin						

<b>Elutionsprofil freier Fettsäuren</b>					
<b>SÄULE 1</b>					
FRAKTION					
	1	2	3	4	5
	Probenaufgabe(300 µg Linolensäure in 1ml Hexan/MTBE 200:3)*3x Elution mit 1ml Hex/MTBE 200:3	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig
Linolenat µg/ml		100:2:0,2	100:2:0,2	100:2:0,3	100:2:0,4
MESSWERT1	0,147	0,154	0,168	82,684	210,109
MESSWERT2	0,144	0,470	0,167	82,444	210,512
MITTELWERT	0,146	0,312	0,168	82,564	210,311
%	0,198	0,106	0,057	28,089	71,550
Linolenat µg/ml	0,1385	0,2970	0,1595	78,6009	200,2156
<b>SÄULE 2</b>					
FRAKTION					
	1	2	3	4	5
	Probenaufgabe(300 µg Linolensäure in 1ml Hexan/MTBE 200:3)*3x Elution mit 1ml Hex/MTBE 200:3	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig
Linolenat µg/ml		100:2:0,2	100:2:0,2	100:2:0,3	100:2:0,4
MESSWERT1	0,122	0,119	0,263	11,894	262,116
MESSWERT2	0,121	0,128	0,262	11,932	262,312
MITTELWERT	0,122	0,124	0,263	11,913	262,214
%	0,177	0,045	0,095	4,332	95,351
Linolenat µg/ml	0,1157	0,1176	0,2499	11,3412	249,6277
<b>SÄULE 3</b>					
FRAKTION					
	1	2	3	4	5
	Probenaufgabe(300 µg Linolensäure in 1ml Hexan/MTBE 200:3)*3x Elution mit 1ml Hex/MTBE 200:3	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig	Elution 1ml Hex/MTBE/Eisessig
Linolenat µg/ml		100:2:0,2	100:2:0,2	100:2:0,3	100:2:0,4
MESSWERT1	0,243	0,179	0,199	9,510	267,104
MESSWERT2	0,249	0,183	0,196	9,535	267,139
MITTELWERT	0,246	0,181	0,198	9,523	267,122
%	0,354	0,065	0,071	3,425	96,085
Linolenat µg/ml	0,2342	0,1723	0,1880	9,0654	254,2997
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen					

Kapazität der Phospholipide						
	FRAKTIONEN					
	1	2	3	4	5	6
<b>PALMITAT</b> µg/ml	je 2 ml 0,25mg/ml Dipalmitoylphosphatidylcholin in Hexan/MTBE 200:3, 300µl/ml					
Mittelwerte zweier Messungen	Hexan/Isopropanol 3:1					
SÄULE A	0,255	0,602	0,560	0,584	0,627	0,693
SÄULE B	0,481	0,558	0,557	0,594	0,693	0,598
SÄULE C	0,520	0,554	0,587	0,552	V	0,678
MITTELWERT(A,B,C)	0,418	0,571	0,568	0,576	0,660	0,656
MITTELWERT(A,B,C) Dipalmitoylphosphatidylcholin in µg	1,135	0,775	0,770	0,782	0,895	0,890
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen						
V= Probenverlust						
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen.						

