

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung,
Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. H.- J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. W. A. Rambeck

**Zur Analytik von Lipiden im Hunde- und Katzenserum
nach Fütterung ungesättigter Fettsäuren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Natalie Zorn
aus Freiburg im Breisgau

München 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Prof. Dr. W. Rambeck

Korreferent: Uni.-Prof. Dr. J. Meyer

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGEN	IX
1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Eigenschaften der Lipide.....	3
2.1.1. Definition und Eigenschaften.....	3
2.1.2. Biologische Funktion von Lipiden.....	3
2.1.3. Klassifizierung der Lipide.....	4
2.1.4. Triglyceride.....	5
2.1.5. Phospholipide.....	5
2.1.5.1. Funktion der Phospholipide im Organismus	8
2.1.5.2. Verteilung der Phospholipide und bestimmter Fettsäuren im Organismus	9
2.1.6. Fettsäuren.....	10
2.1.6.1. Nomenklatur der Fettsäuren	10
2.1.6.2. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....	11
2.1.6.3. Biosynthese der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren	13
2.1.6.4. Funktion der Fettsäuren.....	15
2.1.6.5. Synthese der Eicosanoide	16
2.1.6.6. Wirkung der Eicosanoide	17
2.2. Bedeutung der Omega-Fettsäuren	18
2.2.1. Entwicklung der Omega-6- und Omega-3- Fettsäuren in der Ernährung	18
2.2.2. Nahrungsquellen für Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren.....	19
2.2.3. Klinische Bedeutung der Omega-3-Fettsäuren beim Menschen	20
2.2.4. Klinische Bedeutung der Omega-3-Fettsäuren beim Tier.....	21
2.3. Chromatographische Trennmethoden.....	23
2.3.1. Prinzip der Chromatographie	23
2.3.2. Festphasenextraktion.....	23

2.3.2.1.	Molekulare Wechselwirkungen bei der Festphasenextraktion	25
2.3.2.2.	Selektivität und Kapazität.....	26
2.3.2.3.	Eigenschaften der ausgewählten Sorbentien für die Festphasenextraktion	26
2.3.2.4.	Prinzip der Analytik	27
2.3.3.	Lipidextraktion aus biologischem Material.....	28
2.3.3.1.	Isolierung verschiedener Lipidklassen	29
2.3.3.2.	Lagerung der Fettsäuren.....	30
2.3.4.	Gaschromatographie	30
2.3.4.1.	Grundlagen.....	30
2.3.4.2.	Aufbau des Gaschromatographen.....	31
2.3.4.3.	Analyse am Gaschromatographen.....	32
2.3.4.4.	Derivatisierung von Fettsäuren.....	33
2.3.4.5.	Flammenionisationsdetektor.....	34
2.3.4.6.	Chromatogramm.....	35
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	36
3.1.	Allgemeine Daten zu den Fütterungsstudien.....	36
3.1.1.	Versuchstiere.....	36
3.1.2.	Aufbau der Fütterungsversuche	36
3.1.2.1.	Fütterungsstudie mit 12 Hunden, die mit fischöhlhaltiger Diät gefüttert wurden	37
3.1.2.2.	Fütterungsstudie mit 16 Katzen, die mit fischöhlhaltiger Diät gefüttert wurden.....	38
3.1.2.3.	Fütterungsstudie mit Hunden, die mit Omega-3-fettsäurehaltigen Mikroalgen gefüttert wurden.	39
3.1.3.	Versuchsfutter	40
3.1.4.	Blutgewinnung.....	43
3.2.	Gewinnung der Gesamtfettsäuren aus dem Serum von Hunden und Katzen.....	44
3.2.1.	Prinzip.....	44
3.2.2.	Reagenzien und Material	44
3.2.3.	Apparate.....	45
3.2.4.	Vorbereitung der Glaswaren	45
3.2.5.	Durchführung der Bestimmung der Gesamtfettsäuren.....	45
3.3.	Derivatisierung der Fettsäuren zur GC-Bestimmung	46
3.3.1.	Prinzip.....	46
3.3.2.	Reagenzien und Material	46
3.3.3.	Apparate.....	47
3.3.4.	Durchführung der Derivatisierung	47
3.3.5.	Gaschromatographische Arbeitsbedingungen.....	48
3.3.5.1.	Parametereinstellungen der Messung	48
3.3.6.	Gaschromatographische Bestimmung.....	49
3.3.6.1.	Identifizierung der Fettsäuren.....	49

3.4. Messung der Triglycerid-, Phospholipid- und Fettsäurestandards	49
3.4.1. Prinzip.....	49
3.4.2. Reagenzien und Material	50
3.4.2.1. Messung des Triglyceridstandards	50
3.4.2.2. Messung des Phospholipidstandards	50
3.4.2.3. Messung der freien Fettsäure.....	50
3.5. Auftrennung der Lipidklassen mit Aminopropylsäulen	51
3.5.1. Reagenzien und Material	51
3.5.2. Apparate.....	51
3.5.3. Durchführung der Lipidklassentrennung mit einer Aminopropylsäule.....	52
3.5.4. Ausbeute mit Standards über die Aminopropylsäule	53
3.6. Statistische Auswertung	53
4. ERGEBNISSE	54
4.1. Serumanalysen	54
4.1.1. Gesamtfettsäuren im Hundeserum unter Fischöleinfluss	54
4.1.1.1. Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren.....	57
4.1.2. Gesamtfettsäuren im Katzenserum unter Fischöleinfluss	58
4.1.2.1. Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren.....	61
4.1.3. Gesamtfettsäuren im Hundeserum unter Algeneinfluss	63
4.1.3.1. Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren	64
4.2. Trennung der Lipidklassen mit einer Aminopropylsäule	65
4.3. Trennung der Lipidklassen mit einer Silicasäule	67
5. DISKUSSION	69
5.1. Serumanalysen der Fütterungsstudien	69
5.1.1. Fettsäureanalyse von Hundeserum nach fischöhlhaltiger Fütterung.....	69
5.1.2. Fettsäureanalyse von 16 Katzen nach fischöhlhaltiger Fütterung.....	72
5.1.3. Fettsäureanalyse von 8 Hunden mit Algenfütterung	75
5.1.4. Vergleich der Fütterungsstudien	78
5.2. Trennung der Lipidklassen	79
5.3. Analysetechnische Hinweise	83
6. ZUSAMMENFASSUNG	84

7. SUMMARY	85
LITERATURVERZEICHNIS	86
8. DANKSAGUNG	98
9. LEBENSLAUF	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Speicher- und Mebranlipiden (Lehninger et al. ,1998).....	6
Abbildung 2: Chemische Struktur der Glycerophospholipidklassen mit unterschiedlichen polaren Kopfgruppen (Lottspeich und Zorbas, 1998)	7
Abbildung 3: Strukturformeln verschiedener Fettsäuren (Metz, 2000).....	12
Abbildung 4: Schema der Metabolisierung von Linolsäure (LA) und α -Linolen-säure (LNA) zu Fettssäuren der Omega-6- und Omega-3-Reihe (modifiziert nach Metz 2000).....	14
Abbildung 5: Schema der Eicosanoidsynthese aus den biologischen Vorstufen Arachidonsäure und Eicosapentaensäure (modifiziert nach Metz, 2000)	16
Abbildung 6: Aufbau einer SPE-Säule (NN, 2001)	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines gaschromatographischen Systems (NN ,2002)	31
Abbildung 8: Aufbau eines FID und chemische Reaktionen im FID (Kolb, 1999).....	35
Abbildung 9: Versuchsaufbau der Fütterungsstudie mit Hunden unter Fischölzusatz (Adler, 2002).....	37
Abbildung 10: Darstellung des Versuchsablaufs der cross-over Studie mit Katzen bei den einzelnen Versuchsphasen und dem jeweils eingesetzten Futter: Versuchsfutter mit Fischöl bzw. Kontrollfutter mit Rindertalg (Wilhelm, 2002)	38
Abbildung 11: Versuchsaufbau der Fütterungsstudie mit Hunden unter Algenzusatz (Frischknecht, 2003).....	39
Abbildung 12: Gesamtfettsäuren im Serum von Hunden bei Fütterung von Talg bzw. Fischöl (n=12).....	56
Abbildung 13: Gesamtfettsäuren im Serum von Katzen bei Fütterung von Talg bzw. Fischöl (n=16).....	61
Abbildung 14: Gesamtfettsäuren im Serum von Hunden bei Fütterung mit Algen.....	64
Abbildung 15: Anstieg der Eicosapentaensäure bei 12 Hunden nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung.....	70
Abbildung 16: Anstieg der Docosahexaensäure bei 12 Hunden nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung.....	71

Abbildung 17: Anstieg der Eicosapentaensäure bei 16 Katzen nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung.....	73
Abbildung 18: Anstieg der Docosahexaensäure bei 16 Katzen nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung.....	74
Abbildung 19: Verlauf der Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure	77

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht von ungesättigten Fettsäuren aus der Omega-3- und Omega-6-Familie	11
Tabelle 2: Biologische Effekte der Eicosanoide aus der Arachidonsäure und Eicosapentaensäure	17
Tabelle 3: Polarität verschiedener Lösungsmittel für die Festphasenextraktion	27
Tabelle 4: Prozentuale Zusammensetzung bestimmter mehrfach ungesättigter Fettsäuren im Versuchsfutter (modifiziert nach Adler, 2002)	40
Tabelle 5: Herstellerangaben über die Gehalte der Omega-3- und Omega-6- Fettsäuren von Versuchs- und Kontrollfutter, ausgedrückt in ihrem prozentualen Anteil an der ursprünglichen Substanz und im Bezug auf den Bruttoenergiegehalt der beiden Futtermittel (modifiziert nach Wilhelm).....	41
Tabelle 6: Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollfutter hinsichtlich ihres Gesamtgehaltes an Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren, dem n-6/n-3-Verhältnisses sowie dem Verhältnis von Docosahexaensäure zu Eicosapentaensäure (modifiziert nach Wilhelm, 2002)	41
Tabelle 7: Algenzuteilung in den verschiedenen Fütterungsperioden (modifiziert nach Frischknecht, 2003)	42
Tabelle 8: DHA- Zuteilung in den verschiedenen Fütterungsperioden (modifiziert nach Frischknecht, 2003)	42
Tabelle 9: Durchschnittliches Fettsäuremuster der DHA GOLD Algen™ laut Deklaration des Herstellers (modifiziert nach Frischknecht, 2003)	43
Tabelle 10: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Hunden in Gruppe A (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte.....	54
Tabelle 11: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Hunden in Gruppe B (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte.....	55
Tabelle 12: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren im Serum der Hunde in Gruppe A (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren	57
Tabelle 13: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren im Serum der Hunde in Gruppe B (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren	58

Tabelle 14: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Katzen in Gruppe A (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte	59
Tabelle 15: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Katzen in Gruppe B (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte	60
Tabelle 16: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren aus dem Katzenserum in Gruppe A (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren	62
Tabelle 17: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren aus dem Katzenserum in Gruppe B (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren	62
Tabelle 18: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % im Serum der Hunde (n = 8) in den entsprechenden Zeitabschnitte, die an der Algenfütterungsstudie teilgenommen haben	63
Tabelle 19: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren im Serum der Hunde (n = 8) in den entsprechenden Versuchsabschnitten in % der Gesamtfettsäuren	65
Tabelle 20: Elutionsschema bei einer Aminopropylsäule	65
Tabelle 21: Ausbeute und Verluste in Prozent der Fettsäuren des Lipid-Mix, der auf eine Aminopropylsäulen aufgetragen wurde und mit dem Elutionsschema aus Tabelle 20 eluiert wurde.....	66
Tabelle 22: Ausbeute und Verluste in Prozent nach Auftrag nur eines Phospholipidstandards bei alleiniger Elution mit Methanol an Aminopropylsäulen (n=3).....	67
Tabelle 23: Ausbeute und Verluste in Prozent der Fettsäuren des Lipid-Mix, der auf eine Silicasäule aufgetragen wurde.....	68
Tabelle 24: Vergleich der Ergebnisse der externen Analysen mit den eigenen Untersuchungen nach fischöhlhaltiger Fütterung bei Hunden	72
Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse der externen Analysen mit den eigenen Untersuchungen nach fischöhlhaltiger Fütterung bei Katzen.....	75

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ALA	alpha (α) - Linolensäure
Aqua dest.	Aqua destillata
bzw.	beziehungsweise
BHT	Butylhydroxytoluol
DGLA	Dihomogamma-Linolensäure
DHA	Docosahexaensäure
EPA	Eicosapentaensäure
FAME	fatty acid methyl ester
FID	Flammenionisationsdetektor
FS	Fettsäure
Gc	Gaschromatograph
GC	Gaschromatographie
GLA	gamma-Linolensäure
kg	Kilogramm
LA	Linolsäure
LTB	Leukotrien B
mg	Milligramm
n	Anzahl
NH ₂ -	Aminopropyl-
NK	natürliche Killerzellen
n.s.	nicht signifikant
n-3	Omega- 3
n- 6	Omega- 6
PC	Phosphatidylcholin
PI	Phosphatidylinositol
PE	Phosphatidylethanolamin
PS	Phosphatidylserin
PGE	Prostaglandin E
PGI	Prostaglandin I
PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acid
RG	Reagenzglas
SPE	solid phase extraction

TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TXA	Thromboxan A
V1	Versuchsfutter 1
V2	Versuchsfutter 2

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Beim Menschen spielen die Omega-3-Fettsäuren, die von Organismen nicht selbst synthetisiert werden können, eine wichtige Rolle in der Prävention von Herz - und Kreislauferkrankungen.

