

5 Zusammenfassung

Die Quantifizierung von CLA in Lebensmitteln, Gewebe oder Plasmaproben umfasste in bisher durchgeführten Arbeiten lediglich die gaschromatographische Bestimmung des CLA-Hauptisomeres c9,t11-C18:2, obwohl daneben weitere geometrische und positionelle Isomere auftreten. Eine Erfassung einzelner Isomere gestaltete sich aufgrund mangelnder Trennleistung der GC-Bedingungen als schwierig. Ausgehend von einem CLA-Isomerenstandard und einer Probe aus Rinderfett, die beide mehr als 12 CLA-Isomere enthielten, wurde zunächst die Entwicklung und Optimierung der CLA-Isomerenanalytik verfolgt. Durch Kopplung zwei bis vier silberionenhaltiger HPLC-Säulen wurde eine bisher nicht erreichte Trennung von CLA-Isomeren erzielt. Die CLA-Isomere t12,t14-, t7,t9-, c/t12,14-, t11,c13-, c11,t13- sowie t7,c9-C18:2 wurden durch die Kombination von semipräparativer Ag⁺-HPLC, GC-MS und GC-FTIR sowie im Falle der gemischt konfigurierten 11,13-Isomere auch durch Anwendung von partieller Hydrazinreduktion identifiziert.

Mit dieser optimierten Methode wurden die CLA-Gehalte und CLA-Isomerenverteilungen zunächst in Milch, Milchprodukten und Fleisch hinsichtlich technologischer Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Milchprodukte, die bei höheren und länger anhaltenden Temperaturen hergestellt werden, aufgrund von Isomerisierungsvorgängen signifikant höhere Gehalte der trans,trans-Isomeren im Vergleich zu Milch aufweisen. Unterschiede in den Gehalten einzelner CLA-Isomere ließen sich durch die unterschiedlichen Herstellungsbedingungen nicht nachweisen. Mit einem CLA-Gehalt von 0,56 % im Fleisch von weidegefütterten Ochsen konnte ein signifikant höherer Gehalt verglichen zum Fleisch silagegefütterter Ochsen ermittelt werden. Ebenfalls wurden signifikante Unterschiede im CLA-Isomerenmuster ermittelt, deren Hauptisomere c9,t11- und t7,c9-C18:2 jeweils in der silagegefütterten Gruppe höhere Gehalte aufwiesen.

Bei der Anwendung der CLA-Analytik auf zwei unterschiedliche menschliche Gewebeararten zeigte sich eine positive Korrelation beim CLA-Gehalt von Mammafettgewebe zu Mammakrebsgewebe, während im Ovargewebe eine inverse Korrelation ermittelt wurde. Aufgrund der geringen Probenzahl ist jedoch eine Absicherung bzw. Überprüfung der Befunde notwendig. Unterschiede im CLA-Isomerenmuster konnten im Vergleich von Krebs- zu Fettgewebe ermittelt werden. Hier zeigte der Gehalt von c9,t11-C18:2 in den Krebsgeweben eine inverse Korrelation zum Fettgewebe. Um mögliche Korrelationen zu den aus den Fettsäuren gebildeten Eicosanoide zu finden, wurde neben der CLA-Analytik eine HPLC-ESI-MS-Methode zur Bestimmung von PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂ und TXB₂ entwickelt.

Die Methode zur Bestimmung der vier genannten Eicosanoide wurde erfolgreich auf die genannten Gewebe angewendet. Mit jeweils ca. 150 µg/g Krebsgewebe wurden die beiden erstgenannten PG in deutlich höheren Gehalten ermittelt als mit 1-10 µg/g im Fettgewebe, wobei höhere c9,t11-C18:2-Gehalte im Fettgewebe aufgrund der kompetitiven Nutzung der Enzyme, die für die Bildung von Arachidonsäure und weiter zu PG aus Linolsäure erforderlich sind, für die niedrigeren PG-Gehalte verantwortlich sein können.