Separation von Cholesterinestern und Triglyceriden unter Einfluss von Phospholipiden									
	FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>LINOLAT</b> µg/ml	187,5µg	1ml	1ml	1ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
CE, 150µg	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/
PL, 150µg	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE
TG in 1ml	200:3	200:3	200:3	200:3	96:4	96:5	96:6	96:7	96:7
Mittelwerte zweier Messungen	Hexan/MTBE 200:3								
SÄULE A	37,090	40,660	3,430	0,805	0,300	0,420	0,743	0,511	
SÄULE B	41,301	V	3,614	0,618	0,952	0,298	V	0,000	
SÄULE C	38,186	47,766	7,245	1,660	0,428	0,000	0,769	0,471	
MITTELWERT(A,B,C)	38,859	44,213	4,763	1,027	0,560	0,239	0,756	0,327	
% eluiert *	41,026	47,982	5,685	1,188	0,784	0,978	1,647	1,074	
Standardabw.%	2,137	0,665	1,693	0,377	0,087	0,000	0,081	0,115	
	FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>OLEAT</b> µg/ml	187,5µg	1ml	1ml	1ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
CE, 150µg	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/	Hexan/
PL, 150µg	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE	MTBE
TG in 1ml	200:3	200:3	200:3	200:3	96:4	96:5	96:6	96:7	96:7
Mittelwerte zweier Messungen	Hexan/MTBE 200:3								
SÄULE A	0,745	0,971	0,834	0,798	65,409	0,525	0,521	1,926	
SÄULE B	0,809	V	0,871	0,979	65,480	0,371	V	0,300	
SÄULE C	2,536	1,177	0,999	0,860	67,750	0,766	0,533	2,086	
MITTELWERT(A,B,C)	1,363	1,074	0,901	0,879	66,213	0,554	0,527	1,437	
% eluiert *	1,127	0,745	0,636	0,575	92,512	0,893	0,732	2,785	
Standardabw.%	0,596	0,052	0,040	0,006	0,858	0,143	0,011	0,036	
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen									
TG= Triolein									
CE= Cholesterinlinolat									
PL= Dipalmitoylphosphatidylcholin									
Palmitat aus dem Phospholipid nur in Spuren detektierbar									
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen.									

Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden und freien Fettsäuren unter Einfluss von Phospholipiden und Cholesterin								
FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>LINOLAT</b> µg/ml aus <b>Cholesterinlinolat</b> Mittelwerte zweier Messungen	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4
SÄULE A	33,083	44,886	3,972	0,219	2,023	0,239	0,216	0,062
SÄULE B	41,947	39,602	3,067	0,682	2,262	0,401	0,172	0,081
SÄULE C	37,874	44,208	4,299	1,459	1,870	1,026	0,063	0,086
MITTELWERT(A,B,C)	37,634	42,899	3,779	0,786	2,052	0,555	0,150	0,076
% eluiert *Ch.linolat	41,456	47,368	4,169	0,851	4,532	1,204	0,336	0,168
Standardabw.%	3,369	3,323	0,568	0,536	0,410	0,706	0,150	0,017
FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>OLEAT</b> µg/ml aus <b>Triolein</b> Mittelwerte zweier Messungen	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4
SÄULE A	0,520	0,726	0,687	0,160	64,036	0,205	0,068	0,181
SÄULE B	0,191	0,201	0,292	1,726	69,948	0,719	0,059	0,232
SÄULE C	2,044	2,090	7,245	8,664	60,615	0,801	0,052	0,278
MITTELWERT(A,B,C)	0,918	1,006	2,741	3,516	64,866	0,575	0,060	0,230
% eluiert *Triolein	0,651	0,716	1,925	2,451	93,035	0,808	0,086	0,328
Standardabw.%	0,557	0,550	2,212	2,572	6,071	0,354	0,014	0,046
FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>LINOLENAT</b> µg/ml Mittelwerte zweier Messungen	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	1ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4	2ml Hexan/ MTBE 96:4
SÄULE A	0,642	0,830	0,145	0,125	0,161	0,133	1,127	3,859
SÄULE B	1,479	1,470	0,146	0,161	0,138	0,142	0,725	4,654
SÄULE C	1,226	1,400	0,190	0,259	0,226	0,461	1,607	3,922
MITTELWERT(A,B,C)	1,115	1,233	0,160	0,181	0,175	0,245	1,153	4,145
% eluiert *Linolenat	7,790	8,656	1,138	1,265	2,478	3,360	16,367	59,295
Standardabw.%	2,053	1,426	0,091	0,289	0,418	1,831	4,580	6,192
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen								
TG= Triolein								
CE= Cholesterinlinolat								
PL= Dipalmitoylphosphatidylcholin								
FFA= Linolenat								
C= Cholesterin								
Palmitat aus dem Phospholipid nur in Spuren detektiert								
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen.								

