



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Qualitative und quantitative Analyse von Phospholipiden
mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie
im Österreichischen Alpenlachs

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Sonja Plank
Matrikelnummer:	0308269
Studienrichtung /Studienzweig	Ernährungswissenschaften (474)
(lt. Studienblatt):	
Betreuer:	Ao. Prof. Dr. Eberhard Lorbeer

Wien, im Mai 2010

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Diplomarbeitsprofessor Ao. Univ.-Prof. Dr. Eberhard Lorbeer. DANKE, dass du uns bei allen chemischen und technischen Fragen immer hilfreich zur Seite gestanden bist. Nicht nur im Bereich Chemie wurde oftmals mit dir diskutiert, auch unser Allgemeinwissen hast du des Öfteren auf die Probe gestellt und fortwährend gefördert.

Ein besonderer Dank geht an Hr. Peter Brauchl für die sehr gute Zusammenarbeit mit der Firma Alpenlachs. Danke, dass Sie immer solche Begeisterung und Freude für diese Arbeiten gezeigt haben.

Ein weiterer herzlicher Dank geht an meine Kollegin und sehr gute Freundin Theresa Ettenauer. Danke, dass ich diesen Abschnitt mit dir bestreiten durfte und du immer ein offenes Ohr für all meine Anliegen hattest. Ohne dich würde es diese Arbeit nicht geben! **KIITOS** für die beste Waldviertlerin!

Ein liebes Dankeschön an meine Studienkolleginnen Gabi, Isabella und Rosi für die vielen Gespräche bei einem guten Kaffee.

Herzlich möchte ich mich bei meinem Freund Daniel bedanken, der mir immer zugehört und mich zum Weitermachen motiviert hat. Danke, dass du immer an mich geglaubt hast!!

Meiner Freundin Babsi möchte ich besonders herzlich für die vielen Gespräche und Telefonate danken, die wir geführt haben, wenn es einmal wieder nicht so lief, wie es sollte und sie mir immer wieder gut zugesprochen hat.

Tausend Dank an meine liebsten Freunde Eva, Isa, Sabsi, Joschi, Steffi, Vroni, Gigi, Armin, Agnes, Maria und Karin dafür, dass sie mir immer zugehört haben. Danke für die seit Jahren andauernde Freundschaft!

Herzlich möchte ich mich auch bei meinen Arbeitskolleginnen bedanken, die mir immer mit Worten und Taten zur Seite gestanden sind. DANKE!!!

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner ganzen Familie bedanken.

Ein besonders großer Dank geht an meine Oma, die immer meinen Problemen gelauscht hat.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben. Tausend Dank!!!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen	V
Verzeichnis der Tabellen	VII
Verzeichnis der Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
2 Problemstellung	3
3 Allgemeiner Teil	5
3.1 Lipide	5
3.1.1 Klassifizierung der Lipide	5
3.1.2 Fettsäuren	8
3.1.2.1 Allgemein	8
3.1.2.2 Einteilung	8
3.1.2.3 Nomenklatur (IUPAC und ω -Nomenklatur)	9
3.1.2.4 Schmelzpunktverhalten	10
3.1.2.5 Vorkommen	11
3.1.3 Phospholipide	12
3.1.3.1 Allgemein	12
3.1.3.2 Einteilung	13
3.1.3.2.1 Phosphatidsäure	13
3.1.3.2.2 Phosphatidylcholin	13
3.1.3.2.3 Phosphatidylethanolamin	14
3.1.3.2.4 Phosphatidylserin	15
3.1.3.2.5 Phosphatidylinositol	16
3.1.3.2.6 Phosphatidylglycerin	16
3.1.3.2.7 Diphosphatidylglycerin	17
3.1.3.3 Biosynthese der Phospholipide	17
3.1.4 Einteilung unterschiedlicher Phospholipidaggregate	21
3.1.4.1 Monomolekulare Filme	21
3.1.4.2 Mizellen	21
3.1.4.3 Liposome	22
3.1.4.4 Doppelschicht (bilayers)	23
3.1.4.5 Lipoproteine	23
3.1.5 Zellmembran	24
3.1.5.1 Allgemein	24
3.1.5.2 Fluid-Mosaik-Modell	24
3.1.5.2.1 Allgemein	24
3.1.5.2.2 Lateraldiffusion und Flip-Flop-Diffusion	24
3.1.5.2.3 Phasenübergang der Lipiddoppelschicht	25
3.1.5.3 Membranproteine	26
3.1.5.3.1 Allgemein	26
3.1.5.3.2 Integrale Membranproteine	27
3.1.5.3.3 Periphere Membranproteine	27

3.1.5.3.4	Lipidverankerte Membranproteine	27
3.1.5.4	Transportsysteme der Zellmembran	28
3.1.5.5	Signaltransduktion	28
3.2	Biosynthese von Membranen	28
3.3	Gesundheitsaspekt	30
3.3.1	Bedarf.....	30
3.3.1.1	Allgemeine Übersicht über den Fettbedarf.....	30
3.3.1.2	Tatsächlicher Fettzufuhr der Österreicher.....	31
3.3.1.3	Energiegewinnung von Fett.....	31
3.3.2	ω -3 Fettsäuren.....	33
3.3.2.1	Allgemein.....	33
3.3.2.2	Essentialität	33
3.3.2.3	Vorkommen	33
3.3.2.4	Wirkungsweise und positiver Effekt der ω -3 Fettsäuren.....	34
3.4	Fisch.....	35
3.4.1	Produktion	35
3.4.1.1	Produktion Weltweit	35
3.4.1.2	Produktion in Österreich.....	35
3.4.2	Nährstoffquelle Fisch	35
3.4.2.1	Inhaltsstoffe	35
3.4.2.2	Fettverteilung und Fettsäurenmuster	36
3.4.2.3	Risiken des Fischverzehr	36
3.5	Arktischer Saibling	37
3.5.1	Produktion	37
3.5.1.1	Weltproduktion	37
3.5.1.2	Produktion in Österreich.....	37
3.6	Analyse der Phospholipide.....	37
3.6.1	Allgemein.....	37
3.6.2	Phospholipide	37
4	Material und Methode	39
4.1	Probenmaterial	39
4.1.1	Probenbeschreibung	39
4.1.2	Probenanlieferung und Weiterverarbeitung	39
4.2	Probenstandorte	40
4.3	Verwendete Chemikalien	41
4.4	Herstellung der Lösungen	41
4.5	Vorversuche zur Trennungsoptimierung	41
4.5.1	Phospholipid- und Triglyceridtrennung mittels Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)	41
4.5.1.1	Vorversuch mit Dünnschichtchromatographie.....	41
4.5.1.2	Vorversuch mit Festphasenextraktion.....	42
4.5.2	Mengenbestimmung der Laufmittel	43

4.6	Vorversuche zur Intensitätssteigerung bei HPLC/ESI/MS	44
4.7	Probenaufbereitung	46
4.7.1	Einwaage und Zerkleinerung	46
4.7.2	Extraktion nach Folch	46
4.7.3	Trocknung	46
4.7.4	Phospholipid-Triglycerid-Trennung mittels Festphasenextraktion	47
4.7.5	Umesterung	47
4.8	Verwendete Geräte.....	48
4.8.1	Probenzerkleinerung.....	48
4.8.2	Dünnschichtchromatographie	48
4.8.3	Festphasenextraktion	48
4.8.4	HPLC/ESI/MS.....	48
4.8.4.1	HPLC Bedingungen	48
4.8.4.2	MS/ESI-Bedingungen	49
4.8.5	Gaschromatographische Bedingungen	49
4.8.5.1	Gaschromatograph	49
4.8.5.2	Autosampler	50
4.8.6	GC/MS-Bedingungen.....	50
4.8.6.1	Gaschromatograph	50
4.8.6.2	Massenspektrometer	51
5	Resultate	53
5.1	Ergebnisse der Probenaufbereitung	53
5.2	Qualitative Auswertung mittels HPLC/MS.....	58
5.2.1	Überprüfung der Methode mittels Phospholipidstandards.....	58
5.2.2	Anwendung der Methode bei den Alpenlachsprobe.....	63
5.2.3	MS/MS Experimente mittels Phospholipidstandards	68
5.3	Qualitative Auswertung mittels Gaschromatographie.....	71
5.3.1	Fettsäuremuster	71
5.3.1.1	Allgemein	71
5.3.1.2	Sättigungsgrad	72
5.3.2	Fettsäuremuster der Bauch- und Rückenprobe	73
5.3.2.1	Allgemein	73
5.3.2.2	Standortspezifische Unterschiede	75
5.3.3	Fettsäuremuster der Leberprobe.....	77
5.3.3.1	Allgemein	77
5.3.3.2	Standortspezifische Unterschiede	79
6	Diskussion	81
	Literaturverzeichnis	83
	Zusammenfassung.....	87
	Summary	89

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Struktur von Isopentenylpyrophosphat und Isopren	7
Abbildung 2:	Strukturelle Beziehung zwischen den Hauptklassen der Lipide [2]	7
Abbildung 3:	Stearinsäure	8
Abbildung 4:	Ölsäure	9
Abbildung 5:	α -Linolensäure	9
Abbildung 6:	Räumliche Struktur der α -Linolensäure	10
Abbildung 7:	Grundgerüst der Phospholipide	12
Abbildung 8:	Sphingosin und Sphingomyelin	12
Abbildung 9:	Phosphatidsäure (mit Palmitinsäure und α -Linolensäure)	13
Abbildung 10:	Phosphatidylcholin	14
Abbildung 11:	Phosphatidylethanolamin	15
Abbildung 12:	Phosphatidylserin	15
Abbildung 13:	Phosphatidylinositol	16
Abbildung 14:	Phosphatidylglycerin	16
Abbildung 15:	Diphosphatidylglycerin	17
Abbildung 16:	Biosynthese der Phosphoglyceride [1]	18
Abbildung 17:	Umwandlung der stickstoffhaltigen Phosphoglyceride	19
Abbildung 18:	Acylierungszyklus des Phosphatidylcholins	20
Abbildung 19:	Wirkungsorte der Phospholipasen	20
Abbildung 20:	Monomolekulare Schicht [1]	21
Abbildung 21:	Mizellen [1]	22
Abbildung 22:	Liposom [1]	22
Abbildung 23:	Schematische Darstellung eines Membranlipids und einer Lipiddoppelschicht.	23
Abbildung 24:	Schematische Darstellung der Diffusion von Lipiden innerhalb einer Lipiddoppelschicht[2].	25
Abbildung 25:	Phasenübergang der Lipiddoppelschicht	25
Abbildung 26:	Aufbau einer typischen eukaryontischen Plasmamembran	27
Abbildung 27:	Asymmetrische Verteilung der Phospholipide in der Plasmamembran [2] ...	29
Abbildung 28:	Wirkungsweise von Flippase, Floppase und Scramblase [2]	29
Abbildung 29:	Abbau geradzahiger Fettsäuren durch β -Oxidation [1]	32
Abbildung 30:	Eismersaibling unter Vakuumatmosphäre verpackt	39
Abbildung 31:	Entnahme der Probe an Bauch und Rücken	40
Abbildung 32:	Chromatogramm von Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolamin- standards	43

Abbildung 33: Spektrum von 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standard ...	44
Abbildung 34: Spektrum von 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standard mit 1% Ammoniumformiat	45
Abbildung 35: Chromatogramm von 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin und 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin.....	59
Abbildung 36: Spektrum von 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin	60
Abbildung 37: Spektrum von 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin	60
Abbildung 38: Phosphatidylcholin-Standard aus Rinderhirn	61
Abbildung 39: Chromatogramm der Bauchprobe	63
Abbildung 40: Spektrum der Phosphatidylcholin-Gruppe der Bauchprobe	64
Abbildung 41: Spektrum der Phosphatidylserin-Gruppe der Bauchprobe.....	66
Abbildung 42: Chromatogramm des MS/MS Experiment von 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin.....	69
Abbildung 43: MS/MS Spektrum von Phosphatidylcholin aus Abb. 42	70
Abbildung 44: Verhältnis von Bauch/Rücken zu Leber (in %).....	72
Abbildung 45: Fettsäuremuster der Bauchprobe	73
Abbildung 46: Mittlere Werte der Fettsäuren aller Bauch- und Rückenproben	74
Abbildung 47: Mittlere ω -3 Fettsäuren Konzentration der Bauch- und Rückenproben.....	76
Abbildung 48: Fettsäuremuster der Leber	77
Abbildung 49: Mittlere Werte der Fettsäuren aller Leberproben	78
Abbildung 50: Vergleich der ω -3 Fettsäurekonzentrationen	79
Abbildung 51: ω -3 Fettsäurekonzentrationen der Leberproben nach Standorten	80

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Einteilung nach der Eigenschaft „neutral-polar“ [4]	5
Tabelle 2: Einteilung nach der Hydrolysierbarkeit [1]	6
Tabelle 3: Einteilung der Fettsäure nach ω -3, ω -6, ω -9	10
Tabelle 4: Fettsäurezusammensetzung von tierischen Fetten [5]	11
Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung von pflanzlichen Fetten [5, 17]	11
Tabelle 6: Zusammensetzung von Eilecithin und Sojalecithin (PC) [4, 13]	14
Tabelle 7: Zusammensetzung von Eilecithin und Sojalecithin (PE) [4, 13]	15
Tabelle 8: D-A-CH Referenzwerte der Makronährstoffe	30
Tabelle 9: Bedarf an essentiellen Fettsäuren pro Tag	30
Tabelle 10: Freigesetzte Wärme von Fett, Kohlenhydrate und Proteine	32
Tabelle 11: ω -3-Fettsäuren von unterschiedlichen Fischen in g/100g Filet [4, 20]	33
Tabelle 12: Aufteilung der Gesamtfischproduktion in direkten Fang und Aquakulturen [36]	35
Tabelle 13: Gewicht in g (Fisch ohne Innereien)	53
Tabelle 14: Gewicht der Leber in g	53
Tabelle 15: Probeneinwaage in g	54
Tabelle 16: Gewonnene Triglycerid-Phospholipid-Fraktion in mg	55
Tabelle 17: Aufgetragene Triglycerid-Phospholipid-Fraktion in mg auf Festphasen zur Trennung der PL und TG	56
Tabelle 18: Menge an Phospholipiden in mg nach Festphasen Extraktion	57
Tabelle 19: Phospholipid-Konzentration in mg/ml für die Analyse mittels Gaschromatographie	57
Tabelle 20: Phospholipid-Konzentration in mg/ml für die Analyse mittels HPLC/MS	58
Tabelle 21: $[M+H]^+$ des Phosphatidylcholin-Standards (gewonnen aus Rinderhirn)	62
Tabelle 22: $[M+H]^+$ der Phosphatidylcholone des Alpenlachs	65
Tabelle 23: $[M+H]^+$ der Phosphatidylserine des Alpenlachs	67
Tabelle 24: Fettsäuremuster in den Phospholipiden	71
Tabelle 25: Mittlere Werte der Bauch- und Rückenproben nach Standorten (in %)	75
Tabelle 26: Mittlere Werte der Leberproben nach Standorten eingeteilt (in %)	80

Verzeichnis der Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
ALA	α -Linolensäure
DACH	Deutschland Österreich Schweiz
DC	Dünnschichtchromatographie
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DHA	Docosahexaensäure
EPA	Eicosapentaensäure
ESI	Elektronenspray
FAD ⁺ /FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAO	Food and Agriculture Organization
FID	Flammenionisationsdetektor
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
KHK	Koronare Herzerkrankungen
LDL	Low Density Lipoprotein
Malonyl-CoA	Malonyl-Coenzym A
MS	Massenspektrometrie
MUFA	Einfach ungesättigte Fettsäuren
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺ /H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
PC	Phosphatidylcholin
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylserin
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
SAFA	Gesättigte Fettsäuren
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
TG	Triglyceride
n.n.	nicht nachweisbar
n.i.	nicht identifizierbar
RT	Retentionszeit
DAG	Diacylglycerol

1 Einleitung

Die im Eismeer heimischen Lebewesen passten sich im Laufe der Evolution den extremen arktischen Bedingungen hervorragend an. Eines dieser Tiere ist der Arktische Saibling (*Salvelinus Alpinus*), den man in den polaren Gewässern Nordamerikas und dem Eismeer Europas anfindet. Diesen Fisch kann man auch als Wandersaibling bezeichnen, da er bis zu 4 Jahre im Süßwasser lebt und später ins Meer abwandert. Neben dieser Spezies gibt es auch reine Süßwasserarten, die in kalten Seen beispielsweise in Skandinavien, Großbritannien und im Alpenraum beheimatet sind.

Der hohe Bedarf an langkettigen hochungesättigten Fettsäuren wie Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure und Arachidonsäure ist lebenswichtig für diese Fische, daher ist der Anteil an diesen Fettsäuren vermehrt in der Zellmembran konzentriert um die Fluidität und Funktion der sogenannten Lipiddoppelschicht aufrechtzuerhalten. Somit bleibt der Fisch auch bei tiefen Wassertemperaturen beweglich und erstarrt nicht. Grund dafür liegt in der physikalischen Eigenschaft dieser Fettsäuren. Die enthaltenen Doppelbindungen liegen nicht mehr in gestreckter, sondern räumlich geknickter Form vor. Dadurch können sich die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten nicht mehr so gut ausbilden, was mit einem niedrigeren Schmelzpunkt einhergeht.

Dem Fisch, wie auch allen anderen Tieren, ist es nicht möglich durch Selbstsynthese ω -Fettsäuren aufzubauen, da die nötigen Enzyme fehlen. Daher müssen diese über die Nahrung aufgenommen werden. Gute Quellen dafür sind Algen, Grill und Plankton.

Fettreiche Fische wie Lachs, Makrele und Hering weisen nicht nur einen hohen Gehalt an langkettigen hochungesättigten ω -3-Fettsäuren auf, sondern sind auch eine gute Quelle für hochwertige, leichtverdauliche Proteine, Vitamin A, D und Selen. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt mindestens eine Fischportion pro Woche. Laut aktuellem Ernährungsbericht 2008, welcher Untersuchungen über den Fischverzehr der Österreicher beinhaltet, wird diese Zielvorgabe nicht erreicht, bzw. der Fischkonsum als zu gering eingestuft.

Vom Gesundheitsaspekt betrachtet, hat der Verzehr von fettreichen Fischen mit hohem ω -3-Fettsäuregehalt einen positiven Effekt auf den menschlichen Organismus, welcher durch zahlreiche Untersuchungen und weltweite Studien belegt wurde. ω -3-Fettsäuren können präventiv vor Herz-Kreislauferkrankungen und Rheumatismus schützen. Auch gegen Krebs haben diese Fettsäuren positive Wirkungen gezeigt. Der Stoffwechsel kann direkt durch die Fettsäuren oder durch deren Metaboliten beeinflusst werden. Ökologisch gesehen, kann es unter Umständen schwierig werden die gesamte Weltbevölkerung ausreichend mit Fisch zu versorgen. Ein wesentlicher Grund dafür liegt in der starken Überfischung der Weltmeere. Darum sollte den heimischen Fischzuchtbetrieben

mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden, um den Fischimport, der in Österreich im Jahr 2008 über 64 000 Tonnen betrug, zu minimieren. Konventionelle Aquakulturen liefern im Binnenland Österreich die größte Menge an Fisch, da in fließenden Gewässern kaum bis keine Fischerei betrieben wird. Die heimische Produktion beschränkt sich vor allem auf die Regenbogenforelle und andere Arten, Karpfen, Wels und Bachsaiblinge, die jedoch einen geringeren Gehalt an langkettigen hochungesättigten Fettsäuren aufweisen, als die marinen Fische. Ein niederösterreichischer Fischzüchter wagte die Herausforderung diese marinen Fische wie den Arktischen Saibling in Österreich heimisch zu machen. Neben dem ernährungsphysiologischen Aspekt diesen Fisch zu züchten, spielt auch die Nachhaltigkeit der Umwelt eine bedeutende Rolle. Um der weltweiten Überfischung Einhalt zu gebieten, erfolgt die Fütterung ohne marine Fischmehle. Außerdem werden auch die reichlich vorhandenen Ressourcen in Österreich genutzt, in dem man kaltes reines Quellwasser für die Teiche verwendet und heimische aus biologischem Landbau gewonnene Öle zur Fütterung einsetzt. Auch bei der Überprüfung auf Umweltkontaminationen und Schwermetalle schnitt der sogenannte „Alpenlachs“ sehr gut ab.

„Alpenlachs“ ist eine patentierte Dachmarke und jeder Fisch, der diese Kennzeichnung besitzt, muss unter einem speziellen Aufzuchtprogramm nach genauen Richtlinien gezüchtet werden. Österreichische und deutsche Vertragspartner müssen sich an dieses Züchtungssystem halten, um qualitativ hochwertige Fische mit hoher ernährungsphysiologischer Wertigkeit zu erhalten.

Der hohe Anteil an langkettigen hochungesättigten ω -3-Fettsäuren des in Österreich gezogenen Arktischen Saiblings wurde anhand von Voruntersuchungen des Fettsäuremusters belegt. Der Fisch speichert Fettsäuren großteils im Depotfett als Triglyceride, kann sie aber auch in Phospholipide einlagern. Phospholipide besitzen die Fähigkeit Lipiddoppelschichten auszubilden und legen somit den Grundbauplan biologischer Membranen fest. Grund dafür ist die Zusammensetzung aus hydrophoben Fettsäureresten und hydrophilen Kopfgruppen. Da ein hoher Anteil an langkettigen hochungesättigten Fettsäuren in den Membranen für den Fisch überlebensnotwendig ist, stellt sich die Frage über die tatsächliche Zusammensetzung der Phospholipide.

Die Phospholipidforschung befindet sich noch im Wachstum, daher sind von dieser Substanzklasse weniger Untersuchungen erhältlich als von den Triglyceride. Die Phospholipidklassen wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie analysiert und mit Elektronenspray-Massenspektrometrie detektiert. Zusätzlich wurde mit der gaschromatographischen Analyse das Fettsäurespektrum der gesamten Phospholipidfraktion näher betrachtet.

2 Problemstellung

Durch spezielle Züchtungsbedingungen der Firma Alpenlachs, die durch jahrelange Forschung und Entwicklung entstanden sind, sollen die Bedingungen des im arktischen Eismeer nativ lebenden *Salvelinus alpinus* nachgestellt werden, damit auch dieser in Aquakulturen gezüchtete Fisch die ernährungsphysiologisch wichtigen hochungesättigten ω -Fettsäuren einlagert. Dazu zählen z.B. eine optimale Ernährung, Bewegung und vor allem ein kaltes mit hoher Güteklasse ausgezeichnetes Quellwasser. Durch die kühlen Temperaturen, die zwischen 4°C – 16°C liegen, je nachdem in welchem Bereich der nördlichen Breitengrade (85°N – 42°N) der Fisch lebt, ist es von großer Notwendigkeit, dass dieses marine Lebewesen viele hochungesättigte Fettsäuren einlagert um zu überleben. Da ω -Fettsäuren einen sehr niedrigen Schmelzpunkt haben und bei arktischen Temperaturen flüssig bleiben, schützen diese den Fisch vor dem Einfrieren. Die Speicherung der Fettsäuren kann in den Triglyceriden als Depotfett erfolgen oder in der Zellmembran als Bestandteil der Phospholipide.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob hochungesättigte ω -Fettsäuren wie Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure, sowie auch α -Linolensäure vorzugsweise im Depotfett eingelagert werden oder in den Phospholipiden.

Zahlreiche Untersuchungen von Fettsäuremustern des Gesamtfettgehaltes in verschiedensten Fischen sind schon veröffentlicht, jedoch gibt es nur wenig Forschung im Bereich der Phospholipide. Daher soll in dieser Arbeit die Phospholipidfraktion mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgetrennt und analysiert werden. Durch diese Analysemethode kann man jedoch lediglich die Phospholipidklassen trennen, da trotz verschiedenen Fettsäureresten am C1 und C2 die Polarität des Analyten keine bzw. nur geringe Auswirkung auf die Trennung hat. Darum soll zusätzlich mit Hilfe der Gaschromatographie durch Umesterung der Phospholipide in Fettsäuremethylester das Fettsäurespektrum der gesamten Phospholipidlipidfraktion erstellt.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Lipide

3.1.1 Klassifizierung der Lipide

Um Lipide zu definieren, gibt es verschiedene Erläuterungsmöglichkeiten, wie die Einteilung nach der Löslichkeit oder auch nach der Verseifbarkeit. In polaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol und Chloroform sind Lipide gut löslich, jedoch in Wasser unlöslich. Eine weitere Eigenschaft dieses wichtigen Naturstoffes stellt die Hydrophobie dar, die aufgrund des Vorhandenseins von unpolaren Teilen, wie den langkettigen Kohlenwasserstoffresten entsteht. Durch die Anwesenheit von hydrophoben und lipophilen Domänen können Lipide auch amphipatisch sein, wie zum Beispiel die Phosphoglyceride und Sphingolipide, die essentielle Grundbausteine der biologischen Membran sind [1, 2].

Tabelle 1 und Tabelle 2 geben eine Übersicht über eine mögliche Einteilung und Klassifizierung der Lipide nach Polarität und Hydrolisierbarkeit.

Tabelle 1: Einteilung nach der Eigenschaft „neutral-polar“ [4]

Neutrale Lipide	Polare (amphiphile) Lipide
▪ Fettsäuren ($>C_{12}$) ▪ Mono-, Di-, Triacylglyceride ▪ Wachse ▪ Sterine, Sterinester ▪ Tocopherole ▪ Carotinoide	▪ Glycerophospholipide (<i>Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinosit</i>) ▪ Glyceroglycolipide (<i>z.B. Monogalactosyl-diacylglyceride, Sulfolipid</i>) ▪ Spingophospholipide (<i>z.B: Sphingosin, Sphingomyelin</i>) ▪ Sphingoglykolipide (<i>z.B. Lactosylceramid, Ceramidglykoside</i>)

Tabelle 2: Einteilung nach der Hydrolysierbarkeit [1]

Nicht hydrolysierbare Lipide (einfache Lipide)		
Fettsäure und Derivate	Terpene (Isoprenderivate)	Steroide
Fettsäuren Prostaglandine	Tocopherole Retinol Phyllochinone	Steroidhormone Cholesterin Gallensäure D-Vitamine

Hydrolysierbare zusammengesetzte Lipide (Acyllipide)			
Acylreste	Verestert mit	Weitere Komponenten	Bezeichnung
1	Langekettigen Alkoholen	-	Wachse
1-3	Glycerin	-	Mono-, Di-, Triglycerid
1-2	Glycerin-3-Phosphat	Cholin Serin Ethanolamin Inositol	Phosphoglyceride
1	Sphingosin	Galactose Oligosaccharide Phosphorylcholin	Sphingolipide
1	Cholesterin	-	Cholesterinester

Als einfachstes Lipid fungieren die Fettsäuren, welche in vielen anderen Lipidklassen als Fettsäurereste enthalten sind wie in Triglyceriden, Phosphoglyceriden oder Sphingolipiden. Lipide die Phosphatgruppenträger sind, werden generell Phospholipide genannt. Zu dieser Gruppe zählen die Phosphoglyceride und Sphingomyeline. Glycosphingolipide besitzen Sphingosin (trans-4-Sphingenin) und einen Kohlenhydratrest.

Weiters zählen auch die Isoprenoide, wie Steroide, Terpene und fettlösliche Vitamine zu den Lipiden. Diese Substanzgruppe wird durch Polymerisation von aktivem Isopren, dem sogenannten Isopentenylpyrophosphat, gebildet [2].

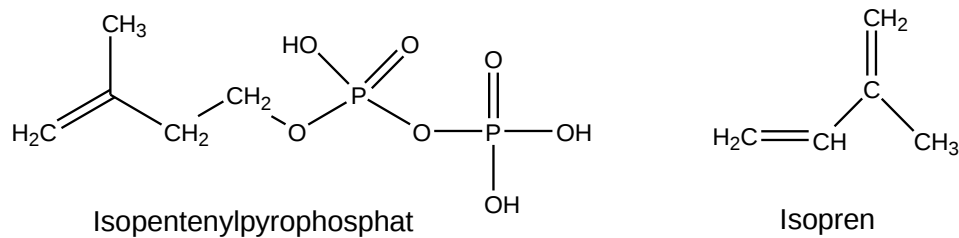


Abbildung 1: Struktur von Isopentenylpyrophosphat und Isopren

Lipide besitzen vielseitige und vor allem lebenswichtige Aufgaben, wie die Energiespeicherung, Wirkung als Druckpolster und Wärmespeicher in Form von Triglyceriden, als Signalmoleküle und als Gewebshormone wie Prostaglandine und Leukotriene die aus Eicosanoiden entstehen [1]. Wachse sind langkettige, großteils gesättigte Fettsäuren, die mit langkettigen primären Alkoholen verestert sind. Sie dienen als Schutz vieler Oberflächen von Organismen, sind unter anderem Fettbegleitstoffe in einigen Speisefetten, Bestandteil der Schale von Sonnenblumenkernen und Fischölen [2, 5].

Um die strukturelle Beziehung zwischen den Lipidklassen besser zu veranschaulichen dient die folgende Abbildung und Erläuterung:

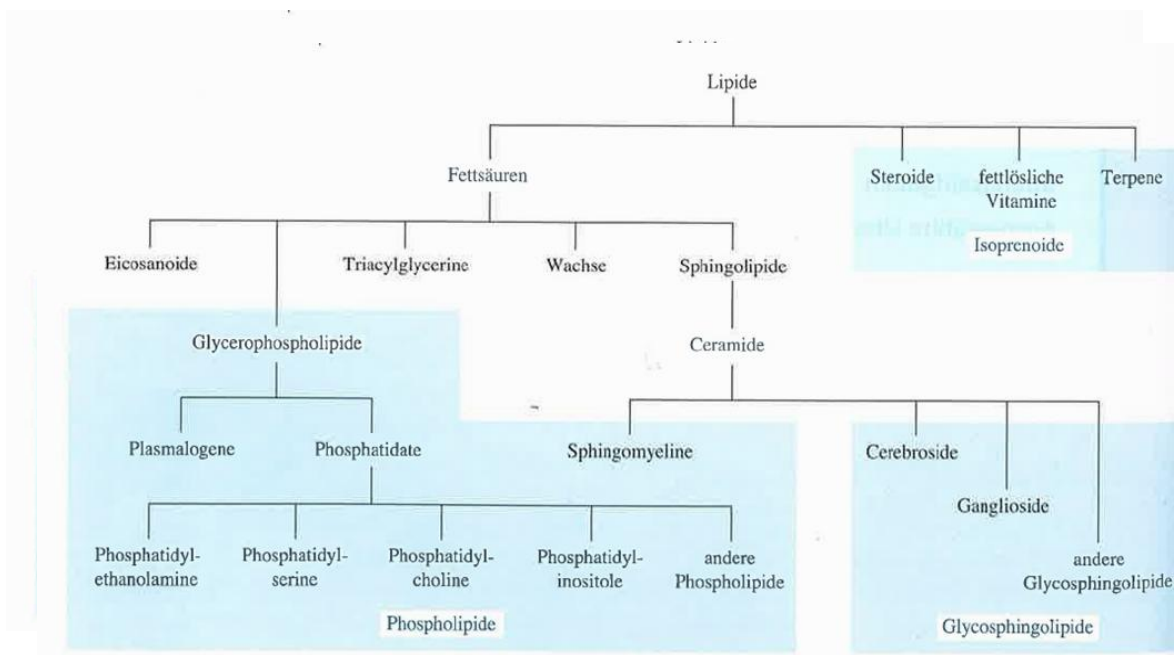


Abbildung 2: Strukturelle Beziehung zwischen den Hauptklassen der Lipide [2]

3.1.2 Fettsäuren

3.1.2.1 Allgemein

Fettsäuren zählen zu den einfachsten Lipiden und bestehen allgemein aus einer Kohlenwasserstoffkette und einer Carboxylgruppe. Die Klassifizierung der Fettsäuremoleküle erfolgt durch die Kettenlänge, Anzahl, Konfiguration und Position der Doppelbindungen sowie nach dem Vorhandensein von Verzweigungen und etwaigen funktionellen Gruppen [2, 4].

Die Anzahl der Kohlenstoffatome befindet sich vorwiegend zwischen 12 und 20 und ist durch die Biosynthese, die Fettsäuren aus C₂-Einheiten aufbaut, meist geradzahlig [2].