In der tierärztlichen Praxis werden zunehmend Fragen zur Wirkung von diesen Omega-3-Fettsäuren bezüglich der Diätetik zur Unterstützung bei Nierenproblemen, tumorbedingter Kachexie, Allergien und Hauterkrankungen gestellt. So helfen Omega-3-Fettsäuren bei chronischer Niereninsuffizienz den renalen Hochdruck durch Senkung von PGE₂ zu reduzieren. Bei Gabe von Fischöl mit Omega-3-enthaltenden Fettsäuren zeigt sich ein positiver Effekt bei atopischer Dermatitis. Einige Futtermittelhersteller bieten spezielle Futtermittel an, wobei immer öfter Omega-3-Fettsäuren zum Einsatz kommen.

Da ein positiver Effekt von Omega-3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel (Osteoporose) beim Menschen diskutiert wird, wurde in drei früheren Fütterungsstudien der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel bei Hunden und Katzen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte als erstes eine verlässliche Methode zur Analyse der Gesamtfettsäuren etabliert werden. Dazu musste eine gaschromatographische Methode gewählt werden, in der die beiden wichtigsten Omega-3-Fettsäuren DHA und EPA bestimmt werden konnten.

Mit dieser Methode sollte das Gesamtfettsäuremuster von 20 Hunden und 12 Katzen, die an drei verschiedenen, früheren Fütterungsstudien teilnahmen, bestimmt und der Anstieg spezieller Omega-3-Fettsäuren untersucht werden.

Adler (2002) untersuchte dabei den Einfluss von Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl auf den Knochenstoffwechsel bei Hunden und stellte fest, dass die Gabe von Fischöl die Parameter des Knochenstoffwechsels nicht veränderte.

Wilhelm (2002) untersuchte bei Katzen den Einfluss von Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl auf den Knochen - und Lipidstoffwechsel. Dabei wurde der Knochenstoffwechsel der Katzen ebenfalls nicht beeinflusst. Jedoch konnten signifikante Abnahmen der Serumcholesterin und Triglyceridwerte unter Fischölgabe beobachtet werden.

Frischknecht (2003) untersuchte den Einfluss von Mikroalgen mit erhöhtem Omega-3-Gehalt auf den Knochenstoffwechsel. Dabei wurde eine signifikante Abnahme von Knochenresorptionsmarkern beobachtet, womit gezeigt werden konnte, dass die Verabreichung von Mikroalgen den Knochenstoffwechsel bei Hunden beeinflusst.

Mit der etablierten Methode sollte das Gesamtfettsäuremuster jedes einzelnen Tieres gemessen und der prozentuale Anstieg bestimmter Omega-3-Fettsäuren nach Fischölfütterung bzw. Algenfütterung ausgewertet werden und in Zusammenhang mit den Ergebnissen der bestehenden Dissertationen gebracht werden.

Als letztes sollte, vorbereitend für weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Fettsäuren von Phospholipiden in den Erythrozyten mit Hilfe der Festphasenextraktion, die Trennung der einzelnen Lipidklassen über eine Aminopropylsäule versucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Eigenschaften der Lipide

2.1.1. Definition und Eigenschaften

Es gibt keine allgemeine Definition für den Begriff Lipide (griech.: Speck). Man einigte sich auf diese Sammelbezeichnung für strukturell sehr unterschiedliche Stoffe, die aber übereinstimmende Lösungsmitelegenschaften besitzen. Allen Lipiden gemeinsam ist die schlechte Löslichkeit in Wasser, dagegen sind sie gut mit organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Benzol, Chloroform, Ether, Hexan oder Methanol extrahierbar.

2.1.2. Biologische Funktion von Lipiden

Triglyceride gehören zu den Speicherlipiden, die im weißen oder braunen Fettgewebe eingelagert sind und bei Bedarf mobilisiert werden können und sowohl Energiespeicher als auch Wärmeisolator im subkutanen Fettgewebe sind (Lottspeich und Zorbas, 1998a). Bei der Fettverbrennung werden Triglyceride unter Sauerstoffverbrauch zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert, wobei eine höhere Ausbeute an Energie als bei Kohlenhydraten und Proteinen erreicht wird. Zusätzlich fungieren sie auch als Druckfettpolster an den Nieren, Fußsohlen und der Orbita.

Vor allem Phospholipide haben die Fähigkeit zur Bildung einer Lipiddoppelschicht, deren Struktur für alle Biomembranen der Zellen nötig ist. Auf Grund ihrer Wasserunlöslichkeit und ihrer amphiphilen Eigenschaft können Phospholipide Micellen bilden. Die Biomembran ist ein Komplex aus Lipiden und Proteinen, wobei die Arten der enthaltenen Lipide die Eigenschaft der Membran beeinflusst. Die Fluidität der Biomembran wird durch einen erhöhten Cholesteringehalt bzw. einen verringerten Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren herabgesetzt. Negativ wirkt sich dies dann auf die Plasmamembran von Zellen im strömenden Blut aus, da sie gegen osmotische Schwankungen und Scherkräfte anfälliger sind und somit die Lebensdauer der Zellen verringert wird.

Eine weitere Funktion der Lipide ist die Signalübertragung. Lipide und deren Fettsäurederivate wirken im Organismus als Steroidhormone und Eicosanoide.

2.1.3. Klassifizierung der Lipide

A) einfache Lipide (nicht hydrolysierbare Lipide)

- a) Kohlenwasserstoffe: Alkane, Squalen, β -Carotin
- b) Alkohole: Cholesterol
- c) Säuren: gesättigte und ungesättigte Fettsäuren

B) komplexe Lipide

einfache Ester:

- a) Neutrallipide (Fettsäure + Glycerin) \Rightarrow Triglyceride
- b) Wachse (Fettsäuren + Fettalkohole)
- c) Sterolester (Fettsäure + Cholesterol) \Rightarrow Cholesterinester

Phospholipide:

- a) Phosphatidsäure (Fettsäure + Glycerin + Phosphat)
- b) Phosphatide (Fettsäure + Glycerin + Phosphat + Aminoalkohol)

Glykolipide

- a) Cerebroside (Fettsäure + Sphingosin + Zucker)
- b) Ganglioside (Fettsäure + Sphingosin + Zucker + Neuraminsäure)

Die heute übliche Einteilung der Lipide ist abhängig von ihrem Aufbau. Einfache Lipide wie Fettsäuren und Cholesterol lassen sich durch Hydrolyse nicht aufspalten. Bei den komplexen Lipiden ist ein Alkohol (Glycerol oder Sphingosin) mit mindestens einer Fettsäure und einer weiteren Komponente verestert. Durch Bindung von Lipiden an Proteine oder Kohlenhydrate entstehen auf diese Weise Lipoproteine und Glycolipide (Lehninger et al., 1998).

Lipide können auch nach ihrem Vorkommen in den verschiedenen Organen unterschieden werden, wie Cerebroside im Gehirn, Cardiolipin im Herzmuskel oder Sphingomyelin in den Erythrozyten (Olsson und Salem, 1997).

2.1.4. Triglyceride

Im tierischen Material stellen Triglyceride und deren Hydrolyseprodukte, die Mono- und Diglyceride, den Hauptanteil der unpolaren Esterlipide und gelten als neutrale Speicherlipide (Rutz, 2001). Man spricht von Neutrallipiden, da sie keine elektrische Ladung tragen. Triglyceride bestehen aus einem dreiwertigen Alkohol, dessen drei Hydroxylgruppen durch Fettsäuren verestert sind. Die meisten tierischen Fetten enthalten eine Mischung von gebundenen Fettsäuren, die sowohl gesättigt als auch ungesättigt sein können.

Langkettige Triglyceride

Die gebundenen Fettsäuren haben mehr als 12 C-Atome. Nahrungsfette setzen sich zu 97% aus langkettigen Triglyceride zusammen (Ruppin und Middleton, 1980). Die Fettsäurenverteilung liegt dabei mit der Ölsäure (C18:1) bei 50%, die restlichen 50% verteilen sich auf die Stearinsäure (C18:0), Linolsäure (C18:2), Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:2) und Myristinsäure (C14:0). 3% der übrigen Nahrungsfette bestehen aus einem Gemisch von Phospholipiden, Sphingolipide, Steroiden und Wachsen.

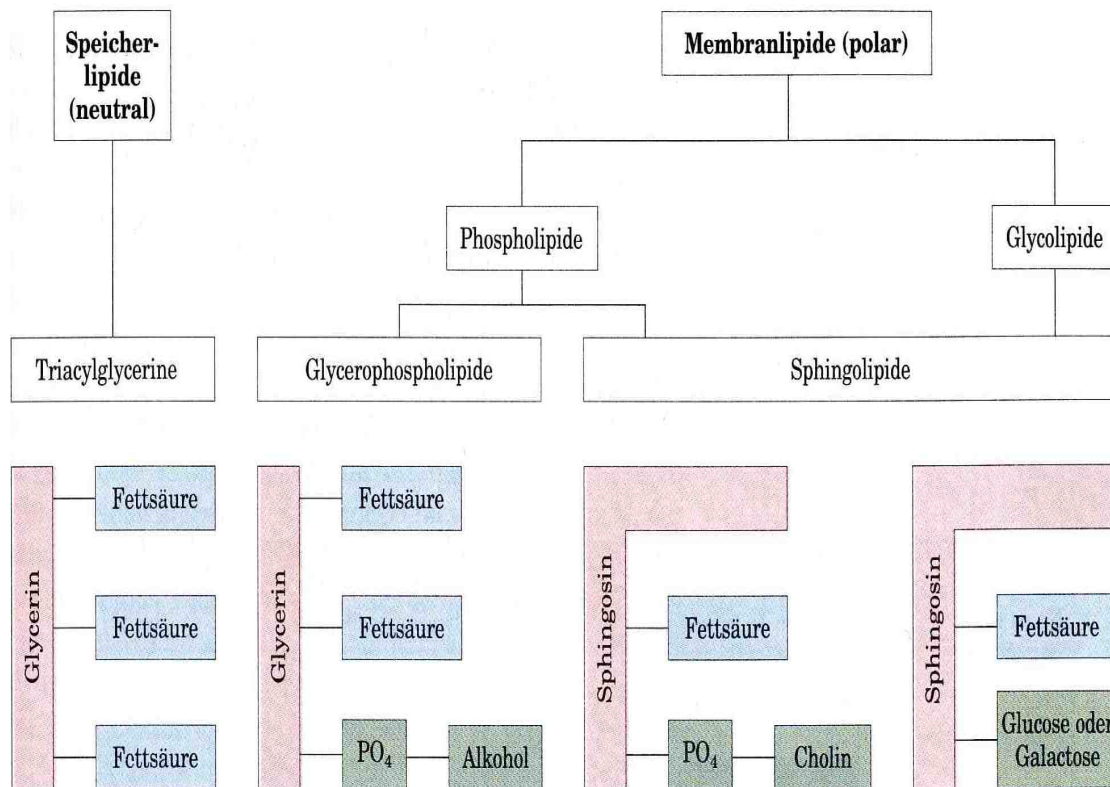
Mittelkettige Triglyceride

Sie bestehen aus 6-12 C- Atomen. Außer Kokosöl besteht das normale Nahrungsfett nicht aus mittelkettigen Triglyceriden.

2.1.5. Phospholipide

Phospholipide sind die Hauptbestandteile biologischer Membranen. Man kann die phosphorhaltigen polaren Lipide in Glycerin- und Sphingosin-Phosphatide unterteilen (Abbildung 1).

Das Grundgerüst der Glycerophospholipide oder Phosphoglyceride besteht aus einem Glycerinmolekül, wobei jedoch nur zwei der OH-Gruppen mit gesättigten oder ungesättigte Fettsäuren verestert sind. An Stelle der dritten Fettsäure wird eine Phosphatgruppe, die wiederum mit einem Alkoholmolekül verestert wird, gebunden.