Fraktionen der freien Fettsäuren					
% eluiert	FRAKTIONEN				
	4	5	6	7	8
	1ml Hexan / /HAc 100:0,2	2ml Hexan / MTBE/ HAc 100:2:0,2	2ml Hexan / MTBE/ HAc 100:2:0,2	2ml Hexan / MTBE/ HAc 100:2:0,2	2ml Hexan / MTBE/ HAc 100:2:0,2
Dipalmitoyl- phosphatidyl- cholin	1,26	1,58	4,92	4,04	4,16
Linolenat	0,98	19,59	61,33	2,06	1,30
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen					

Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden unter Einfluss von									
Cholesterin									
	FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>LINOLAT</b> µg/ml <b>aus</b> <b>Cholesterinlinolat</b>	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	1ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/ Ammoniumacce tat 5:8:2
Mittelwerte zweier Messungen									
SÄULE A	21,252	0,000	0,498	0,000	0,370	0,411	0,457	0,146	0,109
SÄULE B	24,412	0,000	1,010	0,000	0,583	1,016	0,656	0,479	0,785
SÄULE C	24,396	0,000	0,848	0,000	0,589	1,016	0,556	1,050	0,132
MITTELWERT(A,B,C)	23,353	0,000	0,785	0,000	0,514	0,814	0,556	0,558	0,342
% eluiert *Ch.linolat	89,284	0,000	1,908	0,000	1,221	1,789	2,867	0,773	2,159
Standardabw.%	3,296	0,000	0,463	0,000	0,148	0,597	0,212	0,351	1,526
	FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>OLEAT</b> µg/ml <b>aus</b> <b>Triolein</b>	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	1ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/ Ammoniumacce tat 5:8:2
Mittelwerte zweier Messungen									
SÄULE A	0,000	0,000	50,340	0,000	0,000	0,021	0,295	0,000	0,000
SÄULE B	0,872	0,000	60,140	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,000
SÄULE C	0,797	0,000	61,286	0,000	0,000	0,571	0,013	1,534	0,000
MITTELWERT(A,B,C)	0,556	0,000	57,255	0,000	0,000	0,197	0,102	0,518	0,000
% eluiert *Triolein	1,064	0,000	98,320	0,000	0,000	0,020	0,578	0,035	0,000
Standardabw.%	1,064	0,000	0,483	0,000	0,000	0,020	0,578	0,000	0,000
	FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>LINOLENAT</b> µg/ml <b>Mittelwerte zweier</b>	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	1ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/ Ammoniumacce tat 5:8:2
Messungen									
SÄULE A	0,080	0,000	0,032	0,000	1,766	6,089	1,108	0,200	0,094
SÄULE B	0,088	0,000	0,033	0,000	0,257	8,814	0,737	0,224	0,112
SÄULE C	0,076	0,000	0,037	0,000	1,343	8,590	0,716	0,228	0,092
MITTELWERT(A,B,C)	0,081	0,000	0,034	0,000	1,122	7,831	0,853	0,217	0,099
% eluiert *Linolenat	1,156	0,000	0,298	0,000	9,476	68,202	17,043	1,944	1,881
Standardabw.%	0,027	0,000	0,006	0,000	7,172	10,808	3,838	0,064	0,118
	FRAKTIONEN								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>PALMITAT</b> µg/ml <b>aus Dipalmitoyl-</b> <b>phosphatidyl-</b> <b>cholin</b>	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	1ml Hexan/ MTBE 200:3	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	2ml MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/ Ammoniumacce tat 5:8:2
Mittelwerte zweier Messungen									
SÄULE A	0,391	0,000	0,320	0,000	0,561	1,630	0,909	0,475	13,923
SÄULE B	0,357	0,000	0,496	0,000	0,407	2,012	1,014	0,621	12,834
SÄULE C	0,407	0,000	0,540	0,000	0,542	1,715	0,789	0,447	4,882
MITTELWERT(A,B,C)	0,385	0,000	0,452	0,000	0,503	1,785	0,904	0,514	10,546
% eluiert *Triolein	1,723	0,000	1,261	0,000	1,484	5,619	5,926	1,691	82,296
Standardabw.%	0,039	0,000	0,299	0,000	0,203	0,714	0,456	0,262	1,488
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen									
TG= Triolein									
CE= Cholesterinlinolat									
PL= Dipalmitoylphosphatidylcholin									
FFA= Linolenat									
C= Cholesterin									
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen.									

