



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

## **Fettanalytik und Proteinquantifizierung wildlebender Reinanken aus dem Millstättersee**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Nicole Reischütz  
Matrikel-Nummer: 0305049  
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): A-474 Ernährungswissenschaften  
Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. DI. Dr. Helmut Mayer

Wien, im



# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	III
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	X
Abkürzungsverzeichnis .....	XI
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Literaturübersicht .....	3
2.1. Fettsäuren.....	3
2.1.1. Gesättigte Fettsäuren .....	3
2.1.2. Einfach ungesättigte Fettsäuren .....	6
2.1.2.1. Chemie und Vorkommen .....	6
2.1.2.2. Positive Wirkungen einfach ungesättigter Fettsäuren auf die Gesundheit .....	8
2.1.2.2.1 Einfach ungesättigte Fettsäuren und Diabetes Mellitus .....	9
2.1.3. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren .....	12
2.1.3.1. Chemie und Vorkommen .....	12
2.1.3.2. Eicosanoide .....	15
2.1.3.2.1. Definition .....	15
2.1.3.2.2. Synthese .....	16
2.1.3.3. Polyenfettsäuren und die Gesundheit .....	19

2.1.3.3.1. PUFAs und Blutfette.....	19
2.1.3.3.2. PUFAs und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	20
2.1.3.3.3. PUFAs und Entzündungen.....	21
2.1.3.3.4. PUFAs und rheumatoide Arthritis.....	22
2.1.3.3.5. PUFAs und Krebs.....	23
2.1.3.3.6. PUFAs und mentale Gesundheit.....	23
2.1.3.3.6.1. Depression.....	24
2.1.3.3.6.2. Manische Depression.....	25
2.1.3.3.6.3. Alzheimer.....	25
2.1.3.3.7. PUFAs und Osteoporose.....	28
2.2. Vitamin E.....	29
2.2.1. $\alpha$ -Tocomenol marinen Ursprungs.....	32
2.2.2. Vitamin E und die Gesundheit.....	34
2.2.2.1. Vitamin E und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	34
2.2.2.2. Vitamin E und Krebs.....	36
2.2.2.3. Vitamin E und Alzheimer.....	37
2.3. Einführung in die Chromatographie.....	37
2.3.1. Einteilung chromatographischer Methoden.....	38
2.3.2. Einführung in die Gaschromatographie.....	39
2.3.2.1. Die gaschromatographische Appatur.....	39
2.3.3. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC).....	42
2.3.4. Dünnschichtchromatographie.....	45
2.3.4.1. Silberionendünnschichtchromatographie.....	46

3. Materialien und Methoden.....	47
3.1. Untersuchungsparameter.....	47
3.2. Probenvorbereitung .....	47
3.2.1. Prinzip.....	47
3.3. Gesamtfett- und Fettsäurebestimmung.....	48
3.3.1. Verwendete Geräte und Reagenzien.....	48
3.3.2. Herstellung der verwendeten Lösungen .....	49
3.3.3. Durchführung .....	51
3.3.3.1. Gefriertrocknung .....	51
3.3.3.2. Direkte säurekatalysierte Transmethylierung.....	52
3.3.3.3. Durchführung .....	52
3.3.3.4. Gaschromatographisches System .....	53
3.3.3.5. Auswertung der Chromatogramme .....	54
3.4. Identifizierung unbekannter Fettsäuren mittels Silberionendünnschichtchromatographie und Gaschromatographie.....	54
3.4.1. Verwendete Geräte und Reagenzien.....	55
3.4.2. Durchführung .....	56
3.5. Gesamtstickstoffbestimmung und Proteinberechnung nach Kjeldahl .....	57
3.5.1. Prinzip der Methode.....	57
3.5.2. Verwendete Geräte und Reagenzien.....	58
3.5.3. Herstellung der verwendeten Lösungen und Reagenzien .....	59
3.5.4. Durchführung .....	61
3.5.5. Probenaufschluss .....	61

3.5.6. Destillation.....	62
3.5.7. Rücktitration mit Salzsäure unterschiedlicher Konzentrationen zur Auffindung der anzuwenden Konzentration.....	62
3.5.8. Berechnung des Proteingehalts .....	63
3.6. Bestimmung von Vitamin E Isomeren .....	64
3.6.1. Rehydrierung des Renkenfilets .....	64
3.6.1.1. Verwendete Geräte und Reagenzien .....	64
3.6.1.2. Durchführung.....	64
3.6.2. Fettextraktion nach Bligh und Dyer .....	65
3.6.2.1. Verwendete Geräte und Reagenzien .....	65
3.6.2.2. Durchführung.....	65
3.6.3. Quantitative Bestimmung von Tocopherolen.....	66
3.6.3.1. Verwendete Geräte und Reagenzien .....	66
3.6.3.2. Herstellung der verwendeten Lösungen.....	67
3.6.3.3. Durchführung.....	68
3.7. Tocopherolquantifizierung mittels Standardreihe auf der HPLC (nach der DGF-Einheitsmethode F-II 4a (00)).....	70
3.7.1. Verwendete Geräte und Reagenzien: .....	70
4. Ergebnisse und Diskussion .....	73
4.1. Homogenitätsprüfung .....	73
4.2. Gesamtfett- und Proteingehalt .....	74
4.3. Fettsäureprofil der Fische.....	76
4.4. Identifizierung unbekannter Fettsäuren .....	90

4.5. Vitamin E Isomere.....	93
5. Schlussbetrachtung .....	97
6. Zusammenfassung .....	99
7. Literaturverzeichnis.....	100
Anhang:	
Abstract	109
Lebenslauf	110
Danksagung	111

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1: Beispiele für verzweigt-kettige, gesättigte Fettsäuren</b>	<b>4</b>
<b>Abb. 2: Cis- und Trans-Fettsäuren</b>	<b>7</b>
<b>Abb. 3: Linolsäure, <math>\alpha</math>-Linolensäure und konjugierte Linolensäure als Beispiele für PUFAs</b>	<b>12</b>
<b>Abb. 4: Struktur und Metabolismus von n-6 und n-3 PUFAs</b>	<b>14</b>
<b>Abb. 5: Beispiele für die einzelnen Eicosanoidgruppen</b>	<b>16</b>
<b>Abb. 6: Synthese von Prostaglandinen durch die Cyclooxygenase und Peroxidase</b>	<b>17</b>
<b>Abb. 7: Synthese von Hydroxyfettsäuren durch die Lipoxygenase</b>	<b>17</b>
<b>Abb. 8: Arachidonsäure-abstammende Eicosanoidsynthese</b>	<b>18</b>
<b>Abb. 9: Chemische Strukturen der <math>\alpha</math>-Formen der Vitamin E-Vitamer</b>	<b>31</b>
<b>Abb. 10: Funktionsbild eines Gaschromatographen</b>	<b>40</b>
<b>Abb. 11: Splitinjektor im Querschnitt</b>	<b>41</b>
<b>Abb. 12: Schematische Abbildung eines Flammenionisationsdetektors</b>	<b>42</b>
<b>Abb. 13: HPLC Chromatograph mit UV-Detektor</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 14: Strukturformel von 2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (BHT)</b>	<b>50</b>
<b>Abb. 15: Durchschnittliche Fettsäureverteilung der 10 untersuchten Fischfilets in %-Anteilen am Gesamtfett</b>	<b>76</b>
<b>Abb. 16: Chromatogramm des Fettsäurespektrums des Renkenöls, nach Analyse in der GC</b>	<b>78</b>
<b>Abb. 17: Chromatogramm der 7. Fettsäurefraktion der DC-Platte: Die gesättigten Fettsäuren</b>	<b>91</b>
<b>Abb. 18: Chromatogramm von <math>\alpha</math>-Tocomenol und <math>\gamma</math>-Tocopherol nach Auftrennung über die GC-MS</b>	<b>94</b>

<b>Abb. 19: Massenspektrum von <math>\alpha</math>-Tocomonoenol</b>	<b>95</b>
<b>Abb. 20: Auf der HPLC ermittelte Standardgerade von <math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	<b>96</b>

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1: Nomenklatur gesättigter Fettsäuren</b>	<b>5</b>
<b>Tab. 2: Nomenklatur und Vorkommen von Monoenfettsäuren</b>	<b>8</b>
<b>Tab. 3: Nomenklatur und Vorkommen von PUFA</b>	<b>13</b>
<b>Tab. 4: Werte zur Berechnung der Konzentrationen der Standardlösung</b>	<b>71</b>
<b>Tab. 5: Ergebnisse der Homogenitätsprüfung auf Fett und Protein in g/100 g</b>	<b>74</b>
<b>Tab. 6: Zusammensetzung der untersuchten Filets in g/100 g</b>	<b>80</b>
<b>Tab. 7: Gesättigte Fettsäuren in mg/100 g Filet</b>	<b>80</b>
<b>Tab. 8: Bakterielle Fettsäuren in mg/100 g Filet</b>	<b>81</b>
<b>Tab. 9: Einfach ungesättigte Fettsäuren in mg/100 g Filet</b>	<b>82</b>
<b>Tab. 10: Polyungesättigte Fettsäuren in mg/100 g Filet</b>	<b>83</b>
<b>Tab. 11: PUFAs n-3:n6 in mg/100 g Filet</b>	<b>84</b>
<b>Tab. 12: Gesamtfett in mg/100g Filet</b>	<b>85</b>
<b>Tab. 13: Gesättigte Fettsäuren in % am Gesamtfett</b>	<b>85</b>
<b>Tab. 14: Bakterielle Fettsäuren in % am Gesamtfett</b>	<b>86</b>
<b>Tab. 15: Einfach ungesättigte Fettsäuren in % am Gesamtfett</b>	<b>87</b>
<b>Tab. 16: Polyungesättigte Fettsäuren in % am Gesamtfett</b>	<b>88</b>
<b>Tab. 17: PUFAs n-3:n6 in % am Gesamtfett</b>	<b>89</b>
<b>Tab. 18: Werte zur Berechnung der Standardgeraden für <math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -TTP	$\alpha$ -Tocopheroltransportprotein
BDNF	pro-brain-derived neurotrophic factor
BFA	bakterielle Fettsäuren
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol
BSAP	knochenspezifische alkaline Phosphatase
BSTFA	N,O-trimethylsilyl-trifluoroacetonamid
C	Kohlenstoff
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP response element binding protein
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dünnschichtchromatographie
DHA	Docosahexaensäure
EPA	Eicosapentaensäure
FID	Flammenionisationsdetektor
FSME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatographie/Gaschromatograph
HDL	High density Lipoprotein
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPLC	High performance liquid chromatography
IL	Interleukin
KHK	koronare Herzkrankheiten

KVE	kardiovaskuläre Erkrankungen
LC PUFAs	lang kettige polyungesättigte Fettsäuren
LDL	Low density Lipoprotein
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotrien
LX	Lipoxin
MDT	marine derived Tocomenol
MS	Massenspektrometrie/-meter
MUFA	einfach ungesättigte Fettsäuren
NIFA	nicht identifizierte Fettsäuren
NO	Stickstoffmonoxid
NTX	N-Telopeptide
oxLDL	oxidiertes Low density Lipoprotein
PG	Prostaglandin
PUFA	polyungesättigte Fettsäuren
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TMCS	Trimethylchlorosilan
TNF	Tumornekrosefaktor
TXA	Thromboxane
UV	ultraviolett

## 1. Einleitung und Fragestellung

Fisch enthält neben zumeist geringen Anteilen an Fett hohe Mengen an hochwertigem Protein und nur geringe Mengen an Kohlehydraten. Das in Fisch enthaltene Protein ist wegen seines geringen Bindegewebsanteils besonders leicht verdaulich und enthält auch hohe Mengen an essentiellen Aminosäuren. Aufgrund der zumeist besonders hochwertigen Zusammensetzung seiner Fettfraktion ist Fisch ein, als besonders wertvoll anzusehendes Lebensmittel. Zusätzlich enthält Fisch Vitamine wie Vitamin A, E und D sowie eine Reihe von Mineralstoffen Eisen, Fluor und Jod, bei einem niedrigen Natriumgehalt.

Fischöl enthält verhältnismäßig hohe Mengen an essentiellen und anderen polyungesättigten Fettsäuren die allgemein eine positive Wirkung auf die Gesundheit ausüben. Viele Studien wurden veröffentlicht, die derartige Effekte, vor allem von EPA und DHA beim Menschen nachweisen, hierbei handelt es sich zumeist um die Prävention von Zivilisationskrankheiten der industrialisierten Welt. N-3 PUFAs besitzen ein breites Spektrum positiver Wirkungen, wie antithrombotische, antiinflammatorische und antiarrhythmische, so wirken sie präventiv in der Entwicklung koronarer Herzerkrankungen, Hypertonie, Hypercholesterinämie und sind auch in der Lage Symptome chronisch entzündlicher Erkrankungen zu mildern.

Auch enthält Fisch hohe Mengen an einfach ungesättigten Fettsäuren, wie Öl- und Palmitoleinsäure. Monoenfettsäuren wirken, werden sie statt gesättigten aufgenommen, ebenfalls präventiv in der Entwicklung von koronaren Herzerkrankungen, Arteriosklerose, Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie. Zusätzlich konnte durch mehrere Studien eine positive Wirkung der Palmitoleinsäure auf die Entstehung von Diabetes Mellitus nachgewiesen werden, indem sie zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit pankreatischer  $\beta$ -Zellen beiträgt.

Zum Schutz der großen Mengen an hochungesättigten Fettsäuren die sich vor allem in den Zellmembranen befinden bedarf es eines fettlöslichen Antioxidans, dem Vitamin E. Es sorgt für den Erhalt der Membranfluidität und –funktionalität.

In Fisch wurde ein spezielles Isomer, das marine derived  $\alpha$ -Tocomenol identifiziert, das vor allem in arktischen Seefischen in hohen Mengen gefunden wurde und teilweise auch in Süßwasserfischen vorkommt. Es scheint eine Anpassung an kalte Gewässer zu sein, da es bei tiefen Temperaturen besonders guten und vor allem besseren Schutz als  $\alpha$ -Tocopherol vor Fettoxidation durch Peroxylradikale bietet.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden wildlebende Reinanken aus dem Millstättersee untersucht. Durchgeführt wurden eine Homogenitätsprüfung, von Fett und Protein im Filet, wie auch eine Quantifizierung von Gesamtprotein, -fett und Fettsäuren. Durch diese Untersuchungen war es möglich die allgemeinen ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Reinanken zu beurteilen. Zusätzlich wurde eine Vitamin E quantifizierung durchgeführt, wobei hier das  $\alpha$ -Tocomenol, das auch in der marinen Nahrungskette vorhanden ist, identifiziert werden konnte.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Fettsäuren**

Fettsäuren sind Carbonsäuren die sich aufgrund ihrer chemischen Struktur von einander unterscheiden, diese wiederum beeinflusst deren chemische und physikalische Eigenschaften. Ihre Unterteilung kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen: Länge der Kohlenstoffkette; Anzahl, Position und Konfiguration der Doppelbindungen und nach dem Vorkommen zusätzlicher funktioneller Gruppen [BELITZ et al., 2001].

Ihre biologische Bedeutung erlangen sie unter anderem als Energielieferanten und –speicher in den Fettgeweben, in Form von Triacylglyceriden. Auch dienen sie als Schutzpolster innerer Organe und das subkutane Fett als Isolation gegen Kälteeinwirkung. Vor allem die mehrfach ungesättigten, langkettigen Fettsäuren sind Bestandteile von Phospholipiden die zum Aufbau von Zellmembranen und als Vorstufen für die Synthese biologisch aktiver Substanzen dienen, wie zum Beispiel den Eicosanoiden, die aus der Arachidon-, Eicosapentaen- und Dihomogammalinolensäure gebildet werden.

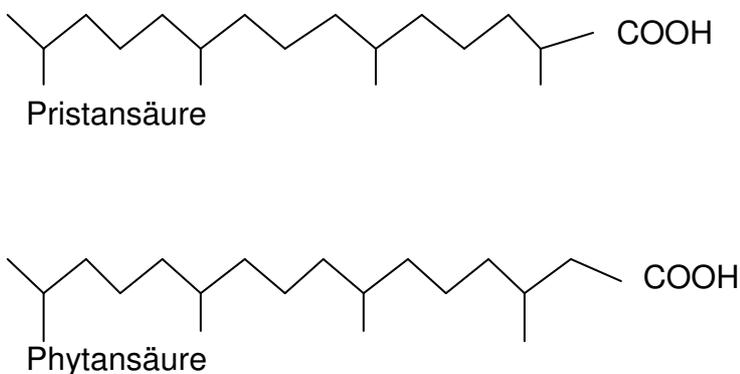
Die Lipidfraktion von fetten Fischen besteht vorwiegend aus Triglyceriden. 35 – 40% der Fettsäuren bestehen aus über 18 Kohlenstoffatomen und 20 – 35% beinhalten mehr als drei Doppelbindungen. Daraus ergibt sich auch die ernährungsphysiologische Bedeutung und Besonderheit des Fischöls, es enthält einen vergleichsweise hohen Gehalt an essentiellen Fettsäuren. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren schwankt zwischen 20 und 50%, ungeradzahlige Fettsäuren kommen mit 1,5 – 2,5% nur in geringen Mengen vor [BUSCH-STOCKFISCH, 2005].

#### **2.1.1. Gesättigte Fettsäuren**

Gesättigte Fettsäuren sind Carbonsäuren von unterschiedlicher Länge, die ausschließlich Einfachbindungen enthalten, was bedeutet, dass alle Kohlenstoffe mit Wasserstoffatomen gesättigt sind. Sie werden unterteilt in

kurzkettige (4 – 6 C-Atome), mittelkettige (8 – 12 C-Atome) und langkettige Fettsäuren (14 und mehr C-Atome). In der Natur dominieren die geradzahligen und unverzweigten Isomere, Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffzahl oder Verzweigungen kommen eher selten vor.

Der Schmelzpunkt von gesättigten Fettsäuren liegt höher als der von ungesättigten, sie sind bei Raumtemperatur fest. Ihr Schmelzpunkt ist abhängig von der Kettenlänge, er steigt mit der Kohlenstoffzahl und sinkt mit zunehmender Zahl an Doppelbindungen [BELITZ et al., 2001].



**Abb. 1: Beispiele für verzweigt-kettige, gesättigte Fettsäuren [BELITZ et al. 2001]**

Verzweigt-kettige Fettsäuren kommen vor allem in Fischöl und im Fett von Wiederkäuern vor, sie werden über die Nahrung, z.B. Plankton aufgenommen, oder von Bakterien gebildet. Neben der Phytan- und Pristansäure, die als Abbauprodukte von Chlorophyll in Fisch vorkommen können, kommen auch iso- und anteiso-Isomere von gesättigten, geradzahligen wie auch ungeradzahligen Fettsäuren vor. Isofettsäuren besitzen eine Methylverzweigung am C2-Atom, während sie sich bei anteiso-Fettsäuren am C3-Atom, jeweils vom Kettenende ausgehend, befindet [RASOARAHONA, 2004].

**TAB.1: Nomenklatur gesättigter Fettsäuren [nach BELITZ et al., 2001]**

Systematischer Name	Trivialname	Kurzform	Vorkommen
Butansäure	Buttersäure	C4:0	Milchfett
Pentansäure	Valeriansäure	C5:0	Milchfett
Hexansäure	Capronsäure	C6:0	Milchfett, Kokosöl
Heptansäure	Önanthsäure	C7:0	
Octanansäure	Caprylsäure	C8:0	Milch-, Kokos-, Palmkernfett
Nonansäure	Pelargonsäure	C9:0	
Decansäure	Caprinsäure	C10:0	Milch-, Kokos-, Palmkernfett
Dodecansäure	Laurinsäure	C12:0	Kokos- und Milchfett
Tetradecansäure	Myristinsäure	C14:0	Milch-, Kokos-, Palmkernfett
Pentadecansäure		C15:0	Rind, Fisch, Lamm
Hexadecansäure	Palmitinsäure	C16:0	Palmöl, Kakaobutter, Rindertalg
Heptadecansäure	Margarinsäure	C17:0	Milchfett, Rindertalg
Octadecansäure	Stearinsäure	C18:0	Tierische und pflanzliche Öle
Eicosansäure	Arachinsäure	C20:0	Kakaobutter, Baumwollsaat
Docosansäure	Behensäure	C22:0	Erdnuss- und Rapsöl
Tetracosansäure	Lignocerinsäure	C24:0	
Hexacosansäure	Cerotinsäure	C26:0	Bienenwachs
<b>Verzweigtkettige Fettsäuren</b>			
2,6,10,14-Tetramethyl- pentadecansäure	Pristansäure		Fischöl, Milchfett
3,7,11,15- methylhexadecansäure	Phytansäure		Fischöl, Milchfett

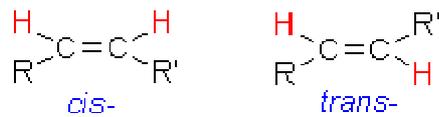
Gesättigte Fettsäuren genießen in unserer Gesellschaft einen eher negativen Ruf, denn sie stehen, im Übermaß verzehrt, in Verbindung mit der Entwicklung einer Reihe von Krankheiten. Vor allem in Industriestaaten sind der Konsum an gesättigten Fettsäuren und dadurch auch die Energieaufnahme viel zu hoch, was zu steigendem Übergewicht und einer Erhöhung der Serumspiegel von Gesamt- und LDL-Cholesterin, sowie von Triglyceriden und einem Absinken von HDL-Cholesterin führt [KRIS-ETHERTON et al. 1999]. Diese Veränderungen können, zur Entwicklung von Arteriosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen führen; auch kommt es häufig zu Bluthochdruck, Diabetes und Leberverfettung, um nur einige negative Folgen eines zu hohen Fettkonsums zu nennen.

## **2.1.2. Einfach ungesättigte Fettsäuren**

### **2.1.2.1. Chemie und Vorkommen**

Monoenfettsäuren enthalten in ihrer Kohlenstoffkette eine Doppelbindung, welche, ausgehend vom Carboxylende, zumeist zwischen den C-Atomen 9 und 10 liegt. Kurz- und mittelkettige einfach ungesättigte Fettsäuren kommen in der Nahrung nur in geringen Mengen vor, langkettige sind hingegen sehr häufig zu finden, insbesondere C18:1n9, die Ölsäure.

Bei Monoenfettsäuren können jeweils zwei natürliche Isomere auftreten. Je nach Orientierung der Wasserstoffatome an den Kohlenstoffatomen die an der Doppelbindung beteiligt sind werden sie unterteilt in cis und trans. Cis-Fettsäuren kommen in der Natur am häufigsten vor, die Wasserstoffatome sind hier auf derselben Seite der Doppelbindung lokalisiert. Transfettsäuren hingegen entstehen in größeren Mengen bei der industriellen Fetthärtung, durch partielle Hydrierung und in geringeren Anteilen im Pansen von Wiederkäuern, durch bakterielle Hydrierung, sie sind daher im Milchfett enthalten. Bei Transfettsäuren sind die Wasserstoffatome auf gegenüberliegenden Seiten der Doppelbindung ausgerichtet.



**Abb. 2: Cis- und Transfettsäuren [CHRISTIE, 2009]**

Durch mehrere Studien wurde nachgewiesen, dass Transfettsäuren negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben können. Sie sind in der Lage das Risiko für Colonkrebs zu erhöhen [STENDER und DYERBERG, 2004] und beeinflussen die Cholesterinspiegel negativ, sie erhöhen LDL- und senken HDL-Cholesterin, was einen Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt [JUDD et al., 1994; ASCHERIO und WILLET, 1997]. Transfettsäuren haben außerdem negative Auswirkungen auf die Endothelfunktion, was eine Erklärung für das durch sie verursachte erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen ist. Auch besteht eine positive Korrelation zwischen der Aufnahmemenge an Transfettsäuren und den Plasmakonzentrationen verschiedener Entzündungsmediatoren, wie dem c-reaktiven Protein und IL-6, wobei CRP eine direkte Rolle spielen dürfte in der Atherogenese [LOPEZ-GARCIA et al., 2005].

Die in der Natur am häufigsten vorkommende einfach ungesättigte Fettsäure in Pflanzen und Tieren ist die Ölsäure. Sie ist die Hauptkomponente von Olivenöl und kommt auch in anderen Ölsaaten, sowie im Speicherfett von Tieren in relativ großen Mengen vor. Die Palmitoleinsäure, die in größeren Mengen in der Makadamianuss und in Fisch enthalten ist, findet erst seit kurzem große Beachtung, da ihr nach neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen positive Wirkungen in der Prävention von Diabetes Mellitus zugeschrieben werden [HOTAMISLIGIL, 2008].

**Tab. 2: Nomenklatur und Vorkommen von Monoenfettsäuren [CHRISTIE, 2009]**

Systematischer Name	Trivialname	Kurzform	Vorkommen
cis-9-hexadecensäure	Palmitoleinsäure	16:1(n-7)	Makadamianuss, Fisch
cis-6-octadecensäure	Petroselinensäure	18:1(n12)	Karotten, Petersilie, Koriander
cis-9-octadecensäure	Ölsäure	18:1(n-9)	Olivenöl, Sonnenblumenöl, Fisch
cis-11-octadecensäure	Cis-Vaccensäure	18:1(n-7)	Bakterien
cis-11-Eicosensäure		C20:1(n-9)	Hanfsamen, Hanföl
cis-13-Docosensäure	Erucasäure	C22:1(n-9)	Wilder Raps
cis-15-Tetradocosensäure	Nervonsäure	C24:1(n-9)	

### 2.1.2.2. Positive Wirkungen einfach ungesättigter Fettsäuren auf die Gesundheit

Epidemiologische Studien zeigen, dass einfach ungesättigte Fettsäuren aus der Nahrung einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Menschen haben. Die Art von Fett die aufgenommen wird, ist wichtig in der Etablierung kardiovaskulärer Erkrankungen, die Gesamtfettaufnahme dürfte hierbei von geringerer Bedeutung sein [NICKLAS et al., 2004]. So ist die Mittelmeerdät äußerst fettreich. Vor allem Olivenöl, welches primär Monoenfettsäuren enthält, wird in großen Mengen verzehrt, gleichzeitig ist die Inzidenzrate für Herzinfarkt jedoch niedriger als in anderen europäischen Ländern. Neuere Diättempfehlungen gehen ein auf positive Wirkungen von ungesättigten

Fettsäuren. Speziell im Hinblick auf einfach ungesättigte Fettsäuren, zeigten Studien, dass der Ersatz von gesättigten Fettsäuren durch Monoenfettsäuren ein Absinken von LDL-Cholesterin und einen Anstieg von HDL-Cholesterin zur Folge hat [NICKLAS et al., 2004; CURB et al., 2000; FELDMAN 1999; KRIS-ETHERTON et al. 1999]. Die Plasmakonzentrationen von Triglyceriden konnten durch Substitution höherer Mengen an einfach ungesättigten Fettsäuren ebenfalls signifikant gesenkt werden [KRIS-ETHERTON et al. 1999]. Auch durch höhere Gaben an Polyenfettsäuren wurde ein Absinken von Gesamt- und LDL-Cholesterin beobachtet, während HDL-Cholesterin anstieg, jedoch kann eine gleichzeitig unzureichende Aufnahme von Antioxidantien zu einer Erhöhung der Lipidperoxidation und so zu vermehrtem oxidativem Stress führen, was eine Erklärung für den Abfall von HDL-Cholesterin in manchen Studien sein könnte [BERRY et al., 1991].

Es wurde auch entdeckt, dass Indexes von Übergewicht und Insulinresistenz positiv korrelieren mit dem Plasmagehalt von C16:1(n-7). Bei fettleibigen Personen sind Plasmaspiegel von Palmitoleinsäure und Stearoyl-CoA-desaturase signifikant erhöht, was auf eine endogene Lipogenese hindeutet, die offenbar die Synthese von Fettsäuren aus Kohlehydraten widerspiegelt. Der Gehalt von C16:1 in Serumcholesterolestern und Triglyceriden im Fettgewebe korreliert außerdem stark mit Indexes von Adipositas und die Konzentrationen an MUFAs in Muskelphospholipiden korrelieren mit dem nüchtern Glucosegehalt im Blut. Zusammen weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass Änderungen in der Zusammensetzung von Monoenfettsäuren in Geweben und Plasma vielleicht zentrale Komponenten in der Entwicklung von Fettsucht und dem metabolischen Syndrom sind [OKADA et al., 2005].

### **2.1.2.2.1 Einfach ungesättigte Fettsäuren und Diabetes Mellitus**

Weltweit steigt die Prävalenz von Diabetes, vor allem Typ II rapide an. Diese Erkrankung führt zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten und ist im fortgeschrittenen Stadium, der Hauptgrund für Erblindung

und Nierentransplantationen, sowie Gefäßerkrankungen und Amputationen von und an Gliedmaßen. Zusätzlich steigt das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen um ein zwei bis fünffaches [JENKINS et al., 2008].