Abbildung 1: Struktur von Speicher- und Membranlipiden (Lehninger et al. ,1998)

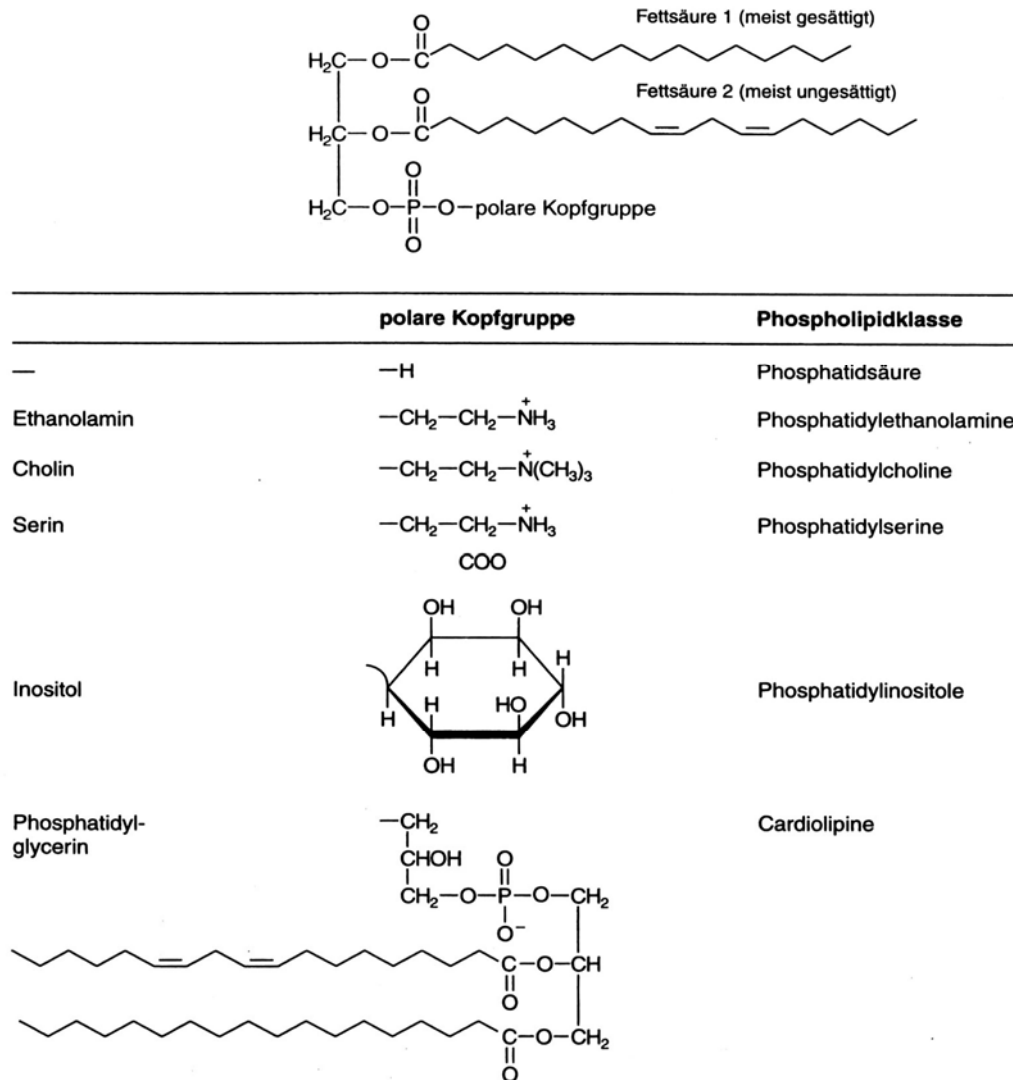
Somit handelt es sich dabei um Derivate der Phosphatidsäure. Die unterschiedlichen polaren Gruppen definieren die Phospholipidklassen wie in Abbildung 2 gezeigt.

Veresterungen mit stickstoffhaltigen Verbindungen wie Cholin und Ethanolamin bilden Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE). Aus einem mehrwertigen Alkohol wie Glycerin und dem Zucker Inositol entstehen Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylinositol (PI).

Eine Verbindung mit der Hydroxyaminosäure Serin wird als Phosphatidylserin (PS) bezeichnet. Als Monoakyl oder Lysophosphatid werden Glycerinphosphatide bezeichnet, die nur eine Fettsäure gebunden haben.

Zusammen mit den Abbauprodukten kennt man bis zu 20 verschiedene natürliche Phospholipide. PC, PE und PI sind die Hauptbestandteile des Lecithins, das aus Eigelb oder der Sojabohne extrahiert werden kann. PC und PS können aus PE gebildet werden und PE wiederum kann aus PS synthetisiert werden.

Abbildung 2: Chemische Struktur der Glycerophospholipidklassen mit unterschiedlichen polaren Kopfgruppen (Lottspeich und Zorbas, 1998)



Die Sphingolipide enthalten als Grundgerüst den Amnioalkohol Sphingosin, das als lange hydrophobe Kette praktisch die Rolle einer Fettsäure übernimmt. Wenn die Aminogruppe an C2 des Sphingosins über eine Amidbindung mit einer Fettsäure gebunden ist und beide OH-Gruppen frei sind, spricht man von einem Ceramid.

Es gibt drei Unterklassen von Sphingolipiden:

- Spingomyeline
- Neutrale Glycolipide
- Ganglioside

Gemeinsam ist ihnen die Grundstruktur eines Ceramids, jedoch unterscheiden sie sich in ihren Kopfgruppen.

Sphingomyeline enthalten PC oder PE. Durch ihre polaren Kopfgruppen werden sie zusammen mit den Glycerophospholipiden allgemein als Phospholipide bezeichnet.

Neutrale Glycolipide und Ganglioside enthalten eine oder mehrere Zucker in ihrer Kopfgruppe. Diese sind direkt an die OH-Gruppe am C1 des Ceramidmoleküls gebunden und enthalten kein Phosphat.

2.1.5.1. Funktion der Phospholipide im Organismus

Zeisel und Szyhaj (1998) haben in einer Übersicht die Funktion der Phospholipide wie folgt dargelegt.

Phosphatidylserine werden in einer intakten Zelle mit einer Translokase von der Außenseite einer Bilayerschicht nach innen transportiert. Bei einigen Prozessen wie zum Beispiel dem programmierten Zelltod wird die Translokase inaktiviert, wodurch die Phosphatidylserine auf der Zelloberfläche erscheinen. Dies wiederum katalysiert die Blutkoagulation und löst die Phagozytose der apoptotischen Zellen aus. Phosphatidylserin kommt vor allem in Zellmembranen der Gehirnzellen vor.

Sphingomyelin und deren Metabolite wie Ceramide, Sphingosine und Sphingosylphosphorylcholine sind wichtige Modulatoren des Zellwachstums, der Differenzierung und dem programmierten Zelltod (Apoptose), bei dem zerstörte Zellen eliminiert werden (Schmelz et al., 1998).

Phosphatidylcholin ist das vorherrschende Lipid (>50%) in den meisten Säugetiermembranen und eukaryotischen Zellen. Das Cholin aus den Phospholipiden ist die Vorstufe des Neurotransmitters Acetylcholin.

Bei der Hydrolyse von Phosphatidylcholin können Lysophosphatidylcholin und freie Fettsäuren entstehen, die dann als second messengers fungieren. Lysophosphatidylcholin reduziert die de novo Synthese von Phosphatidylcholinen (Chi Liang und Zeisel, 1998).

Phosphatidylethanolamin ist das zweit häufigste Phospholipid in der Zellmembran und kann als Vorstufe für die Phosphatidylcholine dienen. Eine bestimmte Mischung aus

Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin wird zum Aktivator für Faktor X in der Blutgerinnungskaskade (Pepeu et al., 1990).

Neben dem Aufbau der Biomembranen kommen Phospholipide in der Gallenflüssigkeit vor und unterstützen die Verdauung der Lipide im Darm. Außerdem wirken sie als oberflächenaktive Substanzen in der Lunge, den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes und der Niere.

2.1.5.2. Verteilung der Phospholipide und bestimmter Fettsäuren im Organismus

Nach einer Arbeit von Yeo und Horrocks (1988a) bestehen 90% der Phospholipide im Rindermuskel aus Cholin- u. Ethanolaminphosphatiden und Plasmalogenen.

Die Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA werden in bestimmte Phospholipidklassen eingebaut. Im menschlichen Organismus wird die EPA in Phospholipiden der Thrombozyten eingebaut, hauptsächlich in die PC und PE. Die DHA findet man ebenfalls vermehrt in PC, PE und PS (Schaky und Weber, 1985; Schaky 1987). In der Plasmamembran aller eukaryotischen Zellen sind die Phospholipide nicht symmetrisch verteilt. Vielmehr ist die Bilayerschicht so aufgebaut, dass die cholinischen Phospholipide (PC, Sph) im extrazytosolischen Bereich und die polaren Aminophospholipide (PS, PE) im zytosolischen Bereich vorherrschen (Zeisel und Szyhaj, 1998).

Jedes Gewebe besitzt ein eigenes Muster an Phospholipidklassen, jede Klasse hat wiederum ein eigenes Muster an Fettsäuren-Kombinationen mit unterschiedlicher Verteilung. Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung der Biomembranen durch ernährungsbedingte oder umweltbedingte Einflüsse verändert werden kann. Fettsäureverteilungen in den einzelnen Lipiden scheinen am einfachsten beeinflussbar zu sein. Lipidklassenzusammensetzungen sind am wenigstens zugänglich für Veränderungen. Veränderungen im Gesamtfettsäurenanteil müssen in Zusammenhang gebracht werden mit Veränderungen in einer oder mehrerer Lipidklasse.

Die Zusammensetzung der Fettsäuren wird sowohl durch die genetische Veranlagung als auch durch Stress, Hunger oder ernährungsbedingten Wechsel beeinflusst. Diese Möglichkeit der Veränderungen können als ein Mittel der zellulären Anpassung an die Umweltbedingungen angesehen werden, um die vitalen Funktionen aufrecht zu erhalten, d.h. das biologische Gewebe hat einen gewissen Schwankungsgrad in der molekularen Zusammensetzung (Olsson und Salem, 1997).

2.1.6. Fettsäuren

2.1.6.1. Nomenklatur der Fettsäuren

Fettsäuren sind die Bausteine der Lipide und werden auch als aliphatische Carbonsäuren bezeichnet.

kurzkettige FS: 1-7 C-Atome

mittlerekettig FS : 8-12 C -Atome

langkettig FS: >12 C-Atome

Etwa 50 natürliche Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C 4 - C 36 kommen in Lipiden vor, wobei die meisten Fettsäuren eine Kettenlänge zwischen C8-C22 aufweisen (Metz, 2000). Je länger die Kohlenstoffkette ist, desto stärkere van der Waals-Kräfte treten auf, um so geringer ist die Flüchtigkeit und um so höher liegt der Schmelz- und Siedepunkt.

Je nach Grad ihrer Wasserstoffsättigung spricht man von gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA).

Eine Fettsäure besteht aus einer Kohlenwasserstoffkette, an deren einem Ende eine Carboxylgruppe (COOH -Säuregruppe) und am anderen eine Methylgruppe hängt.

Die Doppelbindungen werden vom Methylenende gezählt. Das C-Atom mit der Methylgruppe wird als Omega (ω bzw. n) - Ende bezeichnet. Man gibt somit immer die Position der ersten Doppelbindung in Bezug auf das ω -Ende an.

Bei der α -Linolensäure (LNA) gibt es folgende Schreibweise: 18:3 n-3 bedeutet, dass diese Fettsäure aus 18 C- Atomen mit 3 Doppelbindungen besteht, wobei die Zählung am Methylenende beginnt und somit die erste Doppelbindung zwischen C3 und C4 liegt.

2.1.6.2. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

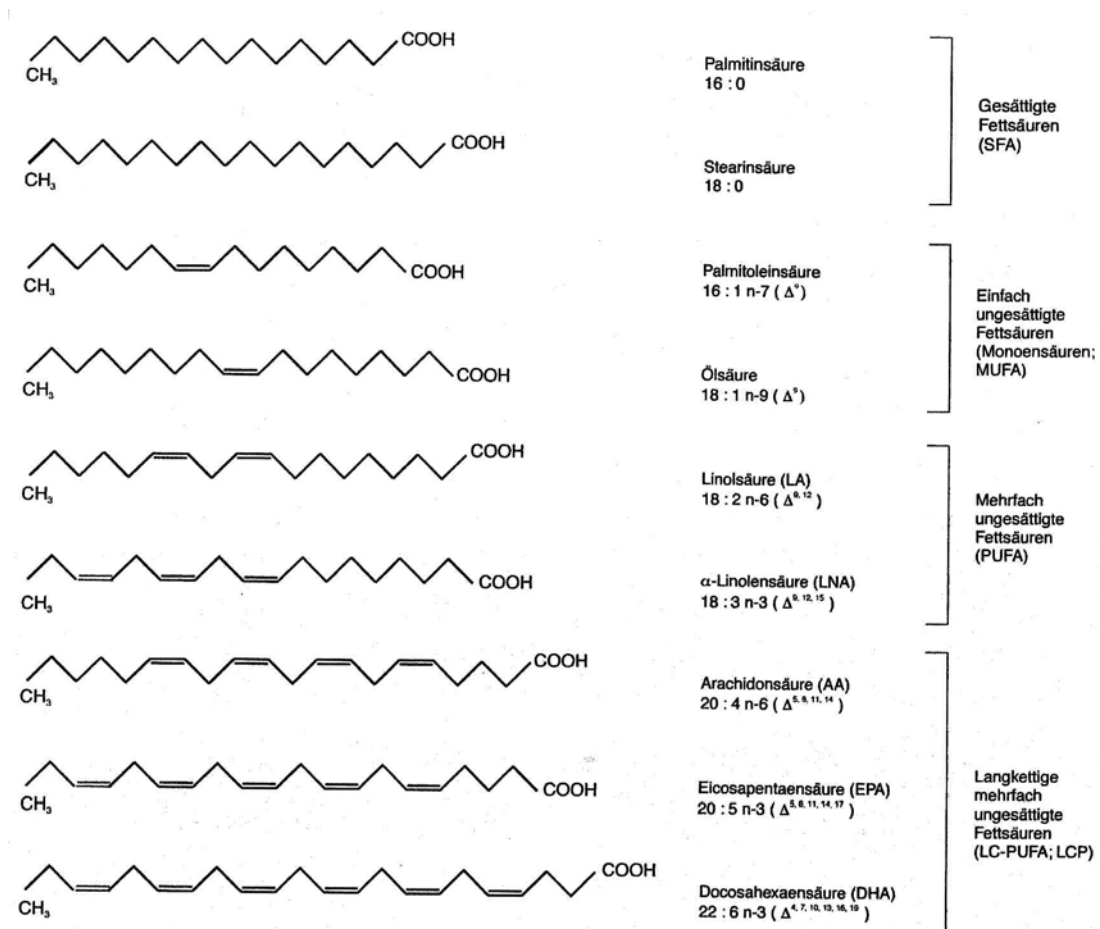
Es gibt vier Hauptfamilien mehrfach ungesättigter Fettsäuren:

Omega-3-, Omega-6-, Omega-7-, Omega-9- Fettsäuren, die auch als n-3-, n-6-, n-7-, n-9-Fettsäuren bezeichnet werden. In Tabelle 1 ist eine Übersicht von Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren und in Abbildung 3 die Strukturformeln einiger Fettsäuren dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht von ungesättigten Fettsäuren aus der Omega-3- und Omega-6-Familie

Strukturformel	C-Atome	Doppelbindungen	Abkürzung	Trivialname
Omega-3-Familie				
18:3 n3	18	3	LNA	α -Linolensäure
18:4 n3	18	4		Stearidonsäure
20:3 n3	20	3	ETA	Eicosatriensäure
20:4 n3	20	4		Eicosatetraensäure
20:5 n3	20	5	EPA	Eicosapentaensäure
22:5 n3	22	5	DPA	Docosapentaensäure
22:6 n3	22	6	DHA	Docosahexaensäure
24:6 n3	24	6		Tetracosahexaensäure
Omega-6-Familie				
18:2 n6	18	2	LA	Linolsäure
18:3 n6	18	3	GLA	γ -Linolensäure
20:2 n6	20	2		Eicosadiensäure
20:3 n6	20	3		Homo- γ -Linolensäure
20:4 n6	20	4	AA	Arachidonsäure
22:2 n6	22	2		Docosadiensäure
22:4 n6	22	4		Docosatetraensäure
22:5 n6	22	5	DPA	Docosapentaensäure

Abbildung 3: Strukturformeln verschiedener Fettsäuren (Metz, 2000)



Als Grundbausteine der Omega-3- und Omega-6-Familie müssen α -Linolensäure und Linolsäure als essentielle Fettsäure beim Menschen mit der Nahrung aufgenommen werden. Für Hund und Katze ist die omega-6-Fettsäure Linolsäure (18:2 n-6) ebenfalls essentiell (Bauer, 1997).

Hansen und Wiese beobachteten schon 1951 bei Mangel an Linolsäure Wachstumsverlangsamung, Fertilitätsstörungen und Hautveränderungen, wobei mit Gabe von Linolsäure und einem geringen Teil von Arachidonsäure die Krankheitserscheinungen verschwanden.

Für die Katze ist außerdem die omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (20:4n-6) essentiell. Da die Katze eine niedrige Enzymaktivität der Δ^6 -Desaturase aufweist, kann nur wenig von der Linolsäure über Zwischenschritte in die Arachidonsäure umgewandelt werden. Somit ist die Eigensynthese aus Linolsäure zu Arachidonsäure nicht bedarfsdeckend gesichert. Die Konsequenz daraus ist, dass bei einer erniedrigten Δ^6 -Desaturase-

Aktivität ebenfalls die Umsetzung von α -Linolensäure zu EPA und DHA vermindert ist und somit vermutet Bauer (1992), dass die Katze gegenüber Omega-3 Supplementierung empfindlicher als andere Spezies sein könnte. Die Omega-3-Fettsäure α -Linolensäure (18:3 n-3) ist für beide bedingt essentiell.

2.1.6.3. Biosynthese der Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren

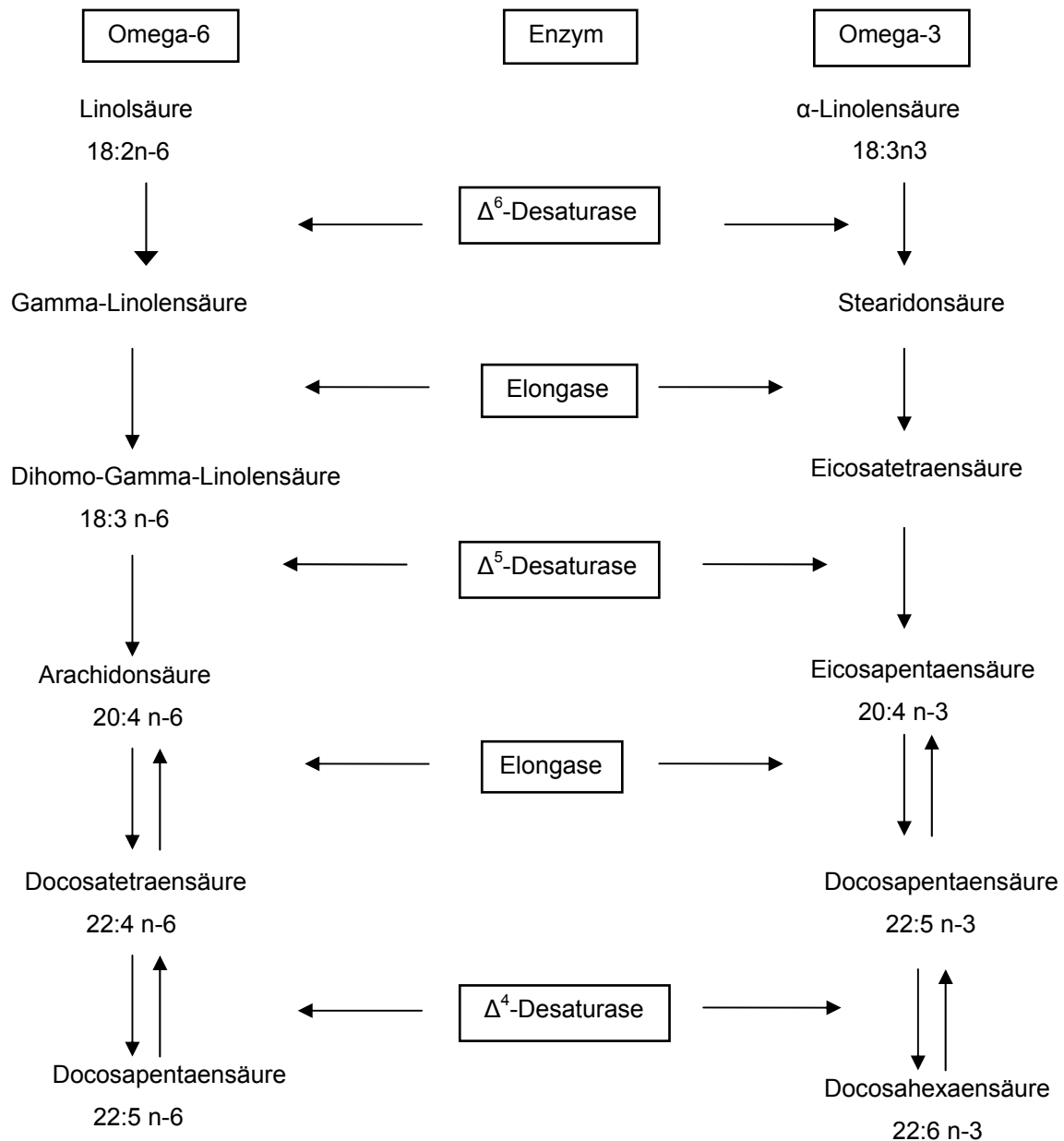
In tierischen Zellen können nur einfach ungesättigte Fettsäuren synthetisiert werden, während die mehrfach ungesättigten wie Omega-6 und Omega-3-Fettsäuren essentiell beim Säugetier sind und über die Nahrung zugefügt werden müssen.

Eine Δ -9-Doppelbindung können Säugetiere leicht in gesättigte Fettsäuren einbauen, was zur Bildung von einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFAs) wie der Ölsäure oder Palmitoleinsäure führt. Der Einbau weiterer Doppelbindungen zwischen C-10 und dem Methylenende ist beim Säugetier nicht möglich.

Linolsäure und Linolensäure sind nicht ineinander umwandelbar, d.h. Omega-3-Fettsäuren können nicht in Omega-6-Fettsäuren umgewandelt werden oder umgekehrt. Nur Pflanzen können diesen Reaktionsschritt durchführen, da sie die Δ -15-Desaturase besitzen (Calder, 2001a).

Pflanzen besitzen die Δ -6, Δ -9, Δ -12, Δ -15 - Desaturasen (Calder, 2001b), mit denen sie Doppelbindungen einbauen und so aus Ölsäure Linolsäure katalysieren können. Der Grund, wieso in Pflanzen vermehrt Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren gebildet werden, liegt darin, dass Pflanzen über diese mehrfach ungesättigten Fettsäuren ihre Kälteempfindlichkeit vermindern (Ishizaki-Nishizawa et al.1996). In Algen und Phytoplankton hat man eine erhöhte Menge an Omega-3-Fettsäuren festgestellt. Über die Nahrungskette gelangen die Fettsäuren in die Fische und dienen dort ebenfalls als Kälteschutz, in dem die Fettsäuren durch Einbau in die Zellmembranen die Fluidität erhöhen (Metz, 2000).

Abbildung 4: Schema der Metabolisierung von Linolsäure (LA) und α -Linolensäure (LNA) zu Fettssäuren der Omega-6- und Omega-3-Reihe (modifiziert nach Metz 2000)



Tier und Mensch können aus Linolsäure und α -Linolensäure die entsprechenden Derivate der Omega-3- bzw. Omega-6-Reihe im endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Peroxisomen bilden (Mimouni und Christiansen et al., 1991). Im Vergleich zum Menschen ist die Syntheseleistung des Tieres jedoch deutlich erhöht.

In der Omega-3-Familie wird aus der α -Linolensäure (LNA, 18:3n-3) als Vorstufe über Zwischenschritte Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n-3), Docosapentaensäure (DPA, 22:5n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3) gebildet.

In der Omega-6-Familie gilt die Linolsäure (LA, 18:2n-6) als Ausgangspunkt für andere Omega-6-Fettsäuren und über Zwischenschritte wird die Arachidonsäure (AA, 20:4n-6) metabolisiert (Taugbol et al., 1998).

In Abbildung 4 wird die Synthese der PUFA durch Desaturierung und Elongation gezeigt. Beide Omega-Fettsäurefamilien konkurrieren um dasselbe Enzymsystem, wobei bei erhöhter Linolsäureaufnahme die Δ 6-Desaturierung in Richtung Arachidonsäure forciert wird bzw. bei vermehrter Aufnahme von α -Linolensäure in Richtung Eicosapentaensäure.

Die Omega-3-Fettsäure α -Linolensäure hat die höchste Affinität zum Enzym Δ 6-Desaturase, d.h. sie hemmt kompetitiv die Desaturierung von Linolsäure zu Arachidonsäure. Je nach Konzentrationsverhältnis der Fettsäuren kommt es zu einer Konkurrenzsituation um das Enzym. Ist α -Linolensäure in hoher Konzentration vorhanden, wird die Katalyse von Linolsäure zu anderen langkettigen Omega-6-Fettsäuren wie Arachidonsäure unterdrückt, ist die Linolsäure im Überschuss vorhanden, wird die Bildung von EPA und DHA aus α -Linolensäure vermindert.

Nicht nur die Kettenverlängerung von EPA zu DHA ist möglich, sondern auch der umgekehrte Weg der Kettenverkürzung durch Verringerung einer Doppelbindung von DHA zu EPA (Barclay et al., 1998).

2.1.6.4. Funktion der Fettsäuren

Fettsäuren sind Bausteine der Lipide, die wiederum wichtige Strukturelemente der biologischen Membranen sind.

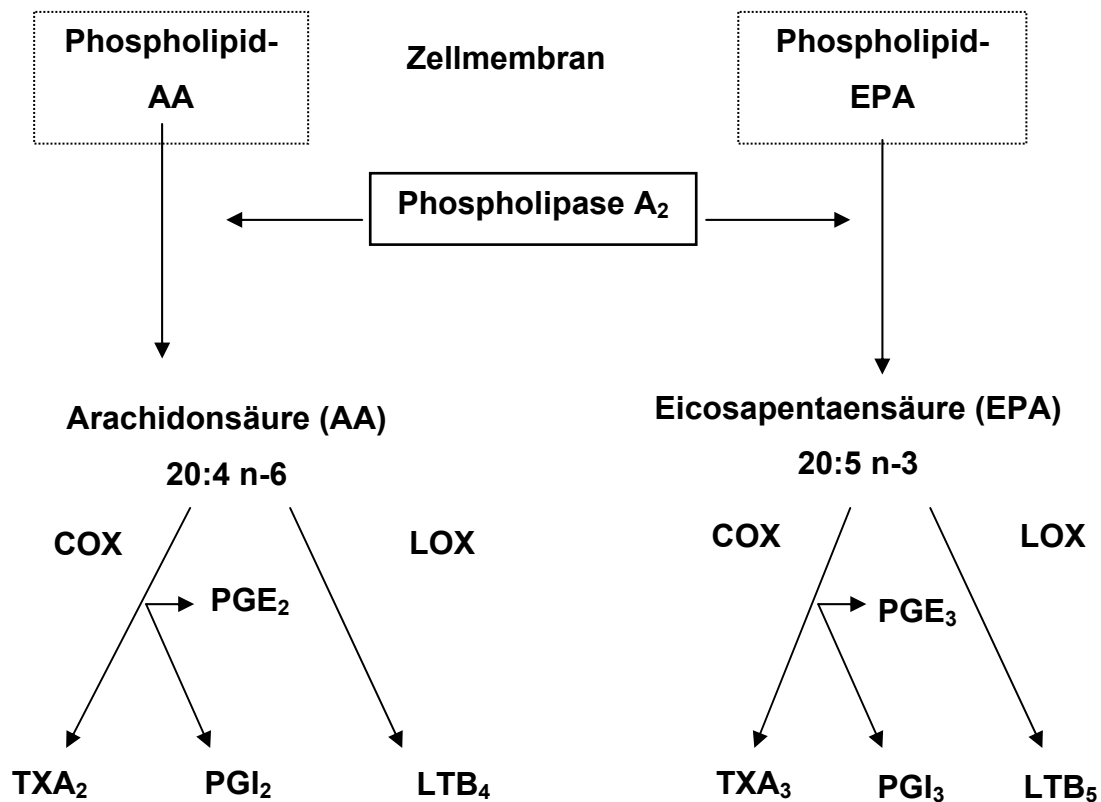
Fettsäuren spielen im Energiestoffwechsel eine wichtige Rolle, 57 % der Energie im Herzmuskel wird durch Fettsäuren gewährleistet, im Vergleich dazu 20 % durch Glucose und 18 % durch Milchsäure.