Freie Fettsäuren kommen im Körper nur in geringen Mengen vor, hauptsächlich sind sie jedoch Bestandteile von Acylglyceriden, Phospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterinestern [1].

3.1.2.2 Einteilung

Die Einteilung der Fettsäuren erfolgt durch die Anzahl der Doppelbindungen. Man unterscheidet zwischen gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Am häufigsten liegt die cis-Konfiguration an den Doppelbindungen vor. Befinden sich zwei oder mehrere Doppelbindungen in einer Fettsäure, werden diese meist durch eine Methylengruppe voneinander getrennt - dies bezeichnet man als isolierte Doppelbindungen [1].

Folgende Aufzählung, mit jeweils einer Zeichnung eines Fettsäuremoleküls, gibt einen Überblick über Vertreter einiger Fettsäuren, geordnet nach ihrem Sättigungsgrad [2]. Die Fettsäuren sind nach Trivialnamen aufgelistet, wo hingegen die numerische Bezeichnung nach den Fettsäurenamen nach der IUPAC-Nomenklatur beschrieben wird, die das C-Atom der Carboxylgruppe als C1 definiert, während das Symbol Δ^n die Position der Doppelbindung angibt. (Exaktere Erläuterungen zu dieser Nomenklatur in 3.1.2.3.)

➤ Gesättigte Fettsäuren (keine Doppelbindung):

- | | |
|-----------------|-------|
| ▪ Laurinsäure | C12:0 |
| ▪ Myristinsäure | C14:0 |
| ▪ Palmitinsäure | C16:0 |
| ▪ Stearinsäure | C18:0 |
| ▪ Arachinsäure | C20:0 |

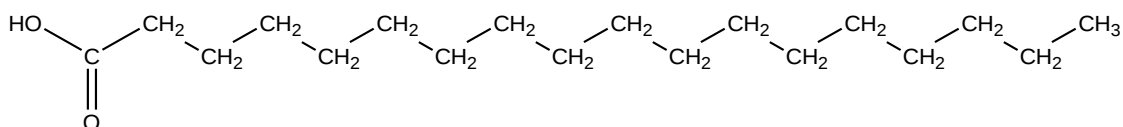
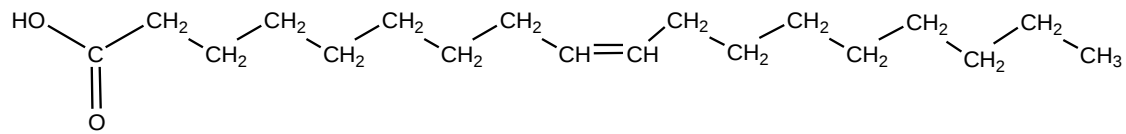


Abbildung 3: Stearinsäure

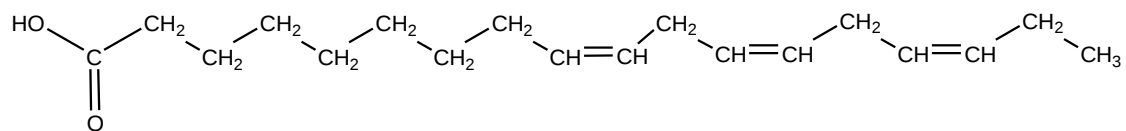
➤ Einfach ungesättigte Fettsäuren (eine Doppelbindung):

- Palmitoleinsäure C16:1- Δ^9
- Ölsäure C18:1- Δ^9

**Abbildung 4:** Ölsäure

➤ Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (zwei oder mehrere Doppelbindungen):

- Linolsäure C18:2- $\Delta^{9,12}$
- α -Linolensäure C18:3- $\Delta^{9,12,15}$
- Arachidonsäure C20:4- $\Delta^{5,8,11,14}$
- Eicosapentaensäure C20:5- $\Delta^{5,8,11,14,17}$
- Docosahexaensäure C22:6- $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$

**Abbildung 5:** α -Linolensäure**3.1.2.3 Nomenklatur (IUPAC und ω -Nomenklatur)**

Nach der IUPAC-Nomenklatur erhält das C-Atom der Carboxylgruppe die Nummer 1 und wird dadurch als C1 benannt. Die anderen C-Atome der Kohlenwasserstoffkette werden demnach fortlaufend durchnummeriert. Durch das Symbol Δ^n wird die Position der Doppelbindung und deren Positionsnummer n gekennzeichnet [1].

Neben der Verwendung arabischer Ziffern gibt es eine andere Zählweise nach griechischen Buchstaben. Somit wird die CH_2 -Gruppe nach der Carboxylgruppe als α benannt, die darauffolgende Methylengruppen als β , γ , δ usw. Das CH_3 -Ende der Fettsäure wird immer als ω -Ende beschrieben [1, 2].

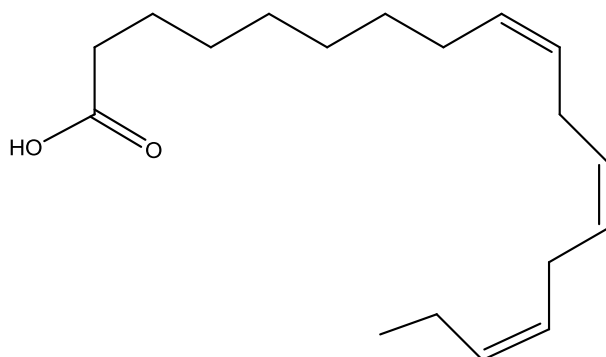
Am häufigsten findet man Doppelbindungen drei, sechs und neun C-Atome vom Methylende entfernt. Somit werden diese Fettsäuren als ω -3, ω -6 und ω -9 Fettsäuren bezeichnet [1, 2].

Tabelle 3: Einteilung der Fettsäure nach ω -3, ω -6, ω -9

Gruppe	Fettsäure	Kurzschreibweise
ω-9	Ölsäure	C 18:2 ω -9
	Eicosatriensäure	C 20:3 ω -9
	Nervonsäure	C 24:1 ω -9
ω-6	Linolsäure	C 18:2 ω -6
	Eicosadiensäure	C 20:2 ω -6
	Homo- γ -Linolensäure	C 20:3 ω -6
	Arachidonsäure	C 20:4 ω -6
ω-3	α -Linolensäure	C 18:3 ω -3
	Eicosapentaensäure	C 20:5 ω -3
	Docosahexaensäure	C 22:6 ω -3

3.1.2.4 Schmelzpunktverhalten

Der Schmelzpunkt jeder Fettsäure ist von der Kettenlänge und vom Sättigungsgrad abhängig. Je mehr Doppelbindungen und je kürzer die Fettsäure ist, desto niedriger liegt der Schmelzpunkt. Durch zunehmende Kettenlänge steigen die sogenannten Van-der-Waals-Wechselwirkungen und ein Schmelzpunktanstieg ist die Folge. Enthalten Fettsäuren Doppelbindungen, liegen sie räumlich gesehen nicht mehr in gestreckter Form vor, wie gesättigte Fettsäuren, sondern in geknicktem Zustand. Dadurch können sich die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten nicht mehr so gut ausbilden, was mit einem niedrigeren Schmelzpunkt einhergeht [2].



Stearinsäure besitzt einen Schmelzpunkt von 69°C, wo hingegen α -Linolensäure schon bei -11°C in flüssiger Form vorliegt.

Abbildung 6: Räumliche Struktur der α -Linolensäure

3.1.2.5 Vorkommen

Tabelle 4: Fettsäurezusammensetzung von tierischen Fetten [5]

	Anteil in %		
Fettsäure	Butter	Schweineschmalz	Rindertalg
6:0	2,3		
8:0	1,4		
10:0	3,2		
12:0	3,6		
14:0	11		14
16:0	31	24	25
18:0	9	14	19
18:1	18	41	36
18:2	3	10	3

Tabelle 5: Fettsäurezusammensetzung von pflanzlichen Fetten [5, 17]

	Anteil in %										
Fett-säure	Sonnen-blumenöl	Mais-keimöl	Olivenöl	Palmöl	Rapsöl	Wal-nussöl	Weizen-keimöl	Kokos-fett	Leinöl Europa	Hanföl	Kürbis-kernöl
6:0								0.7			
8:0								4.6 – 10.0			
10:0								5.0 – 8.0			
12:0	0.1	0.3		0.5				45.1 – 53.2			
14:0	0.2	0.3	0.05	0.5 – 2.0	0.2	0.1	0.1	16.8 – 21.0			
16:0	5.0 – 7.6	8.6 – 16.5	7.5 – 20.0	39.3 – 47.5	2.5 – 7.0	6.0 – 8.0	13.0 – 20.0	7.5 – 10.2	4.0 – 6.0		16
16:1	0.3	0.5	0.3 – 3.5	0.6	0.6	0.2	0.1		0.5		
17:0	0.2	0.1	0.3	0.2	0.3	0.1					
17:1	0.1	0.1	0.3		0.3						
18:0	2.7 – 6.5	3.3	0.5 – 5.0	3.5 – 6.0	0.8 – 3.0	1.0 – 3.0	2.0	2.0 – 4.0	2.0 – 3.0		
18:1	14.0 – 39.4	20.0 – 42.2	55.0 – 83.0	36.0 – 44.0	51.0 – 70.0	14.0 – 21.0	13.0 – 21.0	5.0 – 10.0	10.0 – 22.0		24
18:2	48.3 – 74.0	34.0 – 65.6	3.5 – 21.0	9.0 – 12.0	15.0 – 30.0	54.0 – 65.0	55.0 – 60.0	1.0 – 2.5	12.0 – 18.0	57	54
18:3	0.3	2.0	1.0	0.5	5.0 – 14.0	9.0 – 15.0	4.0 – 10.0	0.2	56.0 – 71.0	28	
20:0	0.1 – 0.5	0.3 – 1.0	0.6	1.0	0.2 – 1.2	0.3	0.2	0.2	0.5		
20:1	0.3	0.2 – 0.6	0.4	0.4	0.1 – 4.3	0.3	0.2	0.2	0.6		
20:2		0.1			0.1		0.1				
22:0	0.3 – 1.5	0.5	0.2	0.2	0.6	0.2	0.1				
22:1	0.3	0.3			2		0.2				
22:2	0.3				0.1						
24:0	0.5	0.5	0.2		0.3						
24:1					0.4						

3.1.3 Phospholipide

3.1.3.1 Allgemein

Unter Phospholipiden versteht man allgemein alle Lipide die Phosphor enthalten [10]. Zu den zwei Hauptgruppen dieser Lipidklasse zählen Phosphoglyceride und Sphingomyeline [3]. Wie der Name verrät, besitzen Phosphoglyceride sowie Triglyceride einen dreiwertigen Alkohol (Glycerol) als Baustein [2]. Dieses Molekül besteht aus einem anorganischen Ester dem Glycerol-3-phosphat, an dessen C1 und C2 Fettsäuren hängen. Die polare Kopfgruppe ist über einen Phosphorsäurediester am C3 verknüpft [15].

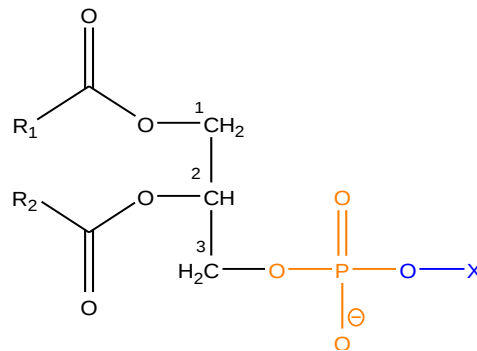


Abbildung 7: Grundgerüst der Phospholipide;

R1 und R2 stehen für beliebige Alkylketten der veresterten Fettsäuren; X steht für die polare Kopfgruppe

Sphingomyelin gehört auch zur Lipidgruppe der Phospholipide. Es verfügt als Rückgrat einen Aminodialkohol, das sogenannte Sphingosin [2].

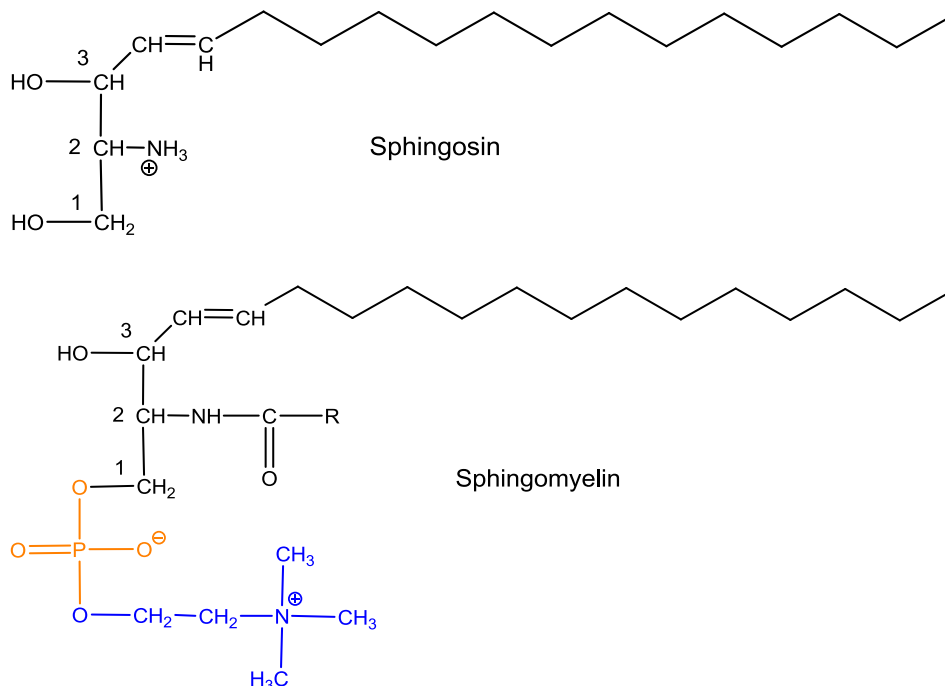


Abbildung 8: Sphingosin und Sphingomyelin

In dieser Arbeit werden nur die Phosphoglyceride untersucht, deswegen bezieht sich die Bezeichnung Phospholipide auf Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol.

Unter anderem wird auch nach Tocher et al. die Bezeichnung Phospholipide in vielen Literatur- und Studienverweisen mit dem Terminus Phosphoglyceride gleichgesetzt [10].

3.1.3.2 Einteilung

Als Hauptbestandteile der biologischen Membran zählen folgende Phosphoglyceride: Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol.

3.1.3.2.1 Phosphatidsäure

Phosphatidsäure zählt zum einfachsten Phosphoglycerid und ist die Vorstufe zur Biosynthese von Triglyceriden und Phosphoglyceriden. Von allen Phospholipiden in der Zelle liegt der Anteil an Phosphatidsäure ungefähr zwischen 1 bis 5 %. Am günstigsten gewinnt man Phosphatidsäure aus Spinat- und Kohlblättern. Meist jedoch bezieht sich die Menge dieser Substanz auf Abspaltprodukte des Phosphatidylcholins durch Phospholipase C. Als Salz ist Phosphatidsäure stabil, kommt es aber in freier Form vor wird es sehr schnell zersetzt [13].

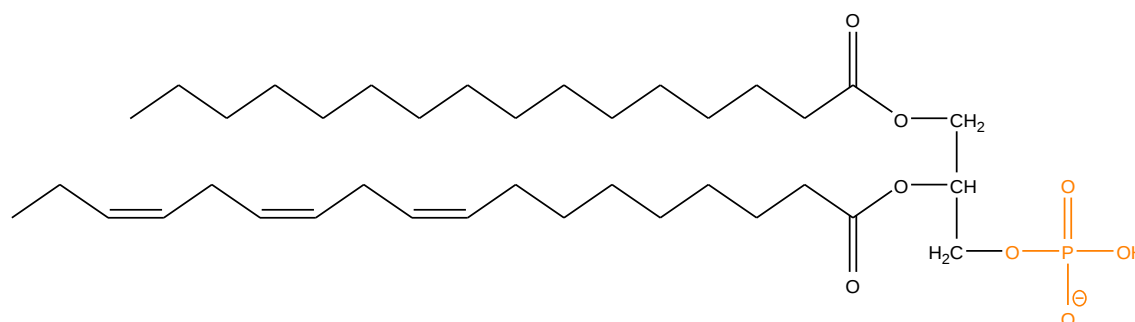


Abbildung 9: Phosphatidsäure (mit Palmitinsäure und α-Linolensäure)

3.1.3.2.2 Phosphatidylcholin

Durch die Verknüpfung des Aminoalkohols Cholin mit Phosphatidsäure über einen Phosphorsäurediester entsteht Phosphatidylcholin [1].

Dieses Phospholipid kommt quantitativ am häufigsten vor, hauptsächlich in Herz, Leber, Gehirn und Eidotter [6, 13].

In der Literatur und Lebensmitteltechnologie ist die geläufigere Bezeichnung für Phosphatidylcholin Lecithin, welches über einen breiten pH-Bereich als Zwitterion existiert. Durch das Vorhandensein einer positiven Ladung am Stickstoff und

einer negativen Ladung am Phosphat wird ein Dipol hervorgerufen, der Lecithin die Fähigkeit gibt als Emulgator bei hydrophoben Verbindungen zu agieren [6]. Durch diese emulgierende Eigenschaft findet dieses Molekül häufig Verwendung in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie [6,13].

Die Gewinnung des Lecithins erfolgt hauptsächlich mittels Extraktion aus Eidotter und Sojabohnen. Sojabohnen beinhalten in etwa 0,5 – 0,6 % Lecithin und in Eigelb schwankt der Gehalt zwischen 7 – 10 % [13].

Tabelle 6: Zusammensetzung von Eilecithin und Sojalecithin (PC) [4, 13]

Lecithin aus:	Eidotter	Sojabohne
Gesamtlipide in %	32,6	23
Anteil an Phospholipiden in % aus Gesamtlipidanteil	28	10
Anteil an Phosphatidylcholin in % aus Gesamtphospholipidanteil	73	30

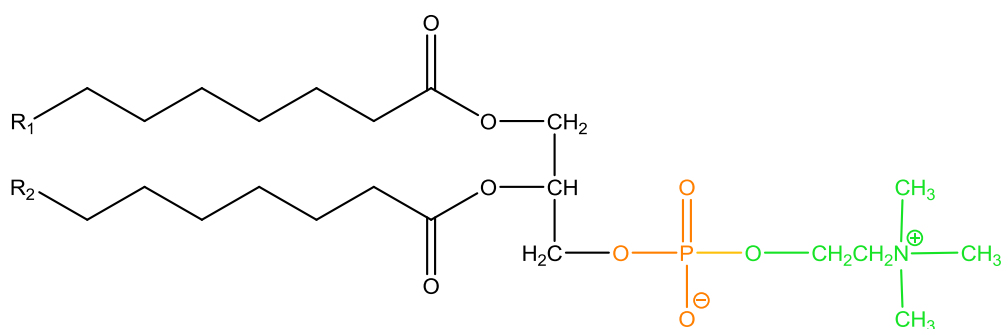


Abbildung 10: Phosphatidylcholin

3.1.3.2.3 Phosphatidylethanolamin

Phosphatidylethanolamin kommt neben Phosphatidylcholin am zweithäufigsten in tierischen und pflanzlichen Geweben vor. Der Trivialname dieses Phospholipids ist Kephalin, welches mit Lecithin einen der Hauptbestandteile der biologischen Membran ausmacht [13].

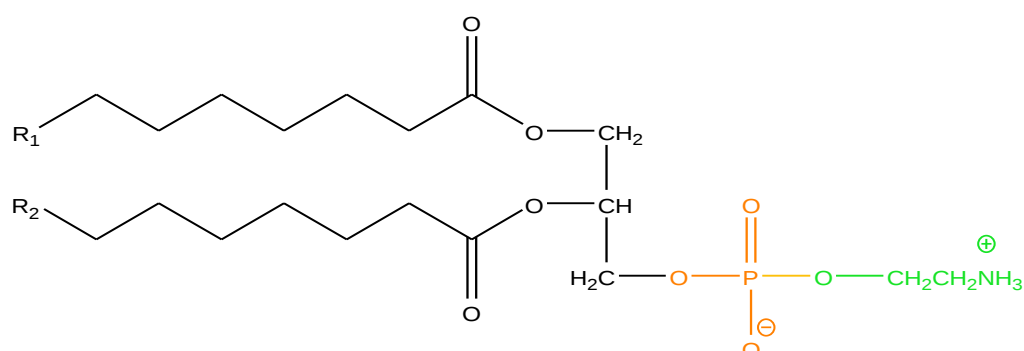
Ethanolamin besitzt einen primären Alkohol und ist deshalb schwächer basisch als Cholinhydroxid. Der pH-Bereich, in dem Phosphatidylethanolamin als Zwitterion vorliegt, ist weitaus kleiner als der von Phosphatidylcholin. Bei physiologischem pH weisen diese beiden Phospholipide eine positive Ladung am Stickstoff auf [1, 13].

Gleichermaßen wie Lecithin wird Kephalin in verschiedenen Industriezweigen als Emulgator genutzt [5].

Aus Tabelle 7 kann man den prozentuellen Phosphatidylethanolaminanteil aus Sojabohnen und Eidotter entnehmen.

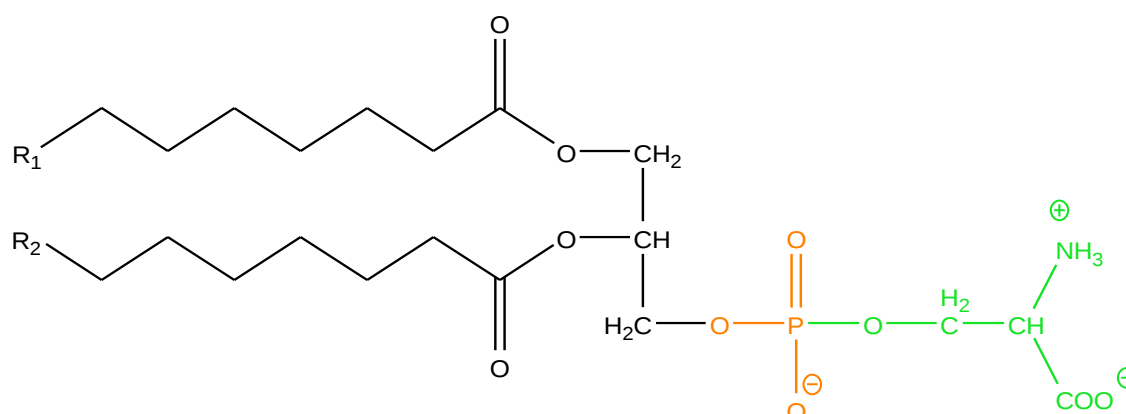
Tabelle 7: Zusammensetzung von Eilecithin und Sojalecithin (PE) [4, 13]

Lecithin aus:	Eidotter	Sojabohne
Gesamtlipide in %	32,6	23
Anteil an Phospholipiden in % aus Gesamtlipidanteil	28	10
Anteil an Phosphatidylethanolamin in % aus Gesamtphospholipidanteil	15,5	22

**Abbildung 11:** Phosphatidylethanolamin

3.1.3.2.4 Phosphatidylserin

Die Hydroxygruppe der L-Aminosäure Serin ist in Phosphatidylserin mit Phosphorsäure verestert. Durch die Carboxylgruppe hat dieses Phospholipid eine positive und eine negative Ladung. Je nach pH-Wert kann Phosphatidylserin in unterschiedlichen ionogenen Zuständen vorliegen [1, 13].

**Abbildung 12:** Phosphatidylserin

3.1.3.2.5 Phosphatidylinositol

Bei der polaren Kopfgruppe dieses stickstofffreien Phosphoglycerides handelt es sich um den zyklischen Zuckeralkohol myo-Inositol. Phosphatidylinositol ist ein wenig wasserlöslich und ein guter Gelbildner. Man findet diese Phospholipide ungefähr zu 2 bis 10 % in der Membran. Am häufigsten kommt Phosphatidylinositol im Gehirn vor zusätzlichen mit Phosphorsäureresten an der 4- und 5-Stellung des Inositols. In Pflanzen und Mikroorganismen stößt man auf komplexere Phosphatidylinositole, die zusätzlich mit Kohlenhydraten, Aminen, Aminosäuren oder Sphingosin verknüpft sind [13].

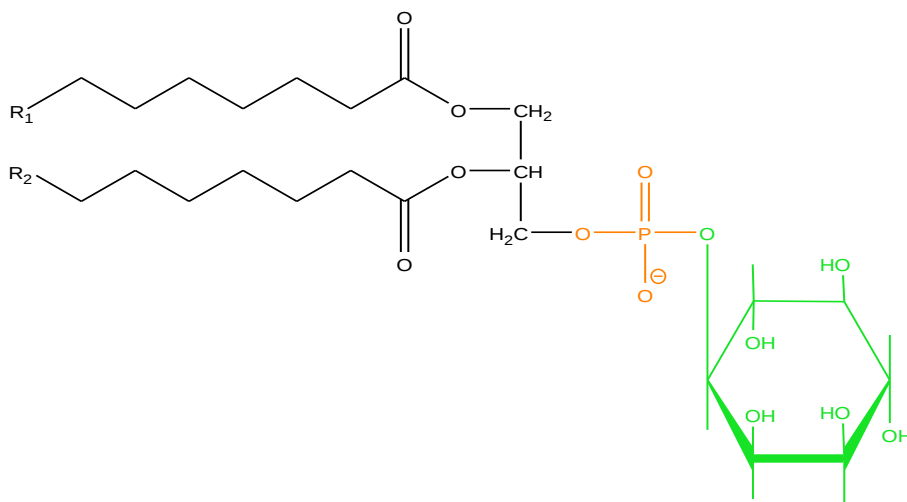


Abbildung 13: Phosphatidylinositol

3.1.3.2.6 Phosphatidylglycerin

Phosphatidylglycerin findet man in kleinen Mengen in Bakterien, Chloroplasten und Säugetieren [13].

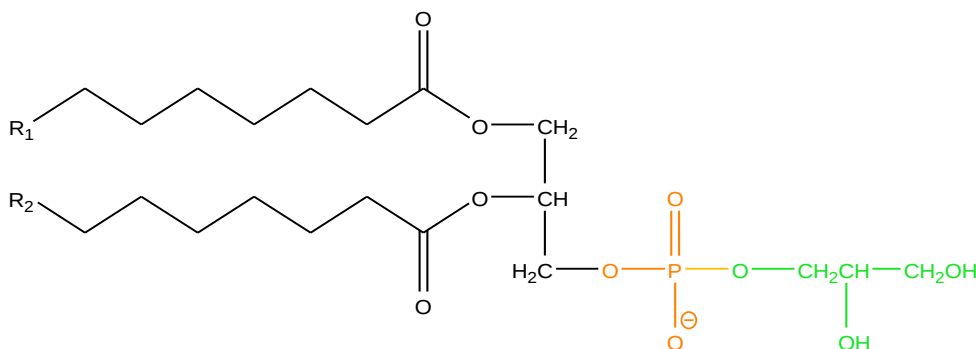


Abbildung 14: Phosphatidylglycerin

3.1.3.2.7 Diphosphatidylglycerin

Durch Anknüpfen eines Phosphatidylrestes entsteht Diphosphatidylglycerin, das auch als Cardiolipin bezeichnet wird. Dieses Phospholipid ist in Bakterien und in den Membranen eukaryontischer Mitochondrien vorhanden. Zu einem Drittel findet man Cardiolipin in Herzmuskelmitochondrien [13].

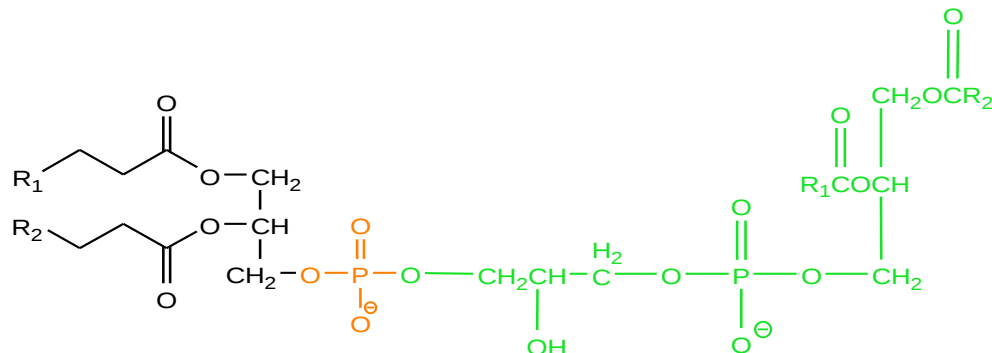


Abbildung 15: Diphosphatidylglycerin

3.1.3.3 Biosynthese der Phospholipide

Die *de novo* Biosynthese der Phospholipide wurde in Fischen noch nicht umfassend untersucht, jedoch fanden Lykidis et al. in den Genomen von Fugu und Zebrafischen die für die Synthese nötigen Enzyme und Proteinfamilien [11]. Biochemische Studien haben gezeigt, dass Fische und Säuger die gleichen Synthesewege besitzen [12].

Die für die Biosynthese der Phosphoglyceride notwendigen Enzymsysteme sind auf der cytosolischen Hälfte des glatten Endoplasmatischen Reticulums zu finden [1, 2].

Ausgangsprodukt der Biosynthese von Phospholipiden wie auch von Triglyceriden ist das Phosphatid (1,2-Diacylphosphoglycerid). Phosphatid entsteht durch Veresterung der beiden Hydroxygruppen des Glycerin-3-phosphates mit zwei Fettsäuren. Mit Hilfe von Acyltransferasen werden am C-1 vorwiegend gesättigte Fettsäuren und am C-2 ungesättigte Fettsäuren übertragen [2]. Durch Abspaltung von anorganischem Phosphat wird 1,2-Diacylglycerin gebildet [1].

Für die Biosynthese von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin reagiert 1,2-Diacylglycerin, katalysiert durch Transferasen, mit aktiviertem Ethanolamin (Cytidindiphosphatethanolamin kurz CDP-Ethanolamin) bzw. Cholin (Cytidindiphosphatcholin kurz CDP-Cholin). Durch anschließende Abspaltung von Cystidinmonophosphat (CMP) entstehen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin [2].

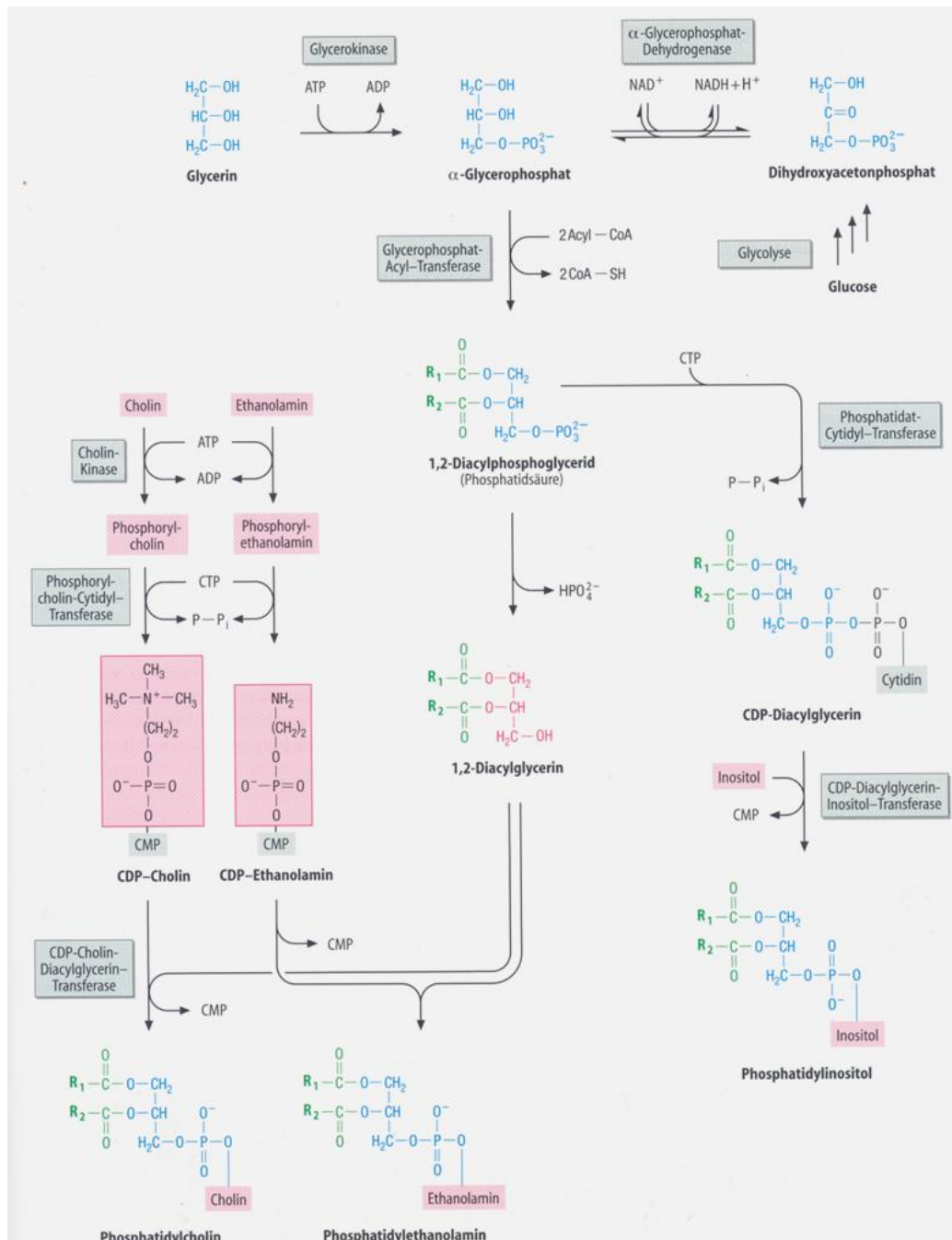


Abbildung 16: Biosynthese der Phosphoglyceride [1]

Bei der Bildung von Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin ist es nötig das Diacylglycerin zu aktivieren, in dem aus der Reaktion Phosphatidsäure mit Cytisintriphosphat (CTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) CDP-Diacylglycerin gebildet wird. CDP-Diacylglycerin reagiert mit dem nicht aktivierten Inositol bzw. Serin unter Abspaltung von CMP.