Erwiesenermaßen hängen Diabetes Typ I und II von der pankreatischen  $\beta$ -Zellmasse ab; zur Erkrankung kommt es aufgrund einer Imbalance zwischen Zelltod und –neubildung. Diabetes Typ I ist eine Autoimmunerkrankung bedingt durch eine übermäßige Induktion der Apoptose von  $\beta$ -Zellen. Diabetes Typ II ist keine Immunerkrankung, sondern steht vielmehr im Zusammenhang mit falscher und übermäßiger Ernährung. Vor allem die Fett- und Zuckeraufnahme spielen in der Pathogenese eine große Rolle [MARZO et al., 2004]. Es ist bewiesen, dass viszerale Fettdepots ein primärer Faktor in der Pathogenese verschiedener Adipositas bedingter metabolischer Störungen sind, einschließlich Diabetes, Insulinresistenz und Hyperlipidämie [FUKUCHI et al., 2004].

Die Fettsäureaufnahme ist ein primärer Faktor, der eine Insulinresistenz in Assoziation mit Übergewicht verursachen kann, denn Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung in Blut und Muskel korrelieren mit dem Auftreten einer Insulin-Resistenz beim Menschen. Eine Imbalance in der Zusammensetzung der Leberfettsäuren kann auch zu Änderungen der Fettsäurezusammensetzung in anderen Geweben führen [FUKUCHI et al., 2004].

Verschiedene Agenzien können eine Induktion der Apoptose pankreatischer  $\beta$ -Zellen verstärken oder abschwächen. Zu den effektivsten zählen die einfach ungesättigten Fettsäuren, sie üben potente protektive Effekte gegen eine lipotoxische und cytokin-medierte Induktion des Zelltods aus [WELTERS et al., 2006].

Derartig positive Effekte konnten hingegen durch eine Supplementierung mit EPA und DHA nicht nachgewiesen werden, sie führen zu keinen nachweislich positiven Wirkungen auf Glukosetoleranz und Insulinresistenz [TOFT et al. 1995].

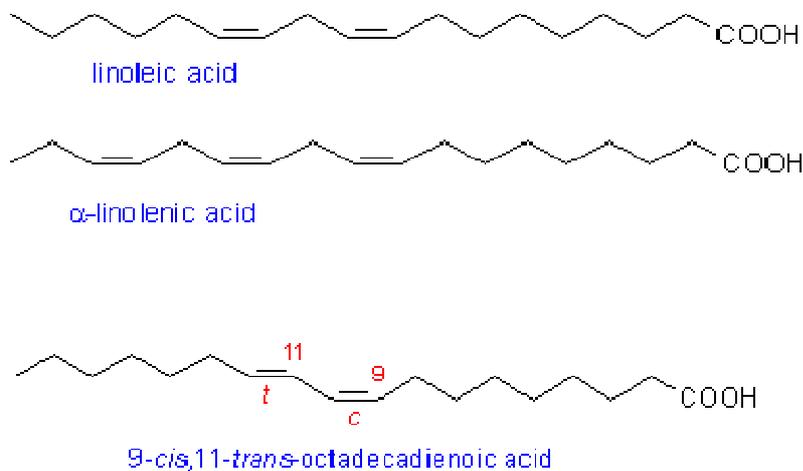
Gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren üben unterschiedliche Effekte auf die Lebensfähigkeit pankreatischer  $\beta$ -Zellen aus. Langkettige gesättigte Fettsäuren wirken zytotoxisch auf sie, was assoziiert wird mit einer Kaspase-Aktivierung und nachfolgender Induktion von Apoptose. C16:1n7 wirkt im Vergleich mit C16:0 nicht toxisch, sie unterdrückt die schädliche Wirkung der Palmitinsäure sogar. Es wird vermutet, dass einfach ungesättigte Fettsäuren die Lebensfähigkeit der pankreatischen  $\beta$ -Zellen, durch Regulation verschiedener Schritte des apoptotischen Enzymweges, durch cAMP, regulieren. Vor allem die Palmitoleinsäure scheint großes Potential zu haben in der Prävention und Behandlung von Diabetes [WELTERS et al., 2006].

C16:1n7 ist scheinbar ein vom Gewebe abgeleitetes Fetthormon, das die Muskelinsulinaktivität stark erhöht und eine Hepatosteatose unterdrückt. Im Tierversuch kam es durch eine Induktion von Diabetes Typ II zu einem dramatischen Anstieg von C16:1, womit eine erhöhte Insulinsensitivität und die Vermeidung einer manifestierten Fettleber assoziiert wurde. Es kam zu einer verbesserten absoluten Glucoseeinlagerung und erhöhter Aufnahme in den Muskel. Auch ist die Palmitoleinsäure scheinbar die einzige Fettsäure deren Gewebskonzentrationen im Zusammenhang mit Änderungen des Fettstoffwechsels im Fettgewebe reguliert werden kann. Die niedrigen basalen Konzentrationen und die rasche Fluktuation reflektieren eine de novo Lipogenese, was die These stützt, dass 16:1n7 geeignet ist als regulierendes Hormon oder Signal zu wirken, um eine Kommunikation zwischen Fett- und anderen Geweben zu mediieren. All diese Ergebnisse lassen vermuten, dass C16:1 in der Tat ein körpereigenes Gewebshormon sein könnte, das in der Lage ist, durch verbesserte Glucoseverwertung in der Entwicklung von Diabetes Mellitus Typ II präventiv zu wirken [CAO et al., 2008].

## 2.1.3. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

### 2.1.3.1. Chemie und Vorkommen

Polyenfettsäuren enthalten mindestens zwei Doppelbindungen, die sowohl cis- als auch trans-konfiguriert sein können, auch das Auftreten von konjugierten Doppelbindungen ist möglich, meist sind sie jedoch isoliert. In der Natur kommen vor allem die cis-Isomere vor, Transpolyenfettsäuren entstehen bei der industriellen Hydrierung von pflanzlichen Ölen zur Margarineherstellung, aber auch im Pansen von Wiederkäuern durch bakterielle Fermentation.



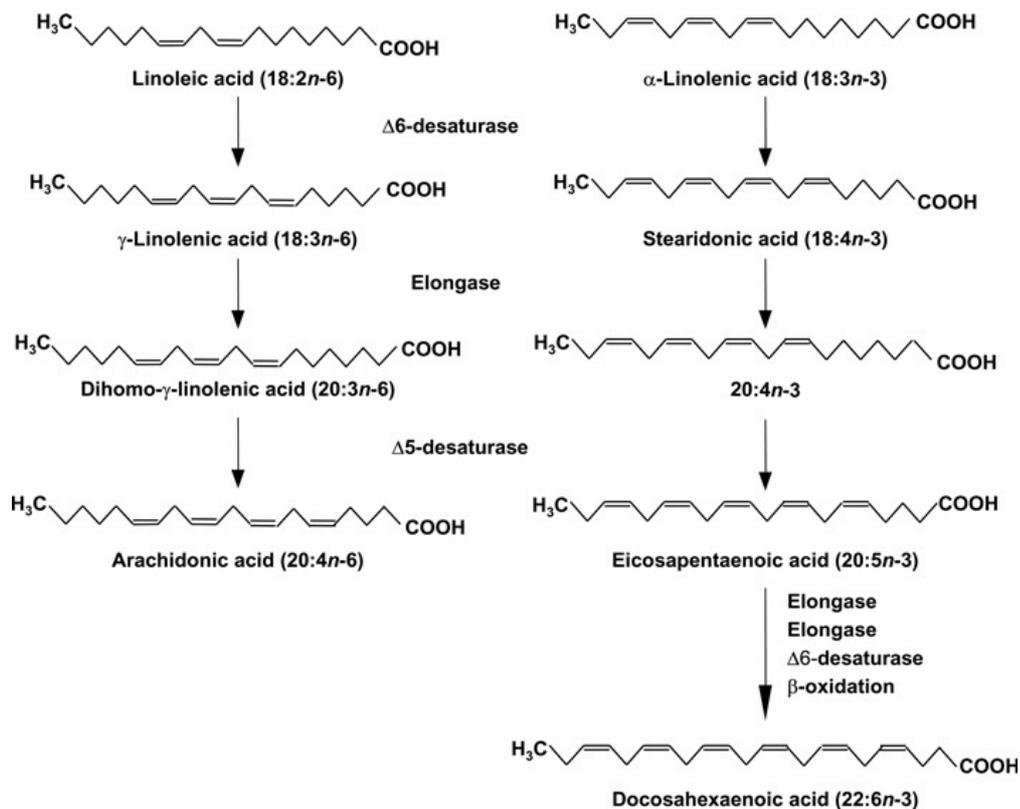
**Abb. 3: Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure und konjugierte Linolensäure als Beispiele für PUFAs [CHRISTIE, 2009]**

Zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren gehören auch die essentiellen Fettsäuren. Der Mensch muss sie mit der Nahrung aufnehmen, da er selbst nicht das Enzymsystem besitzt das für ihre Synthese notwendig ist [BIESALSKI et al., 2004]. Linolsäure wie auch die  $\alpha$ -Linolensäure sind essentiell für Mensch und Tier. Pflanzen sind jedoch in der Lage letztere aus der Linolsäure zu synthetisieren, durch deren Desaturierung mit Hilfe der  $\Delta 12'$  und die  $\Delta 15'$  Desaturasen.

**Tab. 3: Nomenklatur und Vorkommen von PUFA [CHRISTIE, 2009]**

Systematischer Name	Trivialname	Kurzform	vorkommen
9, 12- Octadecadiensäure	Linolsäure	C18:2n6	Distel-, Sonnenblumen-, Hanföl
9, 12, 15- Octadecatriensäure	$\alpha$ -Linolensäure	C18:3n3	Lein-, Hanf-, Raps- und Walnussöl
6, 9, 12- Octadecatriensäure	$\gamma$ -Linolensäure	C18:3n6	Granatapfelkerne, Hanföl
8, 11, 14- Eicosatetraensäure	Arachidonsäure	C20:4n6	Schweineleber, Thunfisch
Eicosapentaensäure	EPA	C20:5n3	Fischöl
Docosahexaensäure	DHA	C22:6n3	Fischöl

Zu den essentiellen Fettsäuren gehören die eben erwähnte Linolsäure und die  $\alpha$ -Linolensäure, durch ihre Elongation und Desaturierung werden aus Linolsäure die Arachidonsäure und aus der  $\alpha$ -Linolensäure die Eicosapentaen- und Docosahexaensäure synthetisiert [CALDER, 2005]. Letztere sind in Fisch in größeren Mengen enthalten, auch er kann deren Vorstufen nicht selbst synthetisieren, nimmt sie jedoch über seine Nahrung auf (Algen, Plankton, und andere einzellige Organismen, Krebse, kleine Fische...). Linolsäure kommt in vielen pflanzlichen Ölen vor, wie Distel-, Sonnenblumen- und Maiskeimöl wo sie die Hauptkomponente ist [BIESALSKI et al., 2004].



**Abb. 4: Struktur und Metabolismus von n-6 und n-3 PUFAs [CALDER, 2005]**

Die Aufnahmeempfehlungen für Polyenfettsäuren belaufen sich derzeit auf einen Anteil von 3,5% an der Gesamtenergieaufnahme, mindestens 3% (10g) Linolsäure und mindestens 0,5% (1g) n-3-Fettsäuren. Das Verhältnis n-6 zu n-3 Fettsäuren sollte 5:1 bis 15:1 betragen [BIESALSKI et al., 2004]. Die Empfehlungen könnten durch zweimaligen Fischverzehr pro Woche leicht erreicht werden. Dies wäre vor allem bei Kindern, Schwangeren und älteren Personen, den sogenannten Risikogruppen besonders wichtig.

## **2.1.3.2. Eicosanoide**

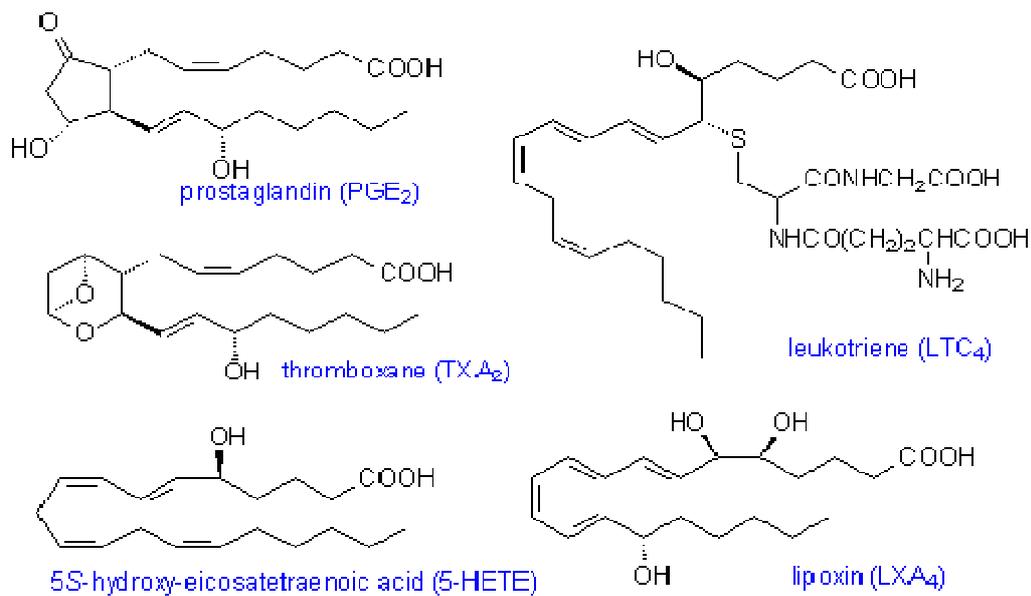
### **2.1.3.2.1. Definition**

Eicosanoide sind Derivate mehrfach ungesättigter C20 Fettsäuren, die durch Oxygenasen gebildet werden. Sie sind Mediatoren und Gewebshormone die in Entzündungsvorgänge im Körper involviert sind. Sie können von jeder Zelle produziert werden und sind beteiligt an Prozessen wie Fieber, Allergie, Entzündung und Schmerz.

Die einzelnen Vertreter der Eicosanoide lassen sich in unterschiedliche Substanzgruppen unterteilen:

1. Prostaglandine: Sie regulieren Muskelkontraktion, Immunantwort und Entzündungen.
2. Prostacycline: Sie hemmen die Blutplättchenaggregation.
3. Thromboxane: Sie verursachen eine Blutplättchenaggregation.
4. Leukotriene: Sie beeinflussen die mikrovaskuläre und bronchiale Konstriktion und Dilatation.
5. Hydroxyfettsäuren: Sie regulieren die Zelladhäsion.

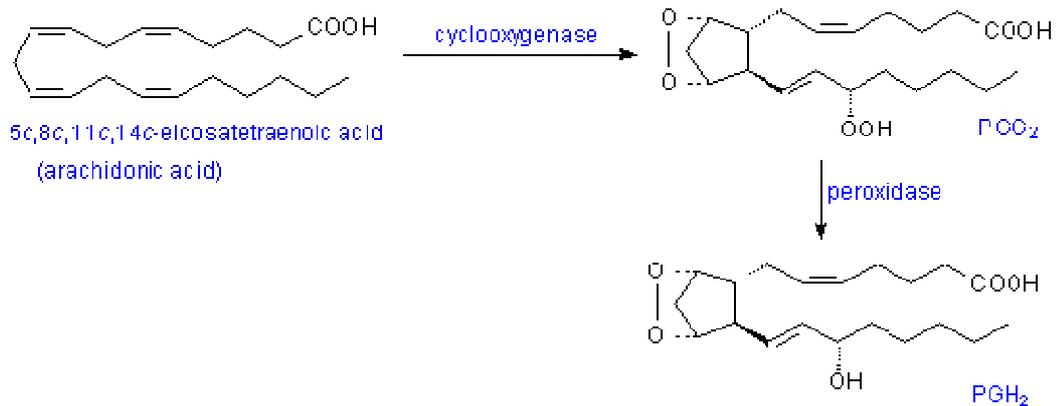
Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane werden über den Cyklooxygenaseweg synthetisiert; Leukotriene und Hydroxyfettsäuren werden durch die Lipoxygenase gebildet [LUNN und THEOBALD, 2006].



**Abb. 5: Beispiele für die einzelnen Eicosanoidgruppen [CHRISTIE, 2009]**

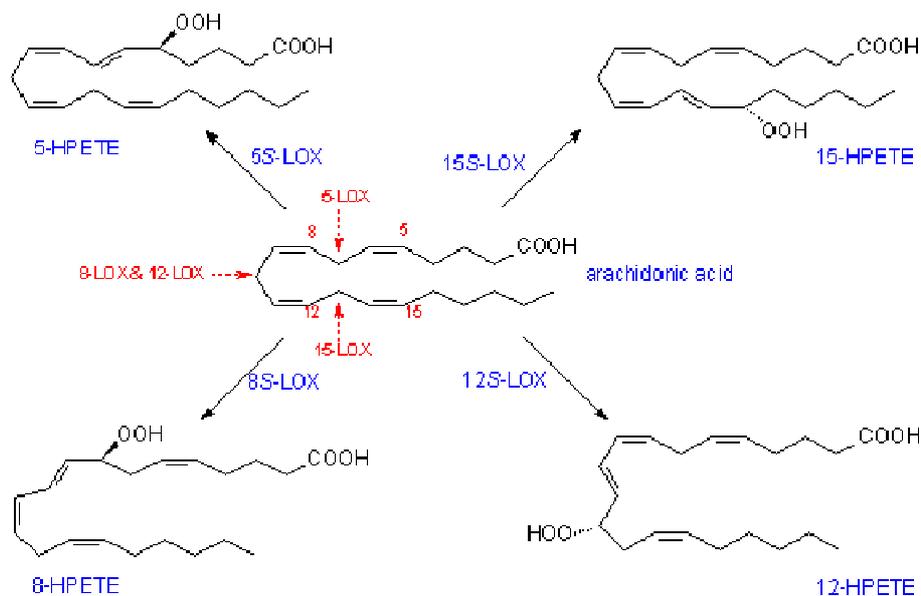
### 2.1.3.2.2. Synthese

Die Eicosanoide stellen eine Verbindung her zwischen mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Entzündungsvorgängen im Körper. Diese Entzündungsmediatoren werden synthetisiert aus C20-Carbonsäuren, PUFAs die aus den Phospholipiden der Zellmembranen durch die Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzt werden und anschließend als Enzymsubstrat dienen. Die an Entzündungen beteiligten Zellen (z.B. Makrophagen) enthalten typischerweise hohe Mengen an n-6 und geringe Mengen an n-3 Polyenfettsäuren, insbesondere EPA in ihren Zellwänden, weshalb die Arachidonsäure dominierende Substrat für die Eicosanoidsynthese ist [CALDER, 2005].



**Abb. 6: Synthese von Prostaglandinen durch die Cyclooxygenase und Peroxidase [Christie, 2009]**

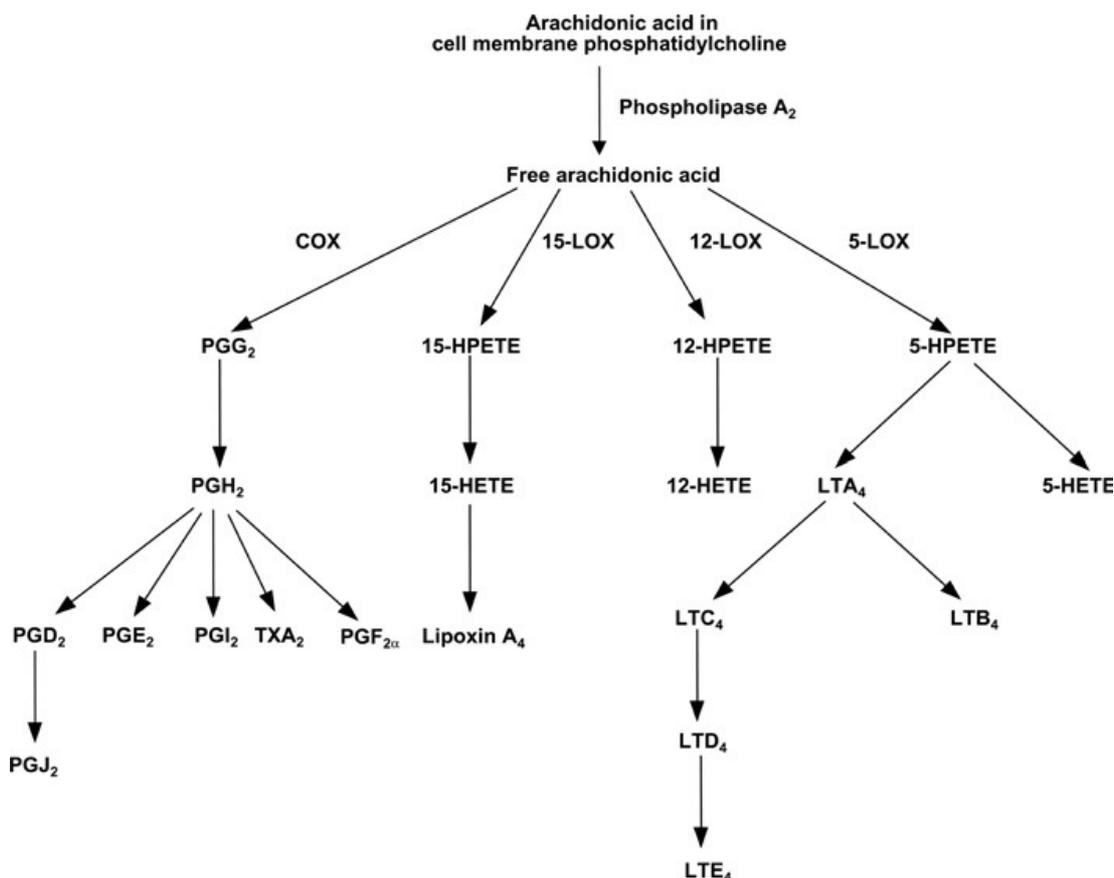
Die Gruppe der Arachidonsäure abstammenden Eicosanoide beinhaltet zum einen die Serie-2 Prostaglandine und Thromboxane, oxygenierte, cyclische Derivate die über den Cyclooxygenase-Weg synthetisiert werden und zum anderen die Serie-4 Leukotriene, Lipoxine und 5-Hydroxyfettsäuren oxygenierte, acyclische Produkte die über den Lipoxygenase-Weg entstehen [KINSELLA et al., 1990].



**Abb. 7: Synthese von Hydroxyfettsäuren durch die Lipoxygenase [CHRISTIE, 2009]**

Es gibt 2 Isoenzyme der Cyclooxygenase: COX 1 und COX 2. COX 1 ist ein konstitutives Enzym das von den meisten Zelltypen gebildet wird, COX 2 ist hingegen ein induzierbares Enzym, als Teil der entzündlichen Immunantwort [HARDMAN, 2004].

Durch vermehrte Aufnahme von Eicosapentaensäure über die Nahrung steigt auch ihr Gehalt in den Phospholipiden der Zellmembranen und sie wird vermehrt für die Eicosanoidsynthese herangezogen. Die Serie-2 Prostaglandine, die durch die Cyclooxygenase aus der Arachidonsäure gebildet werden, wirken stärker proinflammatorisch und proliferativ in den Geweben, als die Serie-3 Prostaglandine, die aus der EPA gebildet werden, welche geringere wirksame Entzündungsmediatoren darstellen [CALDER, 2001<sup>b</sup>].



**Abb. 8: Arachidonsäureabstammende Eicosanoidsynthese [CALDER, 2005]**

Eicosapentaensäure hemmt kompetitiv die Synthese von Eicosanoiden aus der Arachidonsäure, da auch sie als Substrat für die Cyclooxygenase und Lipooxygenase von Entzündungszellen herangezogen wird. Dies führt zur Bildung einer anderen Familie von Eicosanoiden, die wesentlich geringere Wirkung aufweisen, den Serie-3 Prostaglandinen und Thromboxanen, und den Serie-5 Leukotrienen und Hydroxy-Eicosapentaensäuren. So ist LTB<sub>5</sub> ein um 10 – 100-mal weniger potentes neutrophiles chemotaktisches Agens als LTB<sub>4</sub> [CALDER, 2005].

Diese durch n-3 PUFAs verursachte Abschwächung von Entzündungserscheinungen steht momentan im Mittelpunkt des Interesses, als neue Möglichkeit zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen. [LUNN und THEOBALD, 2006]

### **2.1.3.3. Polyenfettsäuren und die Gesundheit**

#### **2.1.3.3.1. PUFAs und Blutfette**

Der wohl am meisten propagierte gesundheitsfördernde Effekt von n-3 PUFAs ist ihre Wirkung auf die Blutlipide. Eine Supplementierung mit Fischöl, das reich an EPA und DHA ist, führte in einer Vielzahl von Studien zu positiven Veränderungen der Blutfettwerte. Ein Anstieg der Plasma-DHA korrelierte negativ mit den Plasma-Triglyceriden, Gesamtcholesterin und LDL-C sanken. HDL-C hingegen stieg mit höheren Fischölgaben an [MILTE et al., 2008; HARRIS, 2004].

Hohe Plasmakonzentrationen an Triglyceriden, Gesamt und LDL-Cholesterin, sowie erniedrigtes HDL-Cholesterin sind anerkannte Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

### **2.1.3.3.2. PUFAs und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine Folge zweier miteinander verbundener pathologischer Prozesse: Atherosklerose (Verhärtung und Verengung von Blutgefäßen) und Thrombose (Blutgerinnung). Atherosklerose ist charakterisiert durch die Akkumulation von Fetten in den Blutgefäßwänden. Dies führt zu gestörtem Blutfluss und damit verbunden zu vermindertem Sauerstofftransport zum Herzen und Angina pectoris (Brustschmerzen). Zu einem Herzinfarkt kommt es durch eine Blockade in der Koronararterie in Folge einer Ruptur von atherosklerotischem Plaque im arteriellen Lumen [LUNN und THEOBALD, 2006].

Eine große Zahl epidemiologischer Studien berichtet von einer negativen Korrelation zwischen der Aufnahme an LC n-3 PUFAs und dem Risiko für koronare Herzerkrankungen. So wird auch ein hoher Fischkonsum, reich an EPA und DHA, assoziiert mit einem verminderten Risiko für KHK und dadurch verursachten Todesfällen. Dies soll über eine Vielzahl von Mechanismen geschehen, wie Modifizierung der Blutlipidwerte und Ersatz der Arachidonsäure in den Phospholipiden von Membranen durch EPA und DHA, was zur Synthese von Eicosanoiden geringerer biologischer Wirksamkeit führt. Von der EPA abstammende Eicosanoide wirken im Gegensatz zu jenen die aus der Arachidonsäure entstehen eher antiaggregatorisch und vasodilatatorisch, wodurch Blutplättchen- und Leukozytenaggregation in den Blutgefäßen vermieden werden. Dies kann die Atherogenese und Thrombosenbildung hemmen und unterbinden [KINSELLA et al., 1990].

Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wirken bereits bei der Entstehung KHK präventiv. Mit steigendem Blutdruck steigt auch das Risiko für KHK und Schlaganfälle, PUFAs sind nachweislich in der Lage diesen bei Menschen die an Hypertension leiden signifikant zu senken [GELEIJNSE et al., 2002].

Es ist wissenschaftlich bestätigt, dass eine ausreichende Aufnahme an n-3 PUFAs die Endothelfunktion verbessert. Endotheliale Dysfunktion ist ein Faktor für die Progression koronarer Erkrankungen und eines der ersten Anzeichen für

die Entstehung von Atherosklerose. Es kommt zu veränderter Permeabilität und Leukozytenadhäsion am Endothelium, erhöhter Thrombenbildung und verminderter Fibrinolyse. Dies geschieht durch eine Verletzung des Endothels, die durch Hypertension hervorgerufen werden kann, aber auch durch Hypercholesterinämie, Diabetes Mellitus und Monozytenadhäsion an die Gefäßwand [LUNN und THEOBALD, 2006].

N-3 PUFAs haben nachweislich positive Effekte auf die Endothelfunktion, was bei Patienten die bereits an KVE litten ausgeprägter feststellbar war, als bei Personen in präklinischen Stadien. Positive Effekte auf die Widerstandsfähigkeit der Gefäßwände, einschließlich einer Verbesserung der endothelialen Funktion zeigten sich durch bestimmte Marker [HJERKINN et al., 2005].

Atherosklerose ist ein weiterer Schlüsselprozess in der Entstehung KHK und wird durch die Akkumulation von Fetten in den Wänden von Blutgefäßen charakterisiert. Es ist auch eine Konsequenz persistierender Entzündungen. N-3 PUFAs sind in der Lage die Progression von Atherosklerose zu reduzieren, zum einen durch Synthese schwächer wirksamer Eicosanoide und zum anderen durch Einbau der Fettsäuren in den atherosklerotischen Plaque, wodurch dessen Stabilität positiv beeinflusst wird [LUNN und THEOBALD, 2006].