Omega-6- und Omega-3- Fettsäuren im Serum, Plasma und in Phospholipiden von Zellmembranen sind die Vorläufer der Eicosanoide, zu denen die Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene zählen. Sie regulieren als intrazelluläre Signalmoleküle und Gewebshormone im Nanogrammbereich viele Zellfunktionen.

2.1.6.5. Synthese der Eicosanoide

Tritt im Körper eine Entzündung auf, werden in Zellmembranen Phospholipasen A₂ aktiviert, die aus den Phospholipiden der Zellmembranen C-20-Fettsäuren freisetzen und diese werden zur Eicosanoidsynthese weiter metabolisiert (Abbildung 5). Abhängig von der Art der freigesetzten Fettsäure werden verschiedene Typen der Eicosanoide gebildet.

Abbildung 5: Schema der Eicosanoidsynthese aus den biologischen Vorstufen Arachidonsäure und Eicosapentaensäure (modifiziert nach Metz, 2000)

**Legende:**

COX: Cyclooxygenase, LOX: Lipooxygenase

PG: Prostaglandin ; TX:Thromboxan; LT: Leukotrien;

Wichtige Bausteine in der Synthese der Eicosanoide sind die Arachidonsäure (AA) aus der Omega-6-Familie und die Eicosapentaensäure aus der Omega-3-Familie (EPA).

Sowohl die AA als auch die EPA sind Ansatzpunkte für die Cyclooxygenase (COX) und Lipoxygenase (LOX) und somit können zwei Biosyntheserichtungen für die Eicosanoide ablaufen (Maynar et al., 2001).

2.1.6.6. Wirkung der Eicosanoide

Die Wirkung der Eicosanoide aus der Arachidonsäure und Eicosapentaensäure sind in Tabelle 2 aufgelistet (Metz, 2000).

Aus der Arachidonsäure werden Prostaglandine der 2-er Reihe, Thromboxan A₂ und Leukotrien der 4-er Reihe gebildet. Sie wirken proinflammatorisch, vasokonstriktorisch, immunsuppressiv und fördern die Aggregation der Blutplättchen.

Aus der Eicosapentaensäure werden Prostaglandine der 3er-Reihe, Thromboxan A₃ und Leukotrien, der 5er-Reihe metabolisiert, die als entzündungshemmend, vasodilatatorisch, nicht immunsuppressiv und wenig wirksam auf die Thrombozytenaggregation gelten. Die Metaboliten der beiden Omega-Familien unterscheiden sich darin, dass die Produkte aus der EPA jeweils eine Doppelbindung mehr zwischen dritten und vierten C-Atom vom Methylenende aus gesehen enthalten.

Tabelle 2: Biologische Effekte der Eicosanoide aus der Arachidonsäure und Eicosapentaensäure

Omega-Familie	Eicosanoide	Abkürzung	Wirkung der Produkte	Enzymweg	Ort der Bildung
Omega-6 AA	Thromboxan A ₂	TXA ₂	Plättchenaggregation, Vasokonstriktion	Cyclooxygenase (COX)	Plättchen
	Prostaglandin	PGI ₂	aggregationshemmend, vasodilatierend	Cyclooxygenase (COX)	Endothelzellen
	Leukotrien B ₄	LTB ₄	chemotaktisch, zelladhäsiv, stark entzündungsfördernd	Lipoxygenase (LOX)	Leukozyten, Granulozyten, Makrophagen
Omega-3 EPA	Thromboxan A ₃	TXA ₃	biologisch nahezu inaktiv	Cyclooxygenase (COX)	Plättchen
	Prostaglandin	PGI ₃	aggregationshemmend vasodilatierend	Cyclooxygenase (COX)	Endothelzellen

	Leukotrien B ₅	LTB ₅	nicht-chemotaktisch, nicht zelladhäsiv entzündungshemmend	Lipoxygenase (LOX)	Leukozyten, Granulozyten, Makrophagen
--	---------------------------	------------------	---	-----------------------	---

Durch vermehrten Einbau von EPA oder DHA in die Phospholipide der Zellmembranen, wird die AA in den Phospholipiden verdrängt, wodurch der Ausgangsstoff für Eicosanoide der 2-er Reihe vermindert wird. EPA und DHA hemmen beide kompetitiv den COX-Weg, auf dem LOX-Weg wirken sie nicht direkt hemmend, jedoch konkurrieren beide um das Enzym (Metz, 2000). Die Bildung und Freisetzung von Leukotrien insgesamt bleibt zwar in den Zellen unverändert, aber die Menge an Leukotrien B₄ wird verringert und von Leukotrien B₅ erhöht, so dass die entzündungsfördernde Wirkung abnimmt und die entzündungshemmende Wirkung gefördert wird.

2.2. Bedeutung der Omega-Fettsäuren

2.2.1. Entwicklung der Omega-6- und Omega-3- Fettsäuren in der Ernährung

Die Ernährung unserer Urahnen, die hauptsächlich als Jäger und Sammler lebten, war reicher an Proteinen, Ballast- und Pflanzenstoffen und ärmer an Zucker und Fett. In unserer heutigen westlichen Ernährung wird doppelt so viel Fett wie im Paläolithikum aufgenommen (Eaton und Konner, 1985) und zusätzlich hat sich ganz entscheidend die Zusammensetzung der Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren verändert. Der Gehalt an Omega-3-Fettsäuren ist gesunken und das Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren ist heutzutage erhöht und liegt bei 25:1, während es im Paläolithikum bei 2:1 lag (Simopoulos 1991, 1998, 1999 und 2000, Eaton und Konner 1985).

Eine Ursache dafür liegt darin, dass unsere Vorfahren als Fleischquelle Wild mit einem Fettanteil von ca. 5% gegessen haben und bei unseren heutigen Schlachttieren der Fettanteil ca. 30% beträgt. Wildtiere fressen im Vergleich viel Moos und Farne, die reich an EPA sind. So beträgt bei Wild der Omega-3-Gehalt im Gesamtfett bis zu 5%, das Fleisch unserer Haustiere enthält jedoch keine Omega-3-Fettsäure, aber einen hohen Anteil an der Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (Metz 2000).

Durch die Entwicklung des Ackerbaus wurde Getreide in den Speiseplan aufgenommen. Mais, Weizen und Reis ersetzen die Wildpflanzen in der Nahrung, was dazu führte, dass sich der Anteil der Omega-6 : Omega-3 Fettsäuren ebenfalls erhöhte.

Eine ähnliche Tendenz des Omega-6:Omega-3-Verhältnisses sieht man bei Lachs bzw. anderen Fischarten aus Zuchtbetrieben, die im Vergleich zu ihren wildlebenden Artgenossen ebenfalls weniger Omega-3-Fettsäuren enthalten (van Fliet und Katan, 1990).

Studien zeigen, dass aufgrund einer sehr fischreichen Ernährung die Fettsäureverhältnisse beim Menschen unterschiedlich sind. Eskimos, die fast ausschließlich von Fisch leben, haben ein Verhältnis von Omega-6:Omega-3 Fettsäuren von ca. 1:3. Bang und Dyerberg (1972; 1976) beobachteten in den 70er Jahren, dass Eskimos viel weniger an koronaren Herzerkrankungen und Krebs erkrankten als die Bevölkerung in den westlichen Industrieländern.

Auch bei Japanern, die eine sehr fischreiche Nahrung zu sich nehmen, stellte man noch ein günstiges Omega-6:Omega-3 Verhältnis von 3:1 fest.

In der westlichen Welt kehrte sich dies vollständig zwischen 15 bis 50: 1 um (Kelly, 1991), wobei der Durchschnitt bei 25:1 laut einer Untersuchung in der USA von 1987 liegt (Raper und Exler, 1991).

2.2.2. Nahrungsquellen für Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren

Omega-6-Fettsäuren wie die Arachidonsäure kommen hauptsächlich in tierischen Fetten vor. Die Linolsäure findet man reichlich in Getreidesamen und Pflanzenölen wie Sonnenblumen, Mais, Soja und Saflor. Reich an Gamma-Linolensäure sind die Samen von Borretsch, Nachtkerze und schwarzer Johannisbeere.

Langkettige Omega-3-Fettsäuren kann man vermehrt in Lammfleisch, Seefisch, Flachs und Leinsamen nachweisen. Ebenfalls erhöhte Gehalte sind in Algen, Phytoplankton, Seevögeln und Meeressäuger wie Robben und Wale messbar. Besonders reich an ungesättigten Fettsäuren sind die Fischöle mit bis zu 75%, wobei EPA und DHA als wichtigste Vertreter der Omega-3-Familie vermehrt in Ölen von Meeresfischen wie Sardinen, Heringen, Makrelen und Lachsen vorkommen (Zöllner und Tato, 1992; Sassen et al., 1994). Da sich Seefische hauptsächlich von Phytoplankton ernähren, ist der erhöhte Gehalt an DHA und EPA im Vergleich zum mageren Süßwasserfisch erklärbar.

Lein-, Raps-, Soja -, Schwarzkümmel - und Walnussöl beinhalten höhere Konzentration an α -Linolensäuren (LNA). Das Öl der asiatischen Nutzpflanze Perilla enthält bis zu 64% LNA und jeweils 20% Ölsäure und Linolsäure. Den höchsten Gehalt an LNA misst

man bei der alten Kulturpflanze Portulak mit 300-400 mg LNA/100g frischen Blättern (Metz, 2000).

2.2.3. Klinische Bedeutung der Omega-3-Fettsäuren beim Menschen

Die Wichtigkeit der Omega-3-Fettsäuren für die Entwicklung und Gesundheit des menschlichen Organismus wurde durch viele Studien belegt.

Sie werden bei der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen, vor allem für die Senkung des Arterioskleroserisikos durch Verminderung des Serumcholesterolspiegels eingesetzt. Des Weiteren zur Behandlung von Hypertonie, Diabetes mellitus, Allergien und Psoriasis (Trautwein, 1999).

Manche Autoren zählen sie auch bei der Prävention bzw. Therapie von Autoimmunkrankheiten und Krebs auf (Metz, 2000). Beobachtungen zeigen, dass Menschen mit fischreicher Ernährung weniger an Krebs erkranken.

In Zellkulturen konnte man zeigen, dass Omega-3-Fettsäuren die Expression von Onkogenen reduziert. Linolsäure förderte das Tumorstadium, während die α -Linolensäure die Größe und Anzahl der Tumore verringerte (Galli et al., 1994).

Simopoulos beschrieb 2002 die anti-inflammatorischen Effekte der EPA und DHA bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, ulcerative Colitis, Lupus erythematoses und anderen chronischen Erkrankungen wie Multiple Sklerose.

Die Omega-3-Fettsäuren sind ebenfalls nötig für die Gehirnentwicklung und Sehfähigkeit (Simopoulos, 1991) eines Neugeborenen, so dass Experten seit der International Conference on Highly Unsaturated Fatty Acids in Nutrition and Disease Prevention im November 1996 die Anreicherung von Omega-3-Fettsäuren in der Säuglingsmilchnahrung empfehlen (Metz, 2000).

Zudem können und werden sie in der Präventionstherapie bei Depressionen eingesetzt (Trautwein, 1999; Chiu et al., 2003).

In der Nahrung wird ein Verhältnis von ungesättigten zu einfach und zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren von 10:10:10 und ein Verhältnis von Omega-6 und Omega-3-Fettsäuren von 5:1 angestrebt. Beim Menschen bestehen die Omega-3-Fettsäuren zu 85 % aus α -Linolensäure. Aus ihr können durch Eigensynthese in Folge von Elongation bzw. Desaturierung EPA und DHA hergestellt werden (Metz, 2000).

Simopoulos (2000) hat beim Menschen den Bedarf an Linolsäure bei 2% und an Linolensäure bei 3% der Gesamtenergie festgelegt. EPA und DHA sollen bei ca. 0,3% der Gesamtenergie liegen, was einer Aufnahme von EPA und DHA je 220 mg /Tag bei einer 2000 kcal Ration entspricht.