Diese Reaktion wird von Synthesen katalysiert um die Entstehung von Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol zu erleichtern [1].

Phosphoglyceride sind wesentliche Bauteile aller biologischen Membranen. Es sind verschiedenste Wege vorhanden, um eine ausreichende Menge an Phospholipiden zu gewährleisten, wie die zuvor beschriebene *de novo*-Synthese ausgehend vom Glycerin. Die Umwandlung des Phosphoglycerids durch Austausch der Phosphoglyceridkomponenten bietet eine weitere Möglichkeit der Versorgung. Hier wird vor allem ein besonderes Augenmerk auf Phosphatidylethanolamin gelegt, da dieser Membranbaustein mittels dreifacher Methylierung am Stickstoff unter Beteiligung des S-Adenosylmethionin (SAM) zu Phosphatidylcholin umgewandelt werden kann. Phosphatidylserin kann durch Substitution von Ethanolamin durch Serin aus Phosphatidylethanolamin gebildet werden. Durch Carboxylierung des Phosphatidylserin bildet sich wiederum Phosphatidylethanolamin [1].

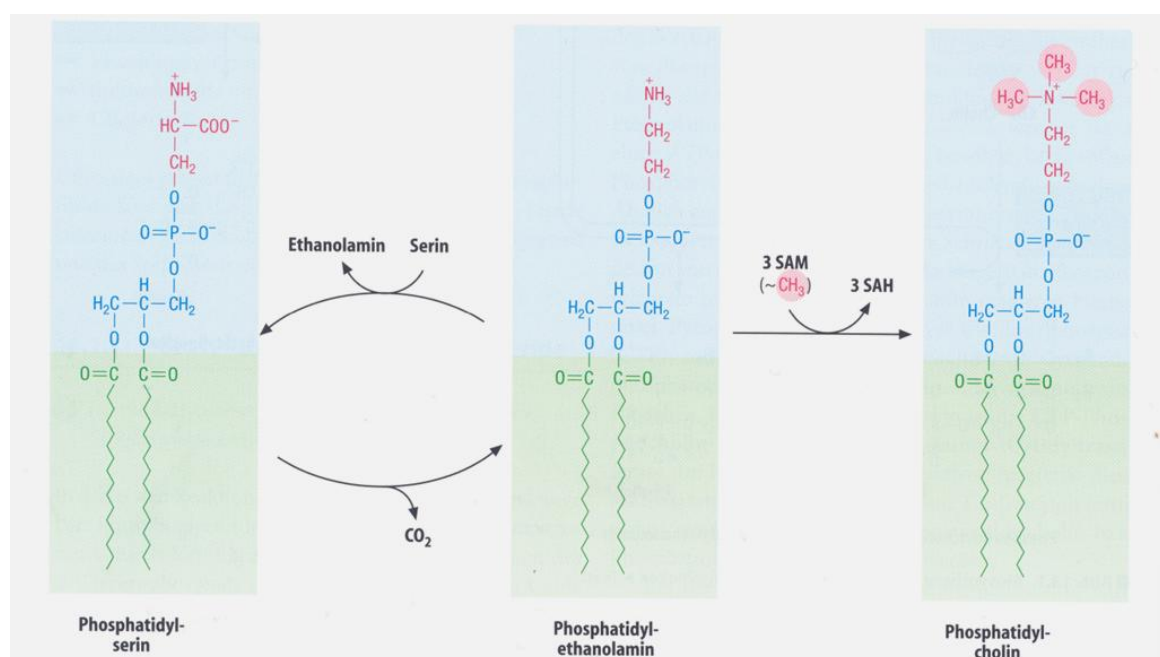


Abbildung 17: Umwandlung der stickstoffhaltigen Phosphoglyceride.

SAM (S-Adenosyl-Methionin); SAH (S-Adenosyl-Homocystein) [1]

Eine bedeutsame Funktion der Resynthese ist die Aufrechterhaltung der Phosphatidylglycerinversorgung in Nervensystem und Leber. Dabei wird im sogenannten Acylierungszyklus z.B. aus Lysophosphatidylcholin mit Acyl-Coenzym A wieder Phosphatidylcholin [1].

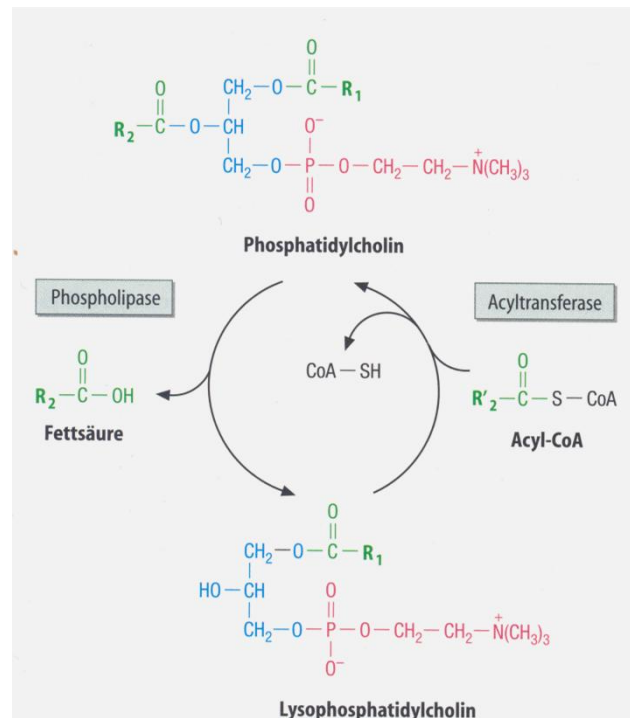


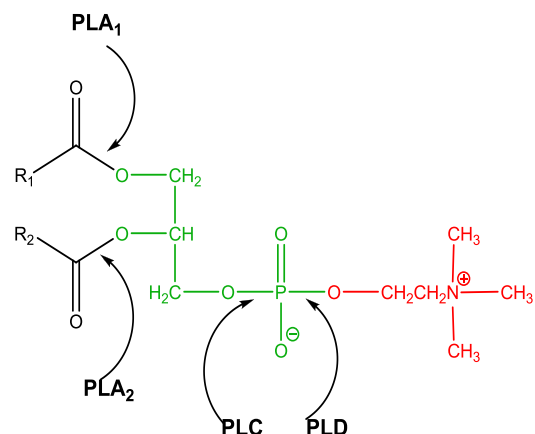
Abbildung 18: Acylierungszyklus des Phosphatidylcholin.

Mittels Phospholipase wird Phosphatidylcholin in Lysophosphatidylcholin umgewandelt, das mit Acyl-Coenzym A acyliert werden kann. R₁, R₂, R₃ stehen für Alkanketten von Fettsäuren [1].

Als amphiphile Membranbausteine sind Phospholipide ständig in Um- und Aufbauprozesse involviert, deswegen ist der Abbau von Phosphoglyceriden durch Phospholipasen in allen Geweben des Körpers möglich. Phospholipase A₁ und A₂ katalysieren die Abspaltung der Fettsäuren am Molekül. Die Abtrennung der Bindung des Phosphorsäurediesters zum Glycerin findet durch die Phospholipase C statt. Die Verknüpfung von polarer Kopfgruppe und Phosphorsäurediester wird durch die Phospholipase D aufgelöst [1].

Abbildung 19:

Wirkungsorte der Phospholipasen A₁, A₂, C und D am Phosphatidylcholin



Phospholipase A1 befindet sich in den Lysosomen oder Mikrosomen. Eine Hemmung dieses Enzyms erfolgt durch Calcium-Ionen. Das pH-Optimum liegt im sauren Bereich [3].

Extrazelluläre Phospholipase A2 kommt auch in Schlangen- und Bienengiften vor. Dabei wird die Fettsäure am C2 abgespalten und es entsteht ein sogenanntes Lysophospholipid. Es wird vorwiegend Lysophosphatidylcholin gebildet, das die Membran von Erythrozyten hämolysiert und somit die Giftwirkung erklärt [3].

Intrazelluläre Phospholipase A2 beeinflusst die Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen durch Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran [1].

Intrazelluläre Phospholipase C bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, IP3 und DAG, sogenannte second-messenger, aus [2].

3.1.4 Einteilung unterschiedlicher Phospholipidaggregate

Folgende Aufzählung gibt einen Überblick über die Möglichkeiten der Anordnung von amphiphilen Lipiden bzw. Verbindungen an Grenzflächen oder im Wasser

[1, 2]:

3.1.4.1 Monomolekulare Filme

Zur Bildung dieser Monoschicht kommt es, wenn sich hydrophobe Kohlenwasserstoffketten zur Luft richten und die polaren Teile sich Richtung Wasser orientieren [1].

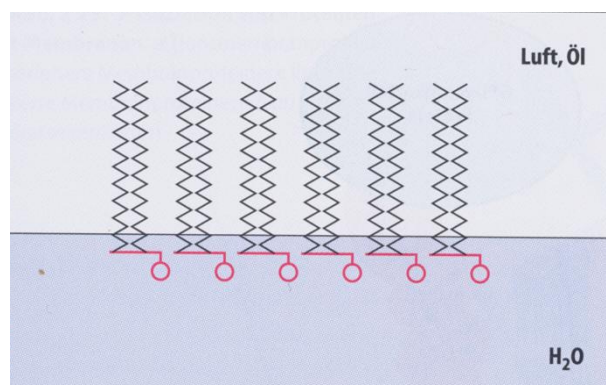


Abbildung 20: Monomolekulare Schicht [1]

3.1.4.2 Mizellen

Als Mizellen bezeichnet man einen Zusammenschluss von amphiphilen Lipiden, die, anders als Phospholipide, nur einen unpolaren Alkylrest besitzen [15].

Diese Aggregate werden bei einer gewissen Stoffkonzentration, der sogenannten kritischen Mizellkonzentration (CMC), gebildet. Die häufigste Form der Mizellen ist eine Kugel bestehend aus ungefähr 80 bis 100 Molekülen. Im Inneren assoziieren die hydrophoben Schwänze miteinander, während die hydrophilen Köpfe an der Außenseite mit dem wässrigen Medium im nahen Umfeld in

Verbindung treten und somit hydratisiert werden [2,13]. Der Aufbau von Membranen entspricht dem selben Prinzip wie der von Mizellen [14]. Da nicht alle Lipide (Triglyceride, Cholesterin) die Eigenschaft besitzen, sich zu Mizellen zusammenzuschließen, ist die Ausbildung von gemischten Mizellen für den Organismus von wesentlicher Bedeutung für die Resorption und Verstoffwechslung von Lipiden im Duodenum [1].

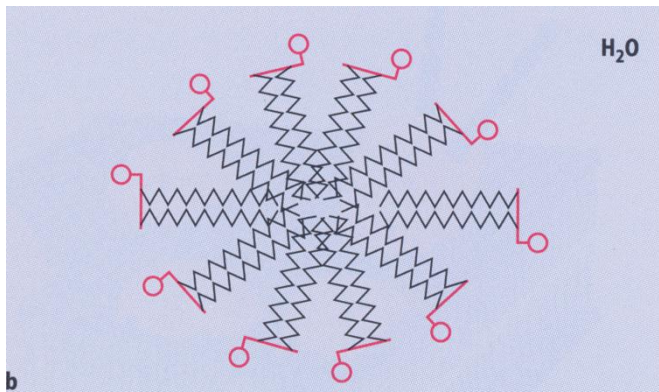


Abbildung 21: Mizellen [1]

3.1.4.3 Liposome

Liposome haben die Form einer kugelförmigen Doppelschicht, welche im Inneren einen wässrigen, abgegrenzten Bereich aufweist [2, 15]. Durch ihre strukturelle Verwandtschaft zur Biomembran können diese sogenannten lamellaren Vesikel mühelos mit den Membranen unzähliger Zellen verschmelzen. Infolgedessen werden Liposome als Transporter von eigentlich impermeablen Stoffen wie Enzymen, DNA oder Medikamenten verwendet, um sie in das Zellinnere zu verfrachten [1, 2, 13].

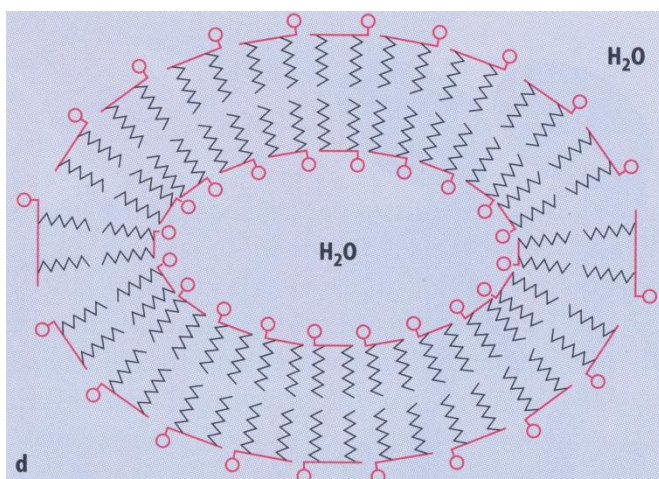


Abbildung 22: Liposom [1]

3.1.4.4 Doppelschicht (bilayers)

Um die Aufzählung der Einteilungsmöglichkeiten von amphiphilen Lipiden in wässriger Umgebung zu vervollständigen, wird nochmals die Ausbildung von Doppelschichten erwähnt, welche die strukturelle Basis aller biologischen Membranen darstellt [1].

Für viele wasserlösliche Verbindungen sind diese dicht zusammen gelagerten Monoschichten nicht frei permeabel, jedoch besitzen sie durch die nichtkovalente Wechselwirkung der Lipidmoleküle ein flexibles System [2].

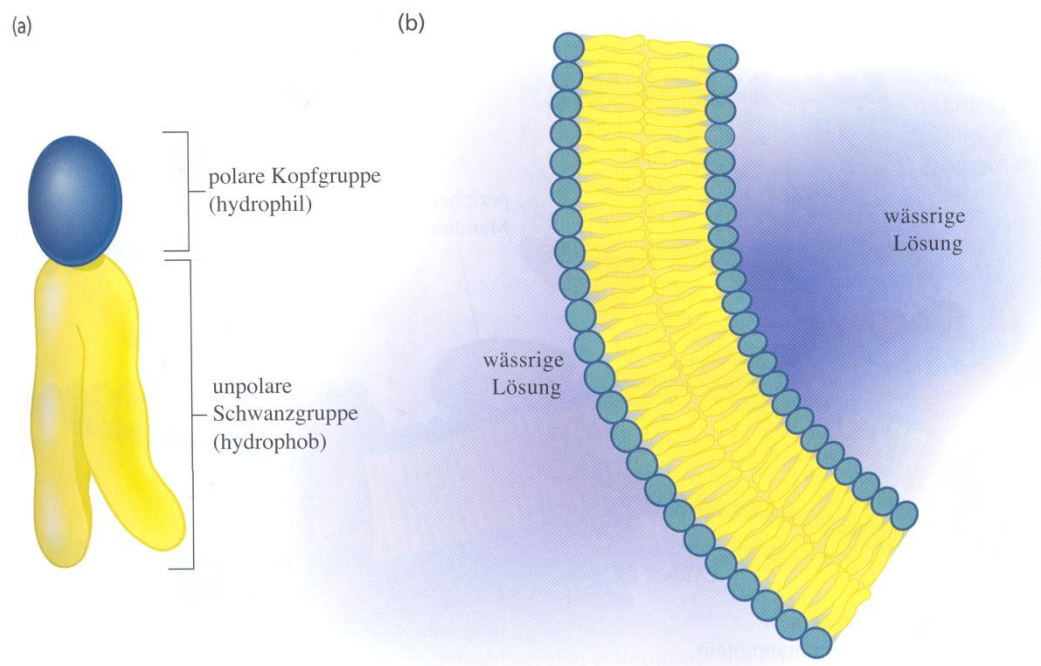


Abbildung 23: Schematische Darstellung eines Membranlipids und einer Lipiddoppelschicht.

(a) ein amphiphiles Membranlipid.

(b) Querschnitt durch eine Lipiddoppelschicht [2]

3.1.4.5 Lipoproteine

Komplexe aus Lipiden mit Kohlenhydraten und Proteinen sind wichtig für den Transport von Lipiden im wässrigen Milieu als sogenannte Lipoproteine und als Membranbausteine für Zellwände [5].

Eine bedeutende Funktion erfüllen Phospholipide zusammen mit Cholesterol als Lipoproteine (low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL)) beim Transport von Fetten im Blut und Körperflüssigkeiten [15].

3.1.5 Zellmembran

3.1.5.1 Allgemein

Die Entstehung von Membranen war ein wichtiger Schritt in der Evolution und Entwicklung des Lebens, da dieses Gebilde, großteils bestehend aus Lipidmolekülen, es erst ermöglichte, eine Abgrenzung zur äußeren Umwelt zu schaffen [2, 13].

Wie schon beschrieben, bestehen Phospholipide aus einem anorganischen Ester, dem Glycerol-3-phosphat, an dessen C1 und C2 Fettsäuren hängen. Die polare Kopfgruppe ist über einen Phosphorsäurediester am C3 verknüpft [15]. Diese Zusammensetzung aus einer hydrophoben Schwanzgruppe und einem hydrophilen Kopfteil macht Phospholipide amphiphil, die die Fähigkeit besitzen in wässriger Umgebung Liposome, Mizellen und Doppelschichten zu bilden. Die Fähigkeit diese Doppelschichtstruktur aufzubauen, bleibt den Triglyceriden durch ihre Hydrophobie und mangelnde Amphiphilie vorenthalten. Lipiddoppelschichten bilden nicht nur den Grundbauplan der biologischen Membranen, sondern auch die äußere Barriere der Zelle und den Kompartimenten im Inneren der Zelle [2, 15]. Die Dicke der Intrazellulärmembran beträgt in etwa 4 nm bis 6 nm [14, 16] und bei cytoplasmatischen Membranen ca. 7 und 15 nm [3].

3.1.5.2 Fluid-Mosaik-Modell

3.1.5.2.1 Allgemein

Das Fluid-Mosaik-Modell beruht auf der Vorstellung, dass die biologische Membran aus einer Phospholipid-Doppelschicht, auch *bilayers* genannt, besteht, und in dieser die Lipide in einem flüssig-kristallinen (fluiden) Gefüge vorzufinden sind. Aufgrund dessen erstellten S. Jonathan Singer und Garth L. Nicolson 1972 dieses Modell um die Anordnung von Proteinen und Lipiden in der Membran zu erläutern [2, 13, 18].

3.1.5.2.2 Lateraldiffusion und Flip-Flop-Diffusion

Wie schon erwähnt, ist die Zellmembran kein starres Gebilde sondern äußerst dynamisch. Proteine und Lipide können seitlich (lateral), innerhalb einer Hälfte der Lipiddoppelschicht, rasch wandern, man bezeichnet diesen Vorgang Lateraldiffusion. Die Bewegung von einem Blatt der Lipiddoppelschicht in das andere nennt man Transversaldiffusion oder Flip-Flop-Diffusion und verläuft wesentlich langsamer. Diese zwei Vorgänge sind wesentlich, um die unterschiedliche Zusammensetzung an Lipiden der beiden Monoschichten der Biomembran zu bewahren. Der Hauptteil der Membranproteine wandert erheblich langsamer als Membranlipide [2].

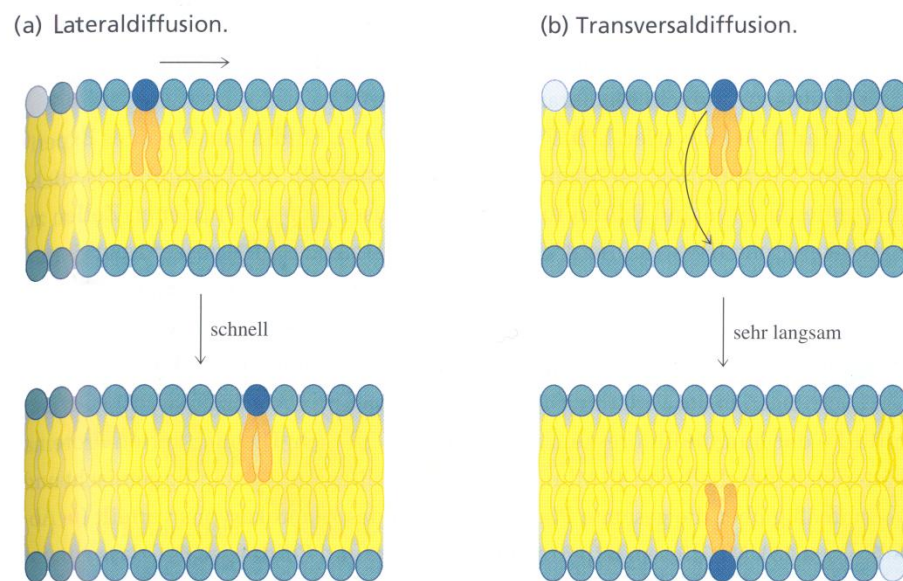


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Diffusion von Lipiden innerhalb einer Lipiddoppelschicht[2].

(a) Lateraldiffusion

(b) Transversaldiffusion

3.1.5.2.3 Phasenübergang der Lipiddoppelschicht

Die Lipiddoppelschicht besitzt durch ihre Kohlenwasserstoffketten, abhängig von deren Länge und Sättigungsgrad, eine kristalline bis flüssigkristalline Struktur [2]. Dieser Übergang von einem geordneten in den sogenannten fluiden Zustand nennt man Phasenübergang, der bei einer bestimmten Temperatur (transition temperature) stattfindet [3, 13]. Da sich die Membran aus vielen verschiedenen Lipiden zusammensetzt, ergibt sich daraus ein stetiger Wandel zwischen Gelzustand und fluiden Zustand. Allgemein findet dieser Phasenübergang bei einer Temperatur zwischen 10°C und 40°C statt [2]. Auch Ionen verändern die Membran, Na^+ und K^+ steigern die Fluidität währenddessen Ca^{2+} und Mg^{2+} als Membranverfestiger wirken [13].

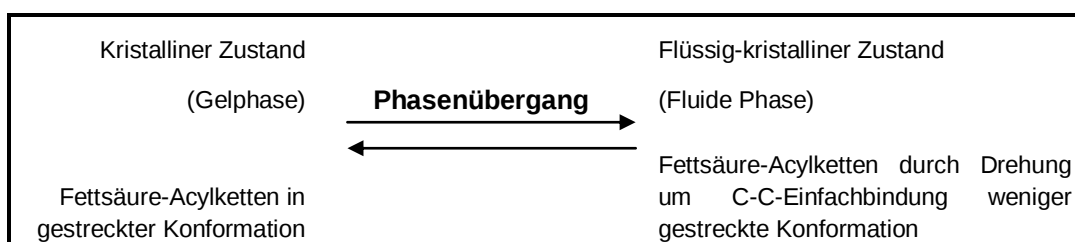


Abbildung 25: Phasenübergang der Lipiddoppelschicht

Die Lipidzusammensetzung der Biomembran hat Auswirkungen auf die Membranfluidität. Durch erhöhte Zufuhr von ungesättigten Fettsäuren steigt deren Anteil in den Phospholipiden. Die Folge ist eine Fluiditätserhöhung und eine Senkung der Phasenübergangstemperatur. Diese Änderungen haben Auswirkungen auf den Stofftransport und auf die katalytische Eigenschaft der Membranproteine [2, 6].

Cholesterin erfüllt als Membranbestandteil wichtige Funktionen, wie die Stabilisierung der Membran und Erhaltung einer konstanten Fluidität. 20 bis 25 % der Lipide nimmt Cholesterin ein. Der hydrophobe Steroidteil platziert sich zwischen den Kohlenwasserstoffketten, während die hydrophile Hydroxygruppe zwischen den polaren Kopfgruppen der Phospholipide an die Außenseite gerichtet ist [1, 2].

Bedeutend für die Erhaltung der Lipiddoppelschicht ist Vitamin E, da es bei einem Mangel Auswirkungen auf die Synthese von langkettigen, ungesättigten Fettsäuren hat und folgedessen auch die Phospholipidbildung beeinflusst. Somit ändert sich das Cholesterin/Phospholipid-Verhältnis und die Membranfluidität verringert sich [6].

3.1.5.3 Membranproteine

3.1.5.3.1 Allgemein

Charakteristisch für Membranen sind zum einen die beiden zusammengelagerten Blätter von Lipidmolekülen und zum anderen die vielen Proteinmoleküle [2].

Davson und Danielli (1935) erstellten den ersten Entwurf einer Biomembran mit Proteinbausteinen. Der Menge dieser Moleküle variiert je nach Membrantyp. Bei Myelinmembranen beträgt der Proteingehalt in etwa 20 % und bei der Innenmembran der Mitochondrien erhöht sich der prozentuelle Anteil bis auf 80 %, der auf eine hohe Stoffwechsellätigkeit zurückzuführen ist [1, 13]. Weiters besitzen auch rote Blutkörperchen einen hohen Anteil an Proteinen in der Plasmamembran [2].

Je nachdem wie Membranproteine mit der Lipiddoppelschicht verknüpft sind, lassen sie sich in drei Gruppen einteilen: periphere, integrale und lipidverankerte Membranproteine [2]. Der Proteinanteil der Biomembran setzt sich aus 30 % peripheren und 70 % integralen Proteinen zusammen [13].

Membranproteine gehören häufig dem Glykoproteintyp an, dessen Kohlenhydratrest immer auf extrazellulären Seite der Membran zu finden ist [1].

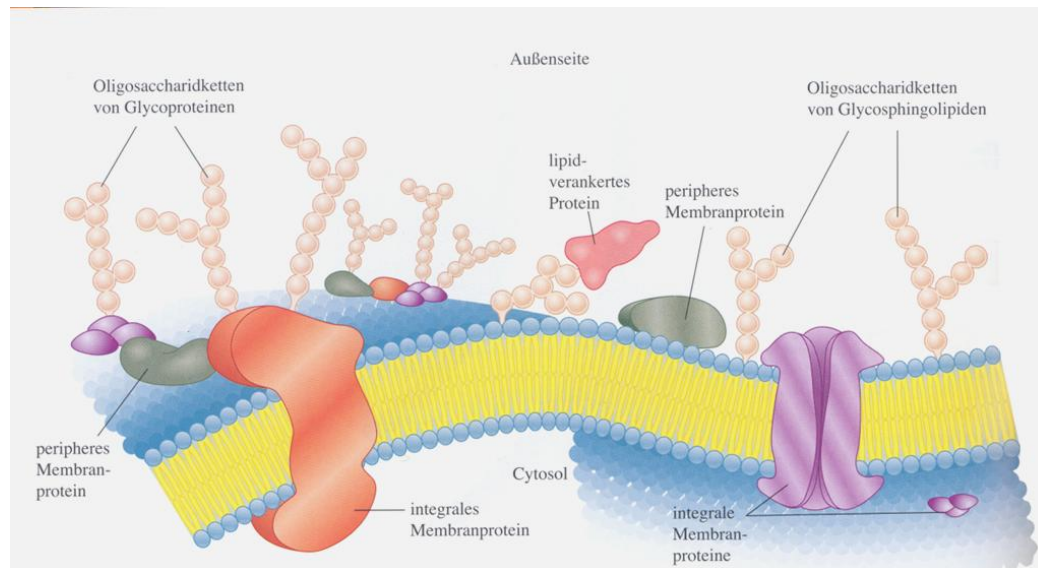


Abbildung 26: Aufbau einer typischen eukaryontischen Plasmamembran mit vielen unterschiedlichen Proteinen eingebettet in die Membran [2]

Membranproteine ermöglichen wichtige Funktionen, wie die Rezeptorwirkung zur Signalübertragung durch Signalmoleküle oder Molekültransporter durch die Membran als Carrier oder Kanäle [1].

3.1.5.3.2 Integrale Membranproteine

Integrale Membranproteine besitzen ein oder mehrere sogenannte Transmembrandomänen. Diese verfügen über hydrophobe Aminosäuren welche mit dem Inneren der Lipiddoppelschicht in Wechselwirkung treten und dadurch verankert werden. Dieser Proteintypus geht vollständig durch die Membran durch [1,2].

3.1.5.3.3 Periphere Membranproteine

Periphere Membranproteine lassen sich leichter aus der Membran trennen als integrale Membranproteine, da sie nur mit der Lipidmonoschicht durch z.B. Ladungswechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide assoziiert sind [1, 2].

3.1.5.3.4 Lipidverankerte Membranproteine

Durch kovalente Bindungen an Lipiden sind Lipidverankerte Membranproteine mit der Membran verkoppelt. Beispiele dafür sind der Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker, Fettsäurereste oder Isoprenoidreste [1].

3.1.5.4 Transportsysteme der Zellmembran

Die biologische Membran trennt den intrazellulären Raum der Zelle von der extrazellulären Umgebung ab. Somit entsteht eine Barriere, um unkontrolliertes Wandern der Moleküle zu verhindern [2].

Kleine und unpolare Teilchen, wie auch lipophile Moleküle, sowie gelöste Gase (O_2 , N_2 und CO_2), Wasser, Steroid- und Schilddrüsenhormone und fettlösliche Vitamine sind Beispiele der sogenannten Diffusion. Kanäle oder Poren, sowie passive und aktive Transporter dienen dazu, größere und polare Moleküle wie z.B. Glucose und Ionen durch die Zellmembran zu schleusen [2].

3.1.5.5 Signaltransduktion

Als Signaltransduktion definiert man die Weiterleitung von extrazellulären Reizen in das Innere der Zelle und die daraus folgenden Stoffwechseländerungen und zellulären Aktionen. Phospholipide besitzen diese Funktion der Signalübertragung indem durch bestimmte Phospholipasen verschiedene Abspaltungsprodukte des Phosphoglycerides entstehen [1]:

Drei Beispiele für Spaltprodukte des Phosphoglycerides mit Signalmolekülfunktion [2]:

- **Arachidonsäure:** Ausgangsprodukt der Biosynthese von Eicosanoiden
- **Inositoltrisphosphat:** Erhöht cytosolische Ca^{2+} -Konzentration
- **Diacylglycerin:** Proteinkinase C – Aktivator

3.2 Biosynthese von Membranen

Die Synthese der Lipide für die Biomembran findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, welches nicht von Ribosomen besetzt ist. Die erforderlichen Enzymsysteme, die für die Bildung von Phosphoglycerid und Sphingomyelin nötig sind, findet man fest in der Membran dieser Zellorganelle fixiert [1].