#### **2.1.3.3.3. PUFAs und Entzündungen**

Entzündungen sind nicht spezifische Antworten des Immunsystems auf Gewebszerstörung. Ihr Auftreten ist ein Schutz vor ihrer weiträumigen Ausdehnung, also in gewissem Ausmaß eine wünschenswerte Reaktion. Eine übertriebene, fehlgeleitete oder langfristige Immunreaktion kann jedoch zu übermäßiger Gewebszerstörung und chronischen Erkrankungen führen. Hierzu zählt eine Vielzahl inflammatorischer Krankheiten wie Asthma, Morbus Crohn und Arthritis, deren Symptome durch Ernährungsmodifikation gemildert werden können [LUNN und THEOBALD, 2006].

Langkettige n-3 Fettsäuren aus der Nahrung senken die Produktion inflammatorischer Cytokine und Eicosanoide. Sie wirken auf zwei Arten, direkt durch Ersatz der Arachidonsäure als Substrat für die Eicosanoidsynthese und Inhibierung des Arachidonsäuremetabolismus und indirekt durch Abwandlung der Expression von inflammatorischen Genen, durch Einwirkung auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren [CALDER, 2004].

#### **2.1.3.3.4. PUFAs und rheumatoide Arthritis**

Rheumatoide Arthritis ist ein Entzündungszustand der auftritt, wenn das Immunsystem beginnt die Gelenkswände an Knorpeln zu zerstören [LUNN und THEOBALD, 2006].

N-3 Fettsäuren sind in der Lage bei Personen die an rheumatoider Arthritis leiden eine Symptomlinderung zu bewirken, da sie anti-inflammatorische Eigenschaften besitzen. Diese sind darauf zurückzuführen, dass die EPA die Wirkung der Arachidonsäure im Hinblick auf die Eicosanoidsynthese kompetitiv zu hemmen vermag. Wird diese vermehrt über die Nahrung aufgenommen, sinkt der Gehalt an Arachidonsäure in den Membranphospholipiden zu Gunsten der EPA. Da diese zur Bildung von Eicosanoiden mit geringerer biologischer Wirkung führt, kommt es zu einer Abschwächung der Entzündungssymptome bei rheumatoider Arthritis. Auch die DHA scheint eine ähnlich antiinflammatorische Wirkung zu besitzen, nicht direkt, doch senkt sie offenbar die Freisetzung der Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden, über eine Verringerung der Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub>. Als Resultat werden Entzündungssymptome vermindert und das Fortschreiten einer chronischen Entzündung verlangsamt [STEPHENSON, 2004].

### **2.1.3.3.5. PUFAs und Krebs**

Entstehung und Verlauf verschiedener Krebsarten können durch Ernährung und Lebenswandel beeinflusst werden. Eine hohe Fettaufnahme, insbesondere an gesättigten und Transfettsäuren, wird häufig mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht. Industriestaaten mit vergleichsweise hohem Fettkonsum weisen eine höhere Krebsinzidenz auf als Länder mit geringerer Gesamtfettaufnahme und höherem Verzehr von ungesättigten Fettsäuren. Einzelne Fettsäuren sind in der Lage präventiv auf die Krebsentstehung zu wirken, sie inhibieren die Progression von Krebs oder töten Krebszellen direkt ab, was bisher jedoch nur in in vitro Studien nachgewiesen werden konnte. Andere wiederum können die Karzinogenese fördern [LUNN und THEOBALD, 2006].

Von der Arachidonsäure abstammende Serie-2 Prostaglandine wirken fördernd auf die Zellproliferation, auch in Bezug auf Krebszellen, wohingegen die aus EPA synthetisierten Serie-3 Prostaglandine geringere Wirkung auf Zellentwicklung und -wachstum haben [HARDMAN, 2004].

Arachidonsäure fördert das Zellwachstum durch Aktivierung der Proteinkinase C, welche die Mitose stimuliert; nicht so die n-3 PUFAs, sie senken zusätzlich die Aktivität onkogener Transkriptionsfaktoren und hemmen, über multiple Mechanismen, die Angiogenese, einschließlich der Prostaglandinsynthese und der Inhibierung der Proteinkinase C. Dies führt dazu, dass wachsende Tumore nicht mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden können. Im Tierversuch waren hohe Gaben von EPA in der Lage das Tumorwachstum verschiedener Krebsarten zu hemmen [HARDMAN, 2004].

### **2.1.3.3.6. PUFAs und mentale Gesundheit**

Das Trockengewicht des Säugerhirns besteht zu ungefähr 80% aus Fett, das wiederum 15 - 30% langkettige PUFAs enthält. Sie sind Bestandteile von Zellmembranen und haben Transmitter- und Rezeptorfunktionen. Besonders wichtig für die Gehirnentwicklung sind EPA, DHA und Arachidonsäure, als

Bestandteile von Phospholipiden und Cholesterolestern, zum Aufbau neuronaler Zellmembranen. Kommt es zu einem Mangel dieser Fettsäuren, werden sie durch andere ersetzt, was zu einer Änderung der Phospholipidmoleküle führt, dies beeinflusst die Tertiär- und Quartärstruktur membrangebundener Rezeptoren und die damit assoziierten Neurotransmitter. Auch Signalsysteme von Zellen werden durch von Lipiden abstammende Produkte reguliert, zum Beispiel Acylglycerole, Eicosanoide (z.B.: PG, LT), freie Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren, die aus den Phospholipiden der Zellwände abstammen [HALLAHAN und GARLAND, 2005].

Auch liegt epidemiologische Evidenz vor, für einen Zusammenhang zwischen Fischkonsum und der Inzidenzrate verschiedener psychischer Erkrankungen, einschließlich Depression, postnatale Depression, manische Depression und Schizophrenie [CLAYTON et al., 2007].

Vor allem n-3 PUFA stehen aufgrund der zuvor genannten Erkenntnisse im Mittelpunkt der Forschung, um positive Effekte einer mit ihnen angereicherten Ernährung auf psychische Erkrankungen zu finden.

#### **2.1.3.3.6.1. Depression**

Eine Studie über den Zusammenhang zwischen Fischkonsum und dem Auftreten von Depression in verschiedenen Staaten kam zu dem Schluss, dass die Rate an depressiven Personen in einem Land stark negativ korreliert mit dem dortigen Fischkonsum. Klinische Studien zeigten, dass Personen die an Depressionen leiden erniedrigte Konzentrationen an PUFAs in den Phospholipiden der roten Blutkörperchen aufwiesen. Dies betraf vor allem die DHA. Eine Supplementierung mit langkettigen PUFAs in randomisierten Kontrollstudien führte zumeist zu einer Verbesserung der Symptome [HALLAHAN und GARLAND, 2005].

Auch sind erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine im Gehirn wahrscheinlich in die Ätiologie von Depression involviert. Höhere

Konzentrationen an n-3 PUFAs führen zu einer Senkung der Zytokinproduktion durch Veränderung des TNF- $\alpha$ -Rezeptors, wodurch sich eine weitere mögliche therapeutische Wirkung bei dieser Erkrankung ergibt [CLAYTON et al., 2007].

#### **2.1.3.3.6.2. Manische Depression**

Der Gehalt an DHA in der Erythrocytenmembran ist bei Personen die an manischer Depression leiden, im Vergleich mit gesunden Personen, extrem niedrig.

Eine EPA und DHA Supplementierung wird assoziiert mit erhöhter Membranfluidität bei Patienten mit manischer Depression. Daher wird vermutet, dass ein verminderter Membrangehalt an diesen Fettsäuren in Zusammenhang steht mit generell gedämpfter Signaltransduktion, betreffend Phosphatidylinositol, Arachidonsäure und anderen Systemen. Auch inhibieren hohe Konzentrationen an EPA und DHA die Aktivität der Proteinkinase C, ähnlich der Wirkung von Lithium und Valporat, der bei dieser Krankheit verschriebenen Medikation. Häufig wird bei manischer Depression eine Supplementierung mit LC n-3 PUFAs empfohlen.

Hohe Dosen an LC n-3 Fettsäuren sind laut Studien in der Lage die Remissionsphasen bei Patienten mit manischer Depression zu verlängern und führten zu deutlichen Verbesserungen der depressiven, nicht aber der manischen Symptomatik. Aus diesen Ergebnissen schließt man, dass depressive Symptome besser auf eine Supplementierung ansprechen als manische [CLAYTON et al., 2007].

#### **2.1.3.3.6.3. Alzheimer**

Die Alzheimer Krankheit ist die häufigste Form von Demenz. Sie ist eine neurodegenerative Erkrankung, klinisch charakterisiert durch progressive und irreversible kognitive Defizite und Verhaltensänderungen, die Gedächtnis und Lernfähigkeit, sowie alltägliche Aktivitäten und Lebensqualität bereits in frühen

Krankheitsstadien stark negativ beeinflussen. Mehrere Studien geben Hinweise darauf, dass vor allem die LC PUFAs EPA und DHA in der Prävention und Behandlung von Alzheimer therapeutische Wirkungen haben [VAN DER BEEK und KAMPHIUS, 2008; BOUDRAULT et al. 2009].

Alzheimer ist assoziiert mit progressivem Verlust an Neuronen und Synapsen. Die Plasmalevel von n-3 Fettsäuren korrelieren direkt mit kognitiver Funktion und sind in Alzheimerpatienten erniedrigt. Auch gibt es Hinweise, dass n-3 PUFAs in der Lage sind die Verfügbarkeit von Nährstoffen im Gehirn durch Beeinflussung vaskulärer Komponenten zu verbessern. Studien belegen eine Verbesserung der Blutversorgung zum Gehirn, der Instandhaltung der Blut-Hirn-Schranke und erhöhte Transporteffizienz [BOUDRAULT et al. 2009].

Das Gehirn ist sehr reich an PUFAs, besonders n-3 Fettsäuren. Ein hohes n-6:n-3 Verhältnis wird hier assoziiert mit geringerer Insulinsensitivität und Diabetes Mellitus Typ II. Ein Mechanismus der eine hohe Aufnahme an Gesamtfett und gesättigten Fettsäuren mit kognitiver Beeinträchtigung und Demenz in Verbindung bringt, könnte somit die Entwicklung einer Insulinresistenz sein. Alzheimerpatienten weisen eine verringerte Expression von Insulinrezeptoren im Gehirn und ernährungsinduzierte Insulinresistenz auf, was zu neurodegenerativen Prozessen führen kann.

PUFAs wie EPA und DHA, sowie ihre Vorstufe die  $\alpha$ -Linolensäure, sind strukturelle Bestandteile von Phospholipiden welche die primären Bestandteile neuronaler Membranen sind. Veränderungen in den Gehirnlipiden durch Erhöhung oder Senkung der Synthese oder des Metabolismus können in einer homöostatischen Fehlregulation und eventuell Neurodegeneration resultieren. N-3 und n-6 Fettsäuren beeinflussen Membranfunktion und -fluidität positiv, während gesättigte Fettsäuren, wenn sie in Neuronenmembranen akkumulieren, deren Steifheit und Dicke erhöhen können.

Gehirne von Alzheimerpatienten weisen veränderte Fettsäurezusammensetzungen in den Phospholipiden auf. Dazu zählen verringerte Mengen an DHA und Arachidonsäure. Zusätzlich enthalten sie

weniger und kleinere Synapsen und weisen verminderte Level an Membranphosphatiden und synaptischen Proteinen auf. Gleichzeitig sind die Konzentrationen an Phosphatidspaltprodukten erhöht und der Cholingehalt vermindert sind [VAN DER BEEK und KAMPHIUS, 2008].

DHA ist besonders wichtig für die Gehirnentwicklung und Plastizität, und unterstützt Prozesse des Lernens und Erinnerns im Tiermodell der Alzheimer Krankheit. DHA kann auf die Funktion von Neuronen einwirken, durch Förderung der synaptischen Membranfluidität und deren Funktion, Regulation der Genexpression und Verbesserung der Zellkommunikation. DHA führt im Tierversuch zu signifikant höherer Lernfähigkeit, dies wurde begleitet von erhöhten Werten von BDNF (pro-brain-derived neurotrophic factor) und dem synaptischen Protein CREB (cAMP response element binding protein). BDNF wird im Gehirn synthetisiert und ist positiv assoziiert mit kognitiver Funktion, und eine verminderte Synthese steht scheinbar im Zusammenhang mit präklinischen Stadien von Alzheimer. CREB und das Protein Synapsin I werden beide im Hippocampus gebildet und durch DHA erhöht, sie sind involviert in Lernen und Erinnern. Diese Wirkungen einer Supplementierung mit DHA werden durch körperliche Aktivität noch verstärkt [WU et al., 2008].

Auch wird Alzheimer in Zusammenhang gebracht mit einer Überproduktion und Akkumulation von  $\beta$ -Amyloid im Gehirn wodurch es letztendlich zu einem Verlust an Neuronenzellen kommt. Zusätzlich wirken auch entzündliche Prozesse bei der Progression der Erkrankung mit. Ratten denen EPA zugefüttert wurde, wiesen geringere Konzentrationen an Cytokinen und  $\beta$ -Amyloid auf.

Auch Zellkulturen, verschiedener Neuronenzellen, wiesen nach einer Behandlung mit DHA deutlich geringere Konzentrationen an  $\beta$ -Amyloid auf, Apoptoseraten und  $\alpha$ -marker sanken und die Zellen zeigten eine höhere Lebensfähigkeit [BOUDRAULT et al., 2009].

Der Zusammenhang zwischen Alzheimer und möglichen Wirkungen von n-3 PUFAs in dessen Therapie ist längst noch nicht gänzlich geklärt, jedoch sind Ergebnisse aus Zell- und Tierstudien äußerst vielversprechend.

### **2.1.3.3.7. PUFAs und Osteoporose**

Osteoporose ist eine systematische Knochenkrankheit, charakterisiert durch eine geschwächte, gebrechliche Knochenmasse, die Patienten für ein hohes Risiko einen Knochenbruch zu erleiden prädisponiert [SALARI et al., 2008].

Mehrere Studien stützen die Theorie, dass PUFAs den Knochenmetabolismus beeinflussen. Ein hoher n-6 zu n-3 Fettsäure-Quotient wird assoziiert mit nachteiligen Effekten auf die Knochengesundheit, während ein niedriger Quotient mit gesunden Knocheneigenschaften in Verbindung zu stehen scheint. Ansteigende Quotienten von n-6 zu n-3 Fettsäuren sind signifikant assoziiert mit niedrigerer Knochenmineraliendichte [WEISS et al., 2005].

Tierstudien zeigen, dass die Aufnahme von n-3 PUFAs beides beeinflusst, die Knochenneubildung und den Knochenabbau, durch Inhibierung der Osteoklasten- und Förderung der Osteoblastenaktivität [GRIEL et al., 2007].

Eine Studie an Osteoporosepatienten führte durch eine hohe Aufnahme an Fischöl zu einer Erhöhung der Calciumabsorption und Stimulierung der Osteoblastenaktivität;. Festgestellt wurde dies über einen Anstieg von Osteocalcin und Prokollagen, als Marker für eine Knochenneubildung [SALARI et al., 2008].

Effekte von n-3 Fettsäuren auf die Knochengesundheit sind facettenreich. Vermutete Mechanismen betreffen Effekte auf die Kalziumabsorption im Darm, Verringerung des Knochenabbaus aufgrund geringerer Kalziumausscheidung über die Nieren und erhöhter Bildung von Knochenkollagen. Auch sind n-3 PUFAs Kandidaten für eine Inhibierung der Produktion einiger Cytokine, wie IL 6, IL 1 und TNF- $\alpha$ , welche impliziert sind in die Pathogenese von Osteoporose, sowie Änderungen in der Prostaglandinsynthese [HÖGSTRÖM et al., 2007].

Die n-6 Fettsäure Arachidonsäure ist eine Vorstufe von PGE<sub>2</sub>, das in der Osteoblastenzelle gebildet wird, während die n-3 Fettsäure EPA eine Vorstufe für das geringer wirksame PGE<sub>3</sub> ist, beide sind essentiell für den Knochenstoffwechsel. PGE<sub>2</sub> weist hier zweierlei Wirkung auf, in geringen Konzentrationen fördert es die Knochenbildung, während hohe sie hemmen. Durch eine erhöhte EPA-Aufnahme über die Nahrung wird diese vermehrt in die Zellwände der Osteoblasten eingebaut, auf Kosten der Arachidonsäure, wodurch mehr geringer wirksames PGE<sub>3</sub> und weniger PGE<sub>2</sub> gebildet wird [MOLLARD et al., 2005].

N-Telopeptide (NTx) und die knochenspezifische alkaline Phosphatase (BSAP) sind Indikatoren für Knochenabbau und –aufbau. Eine Studie ergab, dass hohe Konzentrationen von PUFAs zu einer Senkung von NTx und zu gleichbleibenden Konzentrationen von BSAP im Plasma führen. Vor allem die Senkung von NTx ist ein Zeichen für eine Reduktion des Knochenumsatzes und eine gleichzeitige Erhöhung der Knochenneubildung. Auch korrelieren die Plasmakonzentrationen von NTx mit denen des TNF- $\alpha$ , welcher den Knochenabbau durch die Osteoklasten fördert und in vitro die Kollagensynthese im Knochen inhibiert. Hohe Konzentrationen an TNF- $\alpha$  führen außerdem zu einem Anstieg der Zahl an zirkulierenden Präosteoklasten und erhöhen den Plasmakalziumspiegel [GRIEL et al., 2007].

## 2.2. Vitamin E

Vitamin E ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von Verbindungen, die fettlöslich und antioxidativ wirksam sind. Dazu zählen je vier Tocopherole und Tocotrienole von  $\alpha$  –  $\delta$ , wobei die  $\alpha$ -Form jeweils die biologisch aktivste ist, sowie  $\alpha$ -Tocomonoenol und das erst kürzlich entdeckte MDT (Marine derived Tocomonoenol). Auch bei der Gruppe der Tocomonoenole ist anzunehmen, dass vier natürliche Isomere,  $\alpha$  -  $\delta$ , in der Natur vorkommen. Ein weiteres, das  $\delta$ -Tocomonoenol konnte bereits in Kiwifrüchten nachgewiesen werden. [FIORENTINO et al., 2009]

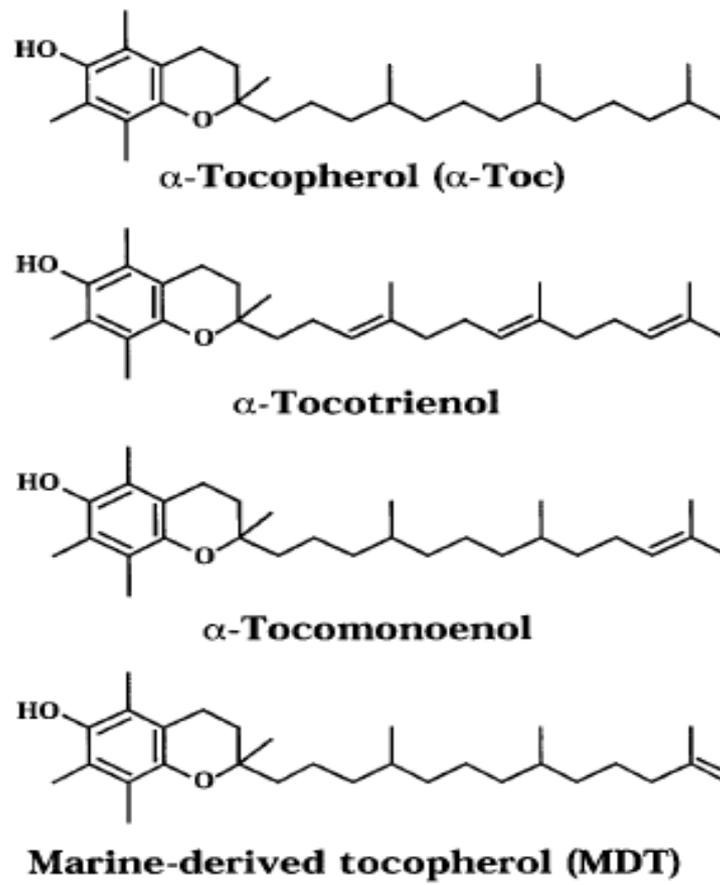
Vitamin E ist das bedeutendste fettlösliche Antioxidans in Tieren und Pflanzen, speziell zum Schutz vor Lipidperoxidation biologischer Membranen und von Lipoproteinen, allerdings wird es nur von photosynthetisch aktiven Organismen wie Pflanzen und Cyanobakterien gebildet [YAMAMOTO et al., 2001].

Die Grundstruktur aller Vitamin E-Formen bildet ein Chromanring der an Position 6 hydroxyliert ist, durch dessen Methylierungsgrad die Vitamere unterteilt werden in eine  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Form. Durch unterschiedlichen Sättigungsgrad der Phytolseitenkette werden wieder drei Familien unterschieden:

- Die Tocopherole sind charakterisiert durch eine gesättigte Phytolseitenkette.
- Tocomonoenole und das marine Tocomonoenol (MDT) besitzen eine einfach ungesättigte Seitenkette.
- Tocotrienole sind gekennzeichnet durch ihre dreifach ungesättigte Seitenkette [PUAH et al., 2007].

Vitamin E hat neben seiner Hauptaufgabe als Oxidationsschutz eine Vielzahl weiterer Funktionen im Körper wie die Regulation der Hämsynthese, Zellproliferation, Modulation in der Immunantwort, Genregulation, Schutz von selenhaltigen Proteinen und Beteiligung in der Elektronentransportkette [Mourente et al., 2007].

Zellproliferation und -differenzierung, wie auch Apoptose sind wichtige zelluläre Regulationsprozesse, die gut kontrolliert ablaufen. Die Proteinkinase C ist ein Schlüsselenzym, das involviert ist in die Regulation von Zellwachstum und -differenzierung, das durch  $\alpha$ -Tocopherol inhibiert wird. Dies führt je nach Zelltyp zu unterschiedlichen positiven Effekten, wie Hemmung der Blutplättchenaggregation, verminderter endothelialer Stickoxid- und Superoxidbildung in Neutrophilen und Makrophagen [TRABER und ATKINSON, 2007].



**Abb. 9: Chemische Strukturen der  $\alpha$ -Formen der Vitamin E-Vitamere [YAMAMOTO et al., 2001]**

Die antioxidative Wirkung der Vitamin E Isomere beruht auf ihrer Fähigkeit ihre phenolischen Wasserstoffatome an freie Radikale, zum Beispiel von Fettsäuren abzugeben, was in der Termination der Lipidperoxidationskettenreaktion resultiert [Gramlich et al., 2004; Mourente et al., 2007].

Aufgrund ihres lipophilen Charakters befinden sich Vitamin E-Formen immer in hydrophober Umgebung, wie in Fettdepots, fettspeichernden Organen und Zellmembranen. Aufgrund dieser bevorzugten Lokalisation erhält es seine Rolle als ein Antioxidans für ungesättigte Fettsäuren und als Membranstabilisierer. Es führt zu verbesserter Integrität von langkettigen PUFAs in den Zellmembranen und so zum Erhalt ihrer Bioaktivität [TRABER und ATKINSON, 2007].

Die membranstabilisierende Wirkung von Vitamin E beruht zum einen auf seiner antioxidativen Wirkung, da vermehrte Lipidperoxidation von Membranlipiden zu verminderter Fluidität, erhöhter Durchlässigkeit für Substanzen und Inaktivierung von membrangebundenen Proteinen führt und zum Anderen auf spezifischen Wechselwirkungen mit potentiell destabilisierend wirkenden Hydrolyseprodukten von Membranlipiden. Vitamin E komplexiert mit diesen Lysophospholipiden und freien Fettsäuren die aus den Membranlipiden freigesetzt wurden.

Wo genau in der Zellmembran Vitamin E lokalisiert ist konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass es sich in die Phospholipiddoppelschicht mit der Längsachse des Moleküls parallel zu den Carbonsäureresten anordnet. Das Molekül ist dadurch in der Lage um seine eigene Längsachse zu rotieren und so in die Zellmembran zu diffundieren. Das Vitamin verteilt sich nicht wahllos in der Membran, sondern bildet Komplexe definierter Stöchiometrie, so komplexiert  $\alpha$ -Tocopherol bevorzugt mit Phosphatidylethanolamin [WANG und QUINN, 1999].

Die Aufnahme von  $\alpha$ -Tocopherol in den Körper erfolgt beim Menschen über das  $\alpha$ -Tocopherol-Transport-Protein ( $\alpha$ -TTP), welches dieses Vitamer bevorzugt bindet, die anderen Formen werden nur in geringen Konzentrationen absorbiert. Defekte des menschlichen  $\alpha$ -TTP führen zu schwerem Vitamin E-Mangel, da es verantwortlich ist für die Aufrechterhaltung der Plasmaspiegel. Charakteristisch für einen schweren physiologischen Mangel ist eine periphere Neuropathie, charakterisiert durch ein Absterben von Axonen in den sensorischen Nerven [TRABER und ATKINSON, 2007].

### **2.2.1. $\alpha$ -Tocomonoenol marinen Ursprungs**

In Palmöl wurde bereits ein  $\alpha$ -Tocomonoenol entdeckt, das identifiziert wurde als ein Zwischenprodukt des reduktiven Syntheseweges von  $\alpha$ -Tocotrienol zu  $\alpha$ -Tocopherol in höheren Pflanzen.

Ein Isomer des  $\alpha$ -Tocomonoenols, das eine ungewöhnliche Methyldoppelbindung im Isopreneterminus aufweist, wurde in der Lipidfraktion von Seefischen aus arktischen Gewässern gefunden. Dieses zehnte bekannt gewordene Vitamin E-Isomer wurde als „Marine derived Tocomonoenol“ bezeichnet [YAMAYMOTO et al., 2001]. Beide Formen  $\alpha$ - und MD-Tocomonoenol konnten im menschlichen Plasma nachgewiesen werden [GOTOH et al., 2009].

Das Auftreten höherer MDT-Konzentrationen in Spezies die in kalten Gewässern leben und dessen höhere Aktivität bei niedrigen Temperaturen lässt vermuten, dass MDT als Antioxidans eine Adaptation an kalte Gewässer ist. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass MDT in tropischen Seefischen nur in geringsten Mengen gefunden werden konnte. Auch Zuchtfische enthielten in ihren Geweben weniger MDT als wildlebende Fische derselben Art [YAMAYMOTO et al., 2001].

Im Vergleich mit  $\alpha$ -Tocopherol zeigte MDT bei 0°C in Fischöl größere antioxidative Aktivität durch höhere Reaktivität mit Peroxylradikalen und schützte besser vor Oxidation von LDL-Cholesterin. Es scheint gesichert, dass diese höhere antioxidative Aktivität von MDT auf der molekularen Eigenschaft beruht, schneller in kalte, viskose Gewebe zu diffundieren als  $\alpha$ -Tocopherol. Diese Entdeckungen zeigen auf, dass die Synthese von MDT oder seine Anreicherung aus der Nahrungskette eine Anpassung mariner Kaltblütler sein dürfte, zur Reduktion der Lipidperoxidation in kalten Gewässern.

Das in Fisch nachgewiesene MDT kommt wohl aus der Nahrungskette, da weder das Tocomonoenolisomer aus dem Palmöl noch Tocotrienole in den Fischen nachgewiesen wurden. Auch Phytoplankton und Krill enthalten verhältnismäßig hohe Mengen an MDT, sie dienen vielen arktischen Fischarten als Nahrung, des weiteren wurde MDT in Zuchtfischen derselben Art in weit geringeren Konzentrationen nachgewiesen als in wild lebenden Artgenossen [DUNLAP et al., 2002].

## 2.2.2. Vitamin E und die Gesundheit

Die wohl wichtigste Aufgabe von Vitamin E besteht in seiner Rolle als Antioxidans, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften vor allem als Schutz von Zellmembranen und deren Fettsäuren. Ein klinischer Vitamin E Mangel äußert sich in Form von Störungen im Bereich der Muskulatur, der Fortpflanzung, des Nervensystems und des Gehirns, des kardiovaskulären Systems, der Erythrozyten und der Leber.

Moleküle die der Gruppe des Vitamin E angehören können sowohl prooxidativ wie auch antioxidativ wirken. In zu hohen Dosen ist  $\alpha$ -Tocopherol in der Lage zum Beispiel die Oxidation LDL-Cholesterin zu beschleunigen, *in vitro* und *in vivo*. Dieser prooxidative Effekt auf die Fettoxidation wird Tocopherol-medierte Peroxidation genannt. Empfohlen werden für Erwachsene Dosen von bis zu 20 mg Tocopheroläquivalente pro Tag, in der Regel werden jedoch Mengen bis zu 800 mg/Tag gut vertragen. Höhere Dosen führen zu gastrointestinalen Symptomen, Übelkeit und Erbrechen, Kopfschmerzen und Blutungen [SIEKMEIER et al., 2007].