Für schwangere und stillende Frauen ist ein erhöhter Bedarf von 300 mg DHA/Tag erforderlich, um die Gehirn und Retinaentwicklung des Kindes nicht zu gefährden.

2.2.4. Klinische Bedeutung der Omega-3-Fettsäuren beim Tier

Therapeutisch werden die Omega-3-Fettsäuren beim Hund bei allergischen Hauterkrankungen (Bond und Lloyd, 1994, Logas und Kunkle, 1994), bei Nierenerkrankungen (Brown et al. 1998, 2000), Tumoren (Ogilvie et al., 2000) und chronischen Entzündungen (Hall et al., 1999) verabreicht.

Bei Katzen mit miliarer Dermatitis beschreiben Lechowski et al. (1998) eine Verbesserung der klinischen Symptome bei Gabe von Omega-3-Fettsäuren.

Ein Mangel an essentiellen Fettsäuren führt zu einem schlechten Zustand des Fells und der Haut. Veränderte Keratinisierung führt zu epidermaler Hyperplasie, Hypergranulose und parakeratotische Hyperkeratose der Haut (Cleff-Matzak und Reinhart, 1999).

Bei der Katze kann der Mangel zu Fortpflanzungsstörungen führen (Cleff-Matzak und Reinhart, 1999).

1989 konnten Chang et al. bei Ratten durch vierwöchige Gabe von EPA in einer Dosierung 100 mg/kg/Tag Leukotrien B₄ senken und eine hemmende Wirkung auf die NK-Zellen feststellen, die bei autoimmunen Erkrankungen zellzerstörend wirken.

In der Studie von Vaughn et al. (1994) wurden 5 Diäten mit unterschiedlichen Omega-6:Omega-3-Fettsäurenverhältnissen (5:1, 10:1, 25:1, 50:1, 100:1) an 30 Beagle über 12 Wochen verabreicht. Leukotrien B₄ als ein inflammatorisches Eikosanoid und Leukotrien B₅ als ein noninflammatorisches Eikosanoid wurden in Haut, Plasma und in den Neutrophilen Granulozyten gemessen. Der Entzündungsmediator Leukotrien B₄ fiel bei 5:1 um ca. 75 %, bei 10:1 um ca. 50%, bei 25:1 um ca. 25% und war bei den Verhältnissen 50:1 und 100:1 nahe zu gleich wie die Basislinie, d.h. bei einem niedrigen Omega-6:Omega-3-Verhältnis wird das proinflammatorische Leukotrien um 50-75% reduziert.

Das noninflammatorische Leukotrien B₅ war beim Verhältnis 5:1 um 75%, bei 10:1 um ca. 40% erhöht, bei den Verhältnissen 25:1, 50:1 und 100:1 nahezu gleich unverändert zur Basislinie.

Man konnte durch diese Untersuchungen feststellen, dass der Pruritus auf zellulärer Ebene über die Nahrung beeinflusst werden kann. Wenn in der Nahrung die Omega-6:Omega-3 Fettsäuren auf ein Verhältnis von 5:1 oder 10:1 eingestellt werden, dann kommt es in der Haut, Plasma und den neutrophilen Granulozyten durch einen Abfall von Leukotrien B₄ und Anstieg von Leukotrien B₅ zu einer Reduzierung der Entzündungsreaktionen. Durch diesen Ernährungseinfluss des Omega-Fettsäure-Verhältnisses kann also eine Verschiebung von den entzündungsfördernden Mediatoren zu den eher nicht inflammatorischen Mediatoren bewirkt werden.

Mooney et al. (1998) beschreiben durch Erhöhung der Omega-3 Fettsäuren in einer Diät ebenfalls eine Abnahme der proinflammatorischen Mediatoren in der Haut und den Neutrophilen und dadurch eine Verbesserung bei der Wundheilung.

Wander et al. (1997) beobachteten bei Hauttests eine verringerte T-Zellimmunantwort, wenn das Verhältnis der Omega-6:Omega-3 verringert wurde.

Ein Futtermittelhersteller empfiehlt, dass bei Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz das Verhältnis 5:1 betragen soll. Denn dies reduziert deutlich die Prostaglandin E₂ und Thromboxan A₂ Ausscheidung im Harn und vermindert somit entzündliche Prozesse in den Nieren (Bauer et al. ,1999). Gleichzeitig wird der glomeruläre Kapillardruck gesenkt und dadurch eine weitere Schädigung der Niere durch renale Hypertonie vermieden.

2.3. Chromatographische Trennmethoden

1903 wurde der Begriff Chromatographie von dem russischen Botaniker Michael Tswett geprägt. Tswett verbrachte Petroletherextrakte von Pflanzen in einen mit Calciumcarbonat gefüllten Glaszylinder und durch kontinuierliche Zugabe von Lösungsmittel bewegte sich die anfänglich schmale gefärbte Zone durch die Säule. Dabei wanderten die grünen und gelben Pflanzenpigmente unterschiedlich schnell, so dass einzelne Banden aufgetrennt wurden. Die erste Schwierigkeit bestand darin, geeignete Trägermaterialien zu finden. Die Ausarbeitung der theoretischen Verständnisse der chromatographischen Vorgänge wurden von Archer Martin und Richard Synge weiterverfolgt, die 1952 für ihre grundlegenden Arbeiten zur Verteilungschromatographie den Nobelpreis für Chemie erhielten (Lottspeich und Zorbas, 1998).

2.3.1. Prinzip der Chromatographie

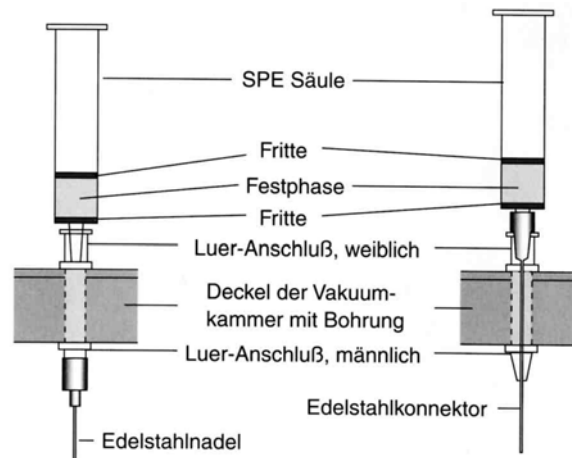
Die Chromatographie ist eine Trennmethode, bei der eine gelöste Substanz mit Hilfe eines Gases oder Flüssigkeitsstromes über eine stationäre Phase geleitet wird und dabei die einzelnen Bestandteile der Mischung aufgetrennt werden. Je nach Art der mobilen Phase unterscheidet man die Gaschromatographie (GC) von der Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography = LC), wobei die mobile Phase entweder dem Trägergas (GC) oder dem Elutionsmittel (LC) entspricht. Bei der LC unterscheidet man je nach Art des Trägermaterials Dünnschicht - oder Säulenchromatographie.

2.3.2. Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction), kurz SPE genannt, gehört zur Säulenchromatographie. Man kann sie auch als eine Adsorptionschromatographie an einer Kiesegelmatrix bezeichnen (NN, 2001).

Bei dieser speziellen Methode wird die Substanzmischung, der Analyt, in einem Lösungsmittel aufgenommen und auf bestimmte Säulen (Abbildung 6) aufgetragen.

Die mobile Phase vermittelt die Wechselwirkung des Analyten mit der spezifischen stationären Phase, die in Form eines Füllmaterials in der Säule vorliegt. Die stationäre Phase muss aus Trägermaterialien bestehen, die den Trenneffekt nicht beeinflussen und bestimmte Eigenschaften besitzen.

Abbildung 6: Aufbau einer SPE-Säule (NN, 2001)

Die physikalische Stabilität ist für den erhöhten Druck durch die Vakuunkammer wichtig, damit die Form und Festigkeit der Partikel gewahrt werden.

Zusätzlich ist die chemische Stabilität wichtig, da man mit unterschiedlichen Lösungsmitteln arbeitet. Ebenso muss das Trägermaterial so beschaffen sein, dass es von mikrobiologischen und enzymatischen Abbauprozessen geschützt ist.

Das Prinzip basiert auf einer Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und Trägermaterial und bewirkt somit einen verzögerten Transport der einzelnen Komponenten durch die Säule. Folglich benötigt das Eluat eine charakteristische Zeit, die sogenannte Retentionszeit und ein bestimmtes Volumen, das Retentionsvolumen, um das Ende der Trennsäule zu erreichen. Aufgrund der verschiedenen Wechselwirkungen der zu analysierenden Probe zur Festphase (Sorbens) und der Vielzahl an Sorbentien kann spezifisch getrennt werden. Die Festphase kann aus modifiziertem oder nicht modifiziertem Kieselgel bestehen und wird in kleine Säulen, sogenannte Kartuschen, gefüllt. Die Probe wird durch die Kartusche gesaugt, wobei die Lipide an die Kieselgelmatrix adsorbieren. Anschließend wird mit kleinen Volumina von organischen Lösungsmitteln eluiert (Sherma und Fried, 1996).

Wird im Laufe der Elution das Lösungsmittel verändert, handelt es sich um eine Gradiententrennung. Solche Veränderungen können schrittweise (Stufengradienten) oder durch kontinuierliches Mischen von mehreren Lösungsmitteln durchgeführt werden (linearer Gradient).

2.3.2.1. Molekulare Wechselwirkungen bei der Festphasenextraktion

Unmodifiziertes Kieselgel zeigt keine unpolaren Wechselwirkungen und muss chemisch verändert werden. Bei den modifizierten Kieselgelen sind über sogenannte Kohlenstoffspacer funktionelle Gruppen an die Oberfläche gebunden, die entweder unpolar oder polar sind.

unpolare Wechselwirkungen

treten zwischen Kohlenwasserstoffresten der funktionellen Gruppe der Festphase und der Probe auf. C8 bzw. C18 modifizierte Kieselgele sind unpolar und können somit das Kohlenstoffgerüst von Fettsäuren binden.

polare Wechselwirkungen

treten zwischen Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Verbindungen auf. Funktionelle Gruppe wie Amino-, Hydroxyl- bzw. Carboxylgruppen sowie aromatische Ringe, Doppelbindungen, Gruppen mit Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Sauerstoff sind polar.

Typische Vertreter mit polarem Charakter sind unmodifizierte Kieselgele und modifizierte Kieselgele mit CN, NH₂ und OH (diol) - Gruppen. Durch eine polare Lösungsumgebung wird die Adsorption von unpolare Stoffen an eine unpolare Festphasenoberfläche begünstigt, wobei die spätere Elution mit einem unpolaren Lösungsmittel erfolgt. Genau umgekehrt verhält sich die Adsorption einer polaren Verbindung an eine polare Festphase in einer unpolaren Lösungsumgebung mit anschließender polarer Lösungsmittel-Elution.

ionische Wechselwirkungen

findet man zwischen geladenen Probenpartikeln und der Festphase, wenn das Sorbens mit umgekehrt geladener funktioneller Gruppe ausgestattet ist.

2.3.2.2. Selektivität und Kapazität

Folgende Begriffe sind von Bedeutung, um optimale Bedingungen für die Festphasenextraktion zu erreichen (NN, 2001):

Selektivität:

ist die Fähigkeit einer Festphase zwischen dem Analyt und anderer Probebestandteile zu unterscheiden, d.h. den Analyten zu binden und die anderen Bestandteile nicht zu adsorbieren. Sie ist sowohl von der Struktur der Probe, von der Matrix der Festphase als auch von dem gewählten Lösungsmittel abhängig.

Die optimale Selektivität erreicht man über die richtige Auswahl der funktionellen Gruppen der Festphasenmatrix für eine bestimmte Probe.

Kapazität:

einer Festphase ist die Gesamtmenge einer Probe, die an einer bekannten Menge Sorbens unter optimalen Bedingungen adsorbiert wird.

Die Kapazitätswerte bei Kieselgel liegen bezogen auf die Menge der Festphase bei ca. 3-5 %. Die oberflächenmodifizierten Kieselgele sind in einem pH - Bereich von 2-8 stabil.

2.3.2.3. Eigenschaften der ausgewählten Sorbentien für die Festphasenextraktion

Aminopropylsäule (NH₂)


In der Kartusche befindet sich ein modifiziertes Kieselgel mit NH₂-Gruppen, die eine polare Eigenschaft besitzen. Aufgrund der Ionisierbarkeit der NH₂-Gruppen kann sie als schwacher Anionenaustauscher benutzt werden. Die Anwendung wird bei Lipiden und Spurenelementen empfohlen.

Silica- Säule (SiOH)

In der Säule befindet sich ein unmodifiziertes, schwach saures Kieselgel mit sehr polarer Matrix. Wegen der hohen Affinität gegenüber polaren Verbindungen sollte es deshalb nicht mit polaren (z.B. Methanol) oder wasserhaltigen Lösungsmitteln konditioniert werden. Hier wird die Konditionierung mit Hexan durchgeführt. Die SiOH-Säulen

adsorbieren Luftfeuchtigkeit und sollten deshalb gut verschlossen und getrocknet gelagert werden. Die Anwendung wird bei Steroiden empfohlen.