Auf dem luminalen Teil des ER werden die Sphingomyeline synthetisiert und mittels Vesikeln zu ihrem Zielort in der äußeren Membranhälfte befördert. Den Hauptsyntheseort der Phosphoglyceride findet man auf der Seite des Cytosols des ER. Somit ist es naheliegend, dass die neugebildeten Phosphoglyceride auf der cytosolischen Hälfte auftreten [1].

In der Plasmamembran ist die Verteilung der Phospholipide asymmetrisch. Das bedeutet, dass Sphingomyeline und Phosphatidylcholin sich hauptsächlich auf der extrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht befinden. Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol dagegen sind auf der cytosolischen Hälfte positioniert [1, 10].

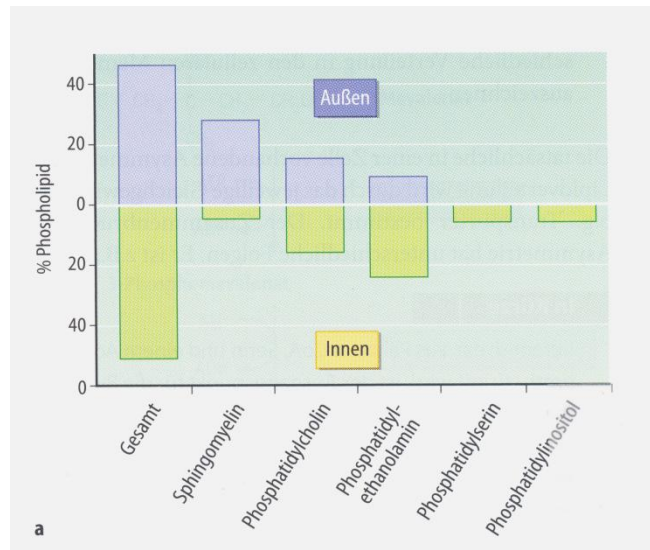


Abbildung 27: Asymmetrische Verteilung der Phospholipide in der Plasmamembran [2]

Mittels eigener Transporter wird diese Asymmetrie beibehalten:

- Flippasen (Aminophospholipid-Translocase)
- Floppasen
- Scramblasen

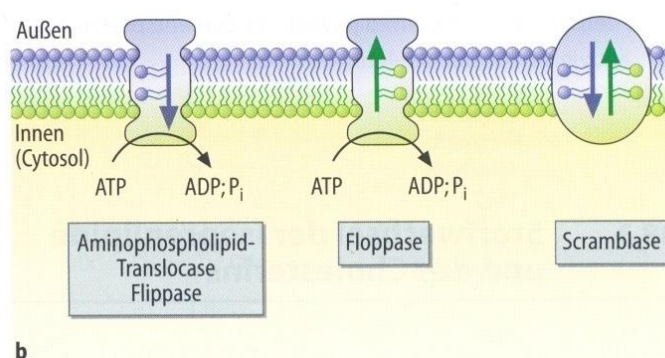


Abbildung 28: Wirkungsweise von Flippase, Floppase und Scramblase [2]

3.3 Gesundheitsaspekt

3.3.1 Bedarf

3.3.1.1 Allgemeine Übersicht über den Fettbedarf

Die D-A-CH Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr an Fett, Kohlenhydraten und Eiweiß sehen folgendermaßen aus:

Tabelle 8: D-A-CH Referenzwerte der Makronährstoffe

Nährstoff	Zufuhr in % der Nahrungsenergie
Kohlenhydrate	> 50
Fett	≤ 30
Eiweiß	9-11

Bei Erwachsenen, die leichte bis mittelschwere Arbeit leisten, sollte Fett nicht mehr als 30 % der täglichen Energiezufuhr ergeben. Das entspricht in etwa 60-80g Fett [6, 7].

Laut Deutscher Gesellschaft für Ernährung (DGE) ergibt sich aus diesen 30% folgende Zusammensetzung für das Fettsäuremuster:

- Höchstens 1/3 SAFAs
- Mindestens 1/3 MUFAs
- Höchstens 1/3 PUFAS

Besonderer Fokus wird auf den Bedarf der essentiellen Fettsäuren gerichtet, der sich für einen Erwachsenen folgendermaßen ergibt [6]:

Tabelle 9: Bedarf an essentiellen Fettsäuren pro Tag

Essentielle Fettsäure	g/Tag	% der Nahrungsenergiezufuhr
Linolsäure	6,5	2,5
α –Linolensäure	1	0,5

Wie man der Tabelle 9 entnehmen kann, sollte das Verhältnis von Linolsäure zu α –Linolensäure 5:1 betragen.

Eine detaillierte Übersicht über die „Aufteilung“ der 30 % der Energiezufuhr aus Fett bieten die D-A-CH-Referenzwerte [9]:

- gesättigte Fettsäuren ≤ 10 En%
- mehrfach ungesättigte Fettsäuren 7–10 En%
- Linolsäure (n-6): α -Linolensäure (n-3) ca. 5:1
- einfach ungesättigte Fettsäuren > 10 En%

Das Verhältnis dieser Fettsäuren sollte *saturated* (S):*monounsaturated* (M):*polyunsaturated* (P) = 10:13:7 ergeben [9].

3.3.1.2 Tatsächlicher Fettzufuhr der Österreicher:

Mit einer Fettzufuhr von 37 Energie% liegen die Österreicher deutlich über der empfohlenen Grenze der DGE von höchstens 30 % [7]. Trotz abfallender Tendenz des Verzehrs an tierischen Fetten, ist der durchschnittliche Konsum mit 15 Energie% immer noch zu hoch. Eine akzeptable Zufuhr von essentiellen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren konnte laut österreichischem Ernährungsbericht 2008 belegt werden, obwohl das derzeitige Verhältnis von n-6 zu n-3 von 8:1 auf 5:1 gesenkt werden sollte [7].

3.3.1.3 Energiegewinnung von Fett

Der Körper kann durch metabolischen Abbau aus Fett zweimal mehr Energie gewinnen als aus anderen Nahrungsstoffen, da Fett vorwiegend aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen aufgebaut ist und im Vergleich zu Proteinen und Kohlenhydraten weniger Sauerstoffatome besitzt. Vergleicht man die Energieausbeute der Fettsäureoxidation mit der Oxidation von Glucose, beziehungsweise von Aminosäuren, ist diese enorm hoch [5].

Der Fettsäureabbau erfolgt durch die sogenannte β -Oxidation in der Mitochondrienmatrix. Zuvor müssen die nicht sehr reaktionsfreudigen Fettsäuren mit Coenzym A aktiviert werden. Endprodukt dieser energie- und enzymabhängigen Reaktion ist ein über einen Thioester gebundenen Acyl-Coenzym A. Weiters kann der Kreisprozess der β -Oxidation, der aus einer Oxidation, Hydratisierung, einer zweiten Oxidation und einer Thiolyse besteht, beginnen. Ziel dieses Abbauvorganges ist es, die aktivierte Fettsäure um einen C2-Körper zu verkürzen. Dieser Kreislauf endet erst, wenn die gesamte Fettsäure zu Acetyl-Coenzym A umgesetzt wurde. Flavinadenindinucleotid (FAD) und Nicotinaminadenindinucleotid (NAD⁺) werden bei diesem Prozess als Oxidationsmittel benötigt [1, 6].

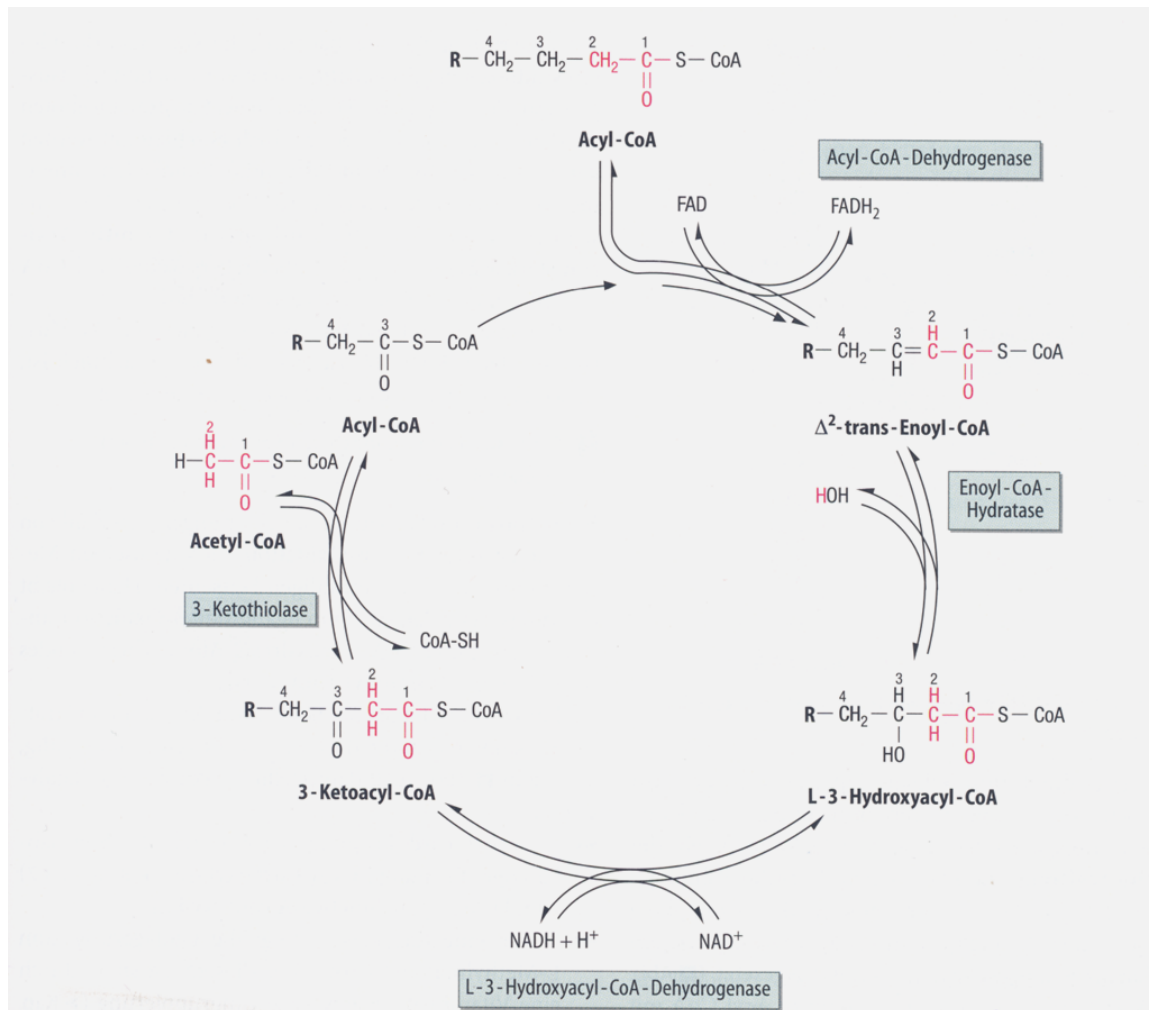


Abbildung 29: Abbau geradzahliger Fettsäuren durch β -Oxidation [1]

Bei Abbau von 1 mol Palmitinsäure (C16) entstehen 131 ATP. 1 mol Glucose liefert hingegen nur um die 30 ATP [2].

Tabelle 10: Freigesetzte Wärme von Fett, Kohlenhydrate und Proteine

Nährstoff	Freigesetzte Wärme [6]	
	kcal/g	Kilojoul/g
Fett	9	38
Kohlenhydrate	4	17
Proteine	4	17

3.3.2 ω -3 Fettsäuren

3.3.2.1 Allgemein

Das Methyl-Ende einer Fettsäure wird als ω -Ende beschrieben. Definitionsgemäß findet man bei ω -3 Fettsäuren immer eine Doppelbindung in cis-Konfiguration am dritten C-Atom nach der CH_3 -Gruppe. Die Kettenlänge und die Anzahl der Doppelbindungen sind nicht festgelegt und können variieren. Jedoch handelt es sich in den meisten Fällen bei ω -3 Fettsäuren um hochungesättigte Fettsäuren [2, 15].

3.3.2.2 Essentialität

Zu den essentiellen Fettsäuren zählen Linolsäuren (ω -6 Fettsäure) und α -Linolensäure (ω -3 Fettsäure). Diese Fettsäuren können vom menschlichen bzw. tierischen Organismus nicht selbst synthetisiert werden und müssen daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Grund dafür ist das Fehlen spezieller Enzymsysteme (Desaturasen). Tierische Zellen besitzen nur die Möglichkeit, Doppelbindungen 5, 6 und 9 C-Atome von der Carboxylgruppe entfernt, einzubauen [1].

Nach Elmadfa et al. benötigt eine Fettsäure, um als essentiell zu gelten, mindestens 18 C-Atome, isolierte Doppelbindungen in cis-Konfiguration und die erste Doppelbindung an 3. oder 6. Stelle vom CH_3 -Ende [6].

3.3.2.3 Vorkommen

Die wichtigsten Vertreter der ω -3 Fettsäuren stellen α -Linolensäure (ALA), Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) dar. Leinsamenöl ist einer der Hauptlieferanten der α -Linolensäure. Einen geringeren Anteil dieser Fettsäure findet man auch in Walnuss-, Weizenkeim- und Rapsöl. DHA und EPA kommen vor allem in fetten Kaltwasserfischen wie Lachs und Hering vor [20, 28].

Tabelle 11: ω -3-Fettsäuren von unterschiedlichen Fischen in g/100g Filet [4, 20]

Fisch	EPA	DHA
Atlantischer Lachs	0,65	1,10
Rotlachs	0,18	0,61
Forelle	0,22	0,62
Tunfisch	0,63	1,70
Barsch	0,17	0,47
Makrele	1,75	
Hering	1,5	
Sardine	1,39	
Karpfen	0,3	
Zander	0,19	

3.3.2.4 Wirkungsweise und positiver Effekt der ω -3 Fettsäuren

Die Aufnahme von mehrfach ungesättigten ω -3 und ω -6 Fettsäuren spielt in der menschlichen Ernährung eine wesentliche Rolle. Laut Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung sollten 2,5% des Energiebedarfs durch ω -6 Fettsäuren, wie Linolsäure und 0,5% des Energiebedarfs durch ω -3 Fettsäuren wie α -Linolensäure, gedeckt werden [20].

Da die Biosynthese der Fettsäuren durch die Fettsäuresynthase auf eine Kettenlänge von maximal 18 C-Atomen beschränkt ist, erfolgt eine Kettenverlängerung zu langkettigen Fettsäuren wie Arachidonsäure (AA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) im Nachhinein mittels Enzyme. Ausgangssubstanzen für diese Fettsäuren stellen die vorher erwähnten ω -3 und ω -6 Fettsäuren der C-18-Reihe dar [30].

Durch Elongation und Einführung von Doppelbindungen entsteht aus einer α -Linolensäure die Eicosapentaensäure und als weiteren Schritt die Docosahexaensäure. Linolsäure kann zu Arachidonsäure umgewandelt werden. Die Fettsäuren der ω -6 und ω -3 Reihe konkurrieren um dasselbe Enzymsystem. Darum ist ein ausgeglichenes Verhältnis dieser Fettsäuren von 5:1 (ω -6: ω -3) wünschenswert. Maximal können 10 % der α -Linolensäure zu Eicosapentaensäure umgesetzt werden, der weitere Schritt zu Docosahexaensäure ist auf ungefähr 4 % festgelegt [20, 29].

AA und DHA sind nicht nur wichtige Membranbestandteile, sondern auch bedeutende Vorläufer von hormonähnlichen Substanzen, den sogenannten Eicosanoiden. Die Fettsäuren werden durch Phospholipase A2 aus der Zellmembran oder aus „lipid bodies“ wie z.B. Leukocyten gelöst und enzymatisch zu Eicosanoiden umgewandelt. Je nachdem aus welcher Fettsäure die Eicosanoide entstanden sind, unterscheiden sie sich in ihrer Wirkungsweise. Prostaglandine der 2er-Reihe, Thromboxane A2 & B2 und Leukotriene der 4er-Reihe werden aus AA gebildet. Aus EPA entstehen Prostaglandine der 3er-Reihe, Thromboxane A3 & B3 und Leukotriene der 5er-Reihe. Generell kann man sagen, dass Eicosanoide aus EPA eine entzündungs- und aggregationshemmende sowie vasodilatative Wirkung haben, im Gegensatz zu jenen aus AA, die einen proinflammatorischen und vasokonstriktiven Effekt aufweisen [28].

Zahlreiche Untersuchungen und weltweite Studien belegen, dass der Konsum von Lebensmitteln, wie fettreiche Fische mit hohem ω -3 -Fettsäuregehalt einen positiven Effekt auf den menschlichen Organismus bewirkt. ω -3 -Fettsäuren können präventiv vor Herz-Kreislauferkrankungen und Rheumatismus schützen. Auch gegen Krebs haben diese Fettsäuren positive Wirkungen gezeigt. Der Stoffwechsel kann direkt durch die Fettsäuren oder durch deren Metabolite beeinflusst werden [30, 32, 33, 34, 35].

3.4 Fisch

3.4.1 Produktion

3.4.1.1 Produktion Weltweit

Die weltweite Fischproduktion beläuft sich laut einem Bericht der Food and Agriculture Organisation (FAO) auf ungefähr 143 Millionen Tonnen [36].

Tabelle 12: Aufteilung der Gesamtfischproduktion in direkten Fang und Aquakulturen [36]

Direkter Fang (in Millionen Tonnen)	Aquakulturen (in Millionen Tonnen)
92 Mio. t	51, 7 Mio. t

Die Meeresfischproduktion betrug mehr als zwei Drittel. China ist mit 51 Millionen Tonnen der führende Produzent, während die EU-Staaten im Jahre 2005 nur in etwa 4 % der Produktion weltweit übernehmen. Island und Norwegen beteiligen sich an der Weltproduktion an Fisch mit ungefähr 3 % [37].

3.4.1.2 Produktion in Österreich

Die Fischproduktion in Aquakulturen betrug in Österreich im Jahre 2008 gemäß Statistik Austria insgesamt 2.089 Tonnen. Bevorzugt gezüchtet werden Regenbogenforellen, die in etwa 1.200 Tonnen der gesamten Speisefischproduktion ausmachen. Wels, Karpfen und Bachsaibling und andere Forellenarten nehmen auch eine bedeutende Rolle in der österreichischen Fischproduktion ein [38]. Da der Selbstversorgungsgrad aufgrund geringer Eigenproduktion nur bei 4% liegt, wurden im Jahre 2008 über 64.900 Tonnen Fisch in Österreich importiert [39].

3.4.2 Nährstoffquelle Fisch

3.4.2.1 Inhaltsstoffe

Die Hauptinhaltsstoffe von Fischen beschränken sich auf Proteine, Lipide und Wasser. Kohlenhydrate kommen nur in geringen Mengen vor. Fettreiche Fische wie Lachs, Makrele und Hering weisen einen hohen Gehalt an langkettigen hochungesättigten ω -3-Fettsäuren auf. Fischproteine sind durch ihren geringen Gehalt an Kollagen (3%) leicht verdaulich und zeichnen sich als hervorragende Quelle von allen essentiellen Aminosäuren aus. Die Konzentrationen von Vitamin A und D sind in fetten Fischen am größten. Der Verzehr von Fischfleisch liefert hohe Mengen an Mineralstoffen wie Calcium, Phosphor, Selen und Jod, die in Meeresfischen im Vergleich zu anderen Fischarten am höchsten ist. Molybdän, Vanadium und Beryllium sind die am häufigsten vorkommenden Spurenelemente in Fischen. Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass die chemische Zusammensetzung des Fisches von Geschlecht, Alter, Jahreszeit und veränderten Umweltbedingungen abhängig ist [7,20].

3.4.2.2 Fettverteilung und Fettsäurenmuster

Die Fettspeicherung ist bei Fischen nicht nur auf das Fettgewebe reduziert. Auch in andere Gewebe wie Muskel und Leber wird Fett eingelagert, jedoch variiert der Gehalt in den verschiedenen Organen. Durch unterschiedliche Beanspruchung der Muskulatur ist der Schwanzteil mit dem geringsten Fettgehalt ausgestattet. Der Bauchteil übernimmt den größten Anteil der Fettspeicherung, wohingegen sich der Rücken mit seinem Fettanteil zwischen Schwanz und Bauch befindet. Die Fettspeicherung erfolgt subkutan und nimmt von der äußeren zur inneren Gewebeschicht ab [24].

Das Fettsäuremuster von Fischen zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an hoch ungesättigten Fettsäuren der ω -3 Reihe aus. Da die Selbstsynthese von Linolsäure und α -Linolensäure bei allen Vertebraten wegen fehlender Enzymsysteme nicht möglich ist, müssen Fische diese Fettsäuren über die Nahrung aufnehmen [23].

Der hohe Bedarf an langkettigen hochungesättigten Fettsäuren wie Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure und Arachidonsäure ist überlebenswichtig für marine Fische. Der Anteil an diesen Fettsäuren ist vermehrt in der Zellmembran konzentriert, um die Fluidität und Funktion der sogenannten Lipiddoppelschicht aufrechtzuerhalten. Somit bleibt der Lachs, der zu den Kaltwasserfischen gehört, auch bei tiefen Wassertemperaturen beweglich und erstarrt nicht. Aufgrund dieser Sachlage lässt sich der hohe Gehalt an diesen hochungesättigten langkettigen Fettsäuren begründen. Neben der Aufrechterhaltung der Membranfunktionalität und Fluidität benötigen Fische diese Fettsäuren auch noch zur Synthese von Eicosanoiden [22, 23].

3.4.2.3 Risiken des Fischverzehr

Hauptlieferant von langkettigen hochungesättigten Fettsäuren für den menschlichen Organismus sind fette Fische, wie Lachse. Jedoch kann der Verzehr von Fischen auch etwaige Risiken beinhalten, wie die Aufnahme von Umweltkontaminaten wie Polychlorierte Biphenyle (PCBs), halogenierte organische Verbindungen, Dioxine, Dieldrin oder Schwermetalle wie Quecksilber und Cadmium. Durch ihre Fettlöslichkeit können sie sich in den Fettdepots von Fischen anreichern. Langlebige Fische wie Haie und Schwertfische weisen somit hohe Konzentration an Kontaminanten auf, wohingegen kurzlebige Tiere wie Lachse und Schalentiere eine geringe Konzentration an den angeführten Stoffen besitzen. Für spezielle Personengruppen wie Schwangere, Stillende und Kleinkinder ist es ratsam Fischarten zu meiden, die hohe Anteile an Risikostoffen vorweisen. Dennoch raten Experten, dass der positive Effekt von moderatem Fischverzehr auf die Gesundheit größer ist, als die potentiellen Risiken durch eine Schadstoffaufnahme von Fischkonsum [20, 40, 41].

3.5 Arktischer Saibling

3.5.1 Produktion

3.5.1.1 Weltproduktion

Die weltweite Produktion von arktischem Saibling betrug 2007 laut der Food and Agriculture Organisation (FAO) 2.384 Tonnen. Nordamerika und Europa produzieren diese Fischart hauptsächlich in Aquakulturen und nur ungefähr 86 Tonnen stammen aus dem Meer. Die Weltproduktion des arktischen Saiblings ist jedoch sehr gering, verglichen mit den Produktionsdaten des atlantischen Lachses, die sich im Jahre 2007 auf über 1,4 Millionen Tonnen belaufen. Allgemein betrachtet, überwiegt die Produktion dieser Fische durch Aquakulturen gegenüber dem Meeresfang [42].

3.5.1.2 Produktion in Österreich

Die Produktion des arktischen Saiblings in Österreich beschränkt sich auf die Firma Alpenlachs, die es nach langjähriger Forschung geschafft hat dieses marine Lebewesen im Süßwasser zu züchten. Alpenlachs ist eine Dachmarke und beschränkt sich nicht nur auf den arktischen Saibling, der auch unter Kavalierlachs bekannt ist, sondern produziert unter anderem auch Atlantische Lachse [43, 44].

3.6 Analyse der Phospholipide

3.6.1 Allgemein

Da Phospholipide nicht unzersetzt in die Gasphase überführbar sind und daher eine direkte Analyse mittels Gaschromatographie nicht möglich ist, wird die Trennung dieser Substanzklasse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgeführt.

3.6.2 Phospholipide

Die HPLC trennt die zu analysierenden Substanzen nach ihren Polaritäten. Durch die polaren Kopfgruppen lassen sich Phospholipide durch die Hochdruckleistungschromatographie trennen.

Durch diese Analysemethode kann man jedoch lediglich die Phospholipidklassen trennen, da trotz verschiedenen Fettsäureresten am C1 und C2 die Polarität des Analyten keine bzw. nur geringe Auswirkung auf die Trennung hat. Darum wurde mit Hilfe der Gaschromatographie durch Ausbildung von Fettsäuremethylester das Fettsäurespektrum der gesamten Phospholipidlipidfraktion erstellt

4 Material und Methode

4.1 Probenmaterial

4.1.1 Probenbeschreibung

Für diese Arbeit wurden Fische der Gattung Arktischer Saibling (*Salvelinus Alpinus*) untersucht. Eismeersaibling oder Kavalierlachs sind weitere Bezeichnungen dieses Tieres. Bei einer systematischen Einteilung gehört der Eismeersaibling zu der Familie der Lachsfische (*Salmoidae*), welche auch als Wandersaiblinge bezeichnet werden.

Alle Proben stammen aus Aquakulturen der Firma Alpenlachs von ausgewählten Vertragspartnern aus Österreich und Deutschland, die ihre Fische nach dem Alpenlachs-Patent züchten.



Abbildung 30: Eismeersaibling unter Vakuumatmosphäre verpackt

4.1.2 Probenanlieferung und Weiterverarbeitung

Die Probenanlieferung der toten und ausgenommenen Fische erfolgte am selben Tag der Schlachtung persönlich durch einen Mitarbeiter der Firma Alpenlachs. In Styroporbehältern auf Eis gelegt oder unter Vakuumatmosphäre verpackt, wurden die Fische zugestellt. Für die Standorte Payerbach, Schwarzach und Gutenstein wurden zusätzlich die Fischlebern unter denselben Lieferbedingungen geliefert.

Die Lieferung der Fische erfolgte im Zeitraum von Juli bis September.

Nach der Probenentnahme aus Rücken und Bauch wurden diese in dunkelbraune Glasbehälter überführt und bei -18°C für die anschließende Weiterverarbeitung zwischengelagert.

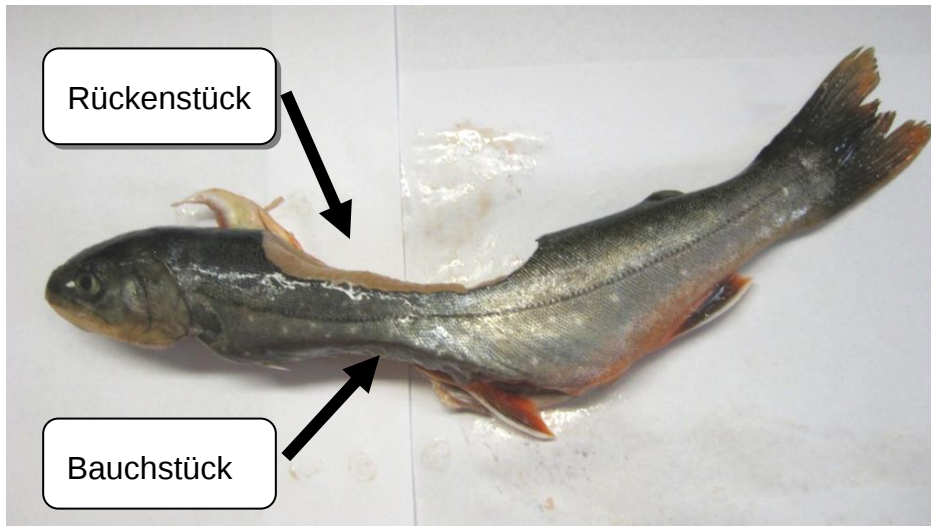


Abbildung 31: Entnahme der Probe an Bauch und Rücken

4.2 Probenstandorte

Für diese Arbeit wurden Proben von sechs unterschiedlichen Standorten analysiert. Die Fische stammen aus folgenden Aquakulturen:

- Gutenstein
- Payerbach
- Schwarza
- Übelbach
- Salzburg
- Bayern

Von jedem Standort wurden drei Fische untersucht. Pro Fisch wurde jeweils ein Stück Fleisch aus Bauch und Rücken entfernt und als Probenmaterial verwendet. Bei den Standorten Gutenstein, Payerbach und Schwarza wurde auch die Fischleber geliefert, die der gleichen Analyse unterzogen wurde wie das Rücken- und Bauchfleisch.

4.3 Verwendete Chemikalien

- Chloroform
- Methanol
- Hexan
- *Tert.*-Butylmethylether
- 2M methanolische Kaliumhydroxid-Lösung (KOH-Lösung)
- 1% Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung)
- Natriumsulfat: Na_2SO_4
- Aceton
- Flüssiger Stickstoff
- Aqua dest.

4.4 Herstellung der Lösungen

- Folch-Extrakt: Methanol und Chloroform werden im Verhältnis 1:2 gemischt
- 2M Methanolisch KOH: 11,2g 85%ige KOH werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit Methanol bis zur Markierung befüllt.
- 1% NaCl-Lösung: 1g NaCl wird in einen 100 ml Messkolben eingewogen bis zur Markierung mit Aqua dest. befüllt.

4.5 Vorversuche zur Trennungsoptimierung

4.5.1 Phospholipid- und Triglyceridtrennung mittels Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)

4.5.1.1 Vorversuch mit Dünnschichtchromatographie

Um eine gute Trennung von Triglyceriden und Phospholipiden auf der Festphase zu erreichen, wurden anhand von Standardlösungen der beiden Substanzklassen Vorversuche mittels (Kieselgel-)Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt, um das Laufverhalten dieser organischen Verbindungen auf einer polaren stationären Phase zu ermitteln.

Bei der Verwendung von reinem Hexan als Laufmittel blieben die Triglyceride auf der Startlinie liegen. Bei einer Mischung von *tert.*-Butylmethylether laufen Triglyceride mit der Laufmittelfront mit, Phospholipide zeigen wiederum keine Tendenz mitzuwandern und bleiben auf der Startlinie.

Methanol hat sich als sehr gutes Laufmittel für Phospholipide erwiesen. Auftrennungen innerhalb der Phospholipidklassen auf der Dünnschichtchromatographie lassen sich durch den Folchextrakt durchführen.

4.5.1.2 Vorversuch mit Festphasenextraktion

Weiters wurde ein Versuch mit Phospholipidstandards (Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin) getätigt. Da diese zwei Klassen der Phospholipide am häufigsten im Gewebe vorkommen, wurden nur Standards dieser zwei Typen für diesen Versuch verwendet und auf die Festphasesäule aufgetragen, mit 15 ml Methanol, gefolgt von 5 ml Methanol/Chloroform (2:1) ausgewaschen. Danach wurde das Eluat im Stickstoffstrom eingedampft, einige Tropfen wurden auf jeweils zwei Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen und mit Methanol entwickelt. Um die exakte Position der Phospholipide zu bestimmen, wurde eine der beiden Dünnschichtchromatographieplatten in den Jodtopf gestellt um die Probe nach Verdampfung des Laufmittels durch Oxidation sichtbar zu machen. Somit wird bekannt wo sich die Probe auf der anderen Platte befindet. Durch Abschaben der gelaufenen Standards von der Platte und Lösen in organischem Lösungsmittel, gefolgt von einer Filtrierung und Eindampfung durch Stickstoff ist es möglich, eine qualitative Analyse mittels HPLC durchzuführen.

Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolaminstandards scheinen zu den gewünschten Retentionszeiten in der HPLC auf. Somit ist bewiesen, dass mit den eingesetzten Lösungsmitteln bei der Festphasenextraktion beide Analyten aus der Festphasensäule eluiert werden.