### 2.2.2.1. Vitamin E und kardiovaskuläre Erkrankungen

Sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* Studien zeigen, dass oxidative Prozesse eine Rolle spielen, in der Pathogenese und Progression von Atherosklerose. Vor allem freie Radikale und oxLDL-Cholesterin besitzen einen stark atherogenen Effekt, weshalb angenommen wird, dass eine vermehrte Aufnahme von Antioxidantien in der Entstehung und Progression von Atherosklerose präventiv wirken könnten.

OxLDL wird von Makrophagen aufgenommen und führt zur Bildung von Schaumzellen, sie binden an das Endothel, es kommt zur Synthese von Wachstumsfaktoren und Cytokinen sowie zur Proliferation, Migration und Hypertrophy von Zellen. Der protektive Effekt von lipophilen Antioxidantien auf die LDL-Oxidation steht in Verbindung mit deren Fettlöslichkeit und ihrer Konzentration in der LDL-Fraktion [SIEKMEIER et al., 2007].

Ein weiterer Faktor in der Entstehung von Atherosklerose ist eine endotheliale Dysfunktion, sie ist eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen vasorelaxation, verursacht durch einen Verlust der Stickoxidaktivität in der Gefäßwand, was zu einer Beeinträchtigung der vaskulären Regulation führt. Hierfür verantwortlich ist ein beschleunigter Abbau von NO durch ROS. Durch eine Senkung der ROS-Konzentration mit Hilfe einer Antioxidantientherapie müsste diesem Vorgang entgegenzuwirken sein. Laut Studien ist  $\alpha$ -Tocopherol in der Lage durch eine Senkung des Plasmacholesterins die Endothelfunktion zu verbessern, in Bezug auf seine antioxidative Wirkung wurde keine Verbindung mit einer verbesserten Endothelfunktion gefunden [PARTHASARATY et al., 2008].

In vitro vermindert die Inkubation von Endothelzellen mit  $\alpha$ -Tocopherol die Monozytenadhäsion und führt so zu verbesserter Endothelfunktion. Auch die Entstehung von Thrombosen in Verbindung mit vaskulären atherosklerotischen Läsionen konnten in vitro durch  $\alpha$ -Tocopherol gesenkt werden, es kam zu verminderter Trombozytenadhäsion und -aggregation wie auch zu verminderter Freisetzung. Dies konnte auch in klinischen Studien beobachtet werden, verursacht durch eine Hemmung der Proteinkinase C [SIEKMEIER et al., 2007].

Auch blocken hohe Dosen an Vitamin in vitro die LDL-Oxidation, senken dessen Ablagerung in der Arterienwand [LANE DUVALL, 2005].

Derartig erfolgreiche in vitro Studien ließen vermuten, dass Vitamin E und andere Antioxidantien kardiovaskuläre Erkrankungen durch die Neutralisierung freier Radikale und eine dadurch verminderte Gewebszerstörung hemmen könnten. Auch kam es zu einer Verlangsamung der Bildung von atherosklerotischem Plaque, einer Hemmung der LDL-Oxidation und Modifikation der Trombozytenaggregation. Jedoch stützen nicht viele Tierversuche und Humanstudien diese Theorie [SESSO et al., 2008].

Im Tierversuch führte Vitamin E zu einer Senkung der Blutfette, geringen antiatherogenen Effekten und in Kombination mit anderen Antioxidantien, wie Vitamin C,  $\beta$ -Carotin und Selen kam es sogar zu einer leichten Inhibierung der

Progression von Atherosklerose. Dahingegen zeigten Studien am Menschen zumeist keinen signifikanten Effekt von Vitamin E auf die Prävention von Atherosklerose. Eine Metaanalyse von 9 Placebo-kontrollierten Studien zeigte zumindest einen geringen positiven Effekt von Vitamin E bei Personen mit Atherosklerose. [SIEKMEIER et al., 2007].

Auch wenn beobachtende Studien ergaben, dass Vitamin E assoziiert wird mit einer 20 – 40 prozentigen Reduktion von koronaren Herzerkrankungen, konnten diese Effekte in randomisierten Studien nicht gezeigt werden. Weshalb immer häufiger diskutiert wird ob nicht die Dauer einer Supplementierung erhöht werden müsse um positive Effekte nachweisen zu können [PARTHASARATY et al., 2008].

#### **2.2.2.2. Vitamin E und Krebs**

Tocopherole wie auch Tocotrienole sind aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften in der Lage als Radikalfänger zu wirken und so oxidativen Stress und die Zahl an freien Radikalen zu reduzieren, was in Folge zu einer Verringerung der Entstehung von Mutationen und so zu geringerer Krebsinzidenz führen kann.

Zellkulturstudien zeigten, dass vor allem Tocotrienole zusätzlich die Proliferation von Tumorzellen inhibieren können. Weiters sind sie in der Lage über mehrere Mechanismen die Angiogenese zu hemmen, die zur Neubildung von Blutgefäßen führt und so die Blutversorgung von Tumoren gewährleistet. Die neu gebildeten Gefäße fördern das Tumorwachstum, da sie Nährstoffe transportieren und Abfallprodukte abtransportieren. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Tocotrienole die Apoptose, bevorzugt in Tumorzellen induzieren. [MIYAZAWA et al., 2009]

### **2.2.2.3. Vitamin E und Alzheimer**

Die Pathologie von Alzheimer ist sehr komplex und neben genetischen Faktoren spielen auch ein defekter Metabolismus des  $\beta$ -Amyloid-Proteins, sowie inflammatorische, oxidative und hormonelle Vorgänge eine Rolle. Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion mit folglich ansteigenden Apoptoseraten spielen offenbar ebenfalls eine Rolle in der Entstehung und dem Fortschreiten dieser Erkrankung. Eine dauerhaft erhöhte Bildung von ROS ist eine mögliche Erklärung für die neuronale Degeneration bei Alzheimer.

Proteinoxidation spielt offenbar eine große Rolle in diesem Zusammenhang. Es wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Aktivität der Acetylcholinesterase durch  $\beta$ -Amyloid induziert wird und begründet ist durch oxidativen Stress, und dass Vitamin E in diesem Zusammenhang in der Lage ist die kognitive und die Gedächtnisfunktion aufrecht zu erhalten oder zu verbessern.

Eine 6 Jahre andauernde Studie kam zu dem Schluss, dass eine Supplementierung mit Antioxidantien, bzw. Vitamin C und E in Kombination mit einem geringeren Risiko für Alzheimer assoziiert ist [ASADA, 2007].

### **2.3. Einführung in die Chromatographie**

Die Chromatographie ist ein chemisch-physikalisches Trennverfahren, das sowohl präparativ als auch analytisch zur Auftrennung eines Stoffgemisches in seine einzelnen Substanzen genutzt wird. Nach der Trennung ist so der quantitative und qualitative Nachweis der Reinsubstanzen mit einfachen Methoden möglich. Vom Prinzip her sind alle chromatographischen Systeme gleich, sie bestehen aus einer stationären, ruhenden Phase über die eine mobile Phase hinweg strömt. Die aufzutrennenden Substanzen können sich in beiden Phasen aufhalten, ihre Trennung beruht auf ihren unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, die durch die verschiedenen großen Aufenthaltszeiten in der stationären Phase entstehen. Beim chromatographischen Prozess finden zahlreiche Adsorptions-, Desorptions- und Verteilungsvorgänge statt, die immer wieder zu einer neuen

Gleichgewichtseinstellung führen. Zwei Extremfälle sind hierbei zu berücksichtigen, so kann es vorkommen, dass Substanzen keinerlei Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen, sie werden nicht retardiert. Die Verbindungen wandern mit der mobilen Phase und es kommt zu keiner chromatographischen Trennung. Es ist auch möglich, dass Substanzen so stark an die stationäre Phase gebunden werden, dass sie von der mobilen Phase nicht weiter transportiert werden. Auswertbare chromatographische Trennungen finden zwischen diesen beiden Extremen statt, wichtig hierfür ist die Wahl entsprechender mobiler und stationärer Phasen [BÖCKER, 1997].

### **2.3.1. Einteilung chromatographischer Methoden**

Die mobile Phase kann ein Gas oder eine Flüssigkeit sein, ist sie gasförmig spricht man von Gaschromatographie, ist sie flüssig von Flüssigkeitschromatographie. Für die gaschromatographische Analyse kommen nur Substanzen in Frage die flüchtig sind oder bei höheren Temperaturen unzersetzt verdampfen, bei der Flüssigkeitschromatographie müssen sich die Probenkomponenten lediglich in der mobilen Phase lösen.

Eine weitere Möglichkeit der Einteilung ist nach dem Trennvorgang. So spricht man von Adsorptionschromatographie, wenn ein fester, aktiver Körper als stationäre Phase dient. Hier kommt es durch unterschiedlich starke Adsorptions- und Desorptionsprozesse zur Auftrennung der Probenbestandteile (z.B. Dünnschichtchromatographie). Wird eine Flüssigkeit auf einen inaktiven Träger aufgebracht, die sich nicht in der mobilen Phase löst, spricht man von Verteilungschromatographie (z.B. Gasflüssigkeitschromatographie), da sich die Probenmoleküle zwischen den Phasen verteilen. Die Retentionszeit ist umso höher, je stärker eine Substanz an die stationäre Phase bindet, da sie dadurch langsamer über die Trennstrecke transportiert wird [BÖCKER, 1997].

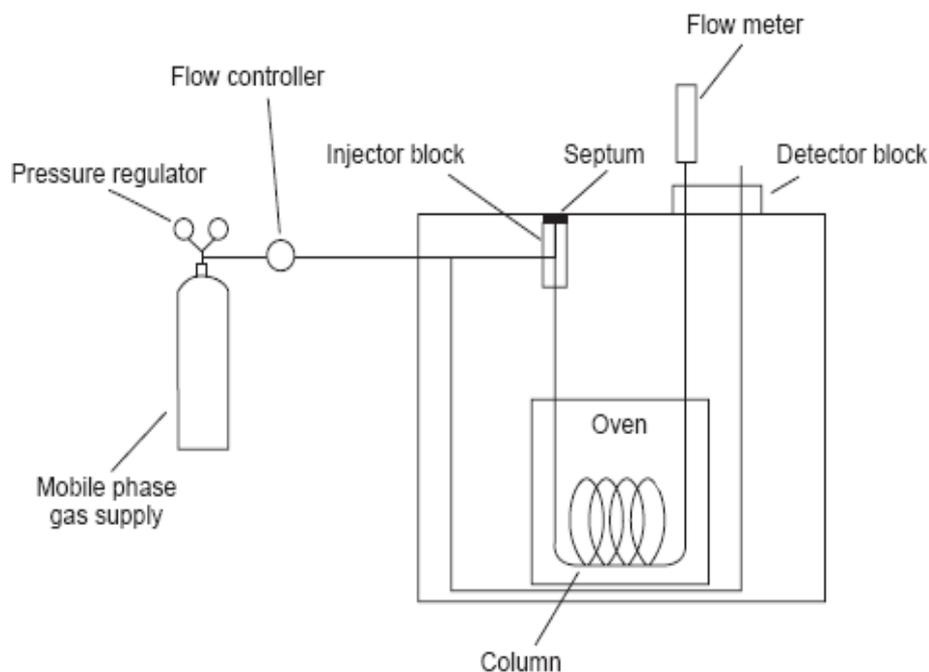
### **2.3.2. Einführung in die Gaschromatographie**

Die Gaschromatographie bzw. Gasflüssigkeitschromatographie ist eine Verteilungschromatographie, bei der die mobile Phase ein Gas ist und die stationäre eine Flüssigkeit. Eine Probe wird in die Gasphase injiziert wo sie sich verflüchtigt und wird durch das Gas über die an einer Säule befestigte, stationäre Phase transportiert; die einzelnen Verbindungen in der Probe verbringen unterschiedliche Zeit in der mobilen und stationären Phase, abhängig von ihrer relativen Affinität zur stationären Phase und sie eluieren am Ende der Säule in einen Detektor. Die Konzentrationen der verschiedenen Probenbestandteile sind durch unterschiedlich große Peaks entsprechend zu erkennen, idealerweise in Form einer Gauss'schen Glockenkurve [CHRISTIE, 2009].

#### **2.3.2.1. Die gaschromatographische Appatur**

Das Trägergas hat die Aufgabe, als mobile Phase, die in den Injektor eingespritzten und anschließend verdampften Substanzen durch das GC-System zu schleusen und dient als Gleichgewichtsmedium für Probenmoleküle zwischen der flüssigen und gasförmigen Phase und es beeinflusst die Trennleistung des gesamten Systems.

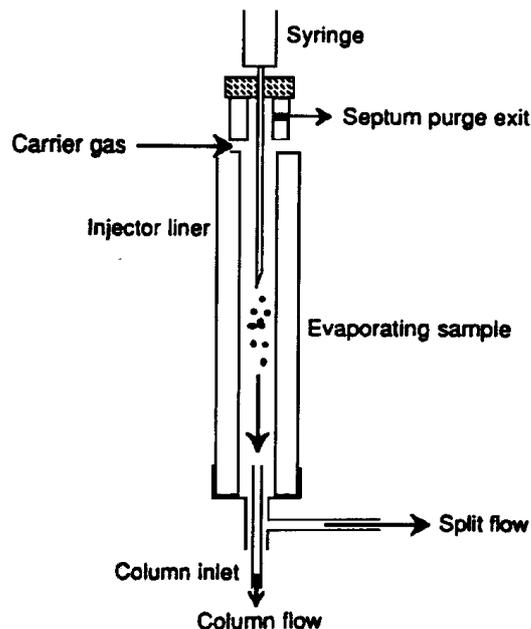
Um eine möglichst lineare Gasgeschwindigkeit im gesamten System aufrecht erhalten zu können, muss ein ausreichend hoher Arbeitsdruck eingestellt werden. Die lineare Gasgeschwindigkeit wird durch den inneren Durchmesser und die Länge der Säule, den Arbeitsdruck, das verwendete Trägergas und die Temperatur bestimmt. Ihre Einstellung erfolgt durch den Vordruck, der am Injektor manuell eingestellt wird, erhöht man diesen steigt damit auch die lineare Gasgeschwindigkeit [GOTTWALD, 1999].



**Abb. 10: Funktionsbild eines Gaschromatographen [HARVEY, 2000]**

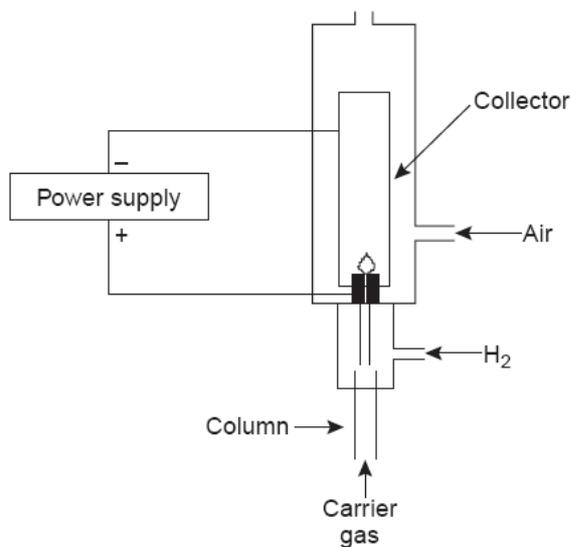
Kapillarsäulen sind nahezu universell einsetzbar und weisen hervorragende Trenneigenschaften auf, weshalb sie gepackte Säulen aus der Gaschromatographie weitgehend verdrängt haben. Verwendete Quarzkapillaren haben in der Regel eine Länge von 10 bis 100 m und einen Innendurchmesser von ca. 0,1 – 0,5 mm, die stationäre Phase ist als dünner Film an den Innenwänden aufgetragen. Durch den dazwischen liegenden Hohlraum kommt es auch bei großen Säulenlängen nur zu geringen Druckabfällen. Ein wesentlicher Vorteil solcher offener Kapillaren ist eine beträchtliche Verbesserung der Trennstufenhöhe. Die Trennsäule ist im Säulenofen aufgehängt. Dieser ist dafür verantwortlich, dass das eingestellte Temperaturprogramm mit hoher Genauigkeit gefahren wird. Dies ist besonders wichtig zur Gewährleistung einer guten Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten [BÖCKER, 1997].

Der Injektor sorgt für die Einschleusung der Probe in den Trägergasstrom. Splitinjektoren werden sehr häufig eingesetzt, da hierdurch schmale Peaks erreicht werden und keine unerwünschten Verunreinigungen in die Säule gelangen können. [GROB und BIEDERMANN, 2000].



**Abb. 11: Splitinjektor im Querschnitt [JENNINGS, 1997]**

Mehrere Detektortypen stehen zur Auswahl. Der FID ist ein nahezu universell einsetzbarer Detektor, dessen Funktionsprinzip darauf beruht, dass die elektrische Leitfähigkeit von Gasen der Konzentration der darin vorkommenden elektrisch geladenen Teilchen proportional ist. In einer Knallgasflamme verbrennen die im Trägergas enthaltenen organischen Verbindungen wodurch elektrisch geladene Teilchen entstehen. Die zylindrische Kollektorelektrode ist genau über der Flamme platziert, der Ionenstrom wird gemessen durch Aufbau eines Potentials zwischen der Düse und dem Kollektor. Der Ionenstrom wird zu einem Verstärker weitergeleitet, das Signal detektiert und als Peak aufgezeichnet [Christie, 2009].



**Abb. 12: Schematisches Abbildung eines Flammenionisationsdetektors [HARVEY, 2000]**

Mit einem Massenspektrometer als Detektor ist eine quantitative Registrierung von Atom-, Molekül- und Molekülbruchstückmassen möglich. Bei den vorliegenden Analysen kam ein Massenspektrometer mit Quadrupol zum Einsatz. Hier bewegen sich die Ionen mit bestimmten Masse/Ladungsverhältnis je nach Stärke anliegender elektrischer Felder auf stabilen oder instabilen Flugbahnen. Durch Variation dieser Parameter werden Ionen unterschiedlicher Masse nacheinander auf stabile Flugbahnen gebracht. Es ist möglich komplette Massenspektren in sehr kurzer Zeit aufzunehmen [GOTTWALD, 1999].

### 2.3.3. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Die HPLC ist eine effiziente Methode zur Auftrennung einer großen Zahl von Analyten und bringt exzellente Trennungen in kurzer Zeit. Sie ermöglicht qualitative und quantitative Analysen und kann auch präparativ eingesetzt werden. Der größte Unterschied zwischen GC und HPLC besteht darin, dass zur Analyse in der GC die Probensubstanzen unzersetzt verdampfen müssen, wofür häufig eine vorhergehende Derivatisierung nötig ist, denn dies trifft nur auf etwa 20% der bekannten organischen Verbindungen zu. Zur Analyse in der

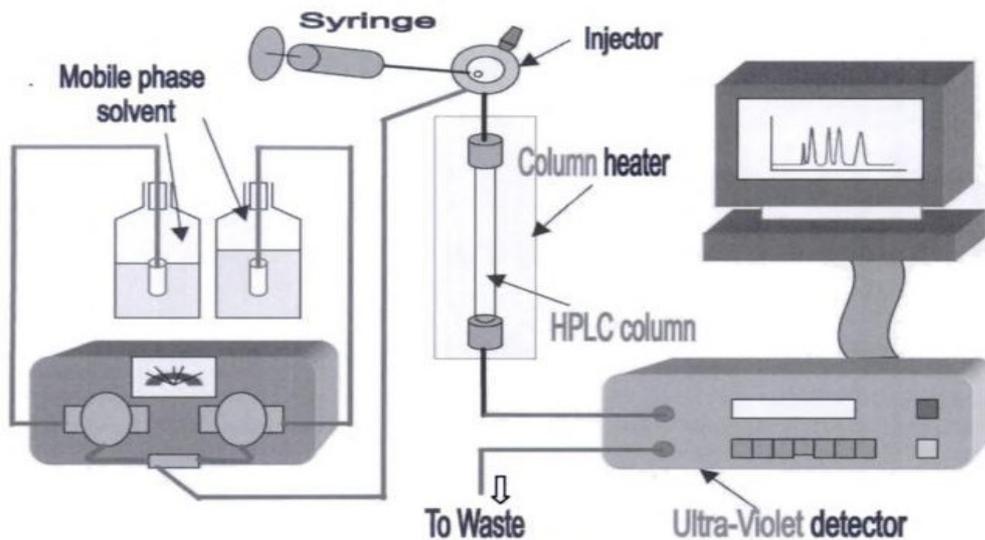
HPLC hingegen müssen die Probensubstanzen lediglich in einem Lösungsmittel löslich sein [MEYER, 2000].

Die mobile Phase darf mit der stationären Phase und den in ihr gelösten Analyten keinerlei chemische Reaktion eingehen. Bei der Normalphasen HPLC werden zumeist gepackte Säulen mit Silicagel als stationäre Phase angewandt, hier ist die stationäre Phase polarer als die mobile. Die Silanolgruppen (Si-OH) sind verantwortlich für den polaren Charakter der verwendeten Trennsäule [BÖCKER, 1997].

Per Definition ist bei der Normalphasen HPLC die stationäre Phase polarer als die mobile, sie wird eingesetzt zur Analyse mäßig polarer, in organischen Lösungsmitteln löslichen, Proben. Bei der Reversed-Phase HPLC verhält es sich umgekehrt, hier ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Die Probenkomponenten werden umso stärker retiniert je unpolarer sie sind [KATZ E. et al., 1998].

Für eine wirksame Auftrennung ist wichtig, dass die Teilchen der stationären Phase sehr klein sind, weshalb ein hoher Druck notwendig ist. Zum Durchpressen der mobilen Phase, bedarf es einer Hochdruckpumpe. In etwa ist ein Druck von 150 bar erforderlich um bei der Analyse eine zufriedenstellende Geschwindigkeit zu erreichen. Die Pumpe sorgt mit hoher Präzision für eine konstante, pulsationsarme Strömung der mobilen Phase, was Voraussetzung ist für reproduzierbare Ergebnisse.

Im Grunde besteht eine HPLC-Apparatur aus einem Probenaufgabensystem, einer Hochdruckpumpe zur Beförderung der mobilen Phase und einer Trennsäule, welche über eine Kapillare mit einem Durchflussdetektor verbunden ist, sowie einem Schreiber zur qualitativen und quantitativen Analyse [BÖCKER, 1997].



**Abb. 13: HPLC Chromatograph mit UV-Detektor [FUNG et al. 2003]**

Die Probenaufgabe ermöglicht, dass ein exakt definiertes, reproduzierbares Probenvolumen in die Trennsäule gelangt, ohne den Eluentenfluss zu unterbrechen. Eine drucklose Dosierschleife hat sich hier durchgesetzt. Die Probe wird mit einem Mehrfachen des Schleifenvolumens drucklos in die Schleife injiziert und der Überschuss über den Überlauf abgeführt.

Währenddessen fließt der Eluent von der Pumpe durch das Ventil zur Säule und kann den Arbeitsdruck aufrechterhalten, schaltet man nun am Ventil auf Injekt fließt der Eluent durch die Dosierschleife. [BÖCKER, 1997]

Das Prinzip der Detektion beruht darauf, dass der Detektor Abweichungen in der chemischen Zusammensetzung, der die Säule durchströmenden Flüssigkeit, in ein elektrisches Signal umwandelt. Dieses wird aufgezeichnet und gibt Auskunft über die Zusammensetzung der injizierten Probe, qualitativ und quantitativ. Die Wahl des Detektors ist abhängig von den chemischen Eigenschaften der Analyten, der Komplexität der Probenmatrix und dem chromatographischen System, das für die Auftrennung verwendet wird [KATZ et al., 1998].

Mit universellen Detektoren ergeben die meisten Analyten ein Signal, die selektiven hingegen sind speziell für eine Gruppe von Analyten konzipiert [BÖCKER, 1997].

Der Fluoreszenzdetektor ist als selektiver Detektor anzusehen, er besitzt eine hohe Sensitivität, erkennt jedoch nur fluoreszierende Substanzen. Die Detektion beruht auf der Eigenschaft bestimmter Moleküle, die nach Anregung durch UV-Strahlung Licht zu emittieren. Verbindungen die Fluoreszenz zeigen sind z.B. hoch konjugierte organische Moleküle, organische Ringstrukturen und Verbindungen mit schweren Atomen wie Chlor und Brom. Aufgrund seiner hohen Selektivität kommt er häufig in der Spurenanalyse zum Einsatz [KATZ et al., 1998].

#### **2.3.4. Dünnschichtchromatographie**

Die Dünnschichtchromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die stationäre Phase als dünne Schicht auf einen festen Träger aufgezogen ist. Zumeist werden mit Silicagel unterschiedlicher Korngröße überzogene Glasplatten verwendet. Die Probe wird auf eine Startlinie aufgetragen und die Dünnschichtplatte zum chromatographischen Prozess in einen Entwicklungstrog gestellt, an dessen Boden sich die mobile Phase befindet.

Die Probe wird durch unterschiedliche Verteilung der Einzelsubstanzen zwischen der mobilen flüssigen und der stationären Phase aufgetrennt. Die mobile Phase steigt durch Kapillarkräfte nach oben über die Platte, dabei werden die Substanzen mittransportiert, die durch Wechselwirkung mit der stationären Phase unterschiedlich stark retardiert werden [BÖCKER, 1997].

### 2.3.4.1. Silberionendünnschichtchromatographie

Dies ist eine Sonderform der DC, wobei zumeist eine mit Silbernitrat imprägnierte Silicageldünnschichtplatte verwendet wird, es ist jedoch auch möglich das Salz der mobilen Phase zuzugeben. Häufig werden Lösungen mit 5 – 20% Silbernitrat in Wasser, Acetonitril u.a. Lösungsmittel angewandt. Als mobile Phase dient häufig ein 2 – 3-Komponentengemisch aus Hexan, Petrolether, Chloroform, Benzen und/oder Toluol.

Bei präparativer Verwendung werden die entwickelten Platten mit einer Lösung eines Fluoreszenzindikators besprüht und unter UV-Licht betrachtet. Die fluoreszierenden Zonen werden abgekratzt und mit einem polaren Lösungsmittel extrahiert, wobei die Silberionen mit Natriumchlorid entfernt werden sollten [CHRISTIE, 2009].

Diese Methode kann genutzt werden um Fettsäuren präparativ nach Anzahl ihrer Doppelbindungen aufzutrennen. Je mehr DB eine Substanz enthält, desto stärker wird sie durch die in der stationären Phase enthaltenen Silberionen zurückgehalten. Auch ist durch die präparative Anwendung dieser Methode eine Auftrennung und Identifizierung von cis/trans Isomeren in der HPLC möglich.

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1. Untersuchungsparameter**

Bestimmt wurden Gesamtfettgehalt und Fettsäurezusammensetzung, wie auch der Proteingehalt des Muskelfleisches der Reinanke. Besonderes Augenmerk wurde auf die Palmitoleinsäure und die mehrfach ungesättigten Fettsäuren gelegt. Es sollte auch festgestellt werden, ob Fett und Protein im Fisch homogen verteilt sind. Zusätzlich wurde eine Vitamin E-Bestimmung durchgeführt, wobei es vor allem darum ging, ein besonderes Isomer des  $\alpha$ -Tocomenols, das  $\alpha$ -Tocomonoenol marinen Ursprungs, das eine ungewöhnliche Doppelbindung am Ende seiner Phytolseitenkette trägt, nachzuweisen und zu quantifizieren.

Zur Durchführung der Homogenitätsprüfung wurde das dafür bestimmte, enthäutete Renkenfilet, das in etwa eine Länge von 20 cm besaß, in zehn 4 cm lange Stücke geschnitten, wobei je 5 aus dem Rücken- und dem Bauchbereich stammten. Nach Lyophilisierung der Fischstücke und Bestimmung der Trockenmasse wurde eine Proteinbestimmung nach Kjeldahl, im Doppelansatz, durchgeführt. Die Fettquantifizierung erfolgte ebenfalls mit dem getrockneten Fisch, durch eine direkte Extraktions-/Transesterifikationsmethode, bei der ein zu hoher Wassergehalt die Transesterifikation stören würde. Die Gesamtfettbestimmung erfolgte mittels Gaschromatographie, durch Quantifizierung der zuvor synthetisierten Fettsäuremethylester, ebenfalls im Doppelansatz.

#### **3.2. Probenvorbereitung**

##### **3.2.1. Prinzip**

Um eine gaschromatische Bestimmung von Gesamtfett und Fettsäuren durchführen zu können, war eine vorherige Extraktion der Lipide aus der Probenmatrix nötig, sowie eine Umwandlung der an Glycerin gebundenen Fettsäuren in leichter flüchtige Fettsäuremethylester. Die Proben wurden erst

gefriergetrocknet und anschließend direkt in einem Schritt extrahiert und transesterifiziert. Die so synthetisierten FSME wurden mittels Gaschromatographie analysiert [ULBERTH und HENNINGER].

Auch die Stickstoff- und Tocopherolbestimmung erfolgte mit den lyophilisierten Proben.

