

5 Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Summary

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

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

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

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

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

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

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

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

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