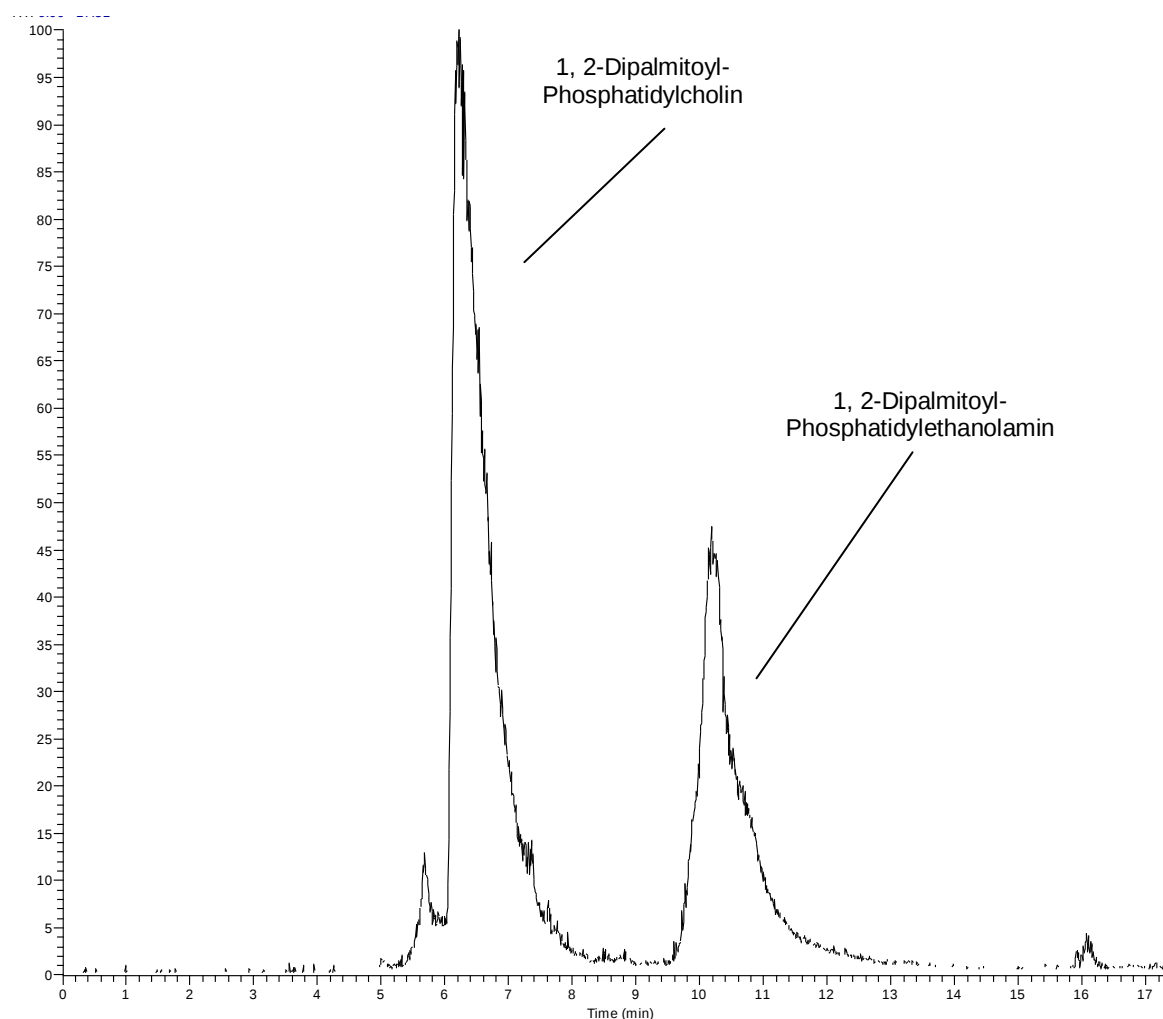


Abbildung 32: Chromatogramm von Phosphatidylcholin- und Phosphatidylethanolaminstandards nach Elution aus der Festphase mit einer Intensität von 10^5

4.5.2 Mengenbestimmung der Laufmittel

Eine bestimmte Menge an Probelösung wird auf die Festphasensäule aufgetragen, um Phospholipide und Triglyceride zu trennen. Um die ausreichende Menge an eingesetztem Lösungsmittel zu bestimmen und um zu gewährleisten dass die gesamte aufgetragene Probe aus der Säule gewaschen wird, werden die letzten Tropfen am unteren Ende der Festphasensäule aufgefangen und auf eine DC-Platte aufgetragen. Wenn das Laufmittel nach einigen Minuten verdampft ist, wird die Platte in einen Jodtopf (Trog mit Jod) gestellt. Befinden sich in den letzten Tropfen noch Probenmaterial, so würde dies zu einer Oxidation der Probe führen und eine braune Verfärbung auftreten.

4.6 Vorversuche zur Intensitätssteigerung bei HPLC/ESI/MS

Um die Intensität des Molekül-Ions zu erhöhen, wurden dem Methanol verschiedene Salze beigelegt, um eine bessere Ionisierung zu erzielen. Mittels direkter Infusion in das Massenspektrometer wurden die unterschiedlichen Messungen aufgezeichnet.

Bei den durchgeführten Versuchen wurde ein 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standard verwendet. Die vorhandenen Molekül-Ionen $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$, sind jeweils mit einer mittleren Masse von 734 und 756 in den angeführten Spektren mit einem Intensitätsbereich zwischen 10^3 bis 10^6 ersichtlich, je nachdem welche Art des Verstärkers verwendet wurde.

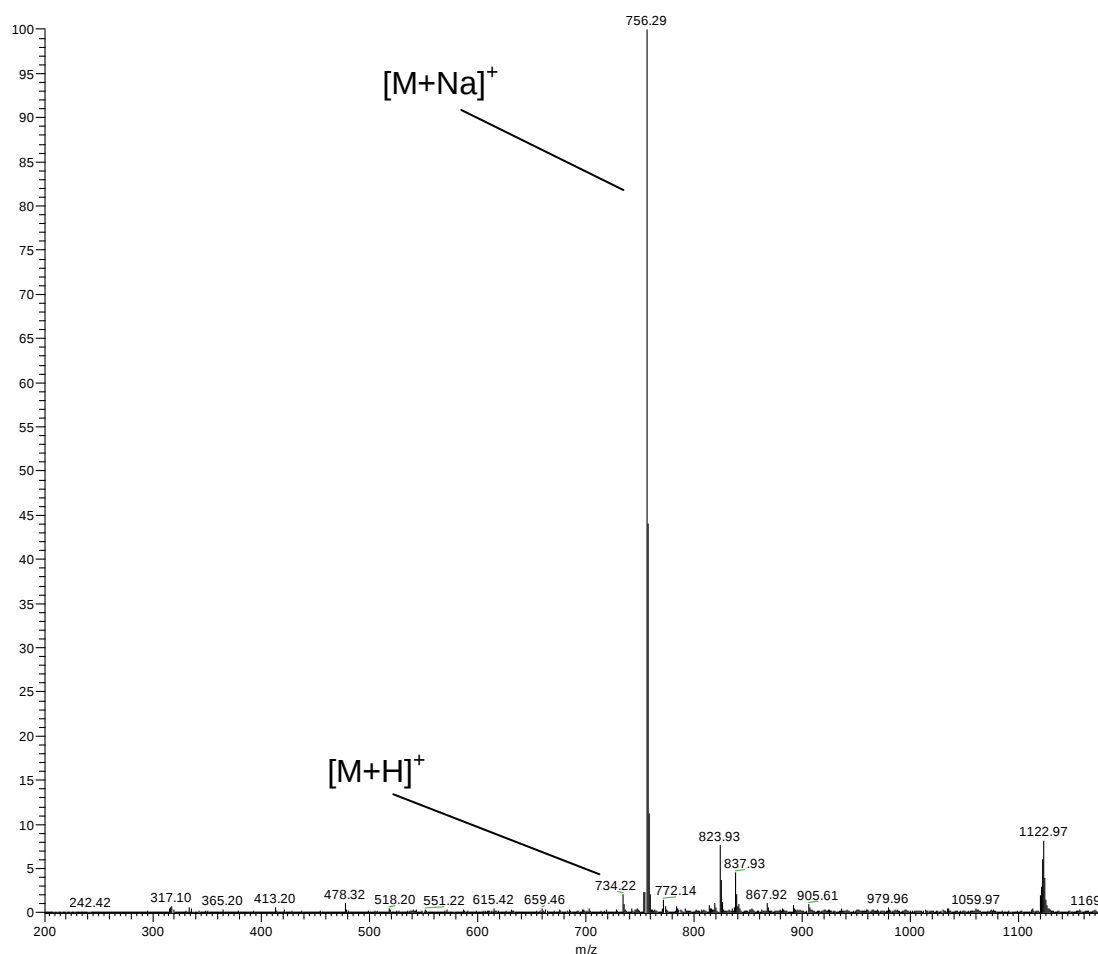


Abbildung 33: Spektrum von 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standard ohne Puffer; Molekül-Ion $[M+Na]^+$ mit einer Masse von 756 und einer Intensität von 10^3

Zur Intensitätssteigerung wurden jeweils folgende Mischungen hergestellt:

- 1% KH_2PO_4 mit Methanol
- 0,5% NH_4Cl mit Methanol

- 1% Ammoniumformiat (HCOONH_4) mit Methanol
- 1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ mit Methanol

Die Intensität der Molekül-Ionen konnte mit KH_2PO_4 auf 10^4 gesteigert werden. Ammoniumformiat (HCOONH_4) und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ erhöhten die Intensität auf 10^5 . Die Mischung von 0,5% NH_4Cl mit Methanol ergab eine Steigerung um einen weiteren Faktor von 10, jedoch wurde dieses Gemisch trotz höchster Intensitätssteigerung nicht verwendet, da NH_4Cl im Massenspektrum bei häufiger Verwendung sublimiert und dies zu Schäden im Gerät führt.

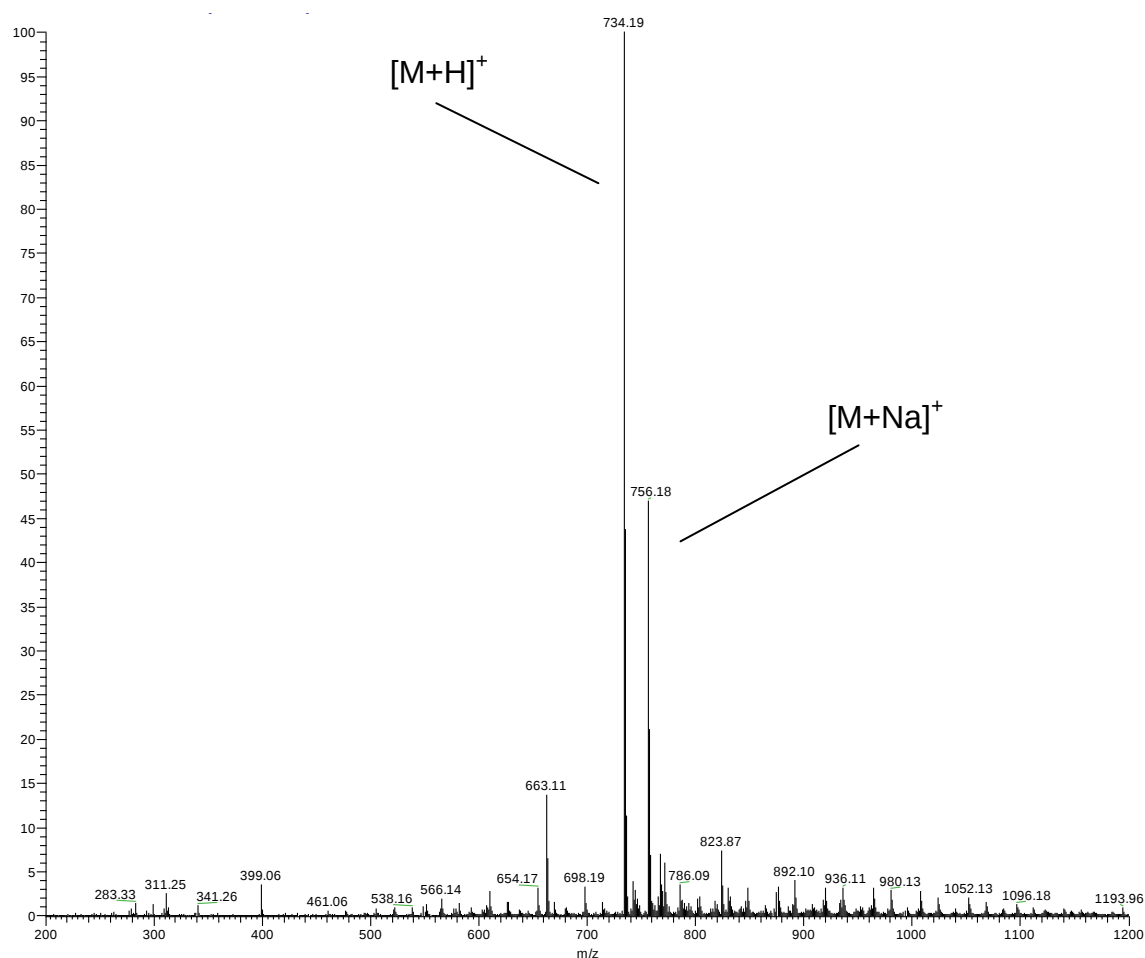


Abbildung 34: Spektrum von 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standard mit 1% Ammoniumformiat (HCOONH_4) mit Methanol; Molekül-Ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ mit einer Masse von 734 und einer Intensität von 10^5

Für die weitere Analyse wurde Ammoniumformiat verwendet, um die Intensität des Molekül-Ions auf 10^5 zu steigern.

4.7 Probenaufbereitung

4.7.1 Einwaage und Zerkleinerung

- Einwaage: 2g Probe
- Einfrieren der Probe in flüssigen Stickstoff
- Proben in Mikro-Dismembrator Tubes überführen
- Proben im Mikro-Dismembrator zerkleinern (ca. 5-10 min)

4.7.2 Extraktion nach Folch

Die Gewinnung der Proben wird mittels Folchextraktion durchgeführt. Triglyceride und Phospholipide können dadurch gemeinsam gelöst werden.

- Probe in 250ml Rundkolben überführen
- Überführte Probe in 40 ml Folch-Extrakt lösen
- Nachwaschen der Mikro-Dismembrator tubes mit Folch Extrakt; Schütteln
- Abfiltrieren des Extraktes über Faltenfilter in 100ml Messzylinder
- Nachwaschen des Kolbens und Filters mit Folch Extrakt
- Extrakt mit 10 ml 1% NaCl Lösung waschen
- Phasentrennung abwarten
- Entnehmen der organischen Phase mit einer Pipette in einen 100 ml Rundkolben
- Wässrige Phase mit 10 ml Folch-Extrakt waschen
- Phasentrennung abwarten
- Entnehmen der organischen Phase mit einer Pipette in einen 100 ml Rundkolben

4.7.3 Trocknung

- Eindampfen des Proben-Extrakts am Rotorvapor bis zur Trocknung
- Lösen der Probe in etwas Hexan
- Überführen der Probe in 25 ml Spitzkolben mittels Pasteurpipette
- Nachwaschen des 100ml Kolben und in 25 ml Spitzkolben überführen
- Entnehmen der Wassertröpfchen am Gefäßboden mittels Pasteurpipette
- Zugabe von Na_2SO_4 zur vollständigen Trocknung
- Überführung der Probe in einen trockenen und abgewogenen 50 ml Rundkolben über Faltenfilter
- Nachwaschen des Filters und des Spitzkolben
- Abdampfen des Lösungsmittels am Rotorvapor
- Bestimmung der Ausbeute von Triglycerid-Phospholipidgemisch auf analytischer Waage (Ausbeute)
- Lösen der Triglyceride und Phospholipide in etwas Hexan
- Überführen in 10 ml Messkolben

4.7.4 Phospholipid-Triglycerid-Trennung mittels Festphasenextraktion

Die Trennung der Phospholipide von den Triglyceriden erfolgt mittels der Festphasenextraktion. Unpolare Triglyceride werden aufgrund der Verwendung einer polaren Silicatrennsäule zuerst herausgewaschen. Als Laufmittel dient ein Hexan-tert-Butylmethylether Gemisch (1:1). Das Eluieren der Phospholipide, die in etwa 10% der aufgetragenen Menge ausmachen, erfolgt anschließend mit Methanol und darauf folgendem Methanol:Chloroform Gemisch (2:1).

- Säulenkonditionierung mit ca. 5 ml Hexan
- Auftragen von ca. 50 mg der Probe auf Säule
- Auftragen von 20 ml Hexan-Tertbutylmethylether-Gemisch (1:1) um Triglyceride rauszuwaschen
- Auftragen von 15 ml Methanol, gefolgt von 5 ml Methanol/Chloroform-Gemisch (2:1) zum Rauswaschen der Phospholipide
- Überführen der Proben in abgewogene trockene 50 ml Rundkolben
- Nachwaschen der Auffangbehälter
- Eindampfen der Proben am Rotorvapor
- Abwiegen/Ausbeute bestimmen
- Triglyceride in Hexan lösen und in 10 ml Messkolben überführen
- Phospholipide in Chloroform lösen und in 10 ml Messkolben überführen

4.7.5 Umesterung

Da die Phospholipide in Chloroform gelöst sind, muss die entnommene Menge erst eingedampft werden, um in Hexan gelöst zu werden, da sonst die Umesterung mit methanolischer KOH zu Fettsäuremethylester nicht gelingt.

Um eine gute Auswertung der Gaschromatographie zu gewährleisten, wird für alle Proben eine Konzentration von ca. 2mg/ml angestrebt, wofür abhängig von der jeweiligen Ausgangskonzentration unterschiedliche Verdünnungsschritte notwendig sind. Die Verdünnung erfolgt mit Hexan.

- Überführen der Probe in Eprovette
- Hinzufügen von 1 ml meth. KOH
- Ausreichend schütteln
- Überführen der Organische Phase mittels Pasteurpipette in zweite Eprovette
- Eliminieren der Wasserrückstände durch Trocknung mit Na_2SO_4
- Filtrieren der wasserfreien Proben über Watte gefüllte Pasteurpipette in Autosampler-Vial

4.8 Verwendete Geräte

4.8.1 Probenzerkleinerung

Gerätetype: Mikro-Dismembrator II: Kurt Barfelt Ges.m.b.H
Tubes plus Wolframkugel

4.8.2 Dünnschichtchromatographie:

Gerätetyp: Merck: DC-Fertigplatten:
Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator
Schichtdicke: 0,25mm

Laufmittel: Chloroform-Methanol (2:1)
Hexan- *tert.*-Butylmethylether (1:1)

4.8.3 Festphasenextraktion

Gerätetyp: J.T.Baker SPE-12; Prod. No. 7018-94
Säulentyp: J.T.Baker: Silica-Gel-SPE
Säulenpackung: 500mg
Elutionsmittel: Hexan: *tert.*-Butylmethylether (1:1)
Methanol bzw. Methanol: Chloroform (2:1)

4.8.4 HPLC/ESI/MS

4.8.4.1 HPLC Bedingungen

Gerätetyp: Dionex UltiMate 3000 Pimp
Säule: J. Baker Bakerbond Aminopropylsäule 5µ
Standard 4.6 x 250mm
Säulentemperatur: 25°C
Injektor: Autosampler
Manueller Split: 1 : 2.5
Injektionsmenge: 500µl
Laufmittel: Methanol : Acetonitril : Wasser (38 : 60 : 2)
mit 1% Ammoniumformiat
Programm: Isokratisch
Detektor: Massenspektrometer mit ESI

4.8.4.2 MS/ESI-Bedingungen

Gerätetyp: Thermo Scientific LCQ Fleet

Ionisation: Elektronenspray (ESI)

Positiver Modus

MS- Bedingungen: Laufzeit 20min

Scanbereich: 300 - 1500

4.8.5 Gaschromatographische Bedingungen

Die Bestimmung des Fettsäuremusters erfolgt mittels Gaschromatographie. Besonderes Interesse der Analyse lag auf der Identifizierung der langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

4.8.5.1 Gaschromatograph

Gerätetyp: Gaschromatograph Thermo Finnigan

Säule: Carbowax.

Länge: 30m

Durchmesser: 0,25mm

Injektor: Split/Splitless Injektor über Autosampler

Injektionstemperatur : 250° C

Splitless Time: 0,15 min

Split Flow: 20ml/min

Detektor: Flammenionisationsdetektor

Detektortemperatur: 280°C

Trärgas: Wasserstoff

Trärgasdruck: 100 kPa

Detektorgase: Wasserstoff

Synthetischer Luft

Stickstoff N₂ als Makeup-Gas

Temperaturprogramm:

Ofenanfangstemperatur: 80°C

Heizrate 1: 10°/min auf 140°C

Heizrate 2: 5°/min auf 280° C

Haltezeit: 5 min

4.8.5.2 Autosampler

Gerätetyp:	Autosampler AS 2000
Injektionsvolumen:	0,4µl
Nadel:	Hamilton 10µl
Nadelspülung:	vor Injektion zwei Mal Hexan Probe drei Mal
nach Injektion:	zwei Mal Hexan
Waschvolumen:	vor Injektion 5µl
nach Injektion:	6µl
Injektionsgeschwindigkeit:	
Nadelauffüllung:	15µl/s
Probeninjektion:	100µl/s

4.8.6 GC/MS-Bedingungen

Die genaue Identifizierung der einzelnen Fettsäuren erfolgte durch die Analyse der Proben mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie.

4.8.6.1 Gaschromatograph

Gerätetyp:	Fisons Instrument, 8000 Series
Säule:	30m Carbowax Trennsäule
Durchmesser:	0,32mm
Injektor:	manuelle Injektion
Injektionstemperatur:	280°C
Split-Time:	0,3 min
Injektionsnadel:	Hamilton 10µl
Injektionsmenge:	0,5µl
Trärgas:	Helium
Trärgasedruck:	0,8 bar
Detektor:	Massenspektrum
Temperaturprogramm:	
Ofenanfangstemperatur:	80°C
Heizrate 1:	25°C/min auf 140° C
Heizrate 2:	5°C/min auf 230
Haltezeit:	5 min

4.8.6.2 Massenspektrometer

Gerätetyp: Fisons Instrument, MD 8000

Ionisation: Elektronenstoß-Ionisation

Emission: 50µA

Elektronisierungsenergie: 70eV

Ionenquellentemperatur: 150 °C

GC-Interface Temperatur 200°C

MS- Bedingungen: Scangeschwindigkeit: 0,4 min/Scan

Massenbereich: 50-420 amu

Detektorverstärkung: 350V

Lösungsmittel- Wartezeit: 4 min.

5 Resultate

5.1 Ergebnisse der Probenaufbereitung

Die Fische wurden unmittelbar nach der Lieferung eines Mitarbeiters der Firma Alpenlachs gewogen. In Tabelle 13 sind die Gewichte (in g) chronologisch nach der Zustellung angeführt. Der Anlieferungszeitraum erfolgte innerhalb von drei Monaten (Juli – September). Dies könnte eine Erklärung der Gewichtsunterschiede zwischen den Standorten sein, da die Fische des Standortes Bayern die höchsten Gewichte besitzen. Bei genauerer Betrachtung jedes einzelnen Standortes ist der Gewichtsunterschied verhältnismäßig klein. Lediglich Fisch 2 des Standortes Gutenstein und Fisch 3 des Standortes Bayern weisen ein um mehr als 100g geringeres Gewicht auf, als die restlichen Fischproben.

Tabelle 13: Gewicht in g (Fisch ohne Innereien)

	Fisch 1	Fisch 2	Fisch 3
Payerbach	371	387	384
Gutenstein	370	269	293
Schwarzaau	304	288	321
Übelbach	432	425	406
Salzburg	424	442	429
Bayern	651	624	454

Bei den Standorten Payerbach, Gutenstein und Schwarzaau wurde die Leber mitgeliefert. In Tabelle 14 findet man die Gewichte der Lebern (in g), die zwischen 6 und 9 g liegen. Mit Ausnahme der Leber von Fisch 3 des Standortes Gutenstein, die einen Wert von nur 3,6g besitzt.

Tabelle 14: Gewicht der Leber in g

	Fisch 1	Fisch 2	Fisch 3
Payerbach	9	7,5	8,5
Gutenstein	7,9	8	3,6
Schwarzaau	6,3	6,1	9

Für die Extraktion wurde eine Probenmenge von ca. 2 g verwendet, um eine ergiebige Ausbeute an Triglyceriden und Phospholipiden zu erbringen. In Tabelle 15 ist die genaue Einwaage der Probenmenge, die zur Analyse verwendet wurden, angegeben.

Tabelle 15: Probeneinwaage in g

Herkunft	Einwaage in g		
	Fisch 1	Fisch 2	Fisch 3
Payerbach			
Bauch	2	2,05	2
Rücken	1,98	1,9	2
Leber	2	2	1,95
Gutenstein			
Bauch	2,6	2,1	2,1
Rücken	1,9	2,1	2
Leber	2,2	2,5	1,8
Schwarza			
Bauch	2	2	1,9
Rücken	2,2	2,1	2,6
Leber	1,9	1,9	2,1
Übelbach			
Bauch	1,9	2,1	2
Rücken	2	2,05	1,95
Leber			
Salzburg			
Bauch	2,1	2,1	2,1
Rücken	2,1	2	2
Leber			
Bayern			
Bauch	2,2	2,1	2,2
Rücken	2,1	2,3	2,5
Leber			

Die Extraktion der Fischproben erfolgte nach Folch, die dabei gewonnenen Lipidfraktionen (in mg) sind in Tabelle 16 ersichtlich. Bei dem Vergleich der Ausbeute der unterschiedlichen Geweben weisen die Leberproben den höchsten Werte auf, gefolgt von den Bauchproben, die mit zwei Ausreißern durchgehend größer sind, als die der Rückenprobe.

Die aufgelisteten Mengen der Triglycerid-Phospholipid-Fraktion kommen in einem breiten Bereich vor. Die Bauchproben schwanken zwischen 56,6mg und 542,1mg, wobei der niedrigere Wert (Standort Payerbach) aus einer zweiten Analyse stammt. Zu erwähnen ist, dass die erste Lipidextraktion von Fisch 1 des Standortes Payerbach ebenso eine niedrige Ausbeute von 63mg ergab. Bei den Rückenproben scheint der kleinste Wert von 55,2mg bei Fisch 2 des Standortes Gutenstein auf und der größte Wert von 266mg ist bei Fisch 1 des Standortes Payerbach vorhanden. Bei den Leberproben weist Fisch 3 des Standortes Payerbach mit 280,8mg die geringste Ausbeute auf, im Gegensatz zu Fisch 2 des Standortes Gutenstein der mit 692,2mg deutlich überwiegt.

Tabelle 16: Gewonnene Triglycerid-Phospholipid-Fraktion in mg

	Payerbach	Gutenstein	Schwarza	Übelbach	Bayern	Salzburg
Fisch 1						
Bauch	406	422,1	287,4	278,8	301,2	228,3
Rücken	266	70,2	99,6	198,7	101,3	114,2
Leber	462,6	372,5	361			
Fisch 2						
Bauch	56,6	240,5	83	325,3	152,7	542,1
Rücken	125	55,2	104,2	103,5	143,1	126,7
Leber	346,6	692,2	322			
Fisch 3						
Bauch	276,8	95,2	112,6	284,4	210,7	178,7
Rücken	139,9	56,9	104,2	135	115,6	156,8
Leber	280,8	404,2	591,4			

Um Phospholipide und Triglyceride zu trennen, wurden bestimmte Mengen der gewonnenen TG-PL Fraktion, die in Tabelle 17 aufgelistet sind, auf eine Festphase aufgetragen. Durch Verlust der Probe des Standortes Payerbach, fehlt dieser Wert in der Tabelle. Dies ist in allen folgenden Tabellen durch ein *-Zeichen markiert.

Tabelle 17: Aufgetragene Triglycerid-Phospholipid-Fraktion in mg zur Trennung der PL und TG

	Payerbach	Gutenstein	Schwarzaau	Übelbach	Bayern	Salzburg
Fisch 1						
Bauch	81,20	42,21	57,48	55,76	47,08	60,32
Rücken	*	56,16	49,80	59,61	45,68	40,52
Leber	92,50	74,50	72,00			
Fisch 2						
Bauch	56,60	48,10	49,80	65,06	54,21	61,08
Rücken	50,00	55,20	52,10	41,40	50,68	45,93
Leber	69,32	69,20	64,50			
Fisch 3						
Bauch	83,04	47,60	67,56	56,88	53,61	63,21
Rücken	79,50	56,90	50,10	54,00	47,04	46,24
Leber	84,00	80,84	49,10			

Tabelle 18 listet die Menge der Ausbeute an Phospholipiden nach der Abtrennung der Triglyceride auf. Der Gehalt an Phospholipiden beträgt durchschnittlich 10 % der Lipide. In den analysierten Proben schwankt dieser Anteil zwischen 6,6 % und 29 %. Einige Proben besitzen höhere Werte. Grund dafür können Lösungsmittelrückstände sein, die trotz Eindampfen am Rotovapor nicht vollständig aus der Probe entfernt werden konnten.

Triglyceride nehmen ungefähr 85 % der Lipide ein. In dieser Arbeit liegt der Triglyceridgehalt in einem Bereich von 70 % bis 93 %, wobei auch hier Lösungsmittelrückstände die Werte erhöhen können.

Tabelle 18: Menge an Phospholipiden in mg nach Festphasen Extraktion

	Payerbach	Gutenstein	Schwarza	Übelbach	Bayern	Salzburg
Fisch 1						
Bauch	13,4	3,2	5,6	4	8,4	4,1
Rücken	*	13,1	6,8	9,6	12,3	6,4
Leber	15,4	9,7	8,6			
Fisch 2						
Bauch	19,9	6,3	11,3	5,6	3,9	8,1
Rücken	6,9	13,7	5,5	10,1	14,3	5,9
Leber	15,6	6,6	8,6			
Fisch 3						
Bauch	9	9,4	12,9	5,1	13,9	5,3
Rücken	9,8	14,4	12,2	9,9	10,9	6,6
Leber	14,7	16,4	8,3			

In Tabelle 19 sind die Konzentrationen in mg/ml aufgelistet, die für die gaschromatographische Analyse eingesetzt wurde. Um eine vergleichbare Analyse zu gewährleisten, besitzen die Proben eine ähnliche Konzentrationen.

Tabelle 19: Phospholipid-Konzentration in mg/ml für die Analyse mittels Gaschromatographie

	Payerbach	Gutenstein	Schwarza	Übelbach	Bayern	Salzburg
Fisch 1						
Bauch	2,68	1,92	2,24	1,20	2,24	2,40
Rücken	*	2,62	2,04	2,40	2,07	2,13
Leber	2,30	2,43	2,15			
Fisch 2						
Bauch	1,99	1,89	2,26	1,77	2,34	2,32
Rücken	2,07	2,74	2,20	2,02	2,15	2,36
Leber	2,34	1,98	2,15			
Fisch 3						
Bauch	2,25	2,35	2,59	1,53	2,09	2,21
Rücken	1,96	2,88	2,44	2,48	2,18	2,20
Leber	2,21	2,46	2,08			

In Tabelle 20 sind die Konzentrationen in mg/ml aufgelistet, die man für die Analyse mittels HPLC eingesetzt wurde.

Tabelle 20: Phospholipid-Konzentration in mg/ml für die Analyse mittels HPLC/MS

	Payerbach	Gutenstein	Schwarzaau	Übelbach	Bayern	Salzburg
Fisch 1						
Bauch	2,68	0,32	0,56	0,4	0,84	0,41
Rücken	*	1,31	0,68	0,96	1,23	0,64
Leber	3,08	0,97	0,86			
Fisch 2						
Bauch	3,98	0,63	1,13	0,56	0,39	0,81
Rücken	1,38	1,37	0,55	1,01	1,43	0,59
Leber	3,12	0,66	0,86			
Fisch 3						
Bauch	1,8	0,94	1,29	0,51	1,39	0,53
Rücken	1,96	1,44	1,22	0,99	1,09	0,66
Leber	2,94	1,64	0,83			

5.2 Qualitative Auswertung mittels HPLC/MS

5.2.1 Überprüfung der Methode mittels Phospholipidstandards

Anhand von Phospholipidstandards mit einer Konzentration von 1mg/ml wurde eine Methode zur Analyse von Phospholipiden mittels HPLC/ESI/MS entwickelt. Die ESI läuft im positiven Modus.