Zur Homogenitätsprüfung wurde ein Renkenfilet, nachdem es gehäutet worden war, in 10 Teile geschnitten und von jedem eine Protein- und Gesamtfettbestimmung durchgeführt.

### **3.3. Gesamtfett- und Fettsäurebestimmung**

#### **3.3.1. Verwendete Geräte und Reagenzien**

- Petrischalen mit Deckel (Durchmesser: 10 und 20 cm)
- Schraubfläschchen mit Verschluss + Dichtung (100ml)
- Messkolben
- Messzylinder
- Spatel
- Pinzette
- 2 ml, 3 ml und 5 ml Vollpipetten
- Pasteurpipetten
- Pyrexröhrchen
- GC-Vials und Verschlüsse
- Hamiltonspritze (701 N, 10 µl)
- Magnetrührer + Magnetfischchen
- Waage (Mettler)
- Feinwaage (Acculab)
- Gefriertrockner (Edwards MODULYO 4K)
- Osterizer
- Wasserbad (GLF)

- Vortex
- Zentrifuge (Funke Gerber)
- Argon
- Interne Standards: C17:0 und C23:0 FSME
- Konzentration: 2mg Standard/ml Toluol
- Toluol
- BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol)
- Acetylchlorid
- Wasserfreies Methanol
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Wasserfreies Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 37 Komponenten Standard
- HCl
- Aqua Glas dest.

### 3.3.2. Herstellung der verwendeten Lösungen

#### 5%ige methanolische HCl

Zur Herstellung der 5%igen methanolischen HCl wurden 80 ml Methanol in eine 100 ml Schraubflasche mit einem Magnetfischchen darin vorgelegt. Unter ständigem Mischen durch den Magnetrührer wurden vorsichtig und langsam 8 ml Acetylchlorid, mittels Pasteurpipette zugegeben. Die ständige Bewegung der Lösung ist notwendig da es durch die chemische Reaktion zwischen Methanol und Acetylchlorid zu starker Wärmebildung kommt.



### 6%ige Kaliumcarbonatlösung

6 g Kaliumkarbonat wurden in ein Schraubfläschchen eingewogen und auf einem Magnetrührer in 100 Aqua Glas dest. gelöst.

### Toluol mit BHT

BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol) ist ein Antioxidans, das dem als Lösungsmittel dienendem Toluol zugesetzt wurde, um die Fettsäuren während der Transmethylierung vor Oxidationsvorgängen zu schützen. Es wurden 10 mg BHT pro 100 ml Toluol gelöst.

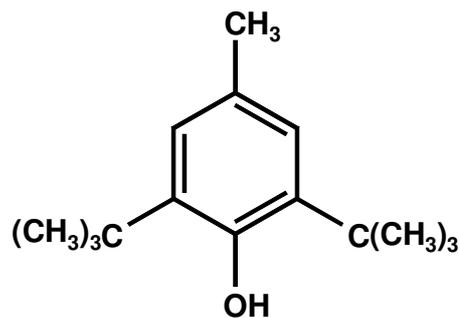


Abb. 14: Strukturformel von 2,6-Di-tert-butyl-4-methyl-phenol (BHT)

### Standardlösungen (in Toluol mit BHT)

Die Konzentration der ersten Standardlösung sollte 4 mg C17:0 Standard/ml Toluol mit BHT betragen und die der zweiten 2 mg C23:0 Standard/ml Toluol. Es wurden 200 mg C17- und 100 mg C23-Standard in je einen 100 ml Messkolben eingewogen, anschließend wurde er bis zur Marke mit der Toluollösung aufgefüllt und der Standard darin gelöst.

### 3.3.3. Durchführung

#### 3.3.3.1. Gefriertrocknung

Als erster Schritt mussten die enthäuteten Fischfilets gefriergetrocknet (lyophilisiert) werden, um den Wassergehalt der Proben weitestgehend zu senken. Dies ist notwendig, da ein zu hoher Wasseranteil bei der direkten Extraktions-/Transmethylierungsmethode die Reaktion stören kann. Um beim Vorgang der Gefriertrocknung eventuell aus der Probe austretendes Fett aufzufangen wurde ein Taschentuch unter jedes Fischfilet gelegt, dessen Gewichtsanteil an der Probe so gering war, dass er in die Berechnungen nach den Analysen nicht signifikant beeinflusste.

#### Arbeitsschritte bei der Lyophilisierung:

1. Vorkühlen des Gefriertrockners auf -50 °C
2. Bestimmung des Leergewichts der Petrischalen und dem als Saugunterlage verwendetem Taschentuch
3. Einwaage der Proben
4. Tiefrieren der Proben bei -80 °C
5. Befüllung des Gefriertrockners mit den Proben
6. Anlegen eines Vakuums

Die Proben wurden über Nacht lyophilisiert und am nächsten Tag die Auswaage vorgenommen um die Trockenmasse der Proben zu bestimmen.

#### Berechnung der Trockenmasse in Gewichtsprozent

$$TM (\%) = \frac{A}{E} * 100$$

A.....Auswaage der Probe in g

B.....Einwaage der Probe in g

Das getrocknete Fischfilet wurde mittels Osterizer fein zerkleinert und direkt zur Fett-, Protein- und Vitamin-E-Bestimmung eingesetzt.

### **3.3.3.2. Direkte säurekatalysierte Transmethylierung**

Bei der direkten Methode der Extraktion und Transesterifikation werden diese beiden Vorgänge in einem Schritt durchgeführt, d.h. es ist keine vorhergehende Fettextraktion mit nachfolgender Synthese von FSME notwendig. [ULBERTH und HENNINGER, 1995]

### **3.3.3.3. Durchführung**

Die Proben für die Homogenitätsprüfung wurden jeweils im Doppelansatz und die Proben zur Gesamtfett- und Fettsäurequantifizierung im Dreifachansatz durchgeführt.

Jeweils 80 mg Fischlyophilisat wurden in ein Pyrexröhrchen eingewogen und anschließend je 1 ml der C17- und der C23-Standardlösungen zupipettiert. Als Methylierungsreagenz wurden 3 ml methanolische HCl zugesetzt. Der im Röhrchen befindliche Sauerstoff wurde durch Begasung mit Argon aus diesem verdrängt, das Röhrchen verschlossen und am Vortex geschüttelt. Die Transmethylierung erfolgte bei 70°C für 2 Stunden im Wasserbad.

Der Reaktionsstopp wurde, nach Abkühlen der Probe, durch Zugabe einer wässrigen Kaliumkarbonatlösung herbeigeführt. Die Röhrchen wurden nochmals am Vortex geschüttelt und anschließend für 5 Minuten bei 1100 U/min. zentrifugiert.

Die obere Phase, die die methylierten Fettsäuren enthält, wurde mittels Pasteurpipette abgenommen und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde die getrocknete Probenlösung in ein GC-Vial überführt, dieses verschlossen und die Proben zur Analyse in den Gaschromatographen injiziert.

### 3.3.3.4. Gaschromatographisches System

Gaschromatograph:	Fisons 8000 mit FID und Splitinjektor
Säule:	Rtx-225 von Restek: 50% Cyanopropylmethyl-50% Phenylmethylpolysiloxan
	Länge: 30m
	Innendurchmesser: 0,25 mm
	Schichtdicke: 0,25 $\mu\text{m}$
Trärgas:	H <sub>2</sub> (Split: 90 kPa)
FID-Gase:	N <sub>2</sub> (80 kPa)
	Luft (70 kPa)
	H <sub>2</sub> (60 kPa)

#### Temperaturbedingungen:

Anfangstemperatur:	170 °C
Heizrate:	3 °C/min
Endtemperatur:	220 °C
Injektortemperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	250 °C
Einspritztechnik:	Luftpfröpfmethode [GROB und BIEDERMANN, 2000]
Split:	1:50
Einspritzvolumen:	1 $\mu\text{l}$
Laufzeit:	21 Minuten

### **3.3.3.5. Auswertung der Chromatogramme**

Die qualitative Bestimmung der in den Proben enthaltenen Fettsäuremethylester erfolgte mit Hilfe eines 37-Komponentenstandards von Supelco. Dieser wurde in den Gaschromatographen injiziert, wodurch über Vergleich der Retentionszeiten der im Standard enthaltenen bekannten Fettsäuremethylester, die in der Probe enthaltenen unbekanntem Verbindungen identifiziert werden konnten.

Zur Quantifizierung der Fettsäuren wurden die internen Standards zugesetzt. Durch die Zugabe genau definierter Mengen zur Probe, konnten aufgrund der Peakflächen die jeweiligen Konzentrationen der enthaltenen Fettsäuren berechnet werden.

Der C17:0 Standard diente zur Quantifizierung der Carbonsäuren mit den Kettenlängen von C14 bis einschließlich C19, während auf den C23-Standard die langkettigen Fettsäuren bezogen wurden mit Kettenlängen von C20 – C24.

## **3.4. Identifizierung unbekannter Fettsäuren mittels Silberionendünnschichtchromatographie und Gaschromatographie**

Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass Silberionen in der Lage sind mit Doppelbindungen Komplexe zu bilden. Die ungesättigten Komponenten agieren als Elektronendonator und die Silberionen als Elektronenakzeptor. Bei natürlich vorkommenden methylenunterbrochenen Doppelbindungen steigt die Stabilität der Komplexe mit der Anzahl der Doppelbindungen im Molekül. Fettsäuren mit Doppelbindungen unterschiedlicher Konfiguration bilden schwächere Komplexe je höher die Anzahl an Transdoppelbindungen ist [CHRISTIE, 2009].

Durch die Wechselwirkung der im Fischöl enthaltenen Doppelbindungen kann es in seine einzelnen Fettsäurefraktionen aufgetrennt werden. Je mehr Doppelbindungen in einer Fettsäure enthalten sind, desto stärker wird sie durch die Silberionen auf der Dünnschichtplatte retiniert. Dadurch wandern die

gesättigten Fettsäuren mit dem Laufmittel nach oben während die hochungesättigten Fettsäuren auf der Startlinie zurückgehalten werden.

### 3.4.1. Verwendete Geräte und Reagenzien

- transmethyliertes Fischöl in Toluol + BHT
- 10 ml Spitzkolben
- Rotavapor
- Feinwaage (Acculab)
- 1 Imprägnierwanne mit Deckel
- Trockenschrank
- 150 ml Becherglas
- 100 ml Messzylinder
- Spatel
- Entwicklungskammer
- Pasteurpipetten
- Pyrexröhrchen
- 10 ml Spitzkolben
- 1 ml Pipettenspitzen
- Trichter
- 10 x 20 cm Dünnschichtplatten: Kieselgel 60 (Merck)
- Extran
- Silbernitrat
- Aqua Glasdest.
- Petrolether
- Diethylether
- n-Hexan
- 2,7-Dichlorfluoreszin, ethanolische Lösung 0,1% (g/v)
- Glaswolle
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- NaCl

- Florisil
- Diethylether
- Toluol

### 3.4.2. Durchführung

5 g Silbernitrat wurden in ein 150 ml Becherglas eingewogen und in 50 ml Aqua Glas dest. gelöst, die Lösung wurde in die durch Extran fettfrei gemachte Imprägnierwanne überführt, die Dünnschichtplatte hineingelegt und die Wanne verschlossen. Die Platte wurde für eine Stunde an einem dunklen Ort imprägniert und anschließend im Trockenschrank für eine Stunde bei 110 °C aktiviert.

Zur Herstellung von 100 ml Laufmittel wurden 90 ml Hexan und 10 ml Diethylether vermischt.

Eine in Toluol gelöste Probe, die durch die säurekatalysierte Transmethylierung erhalten wurde, wurde am Rotavapor eingedampft und anschließend in 100 µl n-Hexan gelöst. Die Dünnschichtplatte wurde aus dem Trockenschrank genommen und 2 cm über dem unteren Ende eine Linie gezogen, auf dieser wurden von jeder Seite 2 cm frei gelassen und in der Mitte die Probenlösung aufgetragen. In den 100 µl Hexanlösung befanden sich etwa 4 mg Fischöl, von denen 1 – 2 mg, also ungefähr 50 µl der Lösung, mit Hilfe einer Hamiltonspritze auf die eingezeichnete Linie auf der DC-Platte aufgetragen wurden.

Das vorbereitete Laufmittel aus Petrol- und Diethylether wurde in die Entwicklungskammer geschüttet, die Dünnschichtplatte zur Auftrennung hineingestellt und so lange entwickelt bis sich die Laufmittelfront etwa 2 cm unter dem oberen Rand befand. Die Platte wurde aus dem Trog herausgenommen und mit einem Bleistift sofort die Laufmittelfront markiert.

Zur Identifizierung der Fettsäurebanden wurde die Dünnschichtplatte mit Dichlorfluorescein, einem Fluoreszenzfarbstoff, besprüht und nach Trocknung unter der UV-Lampe bei 366 nm betrachtet. Die fluoreszierenden Banden auf

der Platte wurden mit einem Bleistift umrandet. Diese 7 Banden wurden im Anschluss abgekratzt und die Fettsäuremethylester mit Diethylether daraus extrahiert.

7 Pasteurpipetten dienten als Säulen zur Extraktion. Sie wurden durch Glaswolle verschlossen, in Pyrexröhrchen gestellt und anschließend mit Natriumsulfat, Natriumchlorid und Florisil (je 1 cm Füllhöhe), über eine abgeschnittene 1 ml Pipettenspitze und einen kleinen Trichter befüllt, abschließend wurde je eine abgekratzte Bande darüber gegeben. Das  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  diente zur Trocknung der Probe, die eventuell noch Wasser enthalten kann, während das  $\text{NaCl}$  die Silberionen binden sollte.

Die Fettsäuren wurden aus dem Silicagel der Dünnschichtplatte mittels Diethylether extrahiert und die 7 Extrakte je in einem Pyrexröhrchen aufgefangen (ca. 5 ml) und in 10 ml Spitzkolben am Rotavapor eingedampft. Der verbleibende Rückstand wurde in 800  $\mu\text{l}$  Toluol gelöst und in ein GC-Vial überführt und die Proben anschließend im Gaschromatographen analysiert.

### **3.5. Gesamtstickstoffbestimmung und Proteinberechnung nach Kjeldahl**

#### **3.5.1. Prinzip der Methode**

Durch Erhitzen der organischen Probe mit konzentrierter Schwefelsäure in Gegenwart von Aufschlusskatalysatoren wird die Probensubstanz oxidativ zerstört. Als Katalysator wurde eine Mischung aus Kupfer- und Kaliumsulfat verwendet. Das Kaliumsulfat diente dazu die Siedetemperatur der Schwefelsäure während des Aufschlusses zu erhöhen.

Bei der oxidativen Zerstörung der Probenmatrix wird der in ihr enthaltene Stickstoff in das Ammoniumion übergeführt und in der Aufschlusslösung als Ammoniumsulfat zurückgehalten. Nach Klarwerden und Abkühlen der Aufschlusslösung wurde sie mit Wasser verdünnt und anschließend in einer

Destillationseinheit durch Zugabe von Natronlauge stark alkalisch gemacht. Das hierdurch freigesetzte Ammoniakgas wird mittels einer Wasserdampfdestillation quantitativ in eine Borsäurevorlage überdestilliert.

Dieser wurde zuvor noch ein geeigneter Indikator zugesetzt (Tashiroindikator). Die endgültige Ammoniakbestimmung erfolgte durch eine acidimetrische Titration der vorgelegten Säure mit Salzsäure. Über den HCl-Verbrauch bis zum Umschlagspunkt und deren Normalität wird der N-Gehalt berechnet, der proportional der Menge an verbrauchter Säure ist.

Bei der Bestimmung eines Blindwertes, der als Korrekturfaktor dient, setzte man alle Reagenzien (Schwefelsäure, Katalysator, Wasser, Natronlauge und Vorlagensäure mit Indikator) in gleicher Weise und Menge wie bei der Probenbestimmung ein. Bei Verwendung sauberer Chemikalien sollte der Blindwert so klein sein, dass er vernachlässigbar ist. Sollte sich bei der Titration jedoch ein nennenswerter Verbrauch ergeben, so wird dieser von den Verbrauchswerten bei der Probenbestimmung abgezogen.

### **3.5.2. Verwendete Geräte und Reagenzien**

- 1000 ml Messkolben + Stopfen
- 2 500 ml Messkolben
- Waage
- Spatel
- Magnetrührer und Magnetfischchen
- Aufschlusskolben
- Maßlöffel
- Glasperlen
- Säurefester Dispenser
- Aufschlusskolbengestell
- 50 ml Becherglas
- Kocher – Büchi 425 Digestor

- Absaugrohr
- Klammern
- Wasserstrahlpumpe
- Taschentuch
- Stehkolben
- Titriervorrichtung (25 ml)
- Büchi 315 Distillation Unit
- $\text{CuSO}_4$
- $\text{K}_2\text{SO}_4$
- Konzentrierte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%)
- Aqua Glas dest.
- Aqua dest.
- Boräure (2%)
- Tashiro-Indikator
- NaOH-Pulver (wasserfrei)
- HCl (0,1 N, 1 N, 0,5 N)

### 3.5.3. Herstellung der verwendeten Lösungen und Reagenzien

#### Katalysator

4g Kupfersulfat wurden in 1000g Kaliumsulfat und durch kräftiges schütteln homogen vermischt.

#### 2%ige Borsäure

20 g Borsäurepulver wurden in einen 1000 ml Messkolben eingewogen und ein Magnetfisch zugegeben. Der Kolben wurde etwa bis zur Hälfte mit Aqua Glas dest. aufgefüllt und das Borsäurepulver darin zur Gänze, auf dem Magnetrührer, gelöst. Anschließend wurde bis zur Marke mit Aqua Glas dest. aufgefüllt, der Kolben mit einem Stopfen verschlossen und die Lösung homogenisiert.

## **NaOH**

700 g Natriumhydroxidpulver wurden in einer 2 l Aqua dest. Vorlage langsam und unter ständigem Rühren gelöst, währenddessen musste die Lösung gekühlt werden, da es zu einer relativ hohen Wärmeentwicklung kommt. Die NaOH-Lösung musste vor ihrer Verwendung auf Zimmertemperatur abgekühlt sein.

## **1 M HCl**

Ein 1000 ml Messkolben wurde bis zur Hälfte mit Aqua Glas Dest. befüllt, dem wurde eine Titrisol-Lösung für 1 M HCl zugegeben (36,461g HCl für 1 Liter). Diese Packung enthält die exakt die nötige Menge an konzentrierte HCl zur Herstellung einer 1 molaren Lösung. Zur quantitativen Überführung der Stocklösung in den Kolben wurde das Gefäß mehrmals gespült. Der Kolben wurde anschließend bis zur Markierung aufgefüllt, mit einem Glasstopfen verschlossen und durch Schütteln homogenisiert.

## **0,5 M HCl**

Ein 500 ml Messkolben wurde mit Aqua Glas dest. bis zur Marke aufgefüllt und das Wasser mit Hilfe eines Trichters in einen 1000ml Kolben überführt. Ein zweiter 500ml Messkolben wurde mit 1 M HCl bis zur Marke aufgefüllt und die Säure mittels eines Trichters in den 1000 ml Messkolben zum Wasser zugegeben. Der 1000ml Kolben wurde mit einem Glasstopfen verschlossen und die Lösung homogen vermischt.

## **0,1 M HCl**

10 ml 1 molare Salzsäure wurden in einen 100 ml Messkolben pipettiert, der bis zur Marke mit Aqua Glas dest. aufgefüllt und die Lösung homogenisiert.

### **3.5.4. Durchführung**

Die Stickstoffbestimmung erfolgte bei der Homogenitätsprüfung und der Proteinbestimmung der ganzen Filets jeweils im Doppelansatz.

### **3.5.5. Probenaufschluss**

Die Aufschlusskolben wurden jeweils mit 1 Maßlöffel Katalysator (entspricht etwa 7,5 g) und 2 Glasperlen versetzt. Die Glasperlen sollten einen möglichen Siedeverzug während dem Probenaufschluss vermeiden. Anschließend wurden 0,5 g der getrockneten Probe, mit Hilfe eines Spatels, auf 1 mg genau eingewogen.

Jedem Aufschlusskolben wurden mittels Dispenser 20 ml konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt (98%ig) und die Proben durch Kochen in der Säure, in Anwesenheit von Aufschlusskatalysatoren, oxidativ zerstört. Dazu wurde ein Absaugrohr auf die Aufschlusskolben gesetzt und die Kolben mittels spezieller Klammern daran befestigt. Mit einem Gummischlauch wurde das hintere Ende des Absaugrohres mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden und die vordere Öffnung mit einem Taschentuch, nicht luftdicht, verschlossen. Die Pumpe wurde in Betrieb genommen und die Kolben in den vorgeheizten Aufschlussapparat eingesetzt.

Der vollkommene Probenaufschluss war nach etwa 7 Stunden erreicht. Die Aufschlusszeit ist abhängig von der Probenart, der Probenmenge und dem Aufschlussgemisch. Nach erfolgtem Aufschluss wurden die Proben auf Zimmertemperatur gekühlt und im Anschluss jeweils 50 ml Aqua Glas dest. zugesetzt.

### 3.5.6. Destillation

Als Destillationsapparat diente eine Büchi 315 Distillation Unit.

Ein Aufschlusskolben mit Probe wurde in die Destillationseinheit eingespannt und am Destillationsausgang mittels einer kleinen Hebebühne ein 250 ml Stehkolben eingespannt. Dieser enthielt eine 20 ml Borsäurevorlage und 2 Tropfen Tashiro-Indikator beinhaltet. Wichtig war, dass das Ende des Destillationsausganges ganz in die Borsäure eintaucht.

Die NaOH-Zugabe muss sehr langsam erfolgen, da es zu einer heftigen Reaktion kam und die Probe hierdurch hätte verloren gehen können.

Die Probelösung im Aufschlusskolben verfärbte sich durch die Zugabe der Natronlauge erst braun und anschließend hellblau. Nach Blauwerden der Aufschlusslösung wurde die NaOH-Zugabe gestoppt und mit der Destillation begonnen. Die Probelösung wurde solange destilliert bis etwa 100 ml in den Erlenmeierkolben übergegangen waren, dabei verfärbte sich die Borsäurelösung von rosa auf grün. Die Destillation wurde gestoppt, der Stehkolben von der Hebebühne genommen und unter den Destillationsausgang gestellt, damit das Destillat noch abtropfen konnte.

### 3.5.7. Rücktitration mit Salzsäure unterschiedlicher Konzentrationen zur Auffindung der anzuwendenden Konzentration

#### Titration mit 0.1 M HCl

Bei einer Trockenmasseeinwaage von 500 mg Fisch schien es nicht sinnvoll mit 0,1 molarer HCl zu titrieren. Die Probe enthielt zu viel Protein, und der Verbrauch bis ein Farbumschlag von grün auf rosa erreicht wurde betrug hier über 30 ml, weshalb entweder die Menge der Probeneinwaage reduziert oder die Molarität der HCl erhöht werden musste.

### **Titration mit 1 M HCl**

Der Verbrauch an 1 M HCl bei einer Probeneinwaage von 500 mg betrug nur etwa 4,9 ml. Ein so geringer Verbrauch ist nicht ausreichend für eine zufriedenstellende Genauigkeit, weshalb sie auf eine 0,5 molare HCl verdünnt wurde.

### **Titration mit 0,5 M HCl**

Der Verbrauch der 0,5 molaren Salzsäure, bei der acidimetrischen Stickstoffbestimmung war mit 8 – 9 ml ausreichend hoch für ein zufriedenstellendes Ergebnis. Die Titration aller Proben erfolgte mit ihr.

### **3.5.8. Berechnung des Proteingehalts**

Die Berechnung des Stickstoffgehalts, über den der Proteingehalt bestimmt werden kann, erfolgte durch den Salzsäureverbrauch bei der acidimetrischen Titration und deren Normalität. Die Formel zur Berechnung des prozentuellen N-Stoffgehalts der Probe lautet wie folgt:

$$\frac{\text{HCl-Verbrauch} * \text{Normalität} * 14,008}{\text{Einwaage}}$$

Durch Multiplikation des Stickstoffanteils mit dem Faktor 6,25 konnte der Proteinanteil der Probe abgeschätzt werden.

### **3.6. Bestimmung von Vitamin E Isomeren**

Zur Bestimmung der Tocopherole wurde zunächst eine Extraktion der Fettfraktion aus dem Fischfilet nach der Methode von Bligh und Dyer durchgeführt, und das extrahierte Fett anschließend durch die Methode von Ulberth und Reich zur Analyse in der HPLC aufbereitet.

#### **3.6.1. Rehydrierung des Renkenfilets**

Die Methode zur Fettextraktion nach Bligh und Dyer ist optimiert für Lebensmittel mit einem hohen Wassergehalt. Im Zuge vorhergehender Analysen wurden die Fischfilets jedoch getrocknet und lagen als Lyophilisat vor. Aus diesem Grund war es notwendig das Probenmaterial wieder auf seinen ursprünglichen Wassergehalt zu rehydrieren.

##### **3.6.1.1. Verwendete Geräte und Reagenzien**

- Aqua Dest.
- 1 Schraubflasche mit Deckel (250 ml)
- 1 Waage

##### **3.6.1.2. Durchführung**

5 g zerkleinertes, lyophilisiertes Fischfilet wurden in eine 250 ml Flasche eingewogen und anschließend 30 ml Aqua dest. zugegeben, die Flasche verschlossen und kräftig geschüttelt, wodurch das Fischlyophilisat wieder aufgeschwemmt wurde.

## **3.6.2. Fettextraktion nach Bligh und Dyer**

### **3.6.2.1. Verwendete Geräte und Reagenzien**

- Schraubflasche mit Deckel (250 ml)
- Stativ mit Muffe und Ring
- 250 ml Scheidetrichter
- Trichter
- Faltenfilter (520 A 1/2, Schleicher & Schuell)
- 250 ml Rundkolben
- Messzylinder
- Rotavapor (Büchi R-134)
- Methanol
- Chloroform
- Aqua dest.

### **3.6.2.2. Durchführung**

In die Flasche mit dem rehydrierten Fischfilet wurden 60 ml Methanol und 30 ml Chloroform zugegeben und die verschlossene Flasche für eine Minute kräftig geschüttelt, um die Lipidfraktion weitestgehend aus dem Gewebe zu extrahieren. Es sollte ein einphasiges Gemisch vorliegen.

Anschließend wurden je 30 ml Aqua dest. und Chloroform zugegeben und die verschlossene Flasche nochmals kräftig geschüttelt, woraufhin ein zweiphasiges System vorlag.

Der Scheidetrichter wurde in die Halterung aus Ring, Stativ und Muffe eingesetzt und ein Trichter mit einem Faltenfilter aufgesetzt, über den das Probengemisch in den Scheidetrichter filtriert wird. Der Faltenfilter mit dem Filtratrückstand wurde nochmals in die 250 ml Flasche überführt, mit 30 ml Chloroform ein weiteres mal extrahiert und wieder über einen Faltenfilter in den Scheidetrichter filtriert.

Das Filtrat wurde über Nacht, bis zum Klarwerden der unteren Phase stehen gelassen.

Die untere Chloroformphase enthielt den Fettextrakt, er wurde in einen 250 ml Rundkolben abgelassen und die obere wässrige Phase verworfen.

Das Chloroform wurde am Rotavapor abgedampft.

### **3.6.3. Quantitative Bestimmung von Tocopherolen**

Die Probenvorbereitung erfolgte unter Zusatz eines 5- $\alpha$ -Cholestanstandards, mit dessen Hilfe nach der massenspektrometrischen Probenanalyse im Gaschromatographen, eine Quantifizierung der Vitamin E Vitamere möglich gewesen wäre. Die Quantifizierung erfolgte jedoch auf andere Weise.

#### **3.6.3.1. Verwendete Geräte und Reagenzien**

- Feinwaage (Acculab)
- Becherglas (25 ml)
- Schraubflasche mit Deckel (250 ml)
- Messzylinder (200 ml)
- Wiegeschiffchen
- Spatel
- Trichter
- 25 ml Messkolben mit Schliffstopfen
- Pasteurpipetten
- Pyrexröhrchen mit Deckel (40 ml)
- Vortex
- 50 ml Rundkolben
- Probenvials
- Messpipetten: 10 ml
- Pilläusball

- Vollpipetten: 1 ml
- Wasserbad
- Zentrifuge
- Rotavapor
- Heizblock –Reacti-Therm heating module (Pierce) mit Stickstoffversorgung
- 5- $\alpha$ -Cholestan
- Aceton
- BHT
- Ethanol
- Aqua dest.
- KOH
- Cyclohexan
- Chloroform
- Pyridin
- BSTFA + TCMS (N,O-Trimethylsilyl-Trifluoroacetonamid + Trimethylchlorosilan)

### **3.6.3.2. Herstellung der verwendeten Lösungen**

#### **BHT in Ethanol (0,125%ig)**

25 mg BHT wurden auf der Feinwaage in ein 25 ml Becherglas eingewogen und in eine 250 ml Schraubflasche überführt. Mit Hilfe eines Messzylinders wurden 200 ml Ethanol zugegeben und die verschlossene Flasche geschüttelt bis sich das BHT gelöst hat.