<b>Separation von Cholesterinestern, Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden mit lipiddklasseninternen Standard unter Einfluss von Cholesterin</b>					
	FRAKTIONEN				
	1	2	3	4	5
<b>LINOLAT</b> µg/ml	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	6ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/Am moniumacce tat 5:8:2
<b>aus</b>					
<b>Cholesterinlinolat</b>					
Mittelwerte zweier Messungen					
SÄULE A	81,786	3,377	0,000	0,000	0,000
SÄULE B	86,547	9,149	0,000	0,000	0,000
MITTELWERT(A,B,C)	84,166	6,263	0,000	0,000	0,000
% eluiert *Ch.linolat	93,237	6,763	0,000	0,000	0,000
Standardabw.%	2,797	2,797	0,000	0,000	0,000
	FRAKTIONEN				
	1	2	3	4	5
<b>OLEAT</b> µg/ml	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	6ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/Am moniumacce tat 5:8:2
<b>aus</b>					
<b>Triolein</b>					
Mittelwerte zweier Messungen					
SÄULE A	2,688	108,503	0,000	0,000	0,000
SÄULE B	4,571	108,085	0,000	0,000	0,000
MITTELWERT(A,B,C)	3,629	108,294	0,000	0,000	0,000
% eluiert *Triolein	3,237	96,763	0,000	0,000	0,000
Standardabw.%	0,820	0,820	0,000	0,000	0,000
	FRAKTIONEN				
	1	2	3	4	5
<b>LINOLENAT</b> µg/ml	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	6ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/Am moniumacce tat 5:8:2
Mittelwerte zweier Messungen					
SÄULE A	0,000	0,000	0,000	25,057	2,514
SÄULE B	0,000	0,000	0,000	25,032	5,497
MITTELWERT(A,B,C)	0,000	0,000	0,000	25,044	4,005
% eluiert *Linolenat	0,000	0,000	0,000	86,439	13,561
Standardabw.%	0,000	0,000	0,000	4,445	4,445
	FRAKTIONEN				
	1	2	3	4	5
<b>PALMITAT</b> µg/ml	187,5µg CE, 150µg PL, 150µg TG, 22,5µgFFA, 45µg C in 1ml Hexan/ MTBE	2ml Hexan/ MTBE 96:4	1ml Hexan /Hac 100:0,2	6ml Hexan / MTBE/ Hac 100:2:0,2	4ml MTBE/ Methanol/Am moniumacce tat 5:8:2
<b>aus Dipalmitoyl- phosphatidyl- cholin</b>					
Mittelwerte zweier Messungen					
SÄULE A	0,000	0,000	0,000	6,535	120,061
SÄULE B	0,000	0,000	0,000	6,312	114,201
MITTELWERT(A,B,C)	0,000	0,000	0,000	6,424	117,131
% eluiert *Triolein	0,000	0,000	0,000	5,200	94,800
Standardabw.%	0,000	0,000	0,000	0,038	0,038
* Anteil in Prozent der Menge im Gesamteluat aller Fraktionen					
TG= Triolein					
CE= Cholesterinlinolat					
PL= Dipalmitoylphosphatidylcholin					
FFA= Linolenat					
C= Cholesterin					
Standardabweichung vergleicht die prozentualen Elutionsergebnisse jeder Säule mit den anderen					
Zur Bestätigung dieser Ergebnisse ist ein vergleichbarer Versuch (mit vorangegangenen Extraktionen) noch zwei Mal durchgeführt worden					



## 9 Literaturverzeichnis

Agren JJ, Julkunen A, Penttila I.

Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column.

J Lipid Res. 1992 Dec; 33(12):1871-6

Albouz S, Galli J, Bourdon R, Baumann N.