Das nachstehende Chromatogramm gibt Aufschluss über die Retentionszeiten der gemessenen Phospholipidklasse.

In Abbildung 35 ist ein Chromatogramm mit zwei Peaks zu unterschiedlichen Retentionszeiten abgebildet. Bei Minute 6,15 bis 6,90 erscheint 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin und ab einer Retentionszeit von 10,90 bis 11,40 tritt 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin auf. Mit dieser Methode erreicht man bei 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin die höchste Intensität von 10^5 .

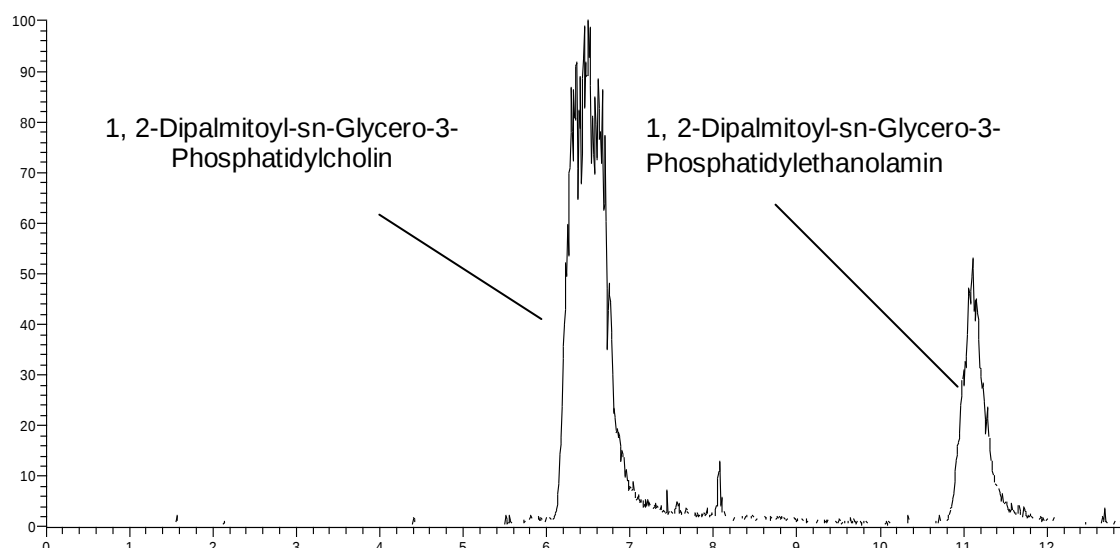


Abbildung 35: HPLC-Totalionenstromchromatogramm der Phospholipide 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (RT=6,15-6,90) und 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin (RT=10,90-11,40)

Die beiden folgenden Massenspektren wurden durch Spektrenaddition aus TIC-Chromatogramm (Abbildung 35) erhalten. Diese zeigen die Massenspektren eines 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standards und eines 1, 2-Dipalmitoyl-Phosphatidylethanolamin-Standards.

In Abbildung 36 ist das Spektrum eines 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standards dargestellt. Die vorhandenen Molekül-Ione $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ sind jeweils mit einer Masse von 734 und 756 ersichtlich. $[M+H]^+$ besitzt eine Intensität von 10^5 .

In Abbildung 37 ist das Spektrum eines 1, 2-Dipalmitoyl-Phosphatidylethanolamin-Standards dargestellt. Die vorhandenen Molekül-Ione $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ sind jeweils mit einer Masse von 692,2 und 714,3 ersichtlich. $[M+H]^+$ besitzt eine Intensität von 10^4 .

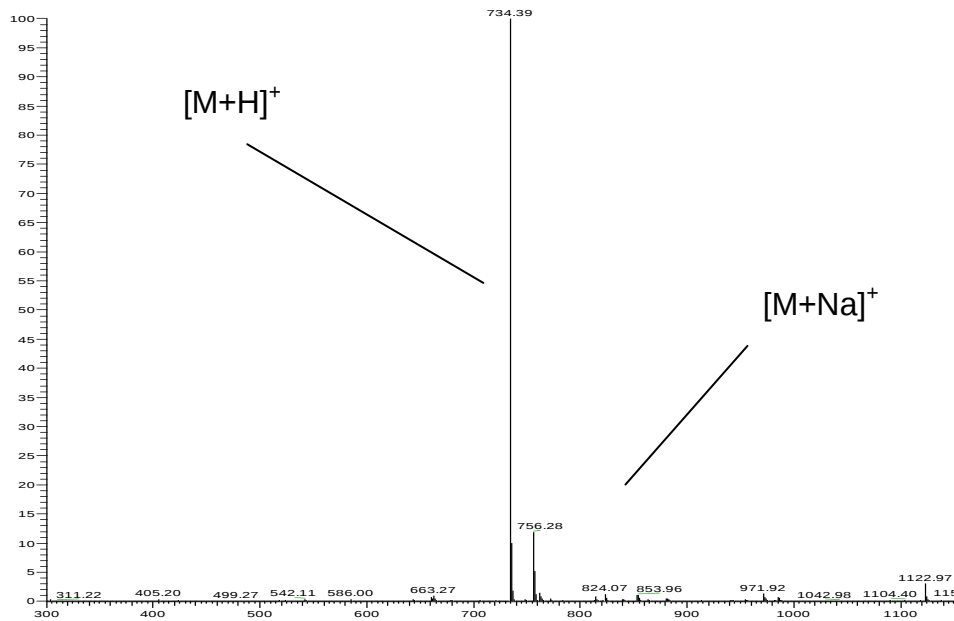


Abbildung 36: Spektrum von 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standard; $[M+H]^+$ mit einer Masse von 734 und einer Intensität von 10^5

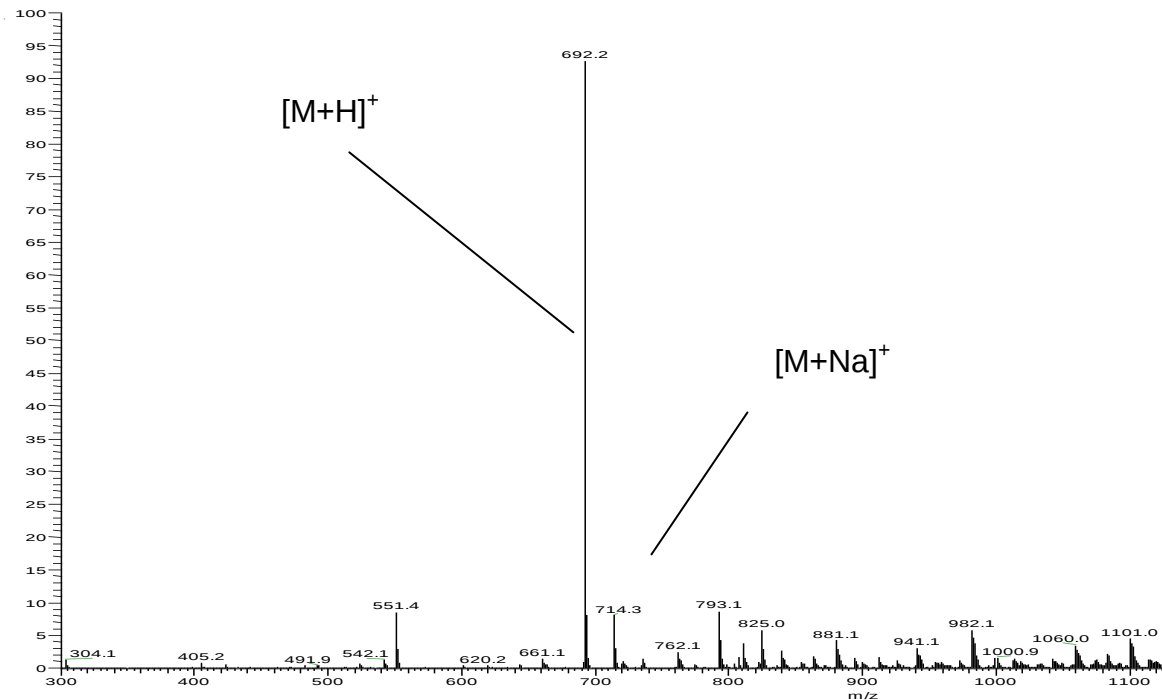


Abbildung 37: Massenspektrum von 1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin -Standard; $[M+H]^+$ mit einer Masse von 692 und einer Intensität von 10^4

Ein weiterer Versuch wurde mit einem Phosphatidylcholin-Standard durchgeföhrt, der aus Rinderhirn gewonnen wurde. Es zeigt sich ein Spektrum mit unterschiedlichen Massen und mit einer Intensität von 10^4 . Der Massenbereich wurde auf 700 bis 850 angegeben, um die verschiedenen Phosphatidylcholin-Gruppen besser erkennen zu können.

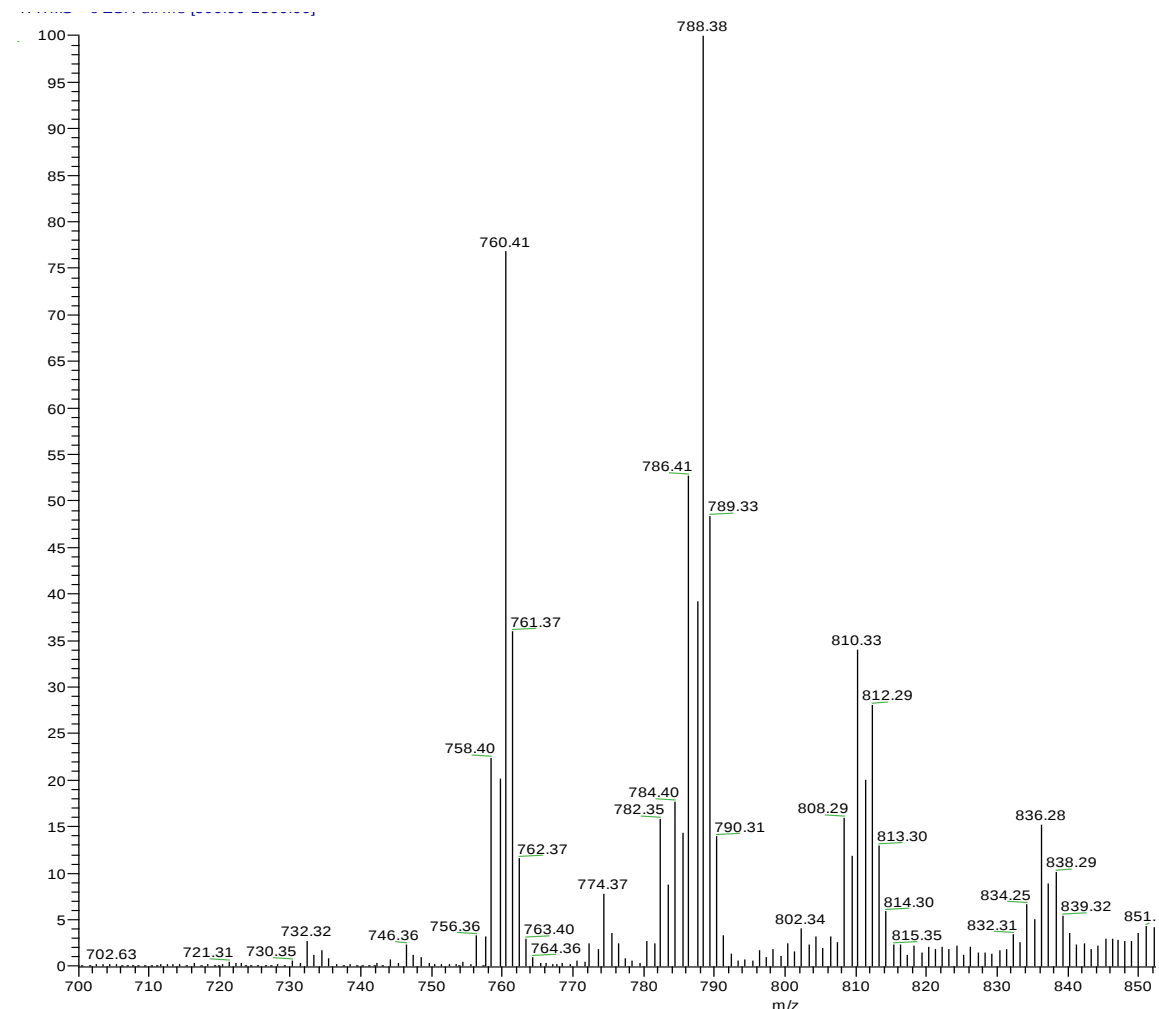


Abbildung 38: Phosphatidylcholin-Standard aus Rinderhirn, Intensität von 10^4

In Tabelle 21 sind die Molekül-Ione $[M+H]^+$ des Phosphatidylcholin-Standards aufgezählt, sowie die verschiedenen möglichen Fettsäuren, die an den Phosphatidylcholinen gebunden sein können. Jedoch ist die Kombinationsmöglichkeit der Fettsäuren im Molekül-Ion sehr vielfältig, deswegen wurden nicht alle in dieser Tabelle aufgezählt.

Tabelle 21: $[M+H]^+$ des Phosphatidylcholin-Standards (gewonnen aus Rinderhirn)

$[M+H]^+$	Summe der C-Atome und der Doppelbindungen der Fettsäuren	Mögliche Fettsäuren	
756	34:3	16:0/18:3	Palmitinsäure/ α -Linolensäure
		16:1/18:2	Palmitoleinsäure/Linolsäure
758	34:2	16:0/18:2	Palmitinsäure/Linolsäure
		16:1/18:1	Palmitoleinsäure/Ölsäure
760	34:1	16:0/18:1	Palmitinsäure/Ölsäure
		16:1/18:0	Palmitoleinsäure/Stearinsäure
762	34:0	16:0/18:0	Palmitinsäure/Stearinsäure
784	36:3	20:3/16:0	Homo- γ -Linolensäure/Palmitinsäure
		18:1/18:2	Ölsäure/Linolsäure
		18:0/18:3	Stearinsäure/ α -Linolensäure
786	36:2	20:1/16:1	Eicosaensäure/Palmitoleinsäure
		18:0/18:2	Stearinsäure/Linolsäure
		18:1/18:1	Ölsäure/Ölsäure
788	36:1	20:1/16:0	Eicosaensäure/Palmitinsäure
		20:0/16:1	Arachinsäure/Palmitoleinsäure
		18:0/18:1	Stearinsäure/Ölsäure
790	36:0	20:0/16:0	Arachinsäure/Palmitinsäure
		18:0/18:0	Stearinsäure/Stearinsäure
808	38:5	20:4/18:1	Arachidonsäure/Ölsäure
		20:3/18:2	Homo- γ -Linolensäure/Linolsäure
		20:5/18:0	Eicosapentaensäure/Stearinsäure
810	38:4	20:4/18:0	Arachidonsäure/Stearinsäure
		20:1/18:3	Eicosaensäure/ α -Linolensäure
		20:3/18:1	Homo- γ -Linolensäure/Ölsäure
812	38:3	20:1/18:2	Eicosaensäure/Linolsäure
		20:0/18:3	Arachinsäure/ α -Linolensäure
		20:3/18:0	Homo- γ -Linolensäure/Stearinsäure

5.2.2 Anwendung der Methode bei den Alpenlachsprobe

Nach der Extraktion der Alpenlachsproben und Abtrennung der Triglyceride mittels Festphasen-Extraktion wurden ein paar Tropfen der erhaltene Phospholipidfraktion auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und Chloroform Methanol (2:1) entwickelt. Anschließend wurde die Platte in einen Jodtopf Überführung, um die Probe nach Verdampfen des Laufmittels durch Oxidation sichtbar zu machen. Man konnte erkennen, dass auf der Kieselgelplatte deutlich zwei Flecken ersichtlich waren. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich um die beiden Hauptgruppen der Phospholipide handelt, den Phosphatidylcholinen und Phosphatidylethanolaminen. Bei Betrachtung der Proben im Massenspektrum wurden jedoch Phosphatidylcholine und Phosphatidylserine identifiziert. Die entwickelte Methode wurde bei einer Alpenlachsprobe (Standort Payerbach Fisch 3) angewendet. Trotz zahlreicher Versuche war es nicht möglich, die Gruppe der Phosphatidylethanolamine zu detektieren. In Kapitel 4.6 ist ein Versuch beschrieben, der zeigt, dass Phosphatidylethanolamine die Festphase bei der Festphasen-Extraktion passieren.

In Abbildung 39 ist ein Chromatogramm der Fischprobe zusehen. Bei einer Retentionszeit von 6,90 bis 7,40 zeigen sich die Phosphatidylcholine mit einer Intensität von 10^4 . Bei Minute 8,60 bis 9,20 treten Phosphatidylserine mit einer Intensität von 10^2 auf.

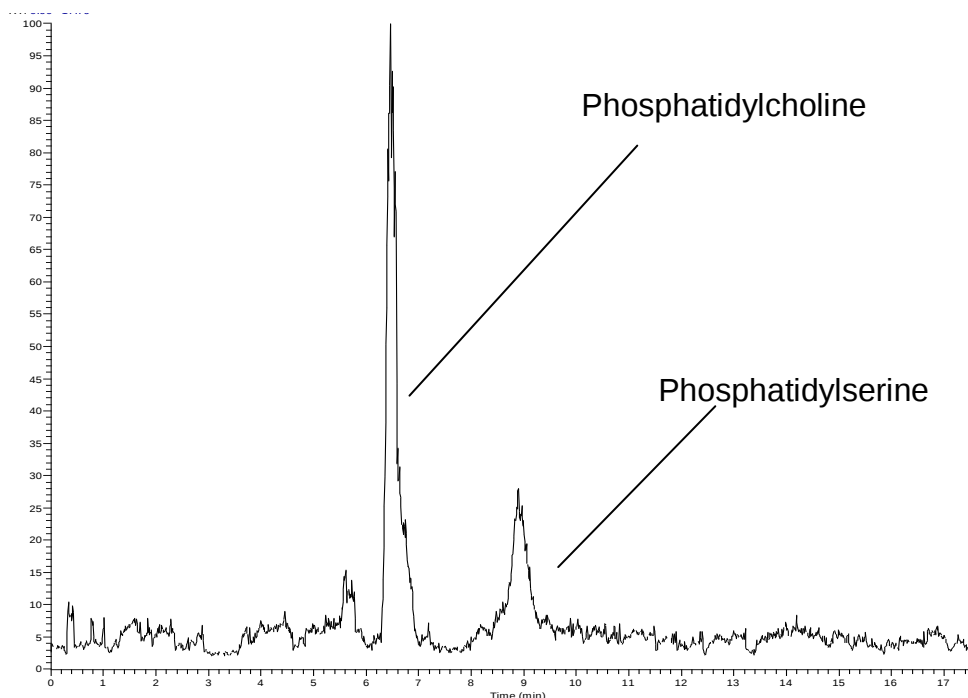


Abbildung 39: Chromatogramm der Bauchprobe von Fisch 3 des Standortes Payerbach

Das Spektrum in Abbildung 40 zeigt die unterschiedlichen Gruppen der Phosphatidylcholine, die in den Fischproben nachgewiesen werden könnten. Das Molekül-Ion $[M+H]^+$ mit der Masse 806,45 weist die höchste Intensität von 10^4 auf.

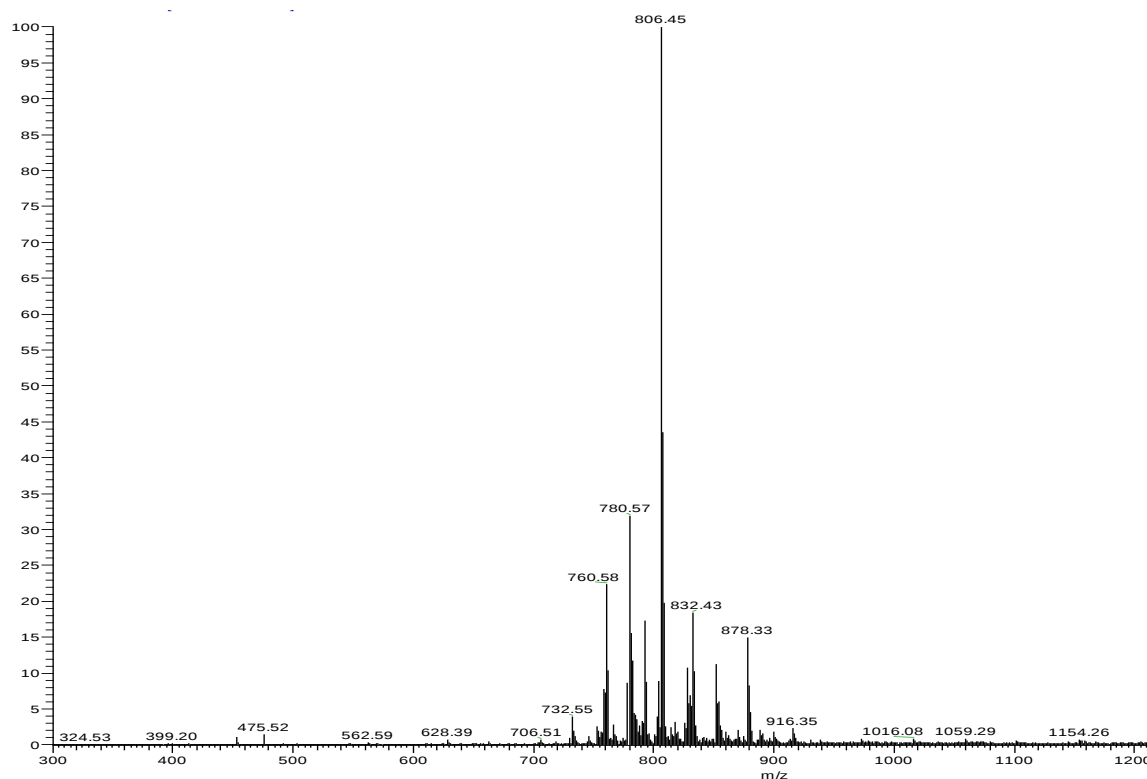


Abbildung 40: Spektrum der Phosphatidylcholin-Gruppe der Bauchprobe von Fisch 3 des Standortes Payerbach mit einer Intensität von 10^4

In Tabelle 22 sind die Molekül-Ione $[M+H]^+$ der Phosphatidylcholine des Alpenlachs aufgezählt, sowie die verschiedenen möglichen Fettsäuren. Da wieder die Kombinationsmöglichkeiten der Fettsäuren im Molekül-Ion sehr zahlreich sind, wurden nicht alle in dieser Tabelle aufgezählt.

Man sieht deutlich, dass das intensivste Molekül-Ion $[M+H]^+$ 806,45 ist. Durch gaschromatographische Analysen, die in Kapitel 5.3 genauer besprochen werden, ist bekannt, dass Docosahexaensäure (22:6) mit über 30% am häufigsten in den Phospholipiden des Alpenlachs vorkommt. An zweiter Stelle steht Palmitinsäure(16:0) mit Werten zwischen 20% und 25%. Im Bereich von 8% bis 12% findet man Ölsäure (18:1) im Fisch. Der Gehalt an Eicosapentaensäure (20:5) beträgt durchschnittlich 10%. Da Docosahexaensäure und Palmitinsäure am häufigsten vorhanden sind, kann man davon ausgehen, dass das Molekül-Ion 806,45 hauptsächlich aus diesen Fettsäuren besteht. Eine andere Kombinationsmöglichkeit könnte Eicosapentaensäure und Ölsäure sein, da diese zwei Komponenten ebenfalls einen hohen Gehalt in den Phospholipiden des Alpenlachs ausmachen.

Tabelle 22: $[M+H]^+$ der Phosphatidylcholine des Alpenlachs

$[M+H]^+$	Summe der C-Atome und der Doppelbindungen der Fettsäuren	Mögliche Fettsäuren	
706	30:0	14:0/16:0	Myristinsäure/Palmitinsäure
732	32:1	16:0/16:1	Palmitinsäure/ Palmitoleinsäure
		14:0/18:1	Myristinsäure /Ölsäure
760	34:1	16:0/18:1	Palmitinsäure/Ölsäure
		16:1/18:0	Palmitoleinsäure/Stearinsäure
780	36:5	20:4/16:1	Arachidonsäure /Palmitoleinsäure
		20:5/16:0	Eicosapentaensäure/Palmitinsäure
		18:2/18:3	Linolsäure/ α -Linolensäure
806	38:6	20:4/18:2	Arachidonsäure/Linolsäure
		20:5/18:1	Eicosapentaensäure/Ölsäure
		22:6/16:0	Docosahexaensäure/Palmitinsäure
		20:3/18:3	Homo- γ -Linolensäure/ α -Linolensäure
808	38:5	20:5/18:0	Eicosapentaensäure/Stearinsäure
		20:4/18:1	Arachidonsäure/Ölsäure
		20:3/18:2	Homo- β -Linolensäure/Linolsäure
826	40:10	20:5/20:5	Eicosapentaensäure/Eicosapentaensäure
832	40:7	22:6/18:1	Docosahexaensäure/Ölsäure
		20:4/20:3	Arachidonsäure/ Homo- γ -Linolensäure
834	40:6	22:6/18:0	Docosahexaensäure/Stearinsäure
854	42:11	22:6/20:5	Docosahexaensäure/Eicosapentaensäure
878	44:12	22:6/22:6	Docosahexaensäure/Docosahexaensäure

Das Spektrum in Abbildung 41 zeigt die unterschiedlichen Gruppen der Phosphatidylserine. Das Molekül-Ion $[M+H]^+$ mit der Masse 764,31 weist die höchste Intensität von 10^2 auf.

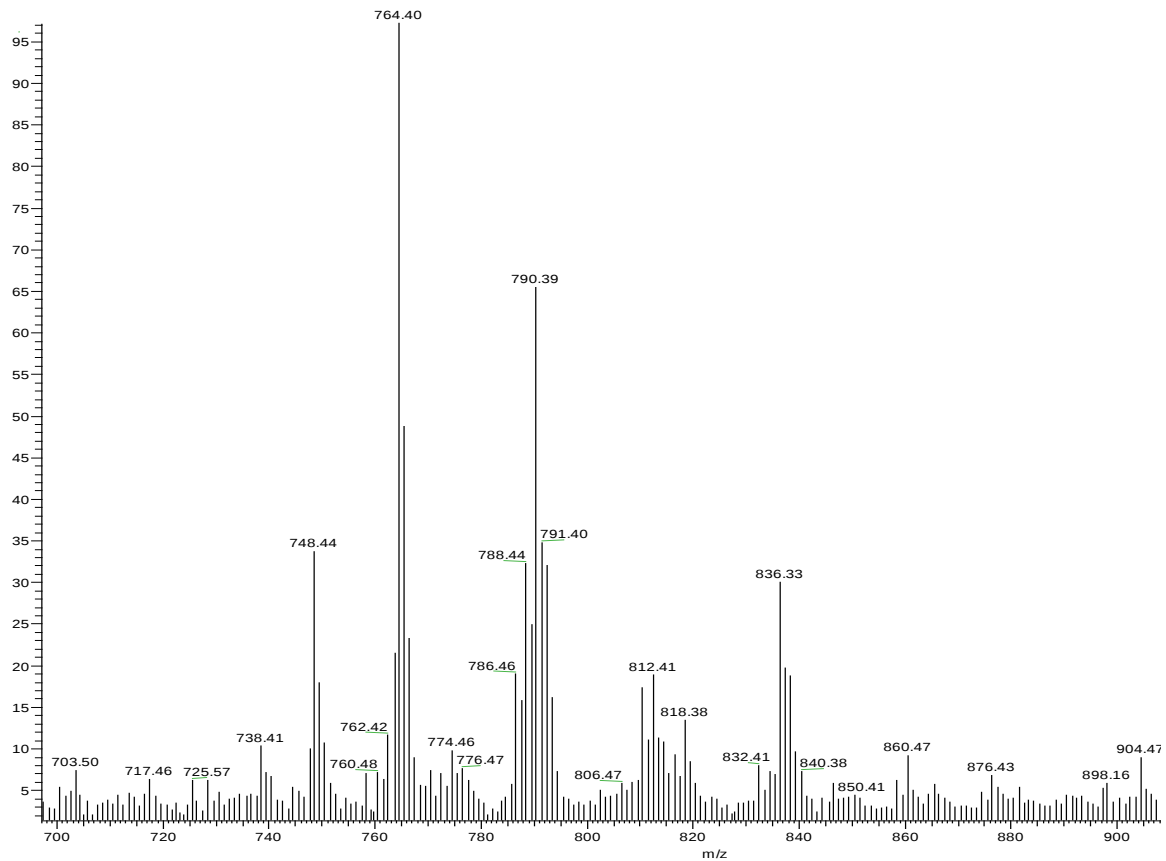


Abbildung 41: Spektrum der Phosphatidylserin-Gruppe der Bauchprobe von Fisch 3 des Standortes Payerbach

In Tabelle 23 sind die Molekül-Ione $[M+H]^+$ der Phosphatidylserine des Alpenlachs aufgezählt, sowie die verschiedenen möglichen Fettsäureresten an den unterschiedlichen Gruppen. Auch hier finden sich wieder zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten der Fettsäuren im Molekül-Ion, die jedoch nicht alle in dieser Tabelle aufgezählt sind.

Tabelle 23: $[M+H]^+$ der Phosphatidylserine des Alpenlachs

$[M+H]^+$	Summe der C-Atome und der Doppelbindungen der Fettsäuren	Mögliche Fettsäuren	
760	34:2	16:0/18:2	Palmitinsäure/Linolensäure
		16:1/18:1	Palmitoleinsäure/Ölsäure
762	34:1	16:0/18:1	Palmitinsäure/Ölsäure
		16:1/18:0	Palmitoleinsäure/Ölsäure
764	34:0	16:0/18:0	Palmitinsäure/Ölsäure
786	36:3	20:3/16:0	Homo- γ -Linolensäure/Palmitinsäure
		18:1/18:2	Ölsäure/Linolsäure
		18:0/18:3	Stearinsäure/ α -Linolensäure
788	36:2	18:0/18:2	Stearinsäure/Linolsäure
		18:1/18:1	Ölsäure/Ölsäure
790	38:2	20:0/18:2	Arachinsäure/Linolsäure
		18:0/18:1	Stearinsäure/Ölsäure
806	38:7	20:5/18:2	Docosahexaensäure/Linolsäure
		20:4/18:3	Arachidonsäure/ α -Linolensäure
808	38:6	20:5/18:1	Eicosapentaensäure/Ölsäure
		20:4/18:2	Arachidonsäure/Linolsäure
		20:3/18:3	Homo- γ -Linolensäure/ α -Linolensäure
		22:6/16:0	Docosahexaensäure/Palmitinsäure
812	38:4	20:4/18:0	Arachidonsäure/Stearinsäure
		20:3/18:1	Homo- γ -Linolensäure/Ölsäure
818	38:1	20:0/18:1	Arachinsäure/Ölsäure
832	40:8	22:6/18:2	Docosahexaensäure/Linolsäure
		20:4/20:4	Arachidonsäure/Arachidonsäure
836	40:6	22:6/18:0	Docosahexaensäure/Stearinsäure
		22:5/18:1	Docosapentaensäure/Ölsäure
840	40:4	20:0/20:4	Arachinsäure/Arachidonsäure

5.2.3 MS/MS Experimente mittels Phospholipidstandards

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch MS/MS Experimente mit Standardverbindungen verschiedener Phospholipidklassen durchgeführt. Dabei wurde ein Molekül-Ion ausgewählt und nochmals fragmentiert. Unter Variation der Elektronenvolt wurde versucht, Fragment-Ionen des Phospholipidmoleküls zu erhalten, um Möglichkeiten der Identifizierung der Fettsäurereste innerhalb einer Phospholipidgruppe zu erleichtern.

Je nachdem mit wieviel Elektronenvolt ein Molekül-Ion fragmentiert wurde, variierte die Anzahl unterschiedlicher Bruchstücke. Es stellte sich heraus, dass bei einer Einstellung von unter 25eV keine Bruchstücke mehr entstehen. Die Versuche fanden bis zu 100eV statt.

Am häufigsten fand man Fragment-Ionen ohne eine Kopfgruppe. Bei Phosphatidylcholin wurden oft ein Fragment-Ion ohne einer $[N(CH_3)_3]^+$ -Gruppe detektiert. Man konnte ebenfalls Diacylglycerine $[DAG]^+$ bei den MS/MS Experimenten nachweisen. Die Intensität der Bruchstücke mit diesen Messungen sind sehr gering ($10^{-1} - 1$).