#### **Herstellung der Standardlösung**

Die Standardlösung mit 5- $\alpha$ -Cholestan sollte eine Konzentration von 1 mg/ml aufweisen. Mit einem Spatel werden 25 mg in ein Wiegeschiffchen eingewogen und über einen Trichter in einen 25 ml Messkolben überführt. Das Wiegeschiffchen und der Trichter wurden mit Aceton gespült um den Standard

quantitativ in den Kolben zu befördern, anschließend wurde er bis zur Marke mit Aceton aufgefüllt, mit einem Schliffstopfen verschlossen und geschüttelt bis sich das 5- $\alpha$ -Cholestan gelöst hat.

### **Herstellung der 40%igen KOH**

10 mg KOH wurden in einen 25 ml Messkolben eingewogen und dieser bis zur Marke mit Aqua dest. aufgefüllt, anschließend wurde er mit einem Schliffstopfen verschlossen und geschüttelt bis sich das Pulver gelöst hat.

### **3.6.3.3. Durchführung**

200 mg Fischölextrakt wurden in ein Pyrexröhrchen eingewogen und 8 ml von der BHT-in-Ethanollösung zupipettiert. Anschließend wurden je 0,5 ml von der Standardlösung und der wässrigen KOH zugefügt. Nach Entfernung des Sauerstoffs durch Verdrängung mit Stickstoff wurde das Röhrchen verschlossen und bei 80 °C für 15 min. im Wasserbad verseift, währenddessen sollte die Probe mehrmals gut geschüttelt werden.

Nach der Verseifung wurde das Pyrexröhrchen unter kaltem Wasser abgekühlt und 15 ml Cyclohexan sowie 12 ml Aqua dest. zupipettiert. Das verschlossene Probenröhrchen wurde für etwa eine Minute kräftig geschüttelt und für 5 min. in der Zentrifuge bei 1100 rpm zentrifugieren.

Die obere Phase wurde mittels Pasteurpipette in einen 50 ml Rundkolben überführt. Die verbliebene untere Phase wurde nochmals mit Cyclohexan extrahiert und zentrifugiert, und die obere Phase mit dem ersten Extrakt im Rundkolben vereinigt. Am Rotavapor wurde das Cyclohexan abgedampft, bis der verbleibende Fettextrakt trocken war.

Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst und in ein Pyrexröhrchen überführt und das Chloroform anschließend über Stickstoff, auf einem Heizblock bei 40 °C abgedampft. In Folge wurden je 100  $\mu$ l Pyridin und BSTFA + TMCS zum

Rückstand pipettiert. Die Probe wurde dann für 30 min. im Trockenschrank bei 60 °C inkubiert wobei es zur Bildung von Trimethylsilylestern kam. Das Lösungsmittel wurde erneut unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in n-Heptan gelöst, mittels Pasteurpipette in ein Probenvial überführt, verschlossen und in die GC-MS injiziert.

### **Gaschromatographisches System**

Gaschromatograph: GC 8000 series mit Splitinjektor

Massenspektrometer: Fisons Instruments MD 800

Säule: J&W Scientific DB-5HT

Länge: 30m

Innendurchmesser: 0,32 mm

Schichtdicke: 0,1 µm

Trärgas: He

### Temperaturbedingungen:

Anfangstemperatur: 70 °C/2min; 20 °C/min

Endtemperatur: 290 °C

Injektortemperatur: 300 °C

Interface: 300 °C

Einspritztechnik: Luftpfröpfungsmethode

Einspritzvolumen: 1 µl Splitless/0,5 min

Laufzeit: 40 Minuten

### 3.7. Tocopherolquantifizierung mittels Standardreihe auf der HPLC (nach der DGF-Einheitmethode F-II 4a (00))

#### 3.7.1. Verwendete Geräte und Reagenzien:

- Rotavapor
- 50 ml Rundkolben
- Pasteurpipetten
- Messpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml)
- Pyrexröhrchen
- Spektrophotometer UV-120-02 Shimadzu
- Messküvetten (Quarz)
- 25 ml Messkolben
- 100 ml Messkolben
- Feinwaage (Acculab)
- HPLC mit UV-Detektor
- Tocopherolstandardlösungen in n-Hexan:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol
- n-Hexan
- Methanol
- Essigsäuremethylester

#### Herstellung der Standardreihe

Verwendet wurden bereits vorbereitete Standardlösungen von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherolen deren Konzentration mittels Photometer bestimmt wurde. Da die Tocopherole in Hexan gelöst waren, mussten sie eingedampft und anschließend zur Analyse in Methanol erneut gelöst werden. Jeweils 10 ml der Stammlösung wurden je in einem 50 ml Rundkolben am Rotavapor eingedampft und anschließend in 10 ml Methanol gelöst.

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentrationen, wurden die Lösungen jeweils in einer Küvette, bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen und ihre Konzentration mit folgender Formel berechnet:

$$\rho_E = \frac{A \cdot 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

A ... Adsorptionswert jedes Tocopherols in der entsprechenden Stammlösung

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  ... der Extinktionswert für jedes Tocopherol, in 1 prozentiger methanolischer Lösung bei 10 mm Schichtdicke der Küvette gemessen.

**Tab. 4: Werte zur Berechnung der Konzentrationen der Standardlösungen nach der DGF-Methode**

Substanz	Wellenlänge	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	292 nm	76
<b><math>\beta</math>-Tocopherol</b>	296 nm	89
<b><math>\gamma</math>-Tocopherol</b>	298 nm	91
<b><math>\delta</math>-Tocopherol</b>	298 nm	87

Die Stocklösung für die Standardreihe wurde hergestellt durch Vereinigung von jeweils 10 ml jedes Tocopherolstandards in n-Hexan in einem 100 ml Messkolben und anschließendem Auffüllen bis zur Marke. Anschließend wurden aus dieser Verdünnungen hergestellt: 1:2, 1:5 und 1:10. Es erfolgte eine 4 Punkt Kalibration mit Konzentrationen zwischen 1,5 und 15  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **Herstellung der Probenlösung**

Hierzu wurde 1 g Fischölextrakt auf ein mg genau in einen 25 ml Messkolben eingewogen und dieser mit Hexan bis zur Marke aufgefüllt, das Fischöl wurde durch schütteln des Verschlussenen Kolbens gelöst.

Anschließend wurden die Verdünnungsreihe der Standardlösungen und die Probe in der HPLC analysiert. Die Identifizierung der Tocopherole erfolgte mittels UV-Detektor, anhand ihrer Retentionszeiten und die Quantifizierung über die Peakflächen der externen Standardreihe, durch Erstellung einer Standardgeraden.

### **HPLC-Einstellungen**

HPLC:	LC-9A (Shimadzu)
Säule:	Varian Chromspher 5 Lipids 250x4,6 mm
Laufmittel:	n-Hexan:Essigsäuremethylester (70:30)
Flussrate:	1,6 ml/min.
Einspritzvolumen:	100 µl in eine 20 µl Probenschleife
Laufzeit:	6 min.
Detektortyp:	Fluoreszenzdetektor
Detektion:	EX: 295 nm
	EM: 340 nm

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Homogenitätsprüfung

Die meisten Fischarten enthalten kaum über 5% Fett, der Proteingehalt beträgt je nach Art etwa zwischen 15 und 20% und der Wassergehalt weißt je nach Menge des Fett- und Proteingehalts Schwankungen zwischen 60 und 80% auf, hinzu kommen noch geringe Anteile an Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen.

Der Eiweißgehalt im Fischfleisch ist in der Regel homogen verteilt und unterliegt keinerlei oder nur geringen Schwankungen bei gesunden Tieren derselben Art. Der Wassergehalt variiert hingegen je nach Höhe des Fettgehaltes, je höher der Fettgehalt umso geringer ist der Wassergehalt des Fischfleisches. Es kann auch innerhalb einer Art vor allem beim Fettgehalt häufig zu interindividuellen Schwankungen kommen, die abhängig sind von verschiedenen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Ernährung und Jahreszeit. Zudem ist auch das Körperfett im Allgemeinen in Fischen nicht homogen verteilt, es befindet vor allem in der Bauchwand und wird zum Kopf hin stärker abgelagert, überschüssiges Fett wird bei Magerfischen in der Leber gespeichert. [BUSCH-STOCKFISCH, 2005]

Das Protein war im Fisch mit einem Mittelwert von 20,9 g/100 g Filet +/- 2,7% weitestgehend homogen verteilt. Dies war beim Fett, wie auch erwartet nicht der Fall, vor allem im Bauchbereich und am Ansatz der Schwanzflosse war der Fettgehalt zum Teil bis um das Doppelte höher als im Rückenbereich. Der Mittelwert beträgt 3,39 g/100 g Filet +/- 18,6%.

**Tab. 5: Ergebnisse der Homogenitätsprüfung auf Fett und Protein in Prozent**

<b>Rücken</b>	<b>RHR 1</b>	<b>RHR2</b>	<b>RHR3</b>	<b>RHR4</b>	<b>RHR5</b>
<b>Protein</b>	21.3	21.9	20.8	21.1	20.1
<b>Fett</b>	3.2	3.3	4.1	2.7	3.4
<b>Bauch</b>	<b>RHR6</b>	<b>RHR7</b>	<b>RHR8</b>	<b>RHR9</b>	<b>RHR10</b>
<b>Protein</b>	21.5	20.5	20.2	20.7	20.9
<b>Fett</b>	3.5	2.9	2.5	4.5	3.9

#### **4.2. Gesamtfett- und Proteingehalt**

Fischeiweiß ist biologisch besonders hochwertig und aufgrund seines geringen Bindegewebsgehaltes, von 1 – 2% besonders leicht verdaulich. In der Literatur beschriebene Werte belaufen sich auf 17 – 20 Prozent Protein/100 g Fischfilet.

Im Gegensatz zum Fettgehalt unterliegt der Eiweißgehalt gesunder Fische innerhalb einer Art nur sehr geringen Schwankungen. Menge und auch Fettsäurezusammensetzung des Fischfettes können innerhalb einer Art sehr großen Schwankungen unterliegen, abhängig von Fischart, Jahreszeit, Fangplatz, Ernährung, Alter und Geschlecht. Diese Schwankungen sind besonders erkennbar beim Vergleich der Fettgehalte von Zucht- und Wildfischen einer Art. Bei der Fischzucht werden Futterzusammensetzung und Haltungsbedingungen gesteuert, was sich besonders auswirken kann auf Fettgehalt und Fettsäurezusammensetzung.

Das Körperfett von Fischen befindet sich besonders in der Bauchwand und wird generell zum Kopfende hin stärker abgelagert. Überschüssiges Fett wird bei Magerfischen, zu denen auch die Reinanke zählt vor allem in der Leber abgelagert [BUSCH-STOCKFISCH, 2005].

Der Proteingehalt variierte nur geringfügig bei den einzelnen untersuchten Filets, er betrug durchschnittlich 20,9 g pro 100 g Filet, wobei der Schwankungsbereich zwischen 20,1 und 21,9 g lag. Laut Literatur beträgt der Proteingehalt von Reinankenfilets in etwa 17,8 g/100 g was mit den in dieser Arbeit bestimmten Werten gut übereinstimmt [SOUCI et al., 2000]. Der Fettgehalt zeigte eine verhältnismäßig höhere Variation auf. Er betrug durchschnittlich 3,39 g pro 100 g Filet, schwankte jedoch zwischen 2,5 und 4,5 g/100 g.

Im Einzelnen lagen die Fettgehalte der untersuchten Filets, im Vergleich mit anderen Literaturquellen, zum Teil deutlich über den beschriebenen Werten. Dies liegt wohl an der großen, möglichen interindividuellen Variation innerhalb einer Art, in Abhängigkeit von Geschlecht, Größe, Alter und auch Jahreszeit. Durchschnittlich entsprach der gefundene durchschnittliche Fettanteil von 3,39 % in etwa den Literaturangaben von 3,21 % [SOUCI et al., 2000].

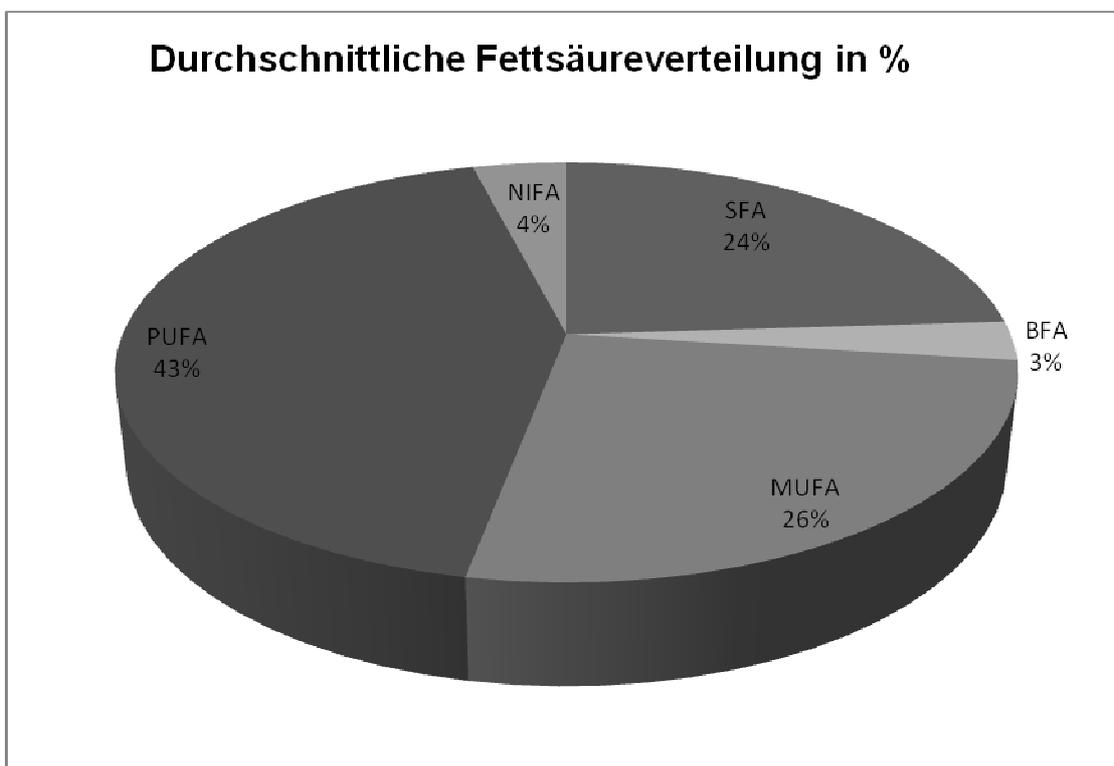
Die von hier untersuchten Renkenfilets hatten nur eine Länge von etwa 20 cm und wogen durchschnittlich 125 g. Ausgewachsene Tiere der Art *Corogonus lavaretus* können allerdings bis zu 50 cm lang und bis zu 6 kg schwer werden.

Vor allem der Fettgehalt und auch dessen Zusammensetzung unterliegen aufgrund der bereits genannten Faktoren hohen Schwankungen, wohingegen beim Proteingehalt gesunder Fische innerhalb einer Art nur geringe Unterschiede auftreten [BUSCH-STOCKFISCH, 2005].

Die vorliegenden sehr guten Ergebnisse über den Fett- und Proteingehalt sind kritisch zu betrachten, da die untersuchten Reinanken Jungfische waren. Dies war zum einen durch die eingetretene Schonzeit und zum anderen durch die erst kurze Dauer des Projektes bedingt. Die gefundenen Daten sollten durch weitere Untersuchungen ausgewachsener Tiere bestätigt werden.

### 4.3. Fettsäureprofil der Fische

In den untersuchten Filets konnten insgesamt 39 verschiedene Fettsäuren identifiziert werden. Den höchsten Anteil am Gesamtfett hatten die mehrfach ungesättigten n-6 und n-3 Fettsäuren mit einem durchschnittlichen Gesamtanteil von 42,7%, danach kamen die gesättigten Fettsäuren mit einem Anteil von 27,4%, wobei es sich bei etwa 3% um verzweigt-kettige Isomere handelte. Auffällig war der besonders hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren, insgesamt beinhaltete das Fischöl nur etwa 27% gesättigte und mit 69% mehr als doppelt so viele ungesättigte Fettsäuren.



**Abb. 15: Durchschnittliche Fettsäureverteilung der 10 untersuchten Fischfilets in %-Anteilen am Gesamtfett**

Quantitativ dominierend war die Palmitinsäure, C16:0 mit 16,4% Anteil am Gesamtfett, die Ölsäure kam auf 11,6% und auch der Anteil an

Palmitoleinsäure, C16:1n7 war mit durchschnittlich 7,9% noch beachtlich. Viel bedeutender waren jedoch die hohen Anteile an EPA und DHA mit 7,7% und 11,2%. Diese 5 Fettsäuren umfassten gemeinsam 54,8% des Gesamtfettes.

Die dominierende Fettsäure unter den gesättigten Fettsäuren war die Palmitinsäure, aber auch C14:0 und C18:0 betragen jeweils ungefähr 4% vom Gesamtfett. Ungeradzahlige Fettsäuren, wie auch verzweigt-kettige Isomere der gesättigten Fettsäuren wurden nur in geringen Mengen gefunden, und betragen jeweils nicht mehr als 1% am Gesamtfett.

Die vorherrschende einfach ungesättigte Fettsäure war die Ölsäure mit durchschnittlich 11,6 %, jedoch war auch der Gehalt an Palmitoleinsäure mit 7,9 % noch beträchtlich. Die anderen Monoenfettsäuren lagen mit ihren Anteilen am Gesamtfett jeweils unter einem Prozent.

Nicht nachgewiesen werden konnten die C22:1 Isomere n-9 und n-11, die für Seefische charakteristisch sind, und ursprünglich von den entsprechenden Fettalkoholen der Wachsester von marinem Zooplankton abstammen [ACKMAN, 1995]. Sie können häufig in Zuchtfischen, auch in höheren Konzentrationen, nachgewiesen werden deren Nahrung zum Teil aus von Seefischen abstammendem Fischmehl oder Fischöl angereichertem Futter besteht. Die Abwesenheit dieser Fettsäuren dürfte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den untersuchten Fischen tatsächlich um Wildfische handelt, die nicht zugefüttert wurden.

Die Gruppe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurde dominiert von der n-3 DHA mit 11,2 %, aber auch der Gehalt an EPA mit 7,7 % und C18:3n3 mit 4,1 % Anteil am Gesamtfett war noch beachtlich. Die n-6 Fettsäuren C18:2n6 und C20:4n6 hatten jeweils einen Anteil von etwa 4 %.

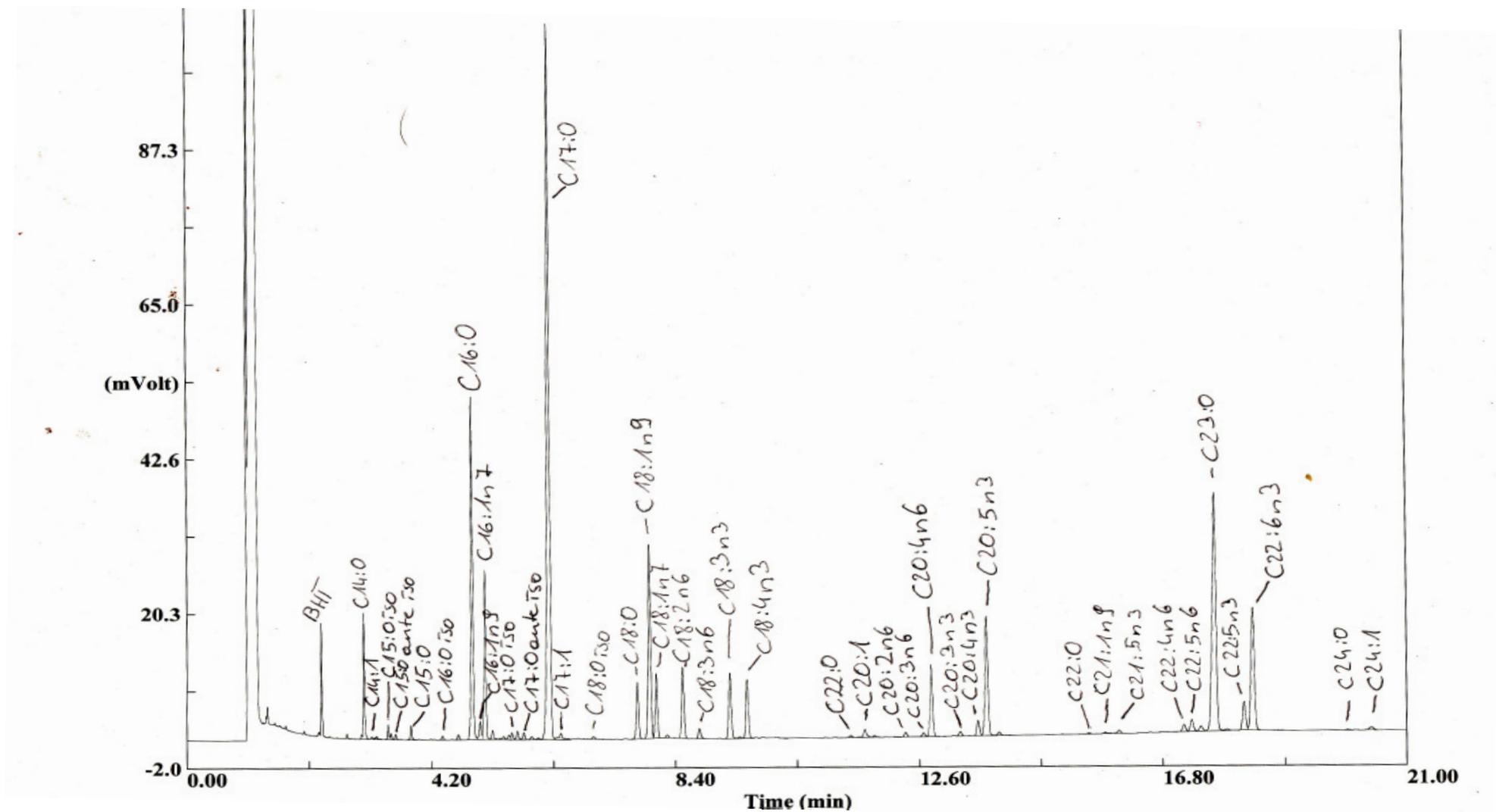


Abb. 16: Chromatogramm des Fettsäurespektrums des Renkenöls, nach Analyse in der GC

Bemerkenswert ist die Auffindung der C21:5n3, sie wird nur sehr selten in Fisch gefunden und wenn zumeist nur in Seefischen. Eindeutig identifiziert werden konnte sie nicht, jedoch lag die Fettsäure in den Chromatogrammen immer genau zwischen C20:5n3 und C22:5n3, sowohl nach Analyse in der GC mit Fid wie auch mit Massenspektrometer. Auch die Masse-Peaks 108 und 79 sind starke Hinweise darauf. Der Peak mit der Masse 108 gibt einen Hinweis auf eine PUFA und der Peak mit der Masse 79 weist hin auf eine n-3-Gruppe.

Der Großteil der gefundenen Fettsäuren gehörte zur Gruppe der ungesättigten Fettsäuren, sie machten zusammen etwa 69 % aus, die gesättigten Fettsäuren hingegen nur 27 %, die übrigen 4 % konnten leider nicht identifiziert und somit keiner Gruppe zugeordnet werden.

Das Verhältnis n-6/n-3 ist mit einem Durchschnittswert von 0,41 überraschend hoch und schwankte zwischen 0,3 und 0,4.

100 g Renkenfilet enthielten durchschnittlich unter einem Gramm gesättigte Fettsäuren und über 2 g ungesättigte Fettsäuren von denen etwa 1 g zur Gruppe der polyungesättigten n-3 Fettsäuren gehörten.

Aufgrund der bislang erst kurzen Dauer des Projektes und der eingetretenen Schonzeit war es leider nur möglich Jungfische zu untersuchen. Diese Untersuchungen kamen zu, aus ernährungswissenschaftlicher Sicht, sehr guten Ergebnissen. Fraglich bleibt jedoch wie und ob sich das Fettsäureverhältnis bei ausgewachsenen Tieren verschieben würden und ob der Fettgehalt bis hin zum ausgewachsenen Fisch noch steigt. Ein höherer Fettgehalt muss nicht unweigerlich auch zu einem höheren Gehalt der PUFAs führen, es kann zu einer vermehrten Anreicherung von gesättigten Fettsäuren kommen.

Es wäre in jedem Fall empfehlenswert die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu Fettgehalt und Fettsäurezusammensetzung bei ausgewachsenen Corogenen zu wiederholen.