Um abschließend Information über die Bildung von CLA-Isomeren aus TFA zu erhalten, wurde der CLA-Gehalt und die CLA-Isomerenverteilung in Blutplasmaproben von Probanden bestimmt, denen zuvor eine TFA-reiche Margarine verabreicht wurde. Diese Untersuchung wurde auf die im Plasma vorkommenden Hauptlipidklassen CE, TG und PL beschränkt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten Unterschiede im CLA-Gehalt und im CLA-Isomerenmuster zwischen den einzelnen Lipidklassen. Die Triacylglycerinfraktion enthält etwa doppelt soviel CLA wie auch TFA, verglichen mit den anderen beiden Lipidklassen. Durch einen hohen Anteil von TFA in der Ernährung wurde eine deutliche Steigerung des CLA-Gehaltes in allen Lipidklassen des Plasmas ermittelt. Durch die Anwendung der entwickelten Ag⁺-HPLC-Methode wurde diese Steigerung nicht nur auf das Hauptisomer c9,t11-, sondern auch auf das t7,c9-C18:2-Isomer zurückgeführt. Die Bildung der genannten CLA-Isomere wird mit der Δ^9 -Desaturierung der t11- bzw. t7-C18:1-Isomere begründet, die in dieser Studie einen Großteil der TFA-Fraktion in der Margarine bildeten.

5 Summary

Up to now only gaschromatographic methods for determining c9,t11-C18:2 have been used to quantify CLA in foodstuffs, tissues or plasma samples, while besides the main isomer further geometrical and positional isomers have been observed. The inclusion of single isomers is difficult because GC methods have not provided a satisfactory separation. Starting with a CLA-mixture and a fat sample from ruminants, which both contain more than 12 CLA-isomers, the development and optimization of the analysis of CLA was pursued. Fitting two to four silver-ion HPLC columns in series resulted in a separation of CLA-isomers, which were still not resolved. With a combination of semi-preparative Ag⁺-HPLC, GC-MS and GC-FTIR as well as partial hydrazine reduction for the mixed geometrical 11,13-isomers, the CLA-isomers t12,t14-, t7,t9-, c/t12,14-, t11,c13-, c11,t13- and t7,c9-C18:2 were separated and identified.

First with this method the content of CLA and the CLA-isomeric distribution in milk, milk products and meat with regard to technological parameters was determined. The results demonstrate that milk products produced at high temperatures show significantly higher amounts of the group of trans,trans-isomers, because of isomerization, compared to milk. Differences in the content of single isomers under the examined production conditions could not be determined. The amount of CLA at 0.56 % in meat of pasture-fed ruminants was significantly higher than the amount in meat of silage-fed ruminants (0.34 %). Furthermore significant differences in the isomeric distribution of CLA, whose main isomers c9,t11- and t7,c9-C18:2 make up the highest amounts in the silage-fed group, occurred.

Using the optimized CLA-analysis for two different types of human tissues a positive correlation was shown between the content of CLA in mammary adipose compared to mammary carcinoma tissue, while in ovarian tissue an inverse correlation was found. Because of the small number of samples, a covering or checking of the results is required. Differences in the isomeric distribution can be seen between carcinoma and adipose tissues. Both in the mammary and in the ovarian tissue an inverse correlation was obtained between the content of c9,t11-C18:2 in the carcinoma tissue and in the adipose tissue. To find possible correlations between the fatty acids and the eicosanoids PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂ and TXB₂ formed in the physiological pathway, an HPLC-ESI-MS method was developed for the determination of the four eicosanoids in the above mentioned tissues. The content of the two first mentioned prostaglandins was approximately 150 µg/g carcinoma tissue, while the content in the adipose tissue at 1-10 µg/g is significantly lower. This is probably due to the effect of a higher amount of c9,t11-C18:2 in adipose tissue, which can influence the pathway of the formation of arachidonic acid.

Finally to get Information about the formation of CLA from TFA, the content of CLA and CLA-isomeric distribution in human plasma samples of patients who consumed a TFA-enriched margarine was determined. These investigations included the main lipid classes CE, TG and PL, respectively. The results of the examination of human plasma show first differences in the content of CLA and the isomeric distribution of CLA between the lipid classes. The tricycleride fraction shows a content twice as high compared to the cholesterol and phospholipid fraction. In the second part of the study a significant increase in the content of CLA due to the consumption of the TFA-enriched margarine was observed in all lipid classes. Using the Ag^+ -HPLC method just developed, the increase is not only due to the main isomer c9,t11-C18:2, but also to the t7,c9-C18:2. This effect occurred because of the Δ^9 -desaturation of the t11- and t7-C18:1-isomers, which formed a large part of the TFA fraction in the margarine used in the study.