Im untenstehenden Chromatogramm wurde bei Minute 6,00 bis 7,20 ein MS/MS Experiment durchgeführt. Es wurde ein 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin-Standard verwendet und mit 45eV fragmentiert. Das Molekül-Ion $[M+H]^+$ weist eine Masse 760 mit einer Intensität von 10^5 auf.

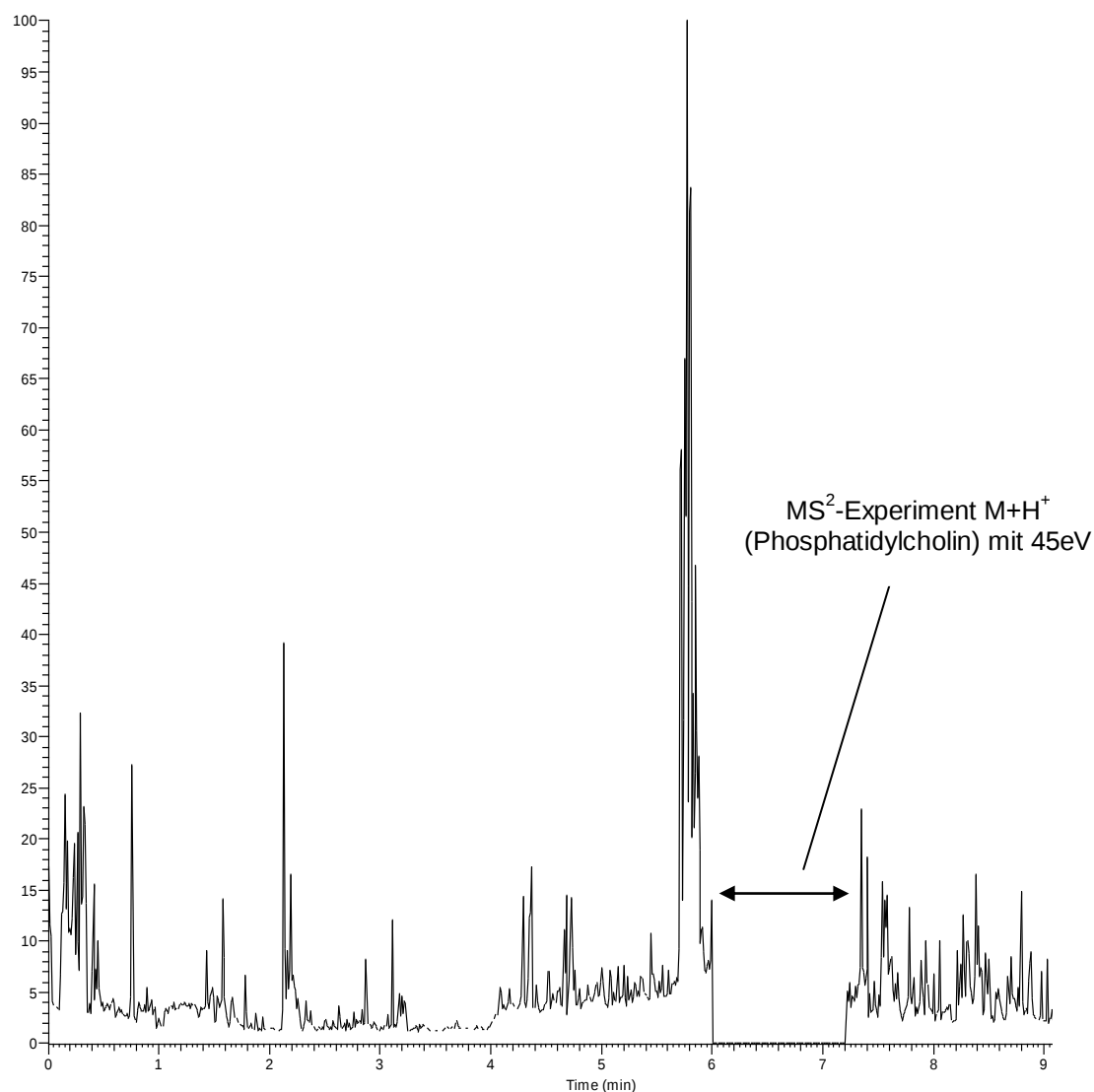


Abbildung 42: Chromatogramm des MS/MS Experiment von 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin

In Abbildung 43 ist ein MS/MS-Spektrum von 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin dargestellt. Das Molekül-Ion $[M+H]^+$ von 760 wurde mit 45eV fragmentiert, dadurch entstanden verschiedene Fragmentionen. Folgende Abbildung zeigt diese Fragment-Ionen mit darüberstehenden Beschriftungen der dazugehörigen abgetrennten Bruchstücke.

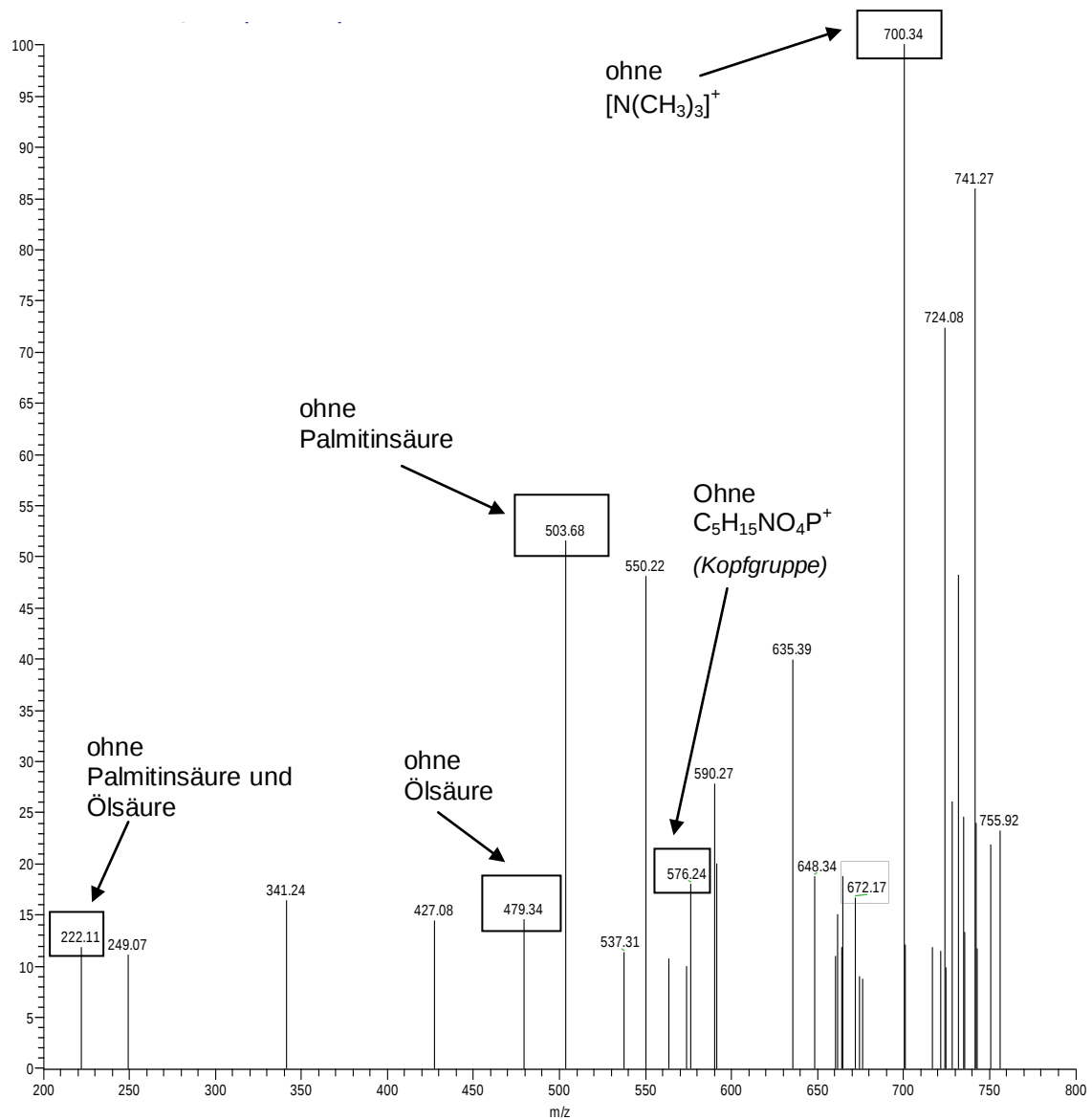


Abbildung 43: MS/MS Spektrum von
 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin;
 Fragment-Ionen: 222; 479; 503; 576; 700;

5.3 Qualitative Auswertung mittels Gaschromatographie

5.3.1 Fettsäuremuster

5.3.1.1 Allgemein

Mittels Gaschromatographie wurde das Fettsäuremuster der Phospholipid-Fraktion ermittelt. In Tabelle 24 sind die insgesamt 17 detektierten Fettsäuren aufgelistet. Fünf Komponenten konnten nicht identifiziert werden, jedoch ergibt das Mittel aus Leber-, Bauch- und Rückenproben 5% der Gesamtmenge. Die Kettenlänge der enthaltenen Fettsäuren liegt zwischen 14 und 22 C-Atomen. Der Sättigungsgrad variiert von gesättigten bis sechsfach ungesättigte Fettsäuren. Alle in Tabelle 24 aufgezählten Fettsäuren konnten in der Leber, sowie in der Rücken- und Bauchprobe ermittelt werden, jedoch mit unterschiedlichen Konzentrationen.

Tabelle 24: Fettsäuremuster in den Phospholipiden

Fettsäure	Abkürzung
Myristinsäure	C14:0
Palmitinsäure	C16:0
Palmitoleinsäure	C16:1 ω 7
Stearinsäure	C18:0
Ölsäure	C18:1 ω 9
cis-Vaccensäure	C18:1 ω 7
Linolsäure	C18:2 ω 6
α -Linolensäure	C18:3 ω 3
Nicht identifiziert	n.i.
Nicht identifiziert	n.i.
Arachidonsäure	C20:4 ω 6
Nicht identifiziert	n.i.
Eicosapentaensäure	C20:5 ω 3
Nicht identifiziert	n.i.
Nicht identifiziert	n.i.
Docosapentaensäure	C22:5
Docosahexaensäure	C22:6 ω 3

5.3.1.2 Sättigungsgrad

In Abbildung 44 sind die Ergebnisse des Sättigungsgrades von Bauch/Rücken und Leber dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass in allen drei Probearten die mehrfach ungesättigten Fettsäuren überwiegen. Bei den Bauch/Rückenproben liegt der Anteil dieser Fettsäuren auf 52 %. 30,3 % nimmt der Gehalt dieses Gewebetypus an gesättigten Fettsäuren ein. Der geringste Teil bezieht sich auf die einfach ungesättigte Fettsäure mit nur 12,8 %. Mit einer durchschnittlichen Menge an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Leberproben von 45 % überragt dieses Analyseergebnis die Werte der gesättigten Fettsäuren (28,2 %) und einfach ungesättigten Fettsäuren (21,4 %).

Besonders Hervorzuheben ist die Gesamtkonzentration von DHA und EPA in den Rücken- und Bauchproben, die zusammen 46 % ergibt. Als Hauptkomponente der einfach ungesättigten Fettsäuren in diesem Gewebe zählt Ölsäure, die bei den Leberproben deutlich höhere ist, als bei den anderen Probenarten. Bei gesättigten Fettsäuren ist der Gehalt bei Leber- und Bauch/Rückenproben beinahe gleich. Der Hauptanteil bei gesättigten Fettsäuren aller Proben liegt auf der Seite der Palmitinsäure mit über 20 %, gefolgt von Stearinsäure mit durchschnittlich 6 %.

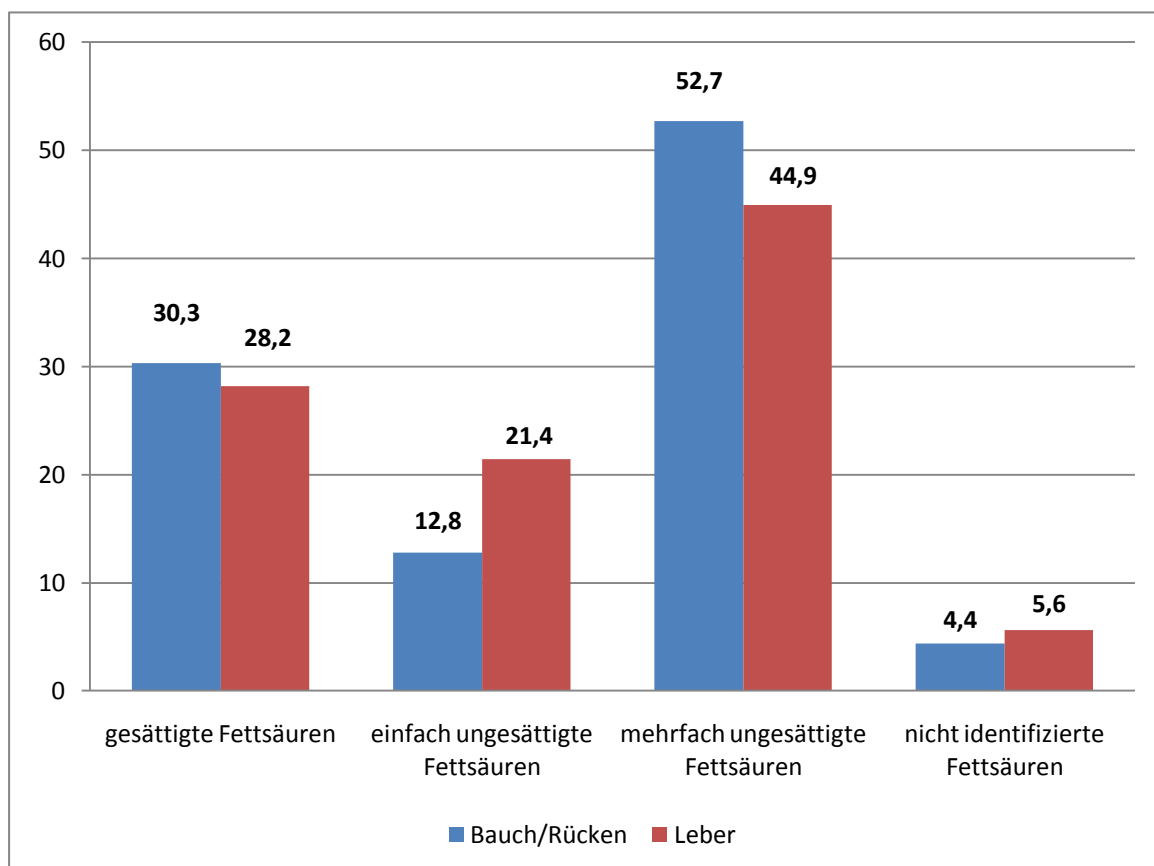


Abbildung 44: Verhältnis von Bauch/Rücken zu Leber (in %)

5.3.2 Fettsäuremuster der Bauch- und Rückenprobe

5.3.2.1 Allgemein

Bis auf einige standortbedingte Variationen, die teilweise eine größere Standardabweichung zufolge haben, ist das Fettsäurespektrum des Bauches und des Rückens ident, weswegen diese Daten zusammengefasst wurden.

Abbildung 44 zeigt das Chromatogramm einer Bauchprobe von Fisch 1 des Standortes Übelbach. Die Hauptkomponenten sind Docosahexaensäure (C22:6 ω -3) und Palmitinsäure (C16:0).

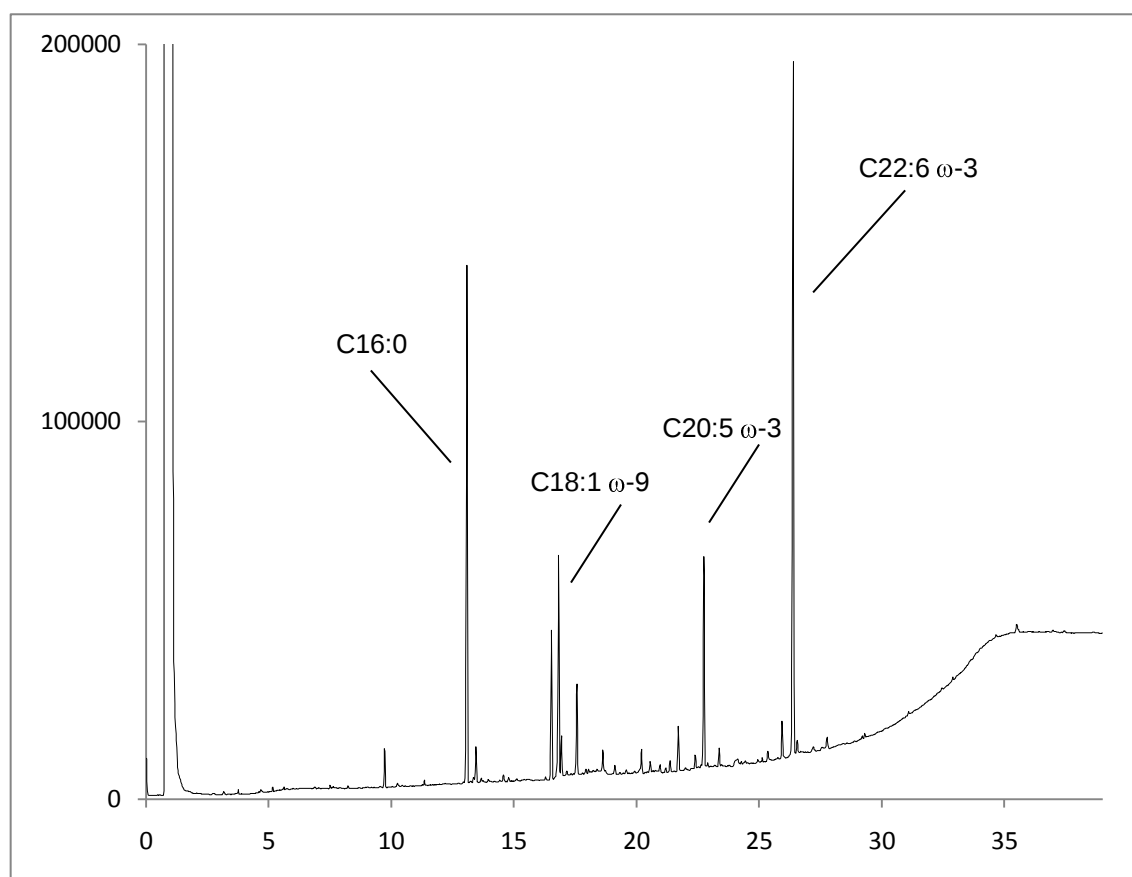


Abbildung 45: Gaschromatographisches Diagramm: Fettsäuremuster der Bauchprobe (Fisch 1; Standort Übelbach)

In Abbildung 46 ist die mittlere, prozentuelle Aufteilung des Fettsäuremusters aller Bauch- und Rückenproben angegeben. Mit 36,3 % überwiegt der Anteil an DHA beträchtlich. Die zweithäufigste Komponente ist Palmitinsäure mit 23,2 %, gefolgt von Ölsäure und EPA, die mit ca. 10 % gleich auf liegen. Die Konzentration der restlichen Fettsäuren schwankt zwischen 0,5 bis 5,7 %.

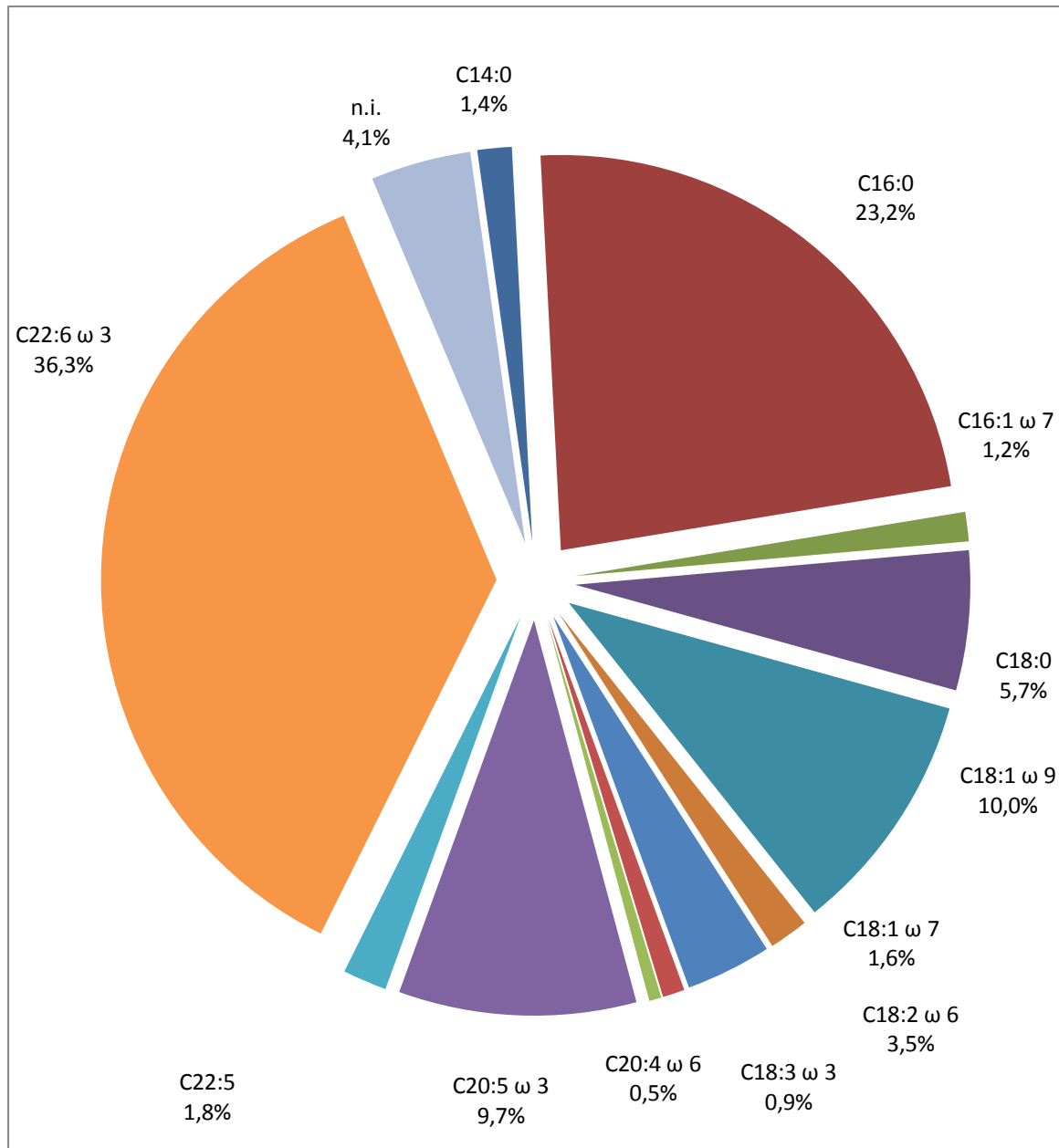


Abbildung 46: Mittlere Werte der Fettsäuren aller Bauch- und Rückenproben

Generell ist die Tendenz vorhanden, dass der Gehalt an Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure und α -Linolensäure in den Bauchproben überwiegen. Der Anteil an Palmitinsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure ist in den Rückenproben höher als im Bauchgewebe.

5.3.2.2 Standortspezifische Unterschiede

In Tabelle 25 sind alle identifizierbaren Fettsäuren mit deren standortspezifischen, mittleren Konzentrationen aufgelistet. Der höchste Gehalt an Palmitinsäure erreicht Standort Salzburg mit genau 25%, gefolgt von Bayern mit 24,4 %. Die restlichen vier Standorte weisen alle eine Konzentration von C16:0 um 22 % auf. Palmitinsäure ist innerhalb der Standorte Schwarza, Payerbach und Bayern sehr konstant, dies drückt eine Standardabweichung von unter 5 % aus. Standorte mit hoher Konzentration an Palmitinsäure tendierten zu niedrigeren Werten an DHA. Bayern zeigt den geringsten Wert an DHA mit 34,2 %, wohingegen der Standort Schwarza mit 39,6% deutlich alle anderen Standorte überragte. Die Tatsache, dass die Standorte Bayern und Salzburg, in Gegensatz zu den anderen, Fische aufzucht in „unbewegte“ Becken betreiben, könnte mit einer Auswirkung auf das Fettsäuremuster einhergehen, da durch Bewegung der Fisch mehrfach ungesättigte Fettsäuren vermehrt einlagert.

Bei Standort Payerbach kommen Maxima bei Stearinsäure und Ölsäure vor, während im selben Standort Minima von Linolsäure, α -Linolensäure und EPA vorhanden sind. Die höchsten Mengen an EPA von 10,1 %, und somit über dem Durchschnitt, haben die Standorte Gutenstein und Übelbach.

Tabelle 25: Mittlere Werte der Bauch- und Rückenproben nach Standorten (in %)

Fettsäuren	Salzburg	Bayern	Gutenstein	Übelbach	Payerbach	Schwarza
C14:0	1,4	2,0	1,3	1,4	1,3	1,2
C16:0	25,0	24,4	22,7	22,7	22,5	22,1
C16:1 ω 7	1,5	1,3	1,3	1,3	1,1	1,0
C18:0	5,9	5,0	5,1	5,8	7,0	5,5
C18:1 ω 9	9,2	10,3	9,9	10,0	11,7	9,4
C18:1 ω 7	1,5	1,4	1,6	1,7	1,6	1,6
C18:2 ω 6	3,6	4,1	3,2	3,9	3,1	3,2
C18:3 ω 3	0,8	1,2	0,9	0,9	0,6	0,9
C20:4 ω 6	0,7	0,7	0,4	0,5	0,4	0,3
C20:5 ω 3	9,9	9,5	10,1	10,1	8,9	9,6
C22:5	1,8	1,7	2,0	1,7	1,7	1,8
C22:6 ω 3	34,3	34,2	37,8	35,9	35,9	39,6

Die Abbildung 47 bezieht sich nur auf den Gehalt an ω -3 Fettsäuren in den Standorten. Die Standorte Bayern und Salzburg haben die niedrigsten Werte, währenddessen Schwarzau und Gutenstein die größten Mengen besitzen.

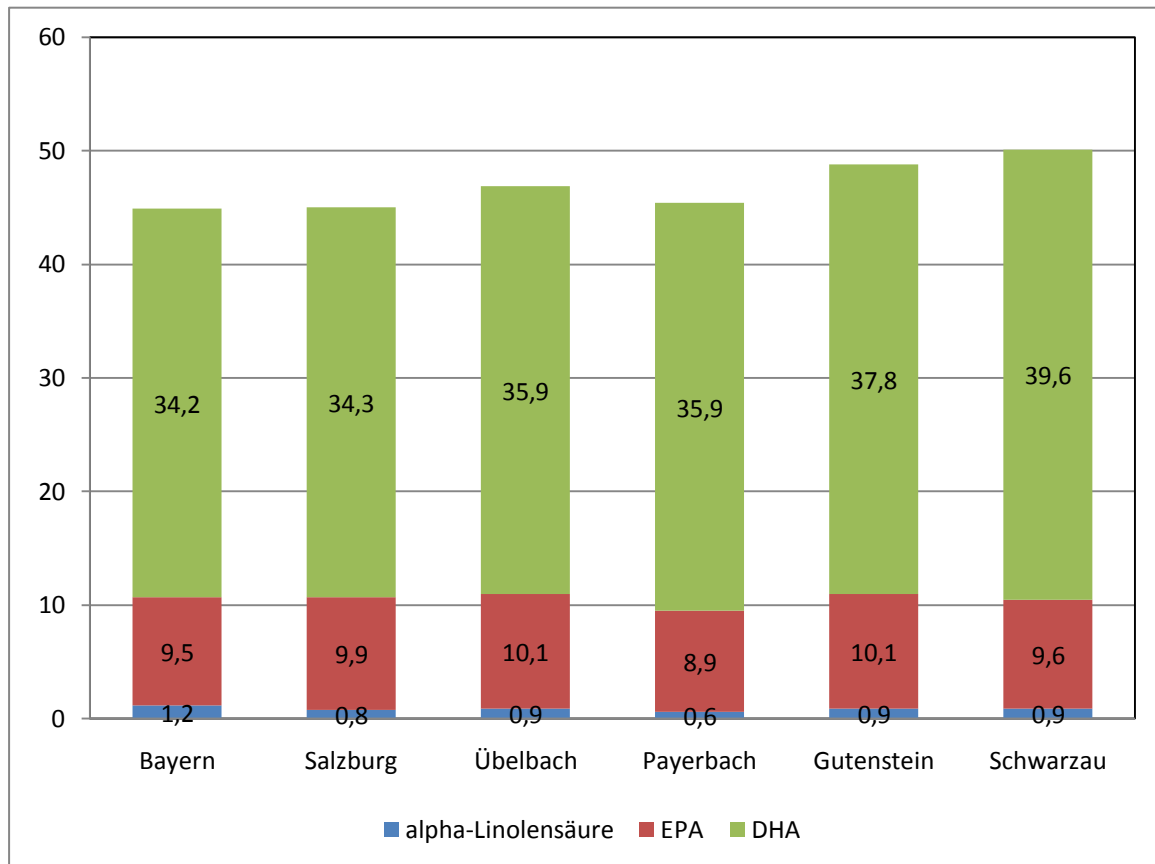


Abbildung 47: Mittlere ω -3 Fettsäuren Konzentration der Bauch- und Rückenproben nach Standorten eingeteilt (in %)

Die Konzentration der ω -3 Fettsäuren ist innerhalb des Standortes Schwarzau durchgehend sehr konstant. Der Standort Gutenstein weist eine Standardabweichung von weniger als 5 % bei DHA und EPA auf.

5.3.3 Fettsäuremuster der Leberprobe

5.3.3.1 Allgemein

In Abbildung 44 ist ein Chromatogramm einer Leberprobe von Fisch 2 des Standortes Gutenstein abgebildet. Die Hauptkomponenten sind Docosahexaensäure (C22:6 ω -3), Palmitinsäure (C16:0) und Ölsäure (C18:1 ω -9).

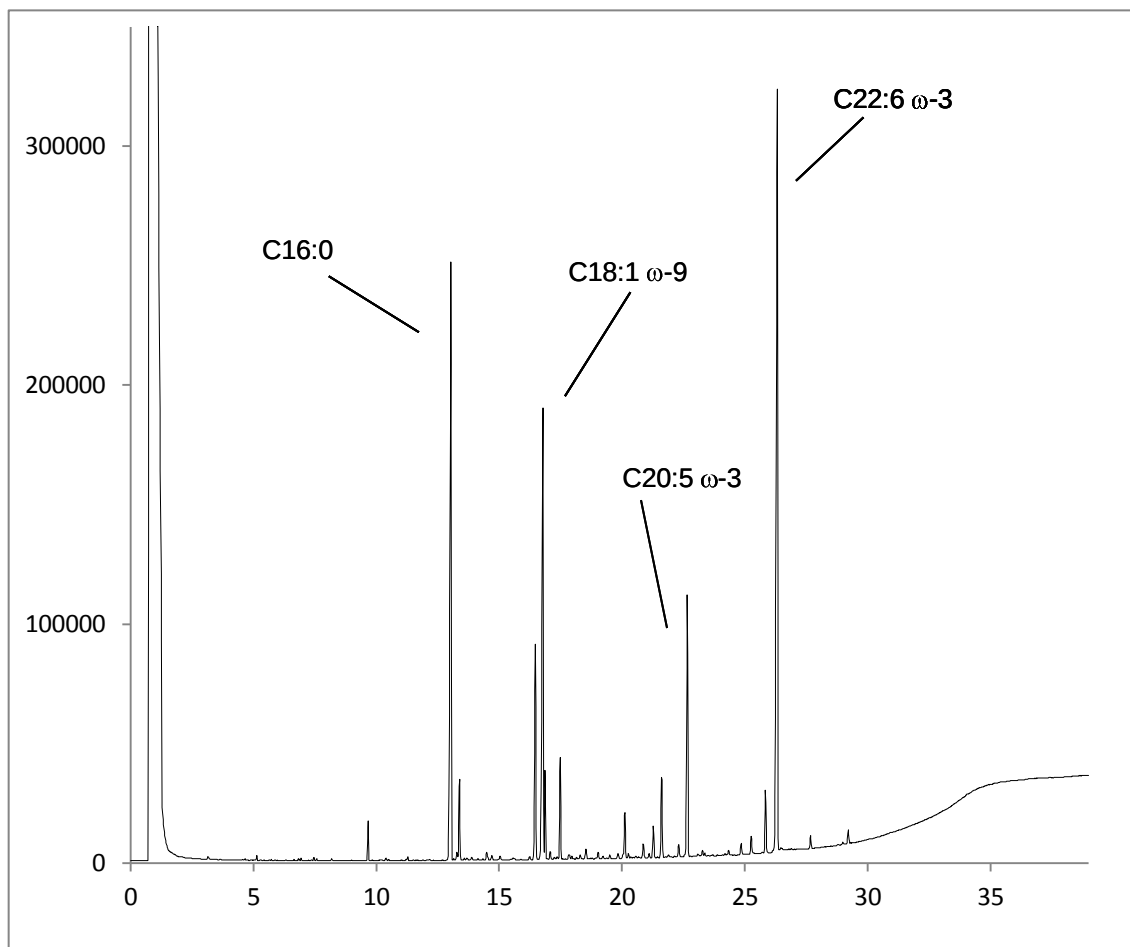


Abbildung 48: Gaschromatographisches Diagramm: Fettsäuremuster der Leber (Fisch 2; Standort Gutenstein)

In Abbildung 49 ist die mittlere, prozentuelle Aufteilung des Fettsäuremusters aller Leberproben angeführt. Mit 31,2 % überwiegt auch bei diesem Gewebe der Anteil an DHA. Die zweithäufigste Komponente ist Palmitinsäure mit 20,7 %, gefolgt von Ölsäure mit 16,9 %. EPA besitzt einen Wert von 6,9 %, gleich danach folgt Stearinsäure mit 6,2 %. Die Konzentration der übrigen Fettsäuren schwankt zwischen 0,4 bis 3,6 %.