[Extraction of plasma lipids preserving antigenic properties of proteins and allowing quantitation of gangliosides by neuraminic acid determination (author's transl)]

Ann Biol Clin (Paris). 1979; 37(5):287-90.

Arab L, Akbar J.

Biomarkers and the measurement of fatty acids.

Public Health Nutr 2002 Dec; 5(6A):865-71

Ariga T, Jarvis WD, Yu RK.

Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases.

J. Lipid Res. 1998; 39:1-16

Burdge GC, Wright P, Jones AE, Wootton SA.

A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction.

Br J Nutr. 2000 Nov; 84(5):781-7.

Camus MC, Aubert R, Bourgesis F, Herzog J, Alexiu A, Lemonnier D.

Serum lipoprotein and apolipoprotein profiles of the obese ob/ob mouse.

Biochim Biophys Acta. 1988 Jul 1; 961(1):53-64

Carrapiso AI, Garcia C.

Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification.

Lipids. 2000 Nov; 35(11):1167-77.



Cham BE, Knowles BR.

A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation.

J Lipid Res. 1976 Mar; 17(2): 176-81.

Christie WW.

Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light scattering) detection.

J Lipid Res. 1985 Apr; 26(4): 507-12.

Christie WW.

Solid-phase extraction columns in lipid analysis

Lipid Technology. 1991; 3: 31-33

Christie WW.

Solid-phase extraction columns in the analysis of lipids

Advances in Lipid Methodology-One. 1992; 1-17

van Doormaal JJ, Muskiet FA, van Ballegooie E, Sluiter WJ, Dooren H.

The Plasma and erythrocyte fatty acid composition of poorly controlled, insulin-dependent (type I) diabetic patients and the effect of improved control.

Clin Chim Acta. 1984 Dec 29; 144(2-3): 203-12.

Duncan IW, Culbreth PH, Burtis CA.

Determination of free, total, and esterified cholesterol by high performance liquid chromatography.

J Chromatogr. 1979 Mar 1; 162(3): 281-92.

Eder K.

Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters.

J Chromatogr B. 1995; 671: 113-131

Eder K, Reichlmayr-Lais AM, Kirchgessner M.

Studies on the extraction of phospholipids from erythrocyte membranes in the rat.

Clin Chim Acta. 1993 Oct 15; 219(1-2): 93-104.

Egberts J, Bulskool R.

Isolation of the acidic phospholipid phosphatidylglycerol from pulmonary surfactant by sorbent extraction chromatography.

Clin Chem. 1988 Jan; 34(1) 163-4

Folch J, Lees M, Sloane-Stanly GH.

J Biol. Chem. 1957; 226: 497

Garces R, Mancha M.

One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues.

Anal Biochem. 1993 May 15; 211(1): 139-43.

Gomez-Munoz A.

Modulation of cell signalling by ceramides.

Biochim. Biophys. Acta. 1998; 1391: 92-109

Gomo Z.

Fatty acid profil in familial hypercholesterolaemia.

Cent Afr J Med. 1993 Nov; 39(11): 228-31.

Hamilton JG, Comai K.

Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica Sep-Pak columns.

Lipids. 1988 Dec; 23(12): 1146-9.

Hannun YA .

Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress.

Science. 1996; 274: 1855-1859

Hannun YA.

The role of ceramide in cell signalling.

Biochim. Biophys. Acta. 1998; 1436: 233-243

Hara A, Radin NS.

Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent.

Anal Biochem. 1978 Oct 1; 90(1): 420-6.

Horrobin DF, Jenkins K, Benett CN, Christie WW.  
Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid: collaboration and not antagonism is the key to biological understanding.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2002 Jan;66(1):83-90.

Hoving EB, Jansen G, Volmer M, van Doormaal JJ, Muskiet FAJ.  
Profiling of plasma cholesterol ester and triglyceride fatty acids as their methyl esters by capillary gas chromatography, preceded by a rapid aminopropyl-silica column chromatographic separation of lipid classes.  
J Chromatogr. 1988; 434: 395-409

Igarashi Y.  
Functional roles of sphingosine, sphingosine-1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signalling pathways.  
J. Biochem.1997; 122:1080-1087

Jensen S, Haggberg L, Jorundsdottir H, Odham G.  
A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents.  
J Agric Food Chem. 2003 Sep 10;51(19):5607-11.