**Tab.6: Zusammensetzung der untersuchten Renken in g/100 g**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>TM</b>	25.1	26.4	26.2	24.9	24.7	26.1	25.7	22.5	26.1	26.3	25.4	1.2
<b>Wasser</b>	74.9	73.6	73.8	75.1	75.3	73.9	74.3	77.5	73.9	73.7	74.6	1.2
<b>Protein</b>	21.3	21.9	20.8	21.1	20.1	21.5	20.5	20.2	20.7	20.9	20.9	0.6
<b>Fett</b>	3.2	3.3	4.1	2.7	3.4	3.5	2.9	2.5	4.5	3.9	3.39	0.6

**Fettsäurezusammensetzung:**

**Tab. 7: Gesättigte Fettsäuren in mg/100 g Filet**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>C14:0</b>	152.7	147.2	167.4	116.4	147.2	171.4	137.1	59.0	211.9	201.0	151.1	43.2
<b>C16:0</b>	565.2	521.3	638.8	426.9	576.1	544.1	461.9	497.5	687.4	588.3	550.8	78.6
<b>C18:0</b>	121.5	114.2	137.8	91.4	121.6	113.2	94.4	103.2	139.6	136.0	117.3	17.4
<b>C20:0</b>	5.6	5.5	5.9	3.3	4.7	5.4	4.2	3.6	5.8	6.7	5.1	1,1
<b>C22:0</b>	3.4	2.9	4.2	2.3	2.7	3.6	2.5	2.5	4.2	3.8	3.2	0.7
<b>C24:0</b>	2.0	1.9	1.5	1.4	1.5	2.4	1.4	1.8	2.4	2.2	1.85	0.4
<b>Gesamt</b>	850.4	793.0	955.5	641.7	853.8	840.1	701.5	667.6	1051.3	938.0	829.9	132.2

**Tab. 8: Bakterielle Fettsäuren in mg/100 g Filet**

	<b>R1R</b>	<b>R2R</b>	<b>R3R</b>	<b>R4R</b>	<b>R5R</b>	<b>R6R</b>	<b>R7R</b>	<b>R8R</b>	<b>R9R</b>	<b>R10R</b>	<b>MW</b>	<b>StAbw</b>
<b>C15:0</b>	20.0	17.7	20.5	15.3	19.8	23.6	15.2	12.1	25.4	21.3	19.1	4,1
<b>C15:0 iso</b>	29.6	25.9	32.8	20.9	32.1	36.9	24.6	7.1	45.0	34.7	29.0	10.3
<b>C15:0 ai</b>	8.7	6.7	8.1	5.6	9.6	11.0	7.0	5.5	13.2	10.6	8.6	2.5
<b>C16:0 iso</b>	3.3	4.0	5.5	6.4	4.9	3.1	4.8	3.5	17.2	3.4	5.6	4.2
<b>C17:0 iso</b>	19.7	18.1	20.2	14.4	22.4	19.0	13.3	11.8	31.2	21.7	19.2	5.5
<b>C17:0 ai</b>	14.8	14.6	15.3	10.0	12.9	15.1	10.9	7.6	18.5	17.9	13.8	3.4
<b>C18:0 iso</b>	9.0	9.2	9.2	6.0	6.8	8.4	6.9	4.4	9.7	11.6	8.1	2.1
<b>C19:0</b>	3.2	3.0	2.5	2.0	2.7	3.3	2.3	2.0	3.1	3.4	2.8	0.5
<b>gesamt</b>	108.3	99.2	114.1	80.6	111.2	120.4	85.0	54.0	163.3	124.6	106.1	29.4

**Tab. 9: Einfach ungesättigte Fettsäuren in mg/100 g Filet**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>C14:1</b>	6.1	9.6	8.5	9.9	8.0	10.5	8.3	2.4	16.3	9.7	8.9	3.5
<b>C15:1</b>	8.2	7.7	7.8	5.1	6.7	7.9	5.8	3.1	9.6	10.0	7.1	2.0
<b>C16:1n7</b>	222.5	225.2	320.7	212.1	296.0	298.3	240.2	181.6	417.2	281.2	269.5	68.4
<b>C16:1n9</b>	17.5	16.0	17.5	13.9	17.6	19.9	12.8	11.4	24.4	17.4	15.8	4.7
<b>C17:1</b>	17.6	15.9	21.7	16.6	13.9	20.8	3.4	13.5	23.2	7.4	15.4	6.2
<b>C18:1n9</b>	334.3	359.7	622.2	318.5	315.5	279.9	331.2	348.5	654.1	388.3	395.2	131.4
<b>C18:1n7</b>	107.8	109.3	141.9	97.6	125.7	250.1	91.8	116.1	160.5	119.6	132.0	46.2
<b>C20:1</b>	21.7	25.8	31.4	16.9	23.2	23.9	14.8	14.1	31.9	29.2	23.3	6.5
<b>C22:1n9</b>	3.2	7.1	5.0	2.7	2.8	5.3	2.2	2.0	6.9	9.5	4.7	2.5
<b>C24:1</b>	17.7	18.1	12.9	7.9	10.6	11.4	10.2	5.6	11.5	24.3	13.0	5.5
<b>gesamt</b>	756.6	794.4	1189.6	701.2	820.0	928.0	720.7	698.3	1355.1	886.6	885.1	221.2

**Tab. 10: Polyungesättigte Fettsäuren in mg/100 g Filet**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>C18:2n6</b>	134.5	138.7	161.2	113.4	133.4	157.5	117.5	94.2	195.4	172.7	141.9	30.3
<b>C20:2n6</b>	12.9	14.1	14.6	8.4	10.0	13.2	8.7	7.4	12.7	15.4	11.7	2.9
<b>C18:3n6</b>	17.8	15.5	23.5	17.7	23.8	27.9	18.3	12.4	34.7	65.6	25.7	15.5
<b>C18:3n3</b>	136.0	135.7	158.3	111.5	131.8	163.5	121.6	83.5	200.0	171.2	141.3	33.1
<b>C18:4n3</b>	112.1	121.8	148.2	101.1	119.9	155.8	125.2	48.0	207.1	165.6	130.5	42.5
<b>C20:3n6</b>	8.7	9.0	11.7	7.1	9.3	11.2	6.4	5.9	10.8	10.1	9.0	2.0
<b>C20:3n3</b>	14.7	14.9	14.7	8.4	10.5	13.6	8.3	7.0	12.5	16.9	12.2	3.4
<b>C20:4n6</b>	141.8	131.2	170.2	140.8	150.9	147.4	114.1	158.5	174.4	138.7	146.8	18.0
<b>C20:4n3</b>	50.3	54.1	59.4	31.9	40.1	53.4	34.7	16.6	51.3	68.4	46.0	15.3
<b>C21:5n3</b>	9.7	10.9	11.6	7.5	8.4	10.6	8.8	3.3	13.5	15.1	9.9	3.3
<b>C22:4n6</b>	15.3	14.2	19.6	15.5	15.7	17.4	11.3	15.6	18.9	17.1	16.1	2.4
<b>C20:5n3</b>	235.2	239.3	307.5	241.5	249.0	270.2	221.2	204.9	353.0	285.0	260.7	44.3
<b>C22:5n6</b>	40.5	47.4	37.2	25.8	29.0	32.4	32.4	17.6	35.8	63.0	36.1	12.5
<b>C22:5n3</b>	72.3	73.4	100.8	72.9	79.5	87.7	66.7	57.9	100.2	100.4	81.2	15.4
<b>C22:6n3</b>	408.6	432.8	421.2	290.5	344.9	329.8	344.0	298.4	357.2	543.2	377.1	76.1
<b>Gesamt</b>	1410.4	1453.0	1659.7	1194.0	1356.2	1491.6	1239.2	1030.7	1777.5	1848.4	1446.1	259.8

**Tab. 11: PUFAs n-3:n-6 in mg/100g Filet**

	<b>R1R</b>	<b>R2R</b>	<b>R3R</b>	<b>R4R</b>	<b>R5R</b>	<b>R6R</b>	<b>R7R</b>	<b>R8R</b>	<b>R9R</b>	<b>R10R</b>	<b>MW</b>	<b>StAbw</b>
<b>Σn-6</b>	371.5	370.1	438	328.7	372.1	407	308.7	311.6	482.7	482.6	387.3	164.3
<b>Σn-3</b>	1038.9	1082.9	1221.7	865.3	984.1	1084.6	930.5	719.1	1294.8	1365.8	1058.8	198
<b>Σn-6:n-3</b>	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0

**Fettsäurenanteile in % am Gesamtfett**

**Tab.12: Gesamtfett in mg/100 g Filet**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>mg/100g</b>	3237.5	3248.0	4053.7	2736.4	3367.4	3516.4	2853.0	2522.4	4482.1	3924.9	3394.2	618.9

**Tab. 13: Gesättigte Fettsäuren in % am Gesamtfett**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>C14:0</b>	4.7	4.5	4.1	4.1	4.4	4.9	4.8	2.3	4.7	5.1	4.4	0.8
<b>C16:0</b>	17.5	16.0	15.8	15.6	17.1	15.5	16.2	19.7	15.3	15.0	16.4	1.4
<b>C18:0</b>	3.8	3.5	3.4	3.3	3.6	3.2	3.3	4.1	3.1	3.5	3.5	0.3
<b>C20:0</b>	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.0
<b>C22:0</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
<b>C24:0</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
<b>Gesamt</b>	26.3	24.4	23.6	23.5	25.4	23.9	24.6	26.5	23.4	24.0	24.5	1.1

**Tab. 14: Bakterielle Fettsäuren in % am Gesamtfett**

	<b>R1R</b>	<b>R2R</b>	<b>R3R</b>	<b>R4R</b>	<b>R5R</b>	<b>R6R</b>	<b>R7R</b>	<b>R8R</b>	<b>R9R</b>	<b>R10R</b>	<b>MW</b>	<b>StAbw</b>
<b>C15:0</b>	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.7	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6	0.1
<b>C15:0 iso</b>	0.9	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	0.9	0.3	1.0	0.9	0.8	0.2
<b>C15:0 ai</b>	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.1
<b>C16:0 iso</b>	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.1	0.2	0.1
<b>C17:0 iso</b>	0.6	0.6	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	0.5	0.7	0.6	0.6	0.1
<b>C17:0 ai</b>	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.5	0.4	0.1
<b>C18:0 iso</b>	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1
<b>C19:0</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
<b>gesamt</b>	3.4	3.1	2.8	3.0	3.4	3.3	3.0	2.2	3.7	3.3	3.1	0.4

**Tab. 15: Einfach ungesättigte Fettsäuren in % am Gesamtfett**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>C14:1</b>	0.2	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3	0.3	0.1	0.4	0.2	0.3	0.1
<b>C15:1</b>	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1
<b>C16:1n7</b>	6.9	6.9	7.9	7.8	8.8	8.5	8.4	7.2	9.3	7.2	7.9	0.8
<b>C16:1n9</b>	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.6	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5	0.1
<b>C17:1</b>	0.5	0.5	0.5	0.6	0.4	0.6	0.1	0.5	0.5	0.2	0.4	0.2
<b>C18:1n9</b>	10.3	11.1	15.3	11.6	9.4	8.0	11.6	13.8	14.6	9.9	11.6	2.4
<b>C18:1n7</b>	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	7.1	3.2	4.6	3.6	3.0	3.9	1.2
<b>C20:1</b>	0.7	0.8	0.8	0.6	0.7	0.7	0.5	0.6	0.7	0.7	0.7	0.1
<b>C21:1n9</b>	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
<b>C24:1</b>	0.5	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2	0.3	0.6	0.4	0.1
<b>gesamt</b>	23.3	24.5	29.2	25.7	24.3	26.5	25.2	27.7	30.3	22.8	25.9	2.5

**Tab. 16: Polyungesättigte Fettsäuren in % am Gesamtfett**

	R1R	R2R	R3R	R4R	R5R	R6R	R7R	R8R	R9R	R10R	MW	StAbw
<b>C18:2n6c</b>	4.2	4.3	4.0	4.1	4.0	4.5	4.1	3.7	4.4	4.4	4.2	0.2
<b>C20:2n6</b>	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1
<b>C18:3n6</b>	0.6	0.5	0.6	0.6	0.7	0.8	0.6	0.5	0.8	1.7	0.7	0.4
<b>C18:3n3</b>	4.2	4.2	3.9	4.1	3.9	4.7	4.3	3.3	4.5	4.4	4.1	0.4
<b>C18:4n3</b>	3.5	3.8	3.7	3.7	3.6	4.4	4.4	1.9	4.6	4.2	3.8	0.8
<b>C20:3n6</b>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1
<b>C20:3n3</b>	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.1
<b>C20:4n6</b>	4.4	4.0	4.2	5.1	4.5	4.2	4.0	6.3	3.9	3.5	4.4	0.8
<b>C20:4n3</b>	1.6	1.7	1.5	1.2	1.2	1.5	1.2	0.7	1.1	1.7	1.3	0.3
<b>C21:5n3</b>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.1	0.3	0.4	0.3	0.1
<b>C22:4n6</b>	0.5	0.4	0.5	0.6	0.5	0.5	0.4	0.6	0.4	0.4	0.5	0.1
<b>C20:5n3</b>	7.3	7.4	7.6	8.8	7.4	7.7	7.8	8.1	7.9	7.3	7.7	0.5
<b>C22:5n6</b>	1.3	1.5	0.9	0.9	0.9	0.9	1.1	0.7	0.8	1.6	1.1	0.3
<b>C22:5n3</b>	2.2	2.3	2.5	2.7	2.4	2.5	2.3	2.3	2.2	2.6	2.4	0.2
<b>C22:6n3</b>	12.6	13.3	10.4	10.6	10.2	9.4	12.1	11.8	8.0	13.8	11.2	1.8
<b>gesamt</b>	43.9	44.9	41.0	43.6	40.4	42.5	43.4	40.8	39.7	47.1	42.7	2.3

**Tab. 19: PUFAs n6:n3 in % am Gesamtfett**

	<b>R1R</b>	<b>R2R</b>	<b>R3R</b>	<b>R4R</b>	<b>R5R</b>	<b>R6R</b>	<b>R7R</b>	<b>R8R</b>	<b>R9R</b>	<b>R10R</b>	<b>MW</b>	<b>StAbw</b>
<b>Σ n-6</b>	11.7	11.4	10.9	11.9	11.2	11.6	10.7	12.3	10.8	12.3	11.5	0.6
<b>Σ n-3</b>	32.2	33.5	30.1	31.7	29.2	30.9	32.7	28.5	28.9	34.8	31.2	2.1
<b>Σ n-6:n3</b>	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1

#### 4.4. Identifizierung unbekannter Fettsäuren

Nach der gaschromatographischen Analyse des extrahierten Fischöls gab es noch eine Reihe nicht identifizierter Fettsäuren, denn die darin enthaltenen Fettsäuren waren nicht alle im 37-Komponentenstandard, der zu deren Identifizierung diente, enthalten. Zum Beispiel enthielt der Standard keine verzweigt-kettigen Fettsäuren, jedoch ist bekannt, dass Fischöl sowohl iso- wie auch anteiso-Fettsäureisomere gesättigter Fettsäuren enthält. Wie sich herausstellte, wurden auch einige Fettsäuren vom Programm, aufgrund nahe zusammenliegender Retentionszeiten, falsch bezeichnet. Soweit möglich sollten diese, bis dahin unbenannten Fettsäuren, mit Hilfe einer Silberionendünnschichtchromatographie und anschließender gaschromatographischer Analyse der aufgetrennten Fettsäurefraktionen identifiziert werden.

Durch die mit Silberionen imprägnierte Dünnschichtplatte war es möglich die im Fischöl enthaltenen Fettsäuren in ihre einzelnen Fraktionen aufzutrennen. Je nach Anzahl ihrer Doppelbindungen wurden sie unterschiedlich stark zurückgehalten, wobei die hochungesättigten Fettsäuren an der Startlinie kleben blieben und die gesättigten Fettsäuren durch das Laufmittelgemisch fast bis zur Lösungsmittelfront mitgetragen wurden. [CHRISTIE, 2009]

Über die einzelnen Fettsäurefraktionen des Fischöls, die durch die Auftrennung über die Silberionendünnschichtchromatographie erhalten wurden, war es möglich weitere, bisher unbenannte Fettsäuren zu identifizieren. Durch Besprühen der entwickelten Dünnschichtplatte mit einem UV-Farbstoff konnten die einzelnen Fraktionen bei 366 nm unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Nach Extraktion der Fettsäuren aus dem von der Platte abgekratzten Silicagel, konnte deren Identifizierung über den Gaschromatographen erfolgen, erst hier wurde sichtbar, dass die Fraktionierung des Fischöls tatsächlich funktioniert hatte.

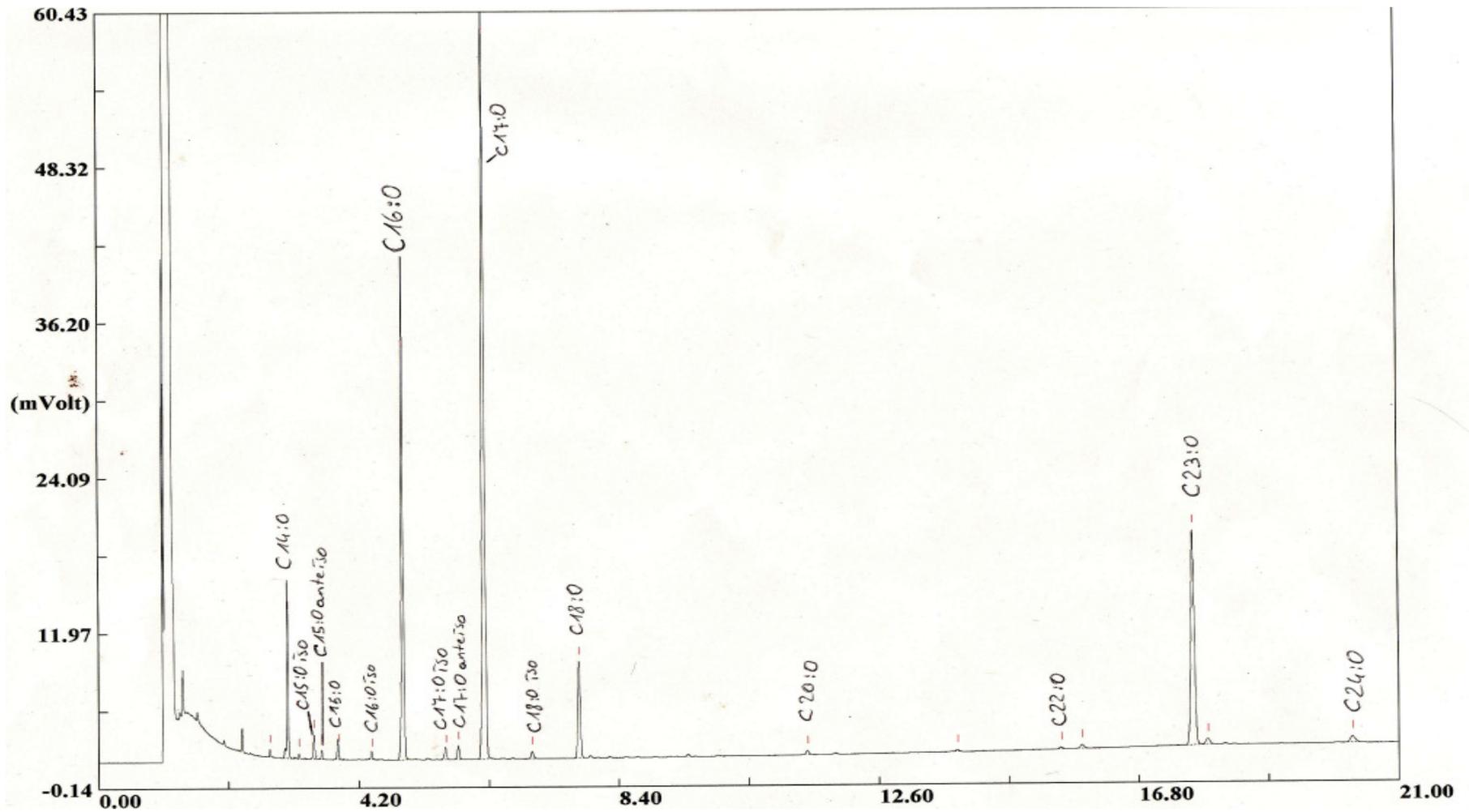


Abb. 17: Chromatogramm der 7. Fettsäurefraktion der DC-Platte: Die gesättigten Fettsäuren

Auf der Platte wurden insgesamt 7 fluoreszierende Banden gefunden. Die erste von unten enthielt die hochungesättigten Fettsäuren, mit 4 – 6 Doppelbindungen. In der 2. Fraktion waren die 3-fach ungesättigten FS, in der 3. die Dienfettsäuren, in der 4. die Monoen- und in der 7. die gesättigten Fettsäuren enthalten. Die 5. und 6. Bande enthielt jeweils keine Fettsäuren, sondern nur das dem Fischöl zugesetzte Antioxidans BHT, das ebenfalls fluoreszierende Banden hervorrufen kann.

Durch die Auftrennung des Fischöls in seine einzelnen Fettsäurefraktionen war es möglich eine Reihe weiterer Fettsäuren zu identifizieren.

Vor allem iso und ante-iso Isomere der gesättigten Fettsäuren, wurden aufgrund ihrer Retentionszeiten identifiziert. Die C17:0 iso befand sich genau zwischen C16:0 und C17:0 und die C17:0 ante-iso ist exakt zwischen C17:0 iso und C17:0 lokalisiert. Bei den anderen iso und ante-iso Fettsäuren verhielt es sich ebenfalls so. Diese Isomere der gesättigten Fettsäuren werden hauptsächlich durch Bakterien gebildet und gelangen über die Nahrung ins Fettgewebe der Fische. [RASOARAHONA et al., 2004]

Abbildung 17 zeigt das Chromatogramm der gesättigten Fettsäuren die aus der siebenten fluoreszierenden Bande der Dünnschichtplatte extrahiert wurden. Sie sollte nur gesättigte Fettsäuren enthalten, jedoch zeigte das Chromatogramm auch einige Monoenfettsäuren. Diese waren eigentlich gesättigte Fettsäuren die vom auswertenden Programm aufgrund ihrer ähnlichen Retentionszeiten falsch bezeichnet wurden. Beim Vergleich des Chromatogramms dieser Fettsäurefraktion mit dem Chromatogramm des gesamten Renkenöls ließ jedoch deutlich erkennen, dass die Retentionszeiten eindeutig nicht übereinstimmten. Die C16:0 iso wurde als C16:1 bezeichnet was aufgrund der Peakflächen eindeutig nicht möglich war.

Die nach der ursprünglichen gaschromatographischen Analyse als C21:0 bezeichnete Fettsäure entpuppte sich als C20:4n3, sie fand sich nach Auftrennung der Fettsäuren über die Silberionendünnschichtplatte in der Fraktion mit den 4-fach ungesättigten Fettsäuren und konnte über Vergleich der

Retentionszeiten und Übereinanderlegen der Chromatogramme dieser Fraktion und eines Chromatogramms des gesamten Fettsäurespektrums der Reinanke eindeutig identifiziert werden. Auch wurden die Fettsäuren C16:1n9 und C21:5n3 erkannt.

#### 4.5. Vitamin E Isomere

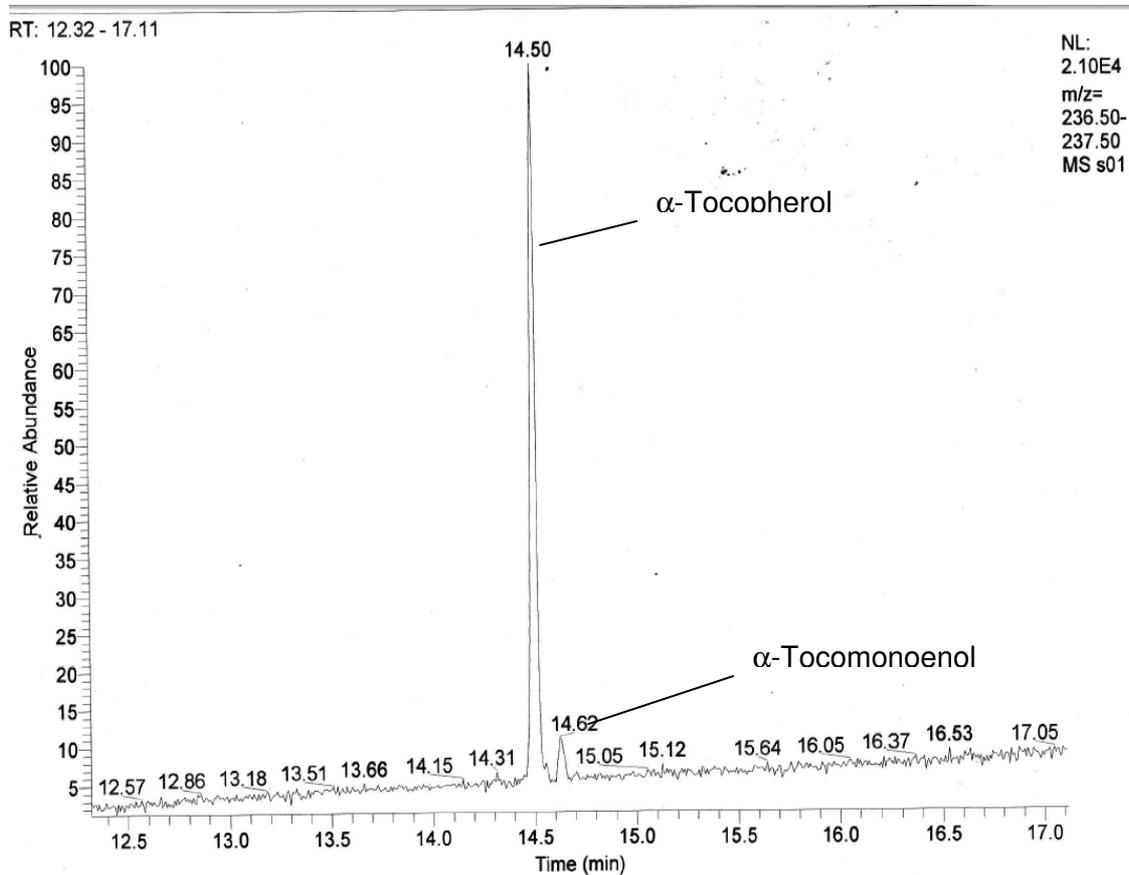
Besondere Aufmerksamkeit lag bei der Auffindung von Vitamin E-Isomeren auf der Identifizierung eines besonderen Isomers, dem  $\alpha$ -Tocomonoenol. Das sogenannte Marine derived Tocomonoenol, besitzt eine ungewöhnliche Doppelbindung am Ende seiner Phytolseitenkette.

Ein weiteres  $\alpha$ -Tocomonoenolisomer wurde bis jetzt vor allem in Palmfett gefunden, als Zwischenprodukt der Synthese von Tocotrienolen aus Tocopherolen. Es konnte besonders in Seefischen aus arktischen Gebieten ein Isomer in verhältnismäßig hohen Konzentrationen gefunden werden. Das MDT enthält eine ungewöhnliche Doppelbindung am Ende seiner Phytolseitenkette, und es stammt mit Sicherheit aus der marinen Nahrungskette, da es auch in Krill und Phytoplankton identifiziert werden konnte. Hinzu kommt, dass Vitamin E-Isomere ausschließlich von Pflanzen und anderen Photosynthese betreibenden Lebewesen synthetisiert können, das heißt, dass sowohl Tier als auch Mensch diese Verbindungen über die Nahrung aufnehmen müssen.

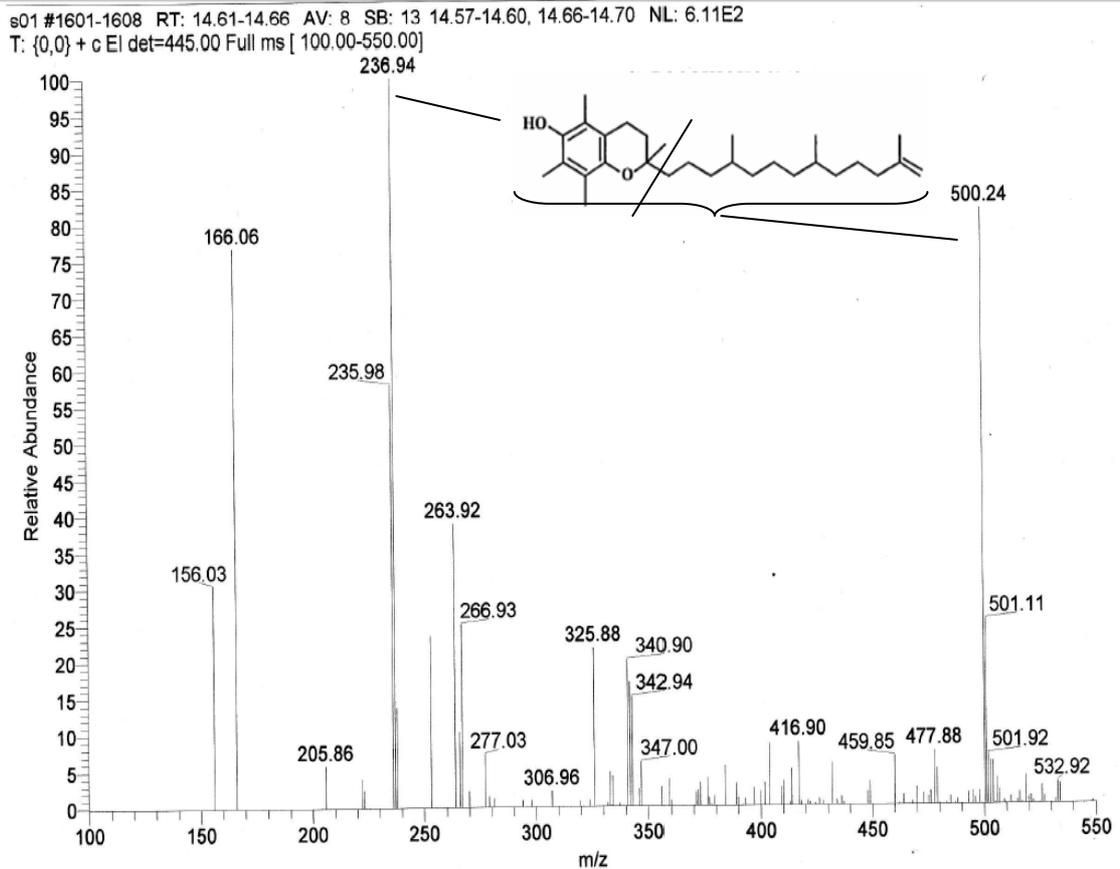
[YAMAMOTO et al., 2007]

Durch die Derivatisierung von Trimethylsilylestern der nicht verseifbaren Fraktion des Fischöls konnte durch dessen Analyse im Gaschromatographen mit Massenspektrometer ein  $\alpha$ -Tocomonoenol nachgewiesen werden. Dessen Quantifizierung erfolgte allerdings nicht durch den zugesetzten internen Standard, sondern über das Verhältnis der Peakflächen von  $\alpha$ -Tocopherol zu  $\alpha$ -Tocomonoenol. Dies geschah mit Hilfe der, über eine externe Standardreihe auf der HPLC berechneten  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im extrahierten Fischöl. Diese Methode zur Berechnung ist vielleicht nicht besonders genau, aufgrund

eines fehlenden Tocomenolstandards jedoch nötig und sie lässt immerhin eine ungefähre Abschätzung des Tocomenolgehaltes zu.



**Abb. 18: Chromatogramm von  $\alpha$ -Tocomenol und  $\alpha$ -Tocopherol nach Auftrennung über die GC-MS**



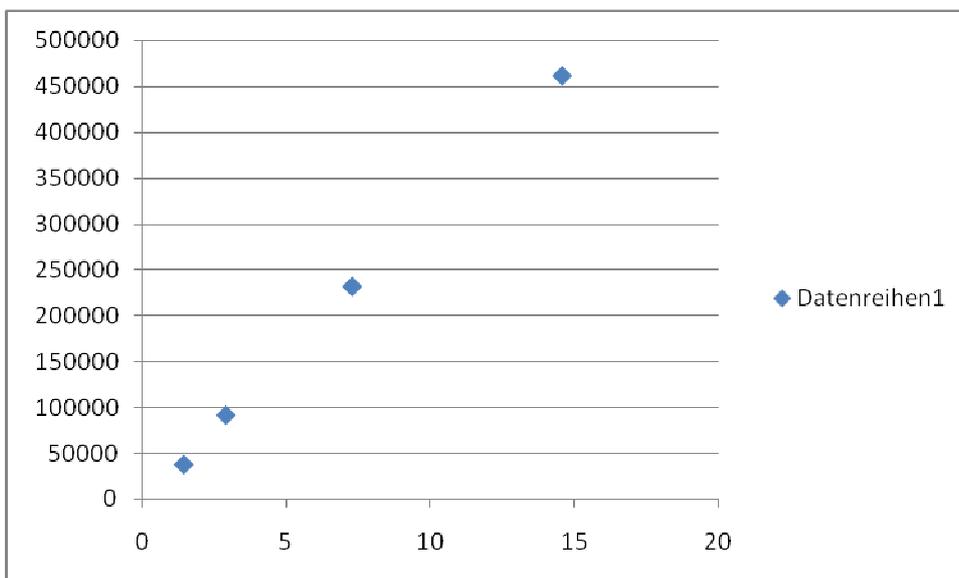
**Abb. 19: Massenspektrum von  $\alpha$ -Tocomonoenol**

Ein großes Problem bei der Tocopherolbestimmung in der GC-MS zeigte sich darin, dass das zu ermittelnde  $\alpha$ -Tocopherol mit dem Cholesterin überlappte. Deshalb war es notwendig dieses über die HPLC zu quantifizieren. Hier war es jedoch nicht möglich das  $\alpha$ -Tocomonoenol zu identifizieren. Aufgrund ihrer ähnlichen Struktur überlappen die beiden Peaks von  $\alpha$ -Tocopherol und -Tocomonoenol und waren nicht aufzutrennen.