Im Vergleich zu den Bauch/Rückenproben ist der Gehalt an Ölsäure in den Leberproben um durchschnittlich 7 % höher. Auffallend ist, dass die Konzentrationen von Palmitinsäure, EPA und DHA in der Leber ca. 3 bis 5 % geringer sind, als bei den Bauch/Rückenproben. Der Gehalt an Palmitoleinsäure ist in der Leber beinahe doppelt so hoch. Die Menge von C18:1 ω -7 im Bauch/Rückengewebe ist um zwei Drittel geringer als in der Leber.

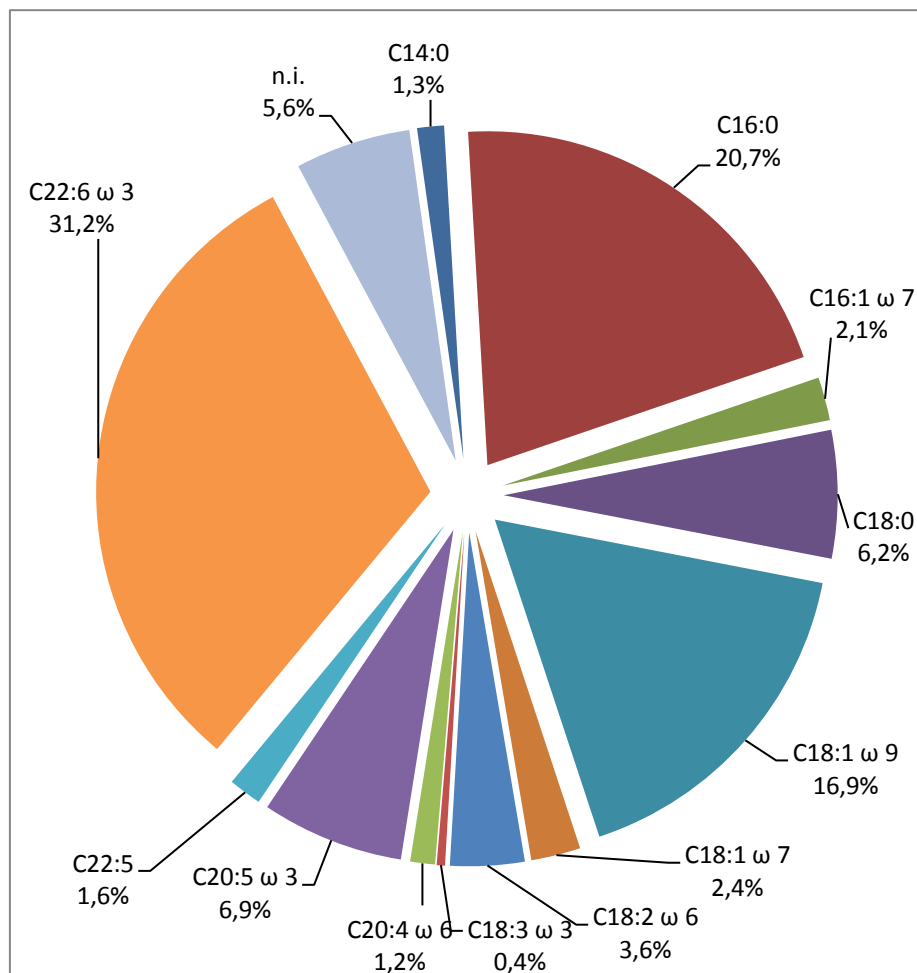


Abbildung 49: Mittlere Werte der Fettsäuren aller Leberproben

In Abbildung 50 sind die unterschiedlichen Konzentrationen der ω -3 Fettsäuren abhängig von der Probenart als Balkendiagramm abgebildet. Es ist klar ersichtlich, dass in den Bauch/Rückenproben mehr an α -Linolensäure, EPA und DHA vorhanden ist. Den größte Unterschied von über 5 % ist bei DHA zu finden. Eine Konzentrationsdifferenz von 2,8 % ist bei EPA ersichtlich und bei α -Linolensäure beschränkt sich der Gehaltsunterschied auf nur 0,5 %.

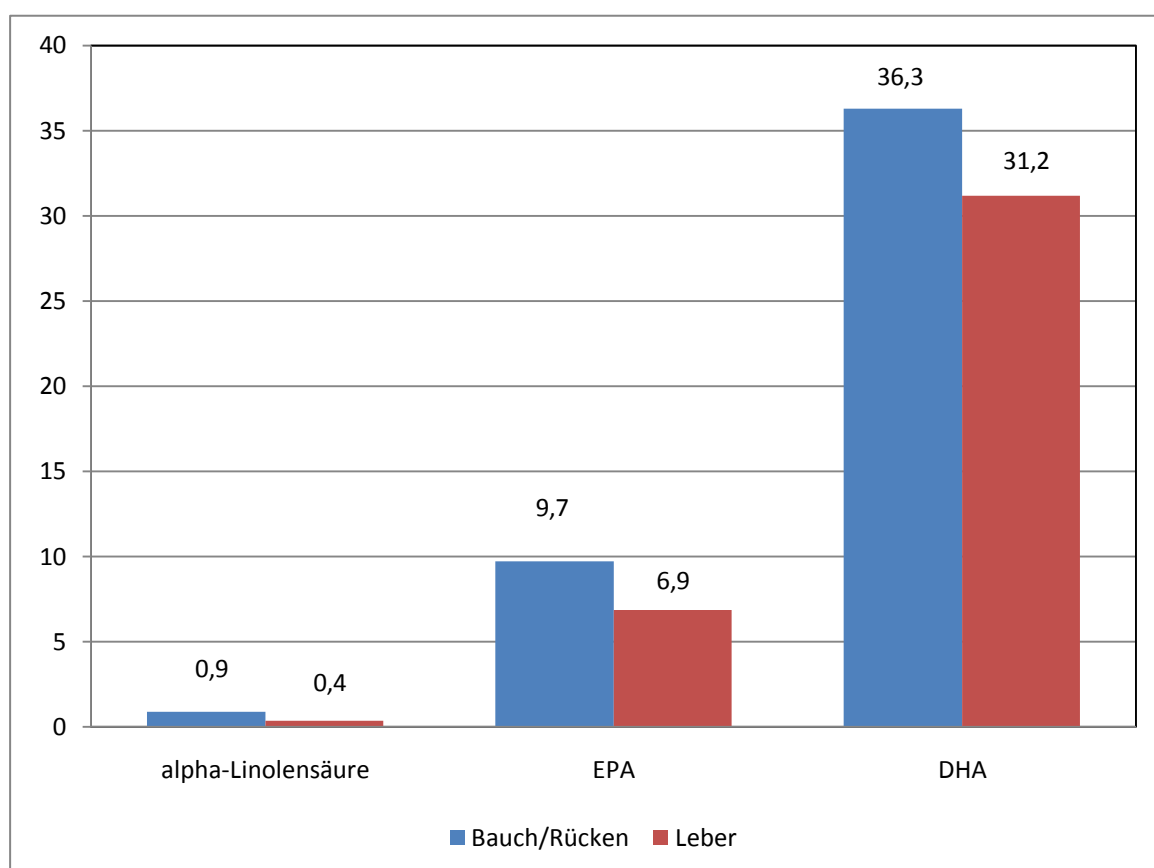


Abbildung 50: Vergleich der Mittleren ω -3 Fettsäuren Konzentration zwischen Bauch-/Rückenproben und Leber (in %)

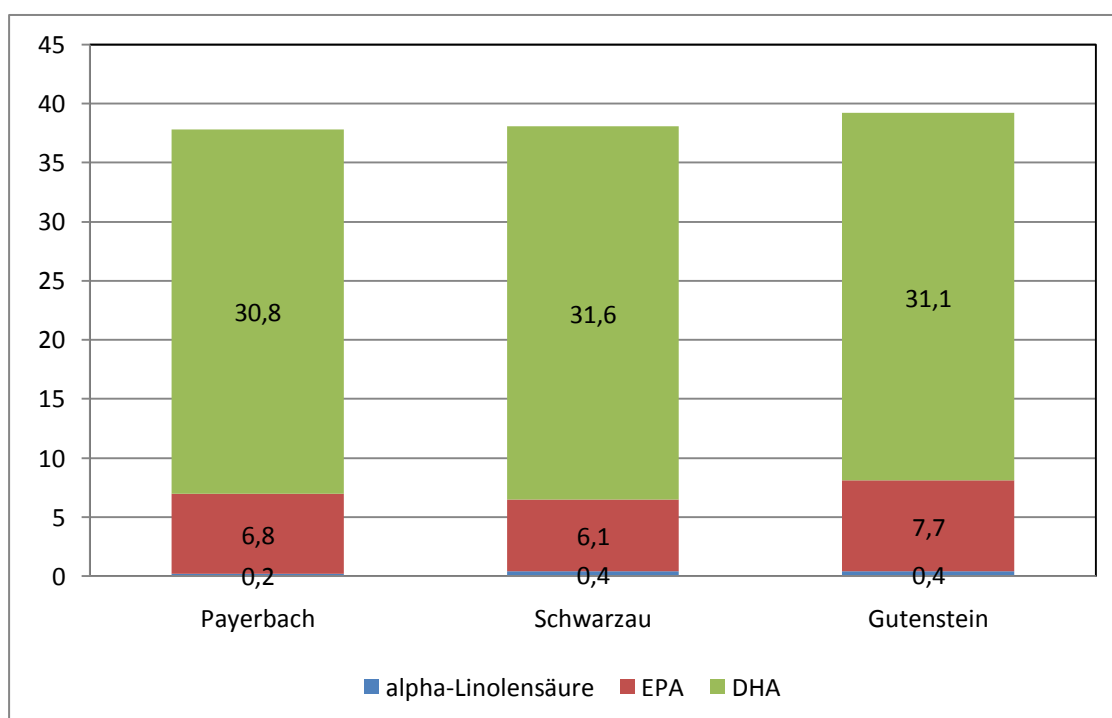
5.3.3.2 Standortspezifische Unterschiede

In Tabelle 26 sind alle identifizierbaren Fettsäuren nach deren mittleren, standortspezifischen Werten aufgelistet. Der Standort Gutenstein besitzt den höchsten Gehalt an Palmitinsäure und Stearinsäure. Mit 7,7 % an EPA überragt dieser Werte bei den Proben des Standortes Gutenstein, die der anderen Stätten. Die Menge an α -Linolensäure ist bei den Standorten Schwarza und Gutenstein mit 0,4 % am höchsten. Linolsäure und DHA sind im Standort Schwarza am häufigsten vorhanden. Mit 17,7 %, und somit über dem Durchschnitt, findet sich Ölsäure im Probenmaterial von Standort Payerbach, im selben Standort ist auch Palmitoleinsäure mit 2,4 % am meisten vorhanden.

Tabelle 26: Mittlere Werte der Leberproben nach Standorten eingeteilt (in %)

Fettsäuren	Payerbach	Schwarzaue	Gutenstein
C14:0	1,3	1,4	1,2
C16:0	19,9	20,3	22,0
C16:1 ω 7	2,4	2,1	1,9
C18:0	6,3	5,5	6,7
C18:1 ω 9	17,7	16,9	16,1
C18:1 ω 7	2,4	2,6	2,2
C18:2 ω 6	3,1	4,4	3,3
C18:3 ω 3	0,2	0,4	0,4
C20:4 ω 6	1,5	1,2	0,7
C20:5 ω 3	6,8	6,1	7,7
C22:5	1,5	1,5	1,8
C22:6 ω 3	30,8	31,6	31,1

Die Abbildung 51 bezieht sich nur auf den Gehalt an ω -3 Fettsäuren in den Standorten Payerbach, Schwarzaue und Gutenstein. Die minimalste Menge weist Payerbach mit 37,8 % auf und das Maximum fällt auf Gutenstein mit 39,2 %.

**Abbildung 51:** Mittlere ω -3 Fettsäuren Konzentration der Leberproben nach Standorten eingeteilt (in %)

6 Diskussion

Bei der Ermittlung des Fettgehaltes variierten die gewonnenen Mengen abhängig vom Gewebetyp der extrahierten Proben. Dabei konnte aus den Leberproben die höchste Ausbeute gewonnen werden, gefolgt von Bauch- und Rückenproben. Möglicherweise liegen die Gründe für diese Unterschiede in der Physiologie, da die Leber als Zentralorgan des Lipidstoffwechsels dient. Die Aufteilung des Depotfetts ist bei Bauch und Rücken verschieden. Durch höhere Aktivität der Muskulatur im Rücken, ist bei diesem Körperteil das Einbetten von Fett geringer als bei der Bauchpartie.

Eine weitere Erklärung für eine unterschiedliche Fettausbeute könnte das Geschlecht des Fisches sein. Die bearbeiteten Proben stammen jedoch von jungen Fischen, bei denen die Geschlechtsreife noch nicht eingesetzt hatte und dadurch die Geschlechtsbestimmung nicht durchführbar war.

Durch eine Auftrennung der Triglycerid-Phospholipid-Fraktion konnte eine Aufteilung der beiden Komponenten durchgeführt werden. Die Triglycerid-Fraktion (Speicherfett) wurde simultan in einer anderen Arbeit analysiert und ausgewertet. Bei der Aufklärung des Fettsäuremusters der Phospholipide und Triglyceride unterscheiden sich die beiden Komponenten deutlich von einander. Bei den Phospholipiden ergibt DHA einen Gehalt von über 35 % und EPA besitzt einen Wert von ca. 10 %. Zusammengefasst ergeben alle ω -3 Fettsäuren in den Phospholipiden durchschnittlich 47 %. Mit über 23 % ist Palmitinsäure die zweithäufigste Fettsäure. Das Fettsäurespektrum der Triglyceride weist Ölsäure als Hauptkomponente auf, gefolgt von Palmitinsäure und Linolsäure. Der Gehalt an ω -3 Fettsäuren im Speicherfett macht ca. 12 % aus, mit einem Hauptanteil an DHA.

Das Fettsäuremuster innerhalb der Phospholipide blieb, trotz schwankender Fettausbeute mancher Proben, gleich. Diese Aussage bestätigten Messungen der Phospholipidfraktion mittels HPLC und GC.

Phospholipide nehmen nur ungefähr 10 – 15 % der Gesamtlipide ein. Den Hauptanteil machen Triglyceride mit ca. 85 % aus. Bei Verzehr von Fischen werden folglich beide Gruppen mit deren spezifischen Gehalt an ω -3 Fettsäuren aufgenommen und im Körper verarbeitet.

Da der Fisch roh nur in Form von Sushi verzehrt wird und dadurch die Ergebnisse nur auf diese Zubereitungsform zutreffen, gäbe es auch die Möglichkeit andere Verarbeitungsarten, wie das Räuchern, zu untersuchen. Eine Konzentrierung von DHA und EPA könnte durchaus die positive Folge sein, da Depotfett bei dieser Konservierungsmethode ausläuft. Ein Beispiel bietet die fettreiche Makrele die geräuchert 2,92 g DHA + EPA/100 g Fisch besitzt. Im Vergleich zur rohen Makrele, die einen Wert von 1,75 g DHA + EPA/100 g Fisch aufweist [20].

Weitere Arbeitsansätze könnten im Bereich der Trennung der unterschiedlichen Phospholipidklassen untereinander sein, gefolgt von einer Analyse des Fettsäuremusters jeder Fraktion anhand Gaschromatographie. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden MS/MS Experimente mit Phospholipidstandards mittels HPLC getätigt, um eine genaue Strukturaufklärung zu erlangen. Diese Versuche könnten mit echtem Probenmaterial weitergeführt werden.

Literaturverzeichnis

1. LÖFFLER G, PETRIDES P E, HEINRICH P C. Biochemie und Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007) 8. Ausgabe, 32-44; 554-564
2. HORTON H R, MORAN L A, SCHRIMGEOUR K G, PETTY M D, RAWN J D. Biochemie. Pearson Studium, München (2008) 4. Auflage, 341-396; 644-696
3. THIELE O W. Lipide, Isoprenoide mit Steroiden. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1979) 1. Auflage 1-196; 374-379
4. BELITZ H-D, GROSCH W, SCHIEBERLE P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag (2001) 5. Auflage, 150-177
5. EBERMANN R, ELMADFA I. Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Springer-Verlag, Wien (2008) 9-114; 298-306; 528-550
6. ELMADFA I, LEITZMANN C. Ernährung des Menschen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1998) 3. Auflage, 95-140
7. ELMADFA I, FREISLING H, NOWAK V, HOFSTÄDTER D, HASENEGGER V, FERGE M, FRÖHLER M, FRITZ K, MEYER LAL, PUTZ P, RUST P, GROSSGUT R, MISCEK D, KIEFER I, SCHÄTZER M, SPANBLÖCHEL J, WAGNER K H, ZILBERSZAC A, VOJIR F, PLSEK K. Österreichischer Ernährungsbericht 2008; 1.Auflage, Wien März 2009. 26-29
8. GEBAUER S K, PSOTA T L, HARRIS W S, KRIS-ETHERTON P M. n-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. American Journal of Clinical Nutrition, (2006) 83: 1526-1535
9. DGE: D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr (2008)
10. TOCHER D R, BENDIKSEN E Å, CAMPBELL P J, BELL J G. Review: The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture (2008) 280, 21-34
11. LYKIDIS A. Review: Comparative genomics and evolution of eukaryotic phospholipid biosynthesis. Progress in Lipid Research (2007) 46(3-4): 171-199
12. TOCHER D R. Glycerophospholipid metabolism. In: HOCHACHKA P W, MOMMSEN T P (Eds.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Metabolic and Adaptational Biochemistry, vol. 4. Elsevier Press, Amsterdam, (1995) 119-157
13. NUHN P. Naturstoffchemie - Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe. S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig (1997) 3. Auflage, 324-367

14. MORTIMER C E, MÜLLER U. Chemie - Das Basiswissen der Chemie. Thieme Verlag, 8. Auflage, 597-599
15. SCHMUCK C, ENGELS B, SCHIRMEISTER T, FINK R. Chemie für Mediziner. Pearson Studium (2008) 1. Auflage, 517-576
16. HABERMEHL G, HAMMANN P E, KREBS H C. Naturstoffchemie. Eine Einführung. Springer Verlag (2002) 2. Auflage, 513-549
17. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft: <http://www.dgfett.de/material/fszus.htm> letzter Zugriff am 21-Dezember-2009
18. SINGER S J, NICOLSON G L. Fluid Mosaic Model of Structure of Cell Membranes. *Sciences*. (1972) 175: 720-731
19. <http://www.fishbase.org/summary/speciessummary.php?id=247>. letzter Zugriff am 17-Februar-2010
20. FREDE W. Taschenbuch für Lebensmittelchemiker. Lebensmittel-Bedarfsgegenstände-Kosmetika-Futtermittel. Springer Verlag (2006) 2. Auflage, 515-557
21. FIEDLER K. Wirbeltiere: 2.Teil: Fische; Lehrbuch der Speziellen Zoologie: Band II: Wirbeltiere, Gustav Fischer Verlag, Jena (1991)
22. STEAD S M, LAIRD L. Handbook of Salmon Farming. Springer Verlag-Praxis Publishing, Chichester (2002)
23. GUILLAUME J, KAUSHIK S, BERGOT P, MÉTAILLER R; Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (2001)
24. TÜLSNER M. Rohstoffeigenschaften von Fisch und Grundlagen der Verarbeitungsprozesse. Behr's Verlag, Hamburg (1994) 33-105.
25. http://www.ernaehrungsgewissen.at/t3/fileadmin/user_upload/PDFs/Ohne_Fisch_geht_s_auch.pdf letzter Zugriff am 19-Februar-2010
26. RATH C. Dissertation; Beiträge zur Anwendung der Massenspektrometrie in der Lipidanalytik; (1999)
27. SHAHIDI F. Omega-3 in foods, Examination the incorporation of omega-3 fatty acids in foods and their significance to health. *INFORM*. (2008) 19: 366-369
28. SCHMITZ G, ECKER J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* (2008) 47: 147-155
29. BURDGE G, CAIDER P. α -Linolenic acid metabolism in adult humans: the effects of gender and age on conversion to longer-chain polyunsaturated fatty acids. *Euroropean Journal of Lipid Science and Technology* (2005) 107: 426-439

30. CALDER P. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition & Food Research* (2008) 52: 885-897
31. LE H D, MEISEL J A, DE MEIJER V E, GURA K M, PUDER M. The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* (2009) 18: 165-170
32. LAVIE C, MILANI R, MEHRA M, VENTURA H. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of Cardiology* (2009) 54: 585-594
33. MARCHIOLI R. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* (1999) 353: 447-455
34. LARSSON S, KUMILIN M, INGELMAN-SUNDBERG M, WOLK A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition* (2004) 79: 935-45
35. STAMP L, JAMES m, CLELAND L. Diet and Rheumatoid Arthritis: A Review of the Literature. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* (2005) 35: 77-94
36. The state of world Fisheries and Aquaculture 2008; Food and Agriculture Organization (FAO) 2009. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf> letzter Zugriff am 25-März-2010
37. Fishery Statistics Data 1990-2006. Eurostat, European Commission, 2007 Edition.
https://univpn.univie.ac.at/+CSCO+0h756767633A2F2F6A6A6A2E7271662D717266676E6776662E7172+3407703120@28516352@1260903169@CB15CC71BFA4CD4F4897903DE8A83104DA5D28D7+/downloads/publ/en5_fishery_pb.pdf letzter Zugriff am 25-März-2010
38. Aquakulturproduktion 2008. Statistik Austria;
http://www.statistik.at/web_de/statistiken/land_und_forstwirtschaft/viehbestand_tierische_erzeugung/aquakultur/index.html letzter Zugriff am 26-März-2010
39. Supply Balance Sheets. Supply balance sheet for fish 2003-2008. Statistik Austria.
http://www.statistik.at/web_en/statistics/agriculture_and_forestry/prices_balances/supply_balance_sheets/index.html letzter Zugriff am 26-März-2010
40. SIDHU K. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (2003) 38: 336-344
41. FUSSENEGGER D, SUPPIN D, RAHEEM A, WIDHALM K. Welcher Fisch soll auf den Tisch? Omega-3-Fettsäuren versus Quecksilberbelastung. *Ernährungsmedizin* (2007) 3: 6-13

42. Global Production Statistics 1950-2007. Food and Agriculture Organisation.
<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/query/en> letzter Zugriff
am 27-März-2010
43. Alpenlachs Homepage. www.alpenlachs.at letzter Zugriff am 27-März-2010
44. Interview Hr. Brauchl Peter vom 2-Dezember-2009
45. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY G H. A simple method for the
isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of
biological chemistry (1957) 226(1): 497-509
46. PENG J, LARONDELLE Y, PHAM D, ACKMAN R, ROLLIN X.
Polyunsaturated fatty acid profiles of whole body phospholipids and
triacylglycerols in anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*
L.) fry. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 134 (2003) 335-348

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin das Fettsäuremuster der in den Zellmembranen enthaltenen Phospholipiden des österreichischen Alpenlaches *Salvelinus Alpinus* zu bestimmen. Einerseits wurde mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) eine Auftrennung in die unterschiedlichen Phospholipidklassen durchgeführt, andererseits wurde das gesamte Fettsäuremuster der Phospholipidfraktion anhand gaschromatographischer Analysen betrachtet.

Die untersuchten Fische stammten von sechs Vertragspartnern der Firma Alpenlachs aus verschiedenen Züchtungsbetrieben in Österreich und Deutschland. Es wurden von jedem Betriebsstandort jeweils drei Fische ausgehändigt. Bei jedem Fisch wurde aus dem Bauch- und Rückenbereich ein Stück entnommen und analysiert, um eventuelle Unterschiede in Abhängigkeit vom Gewebe zu ermitteln. Bei drei Standorten wurde die Leber mitgeliefert und anschließend untersucht.

Ein spezieller Fokus lag in der Analyse der ω -Fettsäuren in den Phospholipiden. Durch Festphasenextraktion wurde die Triglycerid-Phospholipid-Fraktion voneinander getrennt, um lediglich die Phospholipide des Alpenlaches mittels HPLC und GC weiter zu untersuchen.

Die quantitative Bestimmung des Fettsäuremusters ergab insgesamt zwölf identifiziert Fettsäure, die in allen Probenmaterialien vorhanden sind. Lediglich die Menge der Fettsäuren variierte in den unterschiedlichen Gewebetypen. Die Konzentrationen der Bauch- und Rückenproben waren in etwa gleich. Die Leberproben unterscheiden sich in den Gehältern der Hauptkomponenten von den anderen Proben. Der Anteil an DHA in den Bauch- und Rückenproben ergab durchschnittlich 36,3 %, gefolgt von Palmitinsäure mit 23,2 %. Die Menge an Ölsäure und EPA machen jeweils ca. 10 % aus. Zusammengefasst ergeben die ω -3 Fettsäuren durchschnittlich in etwa 47 %. Bei den Leberproben besitzt auch DHA den höchsten, mittleren Wert mit 31,2 %. Palmitinsäure kommt mit 20,7 % am zweithäufigsten vor. Ölsäure ist in den Leberproben, im Vergleich zu den Bauch- und Rückenproben, mit einer Menge von 16,9 % vorhanden. Mit durchschnittlich 6,9 % wird EPA im Lebergewebe nachgewiesen. Der Anteil an ω -3 Fettsäuren ergibt einen mittleren Gehalt von ca. 38 %.

Die qualitative Untersuchung der Phospholipidklassen wies eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der gaschromatographischen Messungen auf. Als Hauptmenge der Phospholipide wurden Phosphatidylcholine mit dem Molekül-Ion $[M+H]^+$ 806,45 ermittelt. Die Auswertungen der möglichen Fettsäurereste ergaben, dass es sich um DHA und Palmitinsäure oder um EPA und Ölsäure handeln könnte. Phosphatidylserin wurde als zweite Komponente detektiert. Als intensivstes Molekül-Ion $[M+H]^+$ erwies sich 764,4, das die Fettsäurereste von Palmitinsäure und Ölsäure besitzen könnte.

Summary

The aim of this thesis was to examine the fatty acid pattern in the cell membrane containing phospholipids of the Arctic Charr. On the one hand a separation of different classes of phospholipids was measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). On the other hand, the whole fatty acid pattern of the phospholipids fraction was determined via gas chromatography (GC).

The fishes which had their origin from six different contractual partners of the Austrian fish farming company Alpenlachs, were subject of the observation. In order to guarantee significant results, a sample size of three fishes from each partner was delivered. Samples were taken from stomach and back parts to present potential differences in fat content. In addition, three partners provided the liver of the fishes for further research.

The main focus relied on the analysis of the ω -3 fatty acids of the phospholipids. In accordance to solid phase extraction, the triglyceride-phospholipid-fraction was separated from each other to analyze the phospholipids only, of the Alpenlachs via HPLC and GC.

In general, 12 out of 17 fatty acids were identified. The results emphasized that the samples in stomach, back and liver had shown these twelve components. As the results due to the quantitative determination in stomach and back were mostly similar, an aggregate view for both areas was built. In more detail, the concentration of fatty acids in the samples coming from stomach and back were approximately the same. However, in comparison with the liver, the fatty acid pattern showed significant variations in the amount of specific fatty acids.

Regarding to the fatty acids in stomach and back tissues, DHA illustrated the highest rate with an average of 36.3 %, followed by palmitic acid with 23.2 %. Continuously, Oleic acid and EPA approximately amounted 10 % each. Adding up all ω -3 fatty acids fraction, created an average amount of 47 %. Findings of samples from the liver showed a decrease in DHA, palmitic acid and EPA and an increase in oleic acid. DHA occurred as major fatty acid with 31.2 %, followed by palmitic acid with 20.7 %. Oleic acid had a concentration with 16.9 %, which was significantly higher than those samples of stomach and back tissue. EPA was detected with an average rate of 6.9 %. The total amount of ω -3 fatty acids in the cell membrane of the liver included 38 %.

The quantitative research of the phospholipid classes showed congruence with the results exposed by GC. Phosphatidylcholine with the protonated molecular ion $[M+H]^+$ 806 was discovered as phospholipid's main component. The analyses of possible fatty acids in phosphatidylcholine suggested that DHA and palmitic acid or EPA and oleic acid could be potential components. Another detected component was phosphatidylserine with most intensive protonated molecule $[M+H]^+$ 764 which might contain fatty acids such as palmitic acid and oleic acid.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Sonja Plank
Adresse	Neustiftgasse 96/2/15, 1070 Wien
Geburtsdatum	15. September 1984
Geburtsort	Scheibbs, Österreich
Familienstand	ledig
Nationalität	Österreich
E-mail	sonja.plank@gmx.at

AUSBILDUNG

10/2003 – dato	Studium an der Universität Wien Ernährungswissenschaften
01/2007- 06/2007	Auslandsstudium an der Universität Kuopio/Finnland Department für Public Health and Clinical Nutrition
1999 - 2003	Bundesoberstufenrealgymnasium in Scheibbs
1995 - 1999	Hauptschule in Gresten
1991 - 1995	Volksschule in Gresten

BERUFLICHE ERFAHRUNG

03/2010 – dato	Affiliate Labeling Coordinator in der Abteilung Regulatory Affairs and Quality Assurance bei Wyeth Whitehall Export GmbH – A Pfizer Company
11/2008 – 04/2010	Tutorentätigkeit an der Fakultät für Chemie/Institut für Organische Chemie Lebensmittelanalytisches Praktikum für Ernährungswissenschaftler
08/2008	Assistentin in der Abteilung Regulatory Affairs and Quality Assurance bei Wyeth Whitehall Export GmbH
09/2007 – 02/2010	Geringfügige Beschäftigung für Assistenzstätigkeit in der Abteilung Regulatory Affairs and Quality Assurance bei Wyeth Whitehall Export GmbH
08/2007	Praktikum im Bereich Produktion der Firma Berglandmilch reg.Gen.m.b.H. in Aschbach
07/2006	Praktikum im Bereich Qualitätsmanagement der Firma Berglandmilch reg. Gen.m.b.H. in Aschbach
09/2005	Praktikum am Kompetenzzentrum für Rückstandsanalytik in der AGES „Österreichischen Agentur für Gesundheits- und Ernährungssicherheit“ GmbH
2000-2004	Feriertätigkeiten im Bereich Gastronomie

SPRACHKENNTNISSE

Sprachen	Englisch in Wort und Schrift Grundkenntnisse in Französisch und Spanisch
----------	---