Tabelle 3: Polarität verschiedener Lösungsmittel für die Festphasenextraktion

Polarität	Lösungsmittel	Wassermischbarkeit	
Unpolar	Hexan	nein	
	Petrolether	nein	
	Cyclohexan	nein	
	Chloroform	nein	
	Diethylether	nein	
	Aceton	ja	
	Acetonitril	ja	
	Isopropanol	ja	
	Methanol	ja	
	Polar	Wasser	ja

2.3.2.4. Prinzip der Analytik

Konditionierung der Säule

auch Solvatisierung genannt, ist nötig, damit eine Probe eine reproduzierbare Wechselwirkung mit der Festphase eingehen kann. Das Lösungsmittel wird in den Poren der Festphase verteilt und durch die Benetzung des Sorbens wird eine Umgebung geschaffen, die eine Adsorption der Probe ermöglicht. Unpolare Sorbentien konditioniert man, in dem man das 2-3 fache Säulenvolumen eines polaren Lösungsmittel aufträgt, das mit Wasser mischbar ist wie Methanol, Isopropanol, gefolgt von dem Lösungsmittel, in dem die Probe gelöst ist.

Polare Sorbentien werden mit unpolaren Lösungsmitteln (Hexan) konditioniert. Die Polarität der einzelnen Lösungsmittel sind in Tabelle 3 dargestellt.

Nach dem Konditionierungsschritt darf das Sorbensbett nicht mehr trocken laufen, da sonst die Benetzung zunichte gemacht wird und keine optimale Bindung der Probe an das Sorbens erfolgen kann.

Probenauftrag (Adsorption)

Die Probe lässt man in die Festphase einziehen und aufgrund der Wechselwirkung des Analyten mit der Säule kommt es zur Adsorption an die Festphase.

Waschen des Sorbens

Dies wird üblicherweise mit einer Waschlösung vorgenommen, kann jedoch entfallen, wenn der Polaritätssprung von Waschlösung zu Eluent zu groß ist bzw. beide nicht miteinander mischbar sind. Dann wird nur ein Trocknen der Säule unter Vakuum durchgeführt.

Elution

Die Elution sollte nicht zu schnell erfolgen, sondern mit einer Geschwindigkeit von ca. 1ml / min. Die adsorbierte Probe wird durch die stufenweise Erhöhung der Elutionskraft des Lösungsmittel von der Festphase eluiert (Stufengradiententechnik).

Die Elution erfolgt mit verschiedenen Lösungsmitteln steigender Polarität, um eine klare Trennung der Analyten zu erreichen und die Probenbestandteile von der Festphase abzulösen. Zur Durchführung der Elution muss sich entweder Druck am Säuleneingang oder Vakuum am Säulenausgang befinden. Folgende Möglichkeiten sind bekannt:

Anwendung mit Einmalspritzen

Anwendung mit Saugflasche oder Vakuumkammer

Einsatz in einer Zentrifuge

2.3.3. Lipidextraktion aus biologischem Material

Die am häufigsten angewandte Methode der Lipidextraktion ist die Folch-Extraktion. (Folch et al.,1957). Dabei wird das biologische Material (Plasma oder Serum) mit einer Mischung aus Chloroform / Methanol (2:1, v/v) versetzt.

Lipide im Serum oder Plasma haben die Eigenschaft in unpolarem Lösungsmitteln löslich zu sein. Um möglichst quantitativ die Lipide zu extrahieren, muss man jedoch die Spaltung der Lipid-Protein-Bindung mit Hilfe eines Lösungsmittelgemisches aus apolaren und polaren Lösungsmitteln unter gleichzeitiger Fällung der Serumproteine erreichen. Präzipitierte Proteine und Nukleinsäuren werden abfiltriert. Der Lipidextrakt wird dann mit Wasser oder einer Salzlösung gewaschen, um alle übrigen Nichtlipide zu entfernen (Müller und Novak, 1978) . Die Lösung lässt man über Nacht zur Phasen-

trennung ruhen. Die obere Phase bestehend aus Wasser und Methanol wird verworfen, die untere Chloroformphase mit den extrahierten Lipiden wird weiter verwendet.

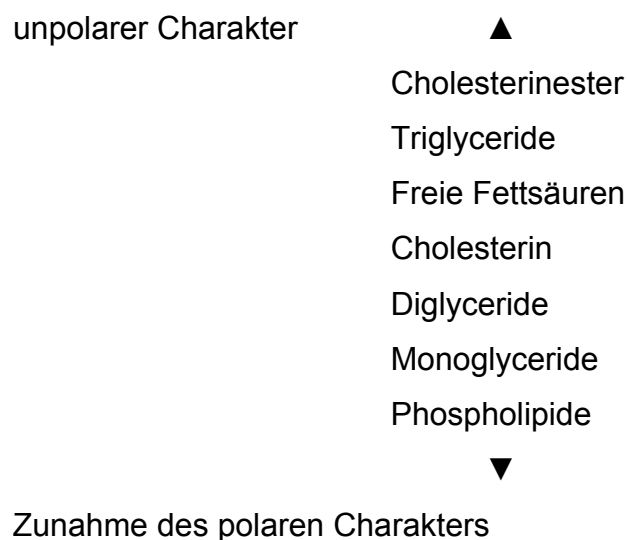
Bei der Flüssigphasenextraktion fallen große Mengen verdünnter Lösungsmittel-extrakte an. Zur Konzentration muss das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt werden, jedoch nicht bis zur vollständigen Trockenheit. Mit dieser Methode sollen Neutrallipide und Phospholipide nahezu quantitativ extrahiert werden. Komplexe Glykolipide mit einem sehr hohen Zuckeranteil gehen nur teilweise in die organische Phase über. Diese könne dann mit Hilfe einer geeigneten SPE - Säule aus der wässrigen Phase des Folch-Extrakts extrahiert werden.

2.3.3.1. Isolierung verschiedener Lipidklassen

Müller und Novak (1978) beschreiben die chromatographischen Verfahren der Lipidanalyse mit den verschiedenen Trennsystemen wie Dünnschicht-, Säulen- und Gaschromatographie.

Um Phospholipide aus einem Lipidgemisch trennen zu können, wird sowohl mit der Dünnschichtchromatographie als auch mit der Säulenchromatographie gearbeitet. Die Dünnschichtchromatographie ist eine einfache und günstige Methode, bei der mit einer Kieselgelplatte ein Lipidgemisch in seine Lipidklassen nach unterschiedlicher Polarität getrennt werden können (Herslöf, 1993). Bei der Festphasenextraktion wird das Lipidgemisch ebenfalls durch die unterschiedliche Polarität der Lipide mit Hilfe einer Kieselgelsäule getrennt.

Die verschiedenen Lipidklassen besitzen eine unterschiedliche Polarität:



Kaluzny et al. (1985) beschreibt die Isolierung der Lipidklassen mit Hilfe einer Amino-propylsäule. Müller und Novak (1978) und Adamitz (1997) führen die Lipidklassentrennung mit Hilfe einer Kieselgelsäule (SiOH) durch.

2.3.3.2. Lagerung der Fettsäuren

Hydrolyse der Estergruppen und Oxidation der ungesättigten Akyllketten durch eine Sauerstoffatmosphäre sind Prozesse, die die Ausbeute der Lipide verringern können. Um bei der Lagerung eine Oxidation der ungesättigten Fettsäuren oder die Spaltung der Esterverbindung zu verhindern, kann folgendes durchgeführt werden. Durch Zugabe eines Antioxidans wie Butylhydroxytoluol (BHT) in der Konzentration von 0,2mg / ml, Begasen des Probefläschchen mit Stickstoff und Lagerung bei mindestens - 20°C werden die Reaktionen der Hydrolyse und Oxidation vermindert (Müller, 1978).

Bis zu 6 Monaten sollen die Proben dadurch unter Verschluss unverändert bleiben.

2.3.4. Gaschromatographie

2.3.4.1. Grundlagen

Die Gaschromatographie (GC) wird hauptsächlich zur Lipidanalytik und Kohlenhydratanalytik eingesetzt, denn Peptide und Proteine lassen sich nicht unzersetzt verdampfen. Sie ist die Methode der Wahl für die Bestimmung der Fettsäuren der Lipide.

Ein inertes Trägergas strömt als mobile Phase durch eine thermostatisierte Kapillarsäule. Kapillarsäulen enthalten kein Trägermaterial, sondern die stationäre Phase ist direkt auf der Kapillarwand aufgebracht. Das Prinzip der Gaschromatographie basiert auf der Verteilung eines gasförmigen Gemischs von Substanzen zwischen einer mobilen Gasphase und der stationären Phase. Die Festphase ist in der Lage, den Strom einzelner Komponenten durch die Säule zu verzögern. Der Transport der Komponenten erfolgt ausschließlich in der Gasphase, die Trennung in der stationären Phase. Als mobile Phase dient strömendes Trägergas wie Stickstoff (N₂) oder Helium (He). Voraussetzung für die Trennung ist, dass sich die Substanzen thermisch nicht zersetzen, aber trotzdem einen ausreichend hohen Dampfdruck besitzen.

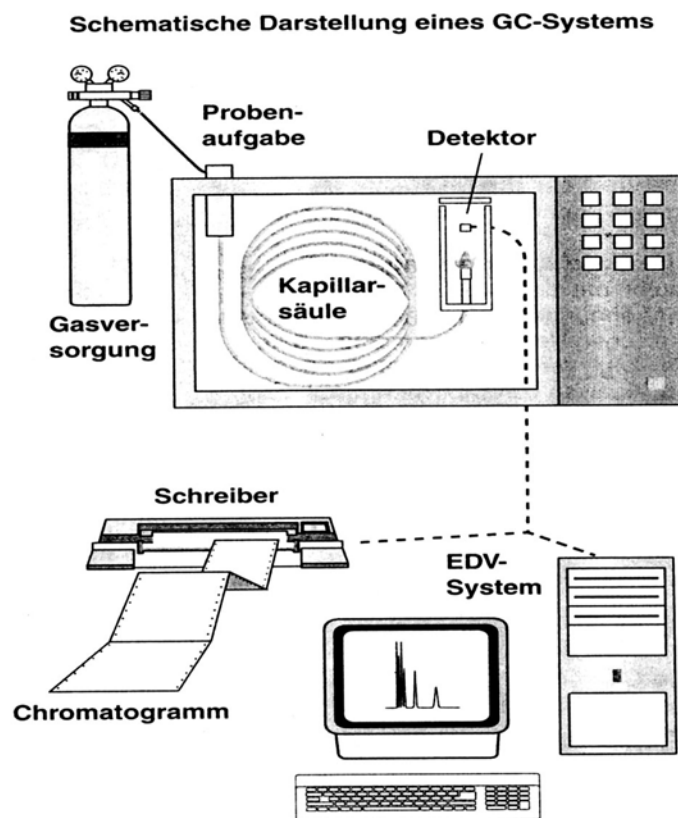
Das zu analysierende Substanzgemisch wird an einem Ende in die meist bei erhöhter Temperatur befindliche Kapillarsäule gespritzt. Das Trägergas trägt die verdampfte Probe in die Kapillarsäule und einzelne Teile des Substanzgemisches passieren bei einer bestimmten Temperatur einen bestimmten Teil der Säule. Da die Wechselwirkung

der Probe mit der stationären Phase temperaturabhängig ist, kann durch Veränderung der Säulentemperatur das Retentionsverhalten der Analytkomponenten variiert werden. Die Säulentemperatur wird meist in Form eines ansteigenden Temperaturgradienten verändert.

2.3.4.2. Aufbau des Gaschromatographen

Ein gaschromatographisches System setzt sich aus folgenden fünf Teilen (Abbildung 7) zusammen. Eine Gasversorgung mit Trägergas (N₂, Helium) für die Säule und Brenngase (Wasserstoff, Luft) für den Flammenionisationsdetektor (FID) ist nötig. Die Probe wird über einen Injektor (Probeaufgabenteil) eingespritzt und erreicht so die Trennsäule im thermostatisierbaren Säulenofen. Am Ende der Kapillarsäule liegt der Flammenionisationsdetektor, der die einzelnen Fettsäuren detektiert. Diese gemessenen Impulse werden an einen Drucker weitergeleitet, der sogenannte Chromatogramme darstellt.

Abbildung 7: Schematische Darstellung eines gaschromatographischen Systems (NN, 2002)



Das am häufigsten verwendete Trägergas für die Kapillarchromatographie ist Helium. Stickstoff ist eine kostengünstigere Alternative, führt aber zu breiteren Peaks.

Eine Reduzierung der Gasgeschwindigkeit führt zu einer höheren Auflösung mit längeren Retentionszeiten. Die Steigerung der Gasgeschwindigkeit hat den umgekehrten Effekt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Probeaufnahme, die direkte und indirekte Probeaufnahme. Bei der direkten Aufnahme wird die Probe in die Trennsäule = on column injiziert, ohne mit anderen Teilen wie Glas oder Metall in Berührung zu kommen. Bei der indirekten Aufnahme wird die Probe in einen Verdampfer injiziert und anschließend als Dampf vollständig oder teilweise (Split-Technik) auf die Trennsäule gegeben. Die Temperaturdifferenz zwischen Injektor und Säule führt zu einer Kondensation der Substanz im oberen Teil der Säule, während das Trägergas über das Kondensat strömt, bewegt sich das Lösungsmittel schnell in der Säule nach unten und wird als erstes detektiert.

Der Splitbetrieb wird dann verwendet, wenn die Probe zu konzentriert ist und die zur Kapillarsäule gelangende Probemenge reduziert werden muss. Dabei erreicht nur ein Bruchteil der Probe die Trennsäule (1-5%), das meiste der Substanz strömt aus.