Johnson AR, Fogerty AC, Hood RL, Kozuharov S, Ford GL.  
Gas-liquid chromatography of ethyl ester artifacts formed during the preparation of fatty acid methyl esters.  
J Lipid Res. 1976 Jul;17(4):431-2.

Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE.  
Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns.  
J Lipid Res. 1985 Jan;26(1):135-40.

Kim HY, Salem N Jr.  
Separation of lipid classes by solid phase extraction.  
J Lipid Res. 1990 Dec;31(12):2285-9.  
Erratum in: J Lipid Res 1993 Jan;34(1):166.

Kris-Etherton P, Daniels SR, Eckel RH, Engler M, Howard BV, Krauss RM, Lichtenstein AH, Sacks F, St Jeor S, Stampfer M, Eckel RH, Grundy SM, Appel LJ, Byers T, Campos H, Cooney G, Denke MA, Howard BV, Kennedy E, Krauss

RM, Kris-Etherton P, Lichtenstein AH, Marckmann P, Pearson TA, Riccardi G, Rudel LL, Rudrum M, Sacks F, Stein DT, Tracy RP, Ursin V, Vogel RA, Zock PL, Bazzarre TL, Clark J.

Summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health: conference summary from the nutrition committee of the American Heart Association.

Circulation. 2001 Feb 20; 103(7):1034-9.

Kongress

Kuksis A, Myher JJ, Geher K, Beckenridge WC, Feather T, McGuire V, Little JA. Gas chromatographic profiles of plasma total lipids as indicators of dietary history. Correlation with carbohydrate and alcohol intake based on 24-h dietary recall.

J Chromatogr. 1992 Aug 7; 579(1):13-24

Lepage G, Levy E, Roneo N, Smith L, Galeano N, Roy CC

Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis.

J Lipid Res. 1989 Oct; 30(10):1483-90

Lepage G, Roy CC.

Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification.

J Lipid Res. 1984 Dec 1; 25(12):1391-6.

Lepage G, Roy CC.

Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction.

J Lipid Res. 1986 Jan; 27(1):114-20.

Lepage G, Roy CC.

Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction.

J Lipid Res. 1988 Feb; 29(2):227-35.

McFarlane AS

Behaviour of Lipoids in human serum.

Nature.1942; 149: 439.

Moreno AO, Dorantes L, Galindez J, Guzman RI.  
Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil.  
J Agric Food Chem. 2003 Apr 9;51(8):2216-21.

Nara C.  
A study on the fatty acid composition of the plasma lipoprotein in patients with fractures.  
Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. 1984 Jun; 58(6): 591-605

Prased MR, Jones RM, Young HS, Kaplinsky LB, Das DK.  
Analysis of tissue free fatty acids isolated by aminopropyl bonded phase columns.  
J Chromatogr. 1988 Jul 15; 428(2) 221-8

Riboni L, Viani P, Bassi R, Prinetti A, Tettamanti G.  
The role of sphingolipids in the process of signal transduction.  
Prog. Lipid Res.1997; 36:153-195

Ruiz-Gutierrez V, Perez-Camino MC.  
Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds.  
J Chromatogr. A 2000 Jul 14;885(1-2):321-41

Scanu A .  
Forms of human serum high densitylipoprotein protein.  
J . Lipid Res.1966; 7: 295-306.

Scanu A, N Schiano.  
Su di una nuova metodica di estrazione continua a freddo con etere dei lipidi del siero. Applicazione allo studio dei complessi lipoproteici.  
Riv. Zst. Sueriter, Ztal.1954 29: 276-302.

Scanu, A., and N. Schiano.  
Su di una nuova metodica di estruzione continua a freddo con etere dei lipidi del siero. Applicazione allo studio dei complessi lipoproteici.  
Riv. Ist. Sieroter, Ztal. 1954,29: 457-471.

Schmitz G, Assmann G, Bowyer DE.