Abgesehen von  $\alpha$ -Tocopherol und -Tocomonoenol enthielten die untersuchten Reinanken keinerlei Vitamin E Isomere. Die über die HPLC bestimmte  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration der Renkenfilets betrug 115,5  $\mu\text{g/g}$  Fischöl. Das nachgewiesene Tocomonoenol war mit 7,3  $\mu\text{g/g}$  Fischöl in weitaus geringeren Mengen enthalten.

**Tab. 23: Werte zur Berechnung der Standardgeraden für  $\alpha$ -Tocopherol**

Konzentration	Peakfläche
1,46	37158
2,92	90995
7,3	231166
14,59	460812
Steigung	3,11718E-05
Achse	0,176252662

**Abb. 20: Auf der HPLC ermittelte Standardgerade von  $\alpha$ -Tocopherol**

Da es sich bei den untersuchten Fischen um keine Zuchtfische handelte, stammt das MDT aus der natürlichen Nahrungskette und nicht aus zugefüttertem Fischmehl. Hieraus lässt sich schließen, dass auch Süßwasserplankton und -algen MDT synthetisieren können. Das Tocomonolenol konnte auch nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, laut Literaturangaben wäre anzunehmen, dass mit fischölangereichertem Futter aufgezogene Tiere einen höheren MDT-Gehalt im Gewebe aufweisen würden. [DUNLAP et al., 2002]

## 5. Schlussbetrachtung

Seine Bedeutung in der Ernährung des Menschen erhält Fisch vor allem durch seinen hohen Anteil an essentiellen, hochungesättigten n-3 Fettsäuren und dem hohen Gehalt an hochwertigem Eiweiß. Das Fischprotein ist dem von Säugern insofern überlegen, da es durch seinen niedrigen Bindegewebsgehalt von nur 1 – 2% sehr leicht verdaulich ist. Auch enthält Fisch eine Reihe von Vitaminen und Mineralstoffen, wie Vitamin A, D und E und einige Vitamine der B-Reihe, sowie die Mineralstoffe Phosphor, Eisen, Fluor und Jod, wobei der Natriumgehalt gleichzeitig sehr gering ist.

Im Gegensatz zum Fettgehalt, der auch bei Tieren derselben Art stark schwanken kann, je nach Geschlecht, Alter, Jahreszeit und Futterangebot, ist der Proteingehalt bei gesunden Fischen einer Art nahezu identisch. Vor allem der Vergleich von wildlebenden und gezüchteten Fischen stellt dies eindrucksvoll dar. Auch ist das Fett, im Gegensatz zum Eiweiß, in Fischen nicht homogen verteilt, es sammelt sich vor allem im Bauchraum an und der Gehalt steigt zum Kopfende hin an, wobei überflüssiges Fett bei magerfischen hauptsächlich in der Leber gespeichert wird.

In Fisch enthaltene essentielle und die hochungesättigten Eicosapentaen- und Docosahexaenfettsäuren sind besonders von Bedeutung für Entwicklung von Gehirn- und Nervensystem, sowie für die Gesunderhaltung und die Prävention häufig auftretender ernährungsassoziierter Erkrankungen, wie koronarer Herzerkrankungen und Diabetes mellitus. Als Bestandteile von Zellmembranen besitzen sie eine Reihe von Aufgaben die zur Aufrechterhaltung der Funktion aller Zellen unerlässlich sind. Bedeutend hierfür ist vor allem auch ein ausreichendes Verhältnis an n-3 zu n-6 Fettsäuren das nicht kleiner als 1:5 sein sollte. Aus diesen Gründen sollten EPA und DHA, auch wenn sie durch Kettenverlängerung und Desaturierung vom Körper gebildet werden können, in ausreichenden Mengen mit der Nahrung aufgenommen werden.

Dahingehend wird empfohlen 2-mal die Woche Fisch zu essen, dem in Österreich eher selten nachgekommen wird. Aufgrund des hohen Proteingehalts und des auffällig hohen n-3 zu n-6 Verhältnisses erweisen sich

die untersuchten Renkenfilets als ein besonders empfehlenswertes Lebensmittel zur Ergänzung einer gesunden Ernährung. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass die Zubereitungsart von Fisch enorme Auswirkungen auf das endgültige n-3 zu n-6 PUFA Verhältnis haben kann. Denn Lebensmittel können zum Beispiel beim Frittieren Frittierfett aufnehmen und dies kann wiederum das Verhältnis zu Ungunsten der omega-3-Fettsäuren verschieben. Günstigere Zubereitungsmethoden wären Kochen, Dünsten oder Dämpfen. Will man auf ein anbraten in Öl nicht verzichten wären Rapsöl, Sesamöl und Olivenöl empfehlenswerter als Schweineschmalz.

Neben den PUFAs EPA und DHA wurde in den untersuchten Fischfilets eine weitere ungesättigte Fettsäure in hohen Mengen gefunden Fettsäure, die Palmitoleinsäure. Sie erhält mehr und mehr Aufmerksamkeit, da sie über mehrere Mechanismen in der Lage zu sein scheint in der Entstehung von Diabetes mellitus präventiv zu wirken. Mehrere Studien zeigten, dass diese Fettsäure in der Lage ist, die durch Palmitinsäure induzierte Apoptose pankreatischer  $\beta$ -Zellen zu hemmen. Auch weist die Möglichkeit der endogenen Synthese in der Leber darauf hin, dass sie unter Umständen ein induziertes Lipidhormon sein könnte.

Das in den Filets in sehr geringen Mengen gefundene „marine derived Tocomenol“, sowie die Abwesenheit der in Zuchtfischen häufig gefundenen marinen Fettsäuren C22:1n9 und C22:2n11, weisen darauf hin, dass es sich bei den untersuchten Reinanken tatsächlich um Wildfische handelte. Höhere Mengen an MDT und den genannten Fettsäuren werden häufig in Zuchtfischen gefunden, da diese zumeist mit Fischmehl oder Fischöl angereichertem Futter aufgezogen werden. Dadurch reichern sich die genannten Verbindungen im Depotfett an, denn derartige Futterzusätze stammen in der Regel aus Abfallprodukten des marinen Fischfangs. Die geringen Mengen an MDT die in der Reinanke nachgewiesen werden konnten stammen wohl aus der Nahrungskette, da es von in Süßwasser lebendem Plankton und Algen synthetisiert werden kann.

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Durchführung einer Homogenitätsprüfung von Gesamtfett und -protein, wie auch eine Quantifizierung von Protein, Fett und Fettsäuren in Filets wildlebender Reinanken aus dem Millstättersee. Zusätzlich wurde eine Vitamin E Bestimmung und Quantifizierung der einzelnen im Filet enthaltenen Vitamere durchgeführt.

Bei der Probenaufbereitung wurden die Renkenfilets enthäutet und gefriergetrocknet. Das anschließend fein vermahlene Lyophilisat wurde durch ein Verfahren in einem Schritt extrahiert und transesterifiziert, die hierdurch gebildeten Fettsäuremethylester wurden durch eine Auftrennung im Gaschromatographen identifiziert und quantifiziert.

Einige der hierbei nicht identifizierten Fettsäuren konnten anschließend, durch Auftrennung des Fischöls in seine Fettsäurefraktionen benannt werden. Hierzu wurde das Fischöl über eine mit Silbernitrat imprägnierte Silicagelplatte aufgetrennt und die einzelnen Fettsäurefraktionen erneut gaschromatographisch analysiert.

Das Protein ist im Filet im Gegensatz zum Fett weitestgehend homogen verteilt. Der Proteingehalt war auch in den anderen Filets konstant, wohingegen der Fettgehalt in den einzelnen Renkenfilets zwischen 2,5 g und 4,5 g schwankte. Der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist auffällig hoch, er beträgt durchschnittlich in etwa 43 % am Gesamtfett und auch das Verhältnis von n-6 zu n-3 Fettsäuren ist mit Schwankungen von 0,3 bis 0,4 sehr erfreulich. Die gefundenen verzweigt-kettigen gesättigten Fettsäuren stammen aus der Nahrungskette und werden vor allem von Bakterien gebildet. Die untersuchten Filets sind aufgrund der vorliegenden Fettsäurezusammensetzung eine sehr hochwertige Quelle für polyungesättigte Fettsäuren.

Die im Filet gefundenen geringen Mengen an  $\alpha$ -Tocopherol und MDT stammen aus der Nahrung, sie können vom Fisch selbst nicht jedoch von Photosynthese betreibenden Kleinstlebewesen wie Phytoplankton synthetisiert werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) ACKMAN R. G. Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids. In: RUITER A.: Fish and Fishery Products – Composition, Nutritive Properties and Stability. CAB International 1995, Wallingford
- (2) ASADA T. Prevention of Alzheimer's disease: Putative nutritive factors; Psychogeriatrics 2007; 7: 125 - 131
- (3) ASCHERIO A., WILLET W. Health effects of trans fatty acids; American Journal of Clinical Nutrition 1997; 66 (4 Suppl): 1006S-1010S
- (4) BELITZ H., GROSCH W., SCHIEBERLE P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie; Springer Verlag, Berlin-Heidelberg; 2001
- (5) BERRY E., EISENBERG S., HARAZ D., FRIEDLANDER Y., NORMAN Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins – the Jerusalem Nutrition Study: high MUFAs vs high PUFAs; American Journal of Clinical Nutrition 1991; 53, 899 – 907
- (6) BIESALSKI H., FÜRST P., KASPER H., KLUTHE R., PÖLERT W., PUCHSTEIN C., STÄHELIN H. Ernährungsmedizin: Nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer, Georg Thieme Verlag, 2004
- (7) BÖCKER J. Chromatographie – Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrode; 1. Auflage, Vogel Verlag und Druck GmbH & Co. 1997
- (8) BOUDRAULT C., BAZINET R., MA D. Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease; Journal of Nutritional Biochemistry 2009; 20: 1 – 10
- (9) BUSCH-STOCKFISCH M. Lebensmittellexikon; Behr's Verlag, Deutschland 2005; Ausgabe 4; 559 - 569
- (10) CALDER P. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: Pouring oil on troubled water or another fishy tale? Journal of Nutrition Research 2001<sup>a</sup>; 21, 309 – 341
- (11) CALDER P. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity; Lipids 2001<sup>b</sup>; Vol. 36; 1007 - 1023
- (12) CALDER P. n-3 Fatty acids, inflammation and immunity-relevance to postsurgical and critically ill patients; Lipids 2004; 39, 1147 – 1161

- (13) CALDER P. Polyunsaturated fatty acids and inflammation; Biochemical Society Transactions 2005; Volume 33, 423 – 427
- (14) CAO H., GERHOLD K., MAYERS J., WIEST M., WATKINS S., HOTAMISLIGIL G. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism; Cell 2008; 134, 933 – 944
- (15) CHRISTIE W. Lipid library; [www.lipidlibrary.co.uk](http://www.lipidlibrary.co.uk): Kapitel: What is a lipid?; Fatty acids and eicosanoids; GC and lipids; Silverion chromatography of lipids; Stand vom 28.02.2009
- (16) CLAYTON E., HANSTOCK T., MANOHAR G., HAZELL P. Long chain omega 3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of psychiatric illnesses in children and adolescents; Acta Neuropsychiatrica 2007; 19: 92 - 103
- (17) CURB J., WERGOWSKA G., DOBBS J., ABBOTT R., HUANG B., Serum lipid effects of a high-monounsaturated fat diet based on macadamia nuts; Arch. Intern Med. 2000; 160, 1154 - 1158
- (18) DHEIN S., HAMMERATH S.-B. Aspects of the intercellular communication in aged hearts: Effect of the gap junction uncoupler palmitoleic acid; Arch. Pharmacol. 2001; 364, 397 - 408
- (19) DHEIN S., KRÜSEMANN K., SCHAEFER T. Effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid on the activation and repolarization wavefronts in isolated rabbit hearts; British Journal of Pharmacology 1999; 128, 1375 – 1384
- (20) DUNLAP W., FUJISAWA A., YAMAMOTO Y., MOYLAN T., SIDELL B. Notothenioid fish, krill and phytoplankton from Antarctica contain a vitamin E constituent ( $\alpha$ -tocomonoenol) functionally associated with cold-water adaptation; Comparative Biochemistry and Physiology 2002; Part B 133: 299 - 305
- (21) FELDMAN E. Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts; American Journal of Clinical Nutrition 1997; 10, 953 – 954
- (22) FIORENTINO A., MASTELLONE C., D'ABROSCA B., FACIFICO S., SCOGNAMIGLIO M., CEFARELLI G., CAPUTO R., MONACO P.  $\delta$ -Tocomonoenol: A new vitamin E from Kiwi (*Actinidia chinensis*) fruits; Food chemistry 2009; 115, 187 – 192

- (23) FUKUCHI S., HAMAGUCHI K., SEIKE M., HIMENO K., SAKATA T., YOSHIMATSU H. Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats; *Experimental Biology and Medicine* 2004; 229, 486 – 493
- (24) FUNG W., STUART B., PRICHARD E. *High Performance Liquid Chromatography*; Royal Society of Chemistry 2003; GB
- (25) GELEIJNSE J., GILTAY E., GROBBEE D., DONDEERS A., KOK F. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials; *Journal of Hypertension* 2002; 20 (8): 1493 - 1499
- (26) GLANDORF K., KUHNERT P. *Handbuch der Lebensmittelzusatzstoffe*; Behr's Verlag, Hamburg 1991; CV 1
- (27) GRIEL A., KRIS-ETHERTON P., HILPERT K., ZHAO G., WEST S., CORWIN R. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans; *Nutrition Journal* 2007; 6:2
- (28) GROB K. und BIEDERMANN M. Video-taped sample evaporation in hot chambers simulating gas chromatography split/splitless injectors I. Thermospray injection; *Journal of Chromatography A* 2000; 897: 237 – 246
- (29)
- (30) GOTOH N., WATANABE H., OKA T., MASHIMO D., NOGUCHI N., HATA K., WADA S.; Dietary marine-derived Tocopherol has a higher biological availability in mice relative to alpha-Tocopherol; *Lipids* 2009; 44: 133 – 143
- (31) GOTTWALD W. *Die Praxis der instrumentellen Analytik – GC für Anwender*; VCH-Weinheim, 1995; 28 - 48
- (32) GRAMLICH G., ZHANG J., NAU W. Diffusion of alpha-Tocopherol in membrane models: Probing the kinetics of Vitamin E antioxidant action by fluorescence in real time; *Journal of the American Chemical Society* 2004; 126 (17), 5482 - 5492
- (33) GRUNDT H., NILSON D. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease; *Haematologica* 2008; 93 (6) 807 – 812
- (34) HALLAHAN B., GARLAND M. Essential fatty acids and mental health; *British Journal of Psychiatry* 2005; 186: 275 - 277

- (35) HARDMAN W. (N-3) Fatty acids and cancer therapy; Journal of Nutrition 2004; 134 (12 suppl.) 3427S – 3430S
- (36) HARRIS W. Fisch oil supplementation: Evidence for health; Cleveland clinical Journal of Medicine 2004; Vol. 71, Nr. 3, 208 – 221
- (37) HARVEY D. Modern Analytic Chemistry; McGraw Hill Publish 2000; S 563 - 570
- (38) HJERKINN E., SELJEFLOT I., ELLINGSEN I., BERSTAD P., HJERMANN I., SKANDVIK L., ARNESEN H. Influence of long term intervention with dietary counseling, long chain n-3 fatty acid supplementation, or both on circulating markers of endothelial activation in men with long-standing hyperlipidemia; American Journal of Clinical Nutrition (2005); 81 (3): 583 - 589
- (39) HÖGSTRÖM M., NORDSTRÖM P., NORDSTRÖM A., n-3 fatty acids are positively associated with peak bone mineral density and bone accrual in healthy men: the NO<sub>2</sub> Study; American Journal of Clinical Nutrition 2007; 85: 803 – 807
- (40) JENKINS D., HU F., JOSSE A., KENDALL C. Possible benefit of nuts in Type 2 Diabetes; Journal of Nutrition 2008; 138: 1752S – 1756S
- (41) JENNINGS W., MITTFELDLT E., STREMPLE P. Analytical Gas Chromatography 2nd Edition; academic press 1997, London, S 54
- (42) JUDD T., CLEVIDENCE B., MUESING R., WITTES J., SUNKIN M. E., PODCZASY J. Dietary trans fatty acids : effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women; American journal of clinical nutrition 1994; Vol. 59, 861-868
- (43) KATZ E., EKSTEEN R., SCHOENEMAKERS P., MILLER N. Handbook of HPLC; Chromatographic Science Series Vol. 78; Marcel Dekker, Inc. 1998; 325 - 360
- (44) KINSELLA J., LOKESH B., STONE R. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: Possible mechanisms; American Journal of Clinical Nutrition 1990; 52, 1 -28
- (45) KOMPAUER I., DEMMELMAIR H., KOLETZKO B., BOLTE G., LINSEISEN J., HEINRICH J. Association of fatty acids in serum phospholipids

with lung function and bronchial hyperresponsiveness in adults; *European Journal of Epidemiology* 2008; 23, 175 – 190

**(46)** KRIS-ETHERTON P., PEARSON T., WAN Y., HARGROVE R., MORIARTY K., FISHELL V. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations; *American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 70, 1009 – 1015

**(47)** LANE DUVALL; Endothelial Dysfunction and Antioxidants; *The Mount Sianai Journal of Medicine* 2005; Vol. 72(2) 71 – 80

**(48)** LI Q., ZHANG Q., WANG M., ZHAO S., XU G., LI J. n-3 Polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines; *Molecular Immunology* 2008; 45, 1356 – 1365

**(49)** LOPEZ-GARCIA E., SCHULZE M., MEIGS J., MANSON J., RIFAI N., STAMPFER M., WILLET W., HU F. Consumption of trans fatty acids is related to biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction; *Journal of Nutrition* 2005; 135: 562 - 566

**(50)** LUNN J., THEOBALD H. The health effects of dietary unsaturated fatty acids; *Nutrition Bulletin* 2006; 31, 178 – 224

**(51)** MAEDLER K., SPINAS G. A., DYNTAR D., MORITZ W., KAISER N., DONATH M. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function; *Diabetes* 2001; Vol. 50, 69 – 76

**(52)** MARZO N., MORA C., FABREGAT M., MARTIN J., USAC E., FRANCO C., BARBACID M., GOMIS M. Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C (Cdk4) knockin mice have significantly increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that Cdk4 is a potential target for pancreatic beta cell mass regeneration in Type 1 diabetes; *Diabetologia* 2004; 47: 686 – 694

**(53)** MEYER V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*; John Wiley and Sons 2000; Third Edition 4 - 86

**(54)** MILTE C., COATES A., BUCKLEY J., HILL A., HOWE P. Dose dependent effects of docosahexaenoic acid-rich fishoil on erythrocyte docosahexaenic acid and lipid levels; *British Journal of nutrition* 2008; 99, 1083 – 1088

- (55) MIYASAKA C., MENDOCA J., NISCHIYAMA A., ALVES DE SOUZA J., PIRES DE MELO M., PITHON-CURI T., CURI R. Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes; *Life Sciences* 69 (15) 1739 - 1751
- (56) MIYAZAWA T., SHIBATA A., SOOKWONG P., KAWAKAMI Y., EITSUKA T., ASAI A., OIKAWA S., NAKAGAWA K. Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol); *Journal of Nutritional Biochemistry* 2009; 20: 79 - 86
- (57) MOLLARD R., GILLAM M., WOOD T., TAYLOR C., WEILER H. (n-3) fatty acids reduce the release of Prostaglandin E<sub>2</sub> from bone but do not affect bone mass in obese (fa/fa) and Lean Zucker rats; *Journal of Nutrition* 2005; 135:499 – 504
- (58) MOURENTE G., BELL J., TOCHER D. Does dietary tocopherol level affect fatty acid metabolism in fish? *Fish Physiology and Biochemistry* 2007; 33: 269 -280
- (59) NESTEL P., CLIFTON P., NOAKES M. Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men; *Journal of Lipid Research* 1994; 35, 656 – 662
- (60) NICKLAS T., HAMPL J., TAYLOR C., THOMPSON V., HEIRD W. Monounsaturated fatty acid intake by children and adults: Temporal trends and demographic differences; *Nutrition Reviews* 2004; Vol. 62, No. 4, 132 – 141
- (61) OKADA T., FURUHASHI N., KUROMORI Y., MIYASHITA M., IWATA F., HARADA K. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children; *American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 82, 747 – 750
- (62) PARATHASARATHY S., LITVINOV D., SELVARAJAN K., GARELNABI M. Lipid peroxidation and decomposition – Conflicting roles in plaque vulnerability and stability; *Biochimica et Biophysica Acta* 1781: Molecular and Cell Biology of Lipids 2008; 221 -231
- (63) PUAH C., CHOO Y., MA A., CHUAH C. The effect of physical refining on palm vitamin E (Tocopherol, Tocotrienol and Tocomonoenol); *American Journal of Applied Sciences* 2007; 4 (6): 374 – 377

- (64) RASOARAHONA J.; BARNATHAN J., GAYDOU E. Annual evolution of fatty acid profile from muscle lipids of the common carp (*Cyprinus carpio*) in Madagascar inland waters; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 57 (24), 7339 - 7344
- (65) RUXTON C., REED S., SIMPSON M., MILLINGTON K. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of evidence; *Journal of human nutrition and Dietetics* 2007; 20, 275 – 285
- (66) SALARI P., REZAIE A., LARIJANI B., ABDOLLAHI M. A systematic review of n-3 fatty acids in bone health and osteoporosis; *Medical Science Monitor* 2008; 14(3): RA 37 - 44
- (67) SESSO H., BURING J., CHRISTEN W., KURTH T., BELANGER C., MAEFADYEN J., BUBES V., MANSON J., GLYNN R., GAZIANO M. Vitamins E and C in the Prevention of Cardiovascular Disease in Men – The Physicians' Health Study II Randomized Controlled Trial; *Journal of the American Medical Association* 2008; Vol. 300(18); 2123 - 2133
- (68) SIEKMEIER R., STEFFEN C., MÄRZ W. Role of Oxidants and Antioxidants in Atherosclerosis: Results of in vitro and in vivo Investigations; *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2007; Vol. 12/4, 265 – 282
- (69) SOUCI S., FACHMANN W., KRAUT H. Die Zusammensetzung der Lebensmittel; Medpharm Scientific Publishers Stuttgart 2000; S 466
- (70) STENDER S., DYERBERG J. Influence of Trans Fatty Acids on Health; *Annals of Nutrition & Metabolism* 2004; 48:61-66
- (71) STEPHENSON C. Fish oil and inflammatory disease: Is asthma the next target for n-3 fatty acid supplements? *Nutrition Reviews* 2004; Vol. 62, No. 12, 486 – 489
- (72) TRAK-FELLERMEIER M., BRASCHE S., WINKLER G., KOLETZKO B., HEINRICH J. Food fatty acid intake and atopic disease in adults; *European Respiratory Journal* 2004; 23, 575 – 582
- (73) TOFT I., BONA K., INGEBRETSON O., NORDOY A., JENSSON T. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on glucose homeostasis and blood

pressure in essential hypertension; *Annals of internal Medicine* 1995; Vol. 123/12: 911 – 918

**(74)** TRABER M., ATKINSON J., Vitamin E, antioxidant and nothing more; *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43: 4 - 15

**(75)** TREBBLE T., STROUD M., WOOTTON S., CALDER P., FINE D., MULLEE M., NONIZ C., ARDEN K. High-dose fish oil and antioxidants in Crohn's disease and the response of bone turnover: a randomised controlled trial; *British Journal of Nutrition* 2005; 94, 253 -261

**(76)** ULBERTH F. und HENNINGER M. Determination of the fatty acid profile of fish by a one-step extraction/methylation method; *Journal of fat Science and Technology* 1995; 97, 77-80

**(77)** VAN DER BEEK E., KAMPHIUS P.; The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's Disease; *European Journal of Pharmacology* 2008; 585: 197 - 207

**(78)** WANG X., QUINN P. Vitamin E and its function in membranes; *Progress in Lipid Research* 1999; 38: 309 - 336

**(79)** WEISS L., BARRETT-CONNOR E., MÜHLEN D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study; *American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 81: 934 - 938

**(80)** WELTERS H., DIAKOIANNAKI E., MORDUE M., TADAYYON M., SMITH S., MORGAN N. Differential protective effects of palmitoleic acid and cAMP on caspase activation and cell viability in pancreatic beta-cells exposed to palmitate; *Apoptosis* 2006; 11, 1231 – 1238

**(81)** WU A., YING Z., GOMEZ-PINILLA F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition; *Neuroscience* 2008; 155: 751 – 759

**(82)** YAMAMOTO Y., FUJISAWA A., HARA A., DUNLAP W. An unusual Vitamin E constituent ( $\alpha$ -tocomonoenol) provides enhanced antioxidant protection in marine organisms adapted to cold-water environments; *PNAS* 2001; Vol. 98/23: 13144-13148

**(83)** YAMAMOTO A., ISOZAKI M., HIRAYAMA K., SAKAI Y. Influence of dietary fatty acids on phospholipid fatty acid composition in subcellular particles of rat liver; *Journal of Lipid Research* 1965; 6, 295 - 300

## Abstract

The aim of this project was the testing of the homogeneity of the total fat and protein content, as well as a quantification of protein, fat and fatty acids in filets of wild Powans a white fish (*Coregonus lavaretus*) from the Lake Millstät. In addition a quantification of Vitamin E-congeners was carried out.

The filet samples of the white fish were skinned and freeze-dried. Afterwards the fat in the finely ground dried filet was extracted and transesterificated in one step. The hereby formed fatty acid methylesters were identified and quantified by separation in a gas chromatograph.

Some of the still unidentified fatty acids could afterwards be named by separating the methyl esters according to their grade of unsaturation. This was accomplished by Silverion thin layer chromatography and the individual fatty acid fractions, which were identified under UV-light and extracted of the plate material, were again analysed in the gas chromatograph.

In contrast to the fat, the protein in the filet is generally spread homogenously. The protein content was constant in all filets, whereas the fat content in the individual Powan filets varied between 2.5 g and 4.5 g. The share of polyunsaturated fatty acids is remarkably high; on average it accounts 43% of total fat, and also the relation of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids which is 0.4 on average is very pleasing. The branched chain saturated fatty acids that were found come from the food chain and are mainly formed by bacteria. Because of the available fatty acid composition the filets are a very high quality source of polyunsaturated omega-3 fatty acids.

The small concentrations of  $\alpha$ -Tocopherol and MDT found in the Powan filets come from their nutrition. The fish are not able to synthesize these compounds but photosynthetic active creatures like phytoplankton are.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Nicole Reischütz

Geburtsdatum: 28.12.1984

Geburtsort: Horn, NÖ

Staatsbürgerschaft: Österreich

### Ausbildung

1991 – 1995 Volksschule Horn

1995 – 2003 BG Horn

2003 – 2009 Studium der Ernährungswissenschaften an der  
Universität Wien

### Praktika

Aug. 2006 Austria Frost

Aug. 2007 Austria Frost

Nov. 2008 bis auf Weiteres ofi, Technologie & Innovation GmbH

Abteilung: Verpackungstechnik

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich...

... bei Prof. Matthias Schreiner für die Unterstützung und Betreuung während der Entstehung und Vollendung meiner Diplomarbeit.

... bei Verena Zach-Polt für die Korrektur meiner Arbeit und das Einsetzen von zahlreichen Beistrichen.

... bei Edith Gruber für die Beantwortung technischer Fragen bezüglich des Layouts dieser Arbeit.

... und bei meiner Familie für ihren emotionalen, wie auch finanziellen Beistand während meines gesamten Studiums.