A quantitative densitometric method for the rapid separation and quantitation of the major tissue and lipoprotein lipids by high-performance thin-layer chromatography. I. Sample preparation, chromatography, and densitometry. *J Chromatogr.* 1984 Apr 13;307(1):65-79.

Segura R.

Preparation of fatty acid methyl esters by direct transesterification of lipids with aluminium chloride-methanol. *J Chromatogr.* 1988;441:99-113.

Shimasaki H, Phillips FC, Privett OS.

Direct transesterification of lipids in mammalian tissue for fatty acid analysis via dehydration with 2,2'-dimethoxypropane. *J Lipid Res.* 1977 Jul;18(4):540-3.

Spiegel S, Merrill AH. Jr. .

Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.*1996; 10:1388-1397.

Tvorogova MG, Isaeva EL, Prokazova NV, Rozhkova TA, Kukharchuk VV, Titov VN.

Determination of lipid composition of high density lipoproteins by thin-layer chromatography on silica gel  
*Klin Lab Diagn.* 1998 Apr; (4): 13-6.

Wolfram G.

Dietary fatty acids and coronary heart disease. *Eur J Med Res.* 2003 Aug 20;8(8): 321-4.

van West D, Maes M.

Polyunsaturated fatty acids in depression. *Acta Neuropsychiatrica.* 2003; 15: 15-21.

Zock PL.

Dietary fats and cancer. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Feb;12(1):5-10.  
Review

**Bücher**

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L.

Biochemie

5.Auflage

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg 2003

Biesalski H-K, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C, Stähelin HB.

Ernährungsmedizin

Hrsg. Biesalski H-K, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C,

Stähelin HB.

6.Auflage

Georg Thieme Verlag 1995

Löffler, Petrides.

Biochemie und Pathobiochemie.

Hrsg. Löffler, Petrides.

7. Auflage.

Berlin Heidelberg NewYork.

Springer Verlag.

2003.

Geigy.

Wissenschaftliche Tabellen;

Teilband Hämatologie und Humangenetik.

Hrsg. Geigy.

8. Auflage

4. Nachdruck

1985

Hofmann E.

Medizinische Biochemie systematisch.

Hrsg. Hofmann E.

3. Auflage

Bremen

UNI-MED Verlag AG

1996-2001

Schwandt P, Richter WO, Parhofer KG.

Handbuch der Fettstoffwechselstörungen.

Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie und Prävention der  
Dyslipoproteinämien.

Hrsg. Schwandt P, Richter WO.

Stuttgart New York.

Schattauer Verlag

2001



## 10 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mir mit Ihrer vielseitigen Unterstützung während meiner Promotionszeit zur Seite standen:

Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Beisiegel für die Überlassung dieses Themas und die hervorragende Betreuung im Institut.

Dr. Klaus Tödter, der jeder Zeit Rat wusste und tatkräftig und engagiert maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Dem gesamten Team des Instituts, ins Besondere Dieter Münch-Harrach, für Geduld und Hilfe.

Meiner Familie und Freunden, besonders meinem Bruder Geoffrey Alexander und meinem Partner Lutz Müller, für mentale und praktische Unterstützung.

## **11 Lebenslauf**

### **Personalien**

Cheryl M. Behrens

Geboren am 4. Januar 1979 in Buchholz i. d. N.

Ledig, eine Tochter geboren am 17.2.2005

### **Schule**

August 1991- Mai 1998 Gymnasium der Samtgemeinde Tostedt

### **Soziales Jahr**

Februar 1999- Januar 2000

Diakonisches Werk Hamburg, eingesetzt im Kinderheim in Erlenbusch

### **Universität**

April 2000- März 2006 Universität Hamburg, Studium der Medizin

März 2002 Ärztliche Vorprüfung

März 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

April 2003- Oktober 2003 praktischer Teil der Doktorarbeit

September 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Oktober 2005- März 2006 Urlaubssemester für meine Tochter

Voraussichtlich:

April 2006 Beginn des Praktischen Jahres

2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **12 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Cheryl M. Behrens