2.3.4.3. Analyse am Gaschromatographen

Bei einer guten GC-Analyse müssen alle zu analysierenden Komponenten ohne Überlappung getrennt und zugeordnet werden, was abhängig ist vom Temperaturverlauf und der Zeit des Temperaturprogramms. Es ist stets die Wiederholbarkeit der Messergebnisse bei konstanten Messparametern am Gaschromatographen zu überprüfen. Man kann sowohl die Peakhöhe als auch die Peakfläche als Auswertung für die eluierte Menge einer bestimmten Komponente heranziehen.

Für die quantitative Auswertung über Peakflächen gilt, dass bei Integration oder Computerauswertung die Peakform keinen großen Einfluss auf die Analyse hat, solange keine Tailings vorhanden sind. Tailings sind extreme Verbreiterungen der Peakbasis, die auch zu einem Ineinanderlaufen von Peaks führen kann und somit die Analyse verfälscht. Bei der Peakhöhe jedoch stören Verzerrungen der Peakform die Auswertung, was meist bei Überlastung der Kapillarsäule vorkommt. Die Peakhöhe ist zu dem auch noch von der Retentionszeit abhängig, somit dürfen keine gaschromatographischen Schwankungen auftreten. Bei der Verwendung der Peakhöhe zur Aus-

wertung muss folglich jede zu analysierende Komponente geeicht werden. In der normalen analytischen Praxis wird die Peakhöhe selten für die Auswertung angewandt, höchstens zur groben Abschätzung der Konzentration.

2.3.4.4. Derivatisierung von Fettsäuren

Fettsäuren sind bei den Arbeitstemperaturen des Gaschromatographen nicht flüchtig, somit müssen vor ihrer Bestimmung Methylester gebildet werden. Durch die Derivatisierung wird die Flüchtigkeit der Fettsäuren erreicht und eine höhere thermische Stabilität erreicht.

Es gibt verschiedene Methoden der Bildung der entsprechenden Fettsäuremethylester (FAME = fatty acid methyl ester):

Die Methylierung ist einmal möglich mit 4% H_2SO_4 in Methanol. Die andere Form der Methylierung läuft über eine Verseifung mit methanolischer Natronlauge und Veresterung mit bortrifluoridhaltigen Methanol (Liu, 1994). Die dritte Variante der Methylierung erreicht man mit Derivatisierungsmitteln.

Bei den ersten beiden Verfahren liegt der zeitliche Laboraufwand bei ca. 1 ½ Stunden, bei der Zugabe eines Derivatisierungsmittels findet die Methylierung ohne weiteren Laboraufwand innerhalb des Probenglases statt.

Derivatisierungsmittel sind sehr reaktive Substanzen und müssen deshalb kühl und unter Feuchtigkeitsausschluss gelagert werden. Einmal geöffnet sollten sie schnellstmöglich verbraucht werden. Die Methylierung mit 0,2 M TMSH = Trimethylsulfoniumhydroxid in Methanol ist geeignet für Phenole, Lipide und Fettsäuren. Der große Vorteil ist der erheblich kürzere Zeitaufwand der Analysenvorbereitung, da man das TMSH nur dem Lipidextrakt zusetzen muss. Eine Entfernung des Reagenzienüberschuss ist nicht notwendig, da im Injektor bei 250°C eine Pyrolyse zu leicht flüchtigen Methanol und Dimethylsulfid erfolgt (NN, 2002).

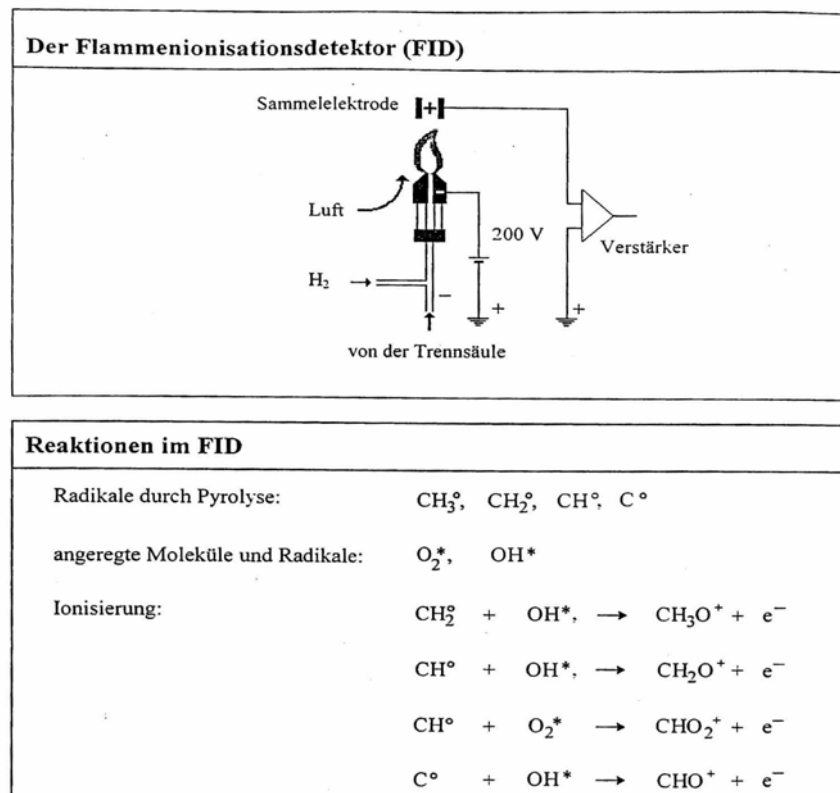
Durch die hohe Reaktivität des TMSH wird ein vollständiger Umsatz häufig bereits bei Raumtemperatur erhalten. 10 Minuten bei 100°C im Heizblock kann eine Alternative sein. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch kein Unterschied zwischen Raumtemperatur und der Durchführung bei 100°C festgestellt.

2.3.4.5. Flammenionisationsdetektor

Die auf der Kapillarsäule getrennten Fettsäuren werden mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektor (FID) bestimmt, wobei das abgegebene Signal den Austritt einer abgetrennten Fraktion aus der Säule anzeigt.

Beim FID werden die nachzuweisenden Substanzen in einer Wasserstoff-Flamme verbrannt und dabei teilweise ionisiert. Wenn ausschließlich Wasserstoff in der Flamme verbrennt, finden nur Radikalreaktionen statt. Es werden dabei keine Ionen gebildet. Gelangen organische Stoffe mit C-H und C-C Bindungen in die Flamme, werden sie zunächst pyrolysiert und die kohlenstoffhaltigen Radikale werden dann mit Sauerstoffmolekülen bzw. den in der Flamme daraus entstehenden OH-Radikalen oxidiert (Abbildung 8). Die sauerstoffhaltigen Reaktionspartner befinden sich in einem angeregten Zustand und ihre Anregungsenergie wird auf die kohlenstoffhaltigen Radikale übertragen, was zur Ionisierung der intermediär gebildeten Oxidationsprodukte führt (Kolb, 1999).

Das Signal am Detektor entsteht dadurch, dass die positiven Ionen an der negativ geladenen Düse und die dazugehörigen Elektronen an der ringförmigen Sammelelektrode, die sich auf einen mit ca. 200 V positiverem Potential gegenüber der Düse befindet, eingefangen werden. Zwischen Düse und Sammelelektrode kommt es zu kleinen Strömen im Picoamperebereich. Mit Hilfe eines Verstärkers werden die kleinen Ströme in Spannung umgewandelt und können an einem Schreiber dargestellt werden. Es werden nur Substanzen mit mindestens einer C-H oder C-C Bindung angezeigt, nicht jedoch Wasser.

Abbildung 8: Aufbau eines FID und chemische Reaktionen im FID (Kolb, 1999)

2.3.4.6. Chromatogramm

Ein Chromatogramm besteht aus einer Basislinie und einer entsprechenden Anzahl von Peaks. Es zeichnet die Menge eluierter Komponenten gegen die Retentionszeit auf. Die Fläche der Peaks dient der quantitativen Bestimmung. Die Retentionszeit ist die Zeit von der Einspritzung bis zum Durchlauf des Substanzmaximums durch den Detektor, was der Messung der Flammenionisation beim FID entspricht. Bei der Dünnschichtchromatographie entspricht dies dem R_f -Wert. Das Chromatogramm beginnt mit der Injektion der Probe. Der zeitliche Abstand zwischen Beginn des Chromatogramms bis zum Peakmaximum wird als Bruttoretentionszeit t_{R1} bezeichnet. Sie setzt sich zusammen aus der Aufenthaltsdauer in der mobilen Phase (t_0) = Totzeit und der Verweilzeit in der stationären Phase ($t_{R1}' = \text{Nettoretentionszeit}$).

$$t_{R1} = t_0 + t_{R1}'$$

3. Material und Methoden

3.1. Allgemeine Daten zu den Fütterungsstudien

3.1.1. Versuchstiere

Die Serumproben von drei verschiedenen Fütterungsstudien, die zwischen 2000-2002 am Institut für Tierernährung in München stattfanden, standen zur Verfügung:

- Fütterungsstudie mit 12 Hunden, die mit Omega-3- Fettsäuren aus Fischöl gefüttert wurden (Adler, 2002).
- Fütterungsstudie mit 16 Katzen, die mit Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl gefüttert wurden (Wilhelm, 2002).
- Fütterungsstudie mit 8 Hunden, die mit Omega-3-fettsäurehaltigen Mikroalgen gefüttert wurden (Frischknecht, 2003).

Informationen zu den Versuchstieren, deren Gesundheitszustand sowie die Versuchstierhaltung sind in den jeweiligen Dissertationen nachzulesen.

3.1.2. Aufbau der Fütterungsversuche

Im Prinzip besteht die Gemeinsamkeit aller drei Fütterungsstudien darin, dass das Futter mit bestimmten Omega-3-Fettsäuren angereichert wurde.

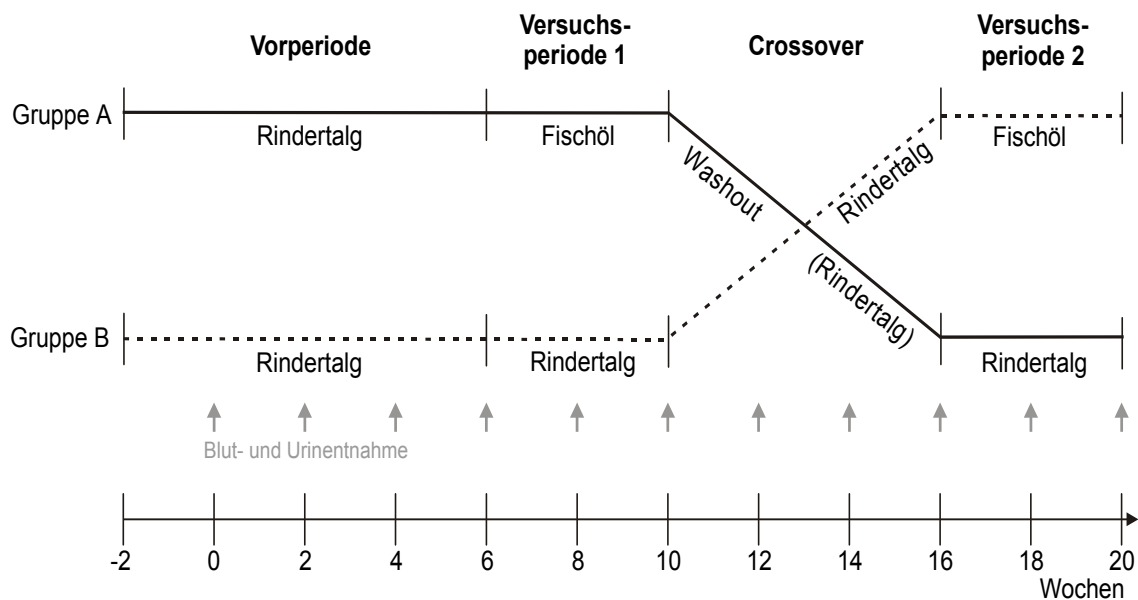
Bei Wilhelm und Adler erhielt die Hälfte der Versuchstiergruppe ein Kontrollfutter, in dem als Fettquelle Rindertalg verwendet wurde. Die andere Hälfte der Tiere erhielt das gleiche Futter, mit dem Unterschied, dass Fischöl zugesetzt wurde.

Bei Frischknecht wurden den Hunden in der Algenperiode I und II Omega-3-fettsäurehaltige Mikroalgen unter das Futter gemischt.

3.1.2.1. Fütterungsstudie mit 12 Hunden, die mit fischöhlhaltiger Diät gefüttert wurden

Der Versuch von Adler (2002) dauerte insgesamt 22 Wochen (Abbildung 9). Die ersten 8 Wochen erhielten die Tiere Kontrollfutter, anschließend wurde die Hälfte der Tiere mit Fischöl (Gruppe A) und die andere Hälfte mit Rindertalg (Gruppe B) gefüttert, dann folgte eine 6-wöchige Wash-out-Phase mit Rindertalg. Als letztes erhielt Gruppe A talghaltiges Futter und Gruppe B erhielt diesmal Futter, das mit Fischöl angereichert war.

Abbildung 9: Versuchsaufbau der Fütterungsstudie mit Hunden unter Fischölzusatz (Adler, 2002)

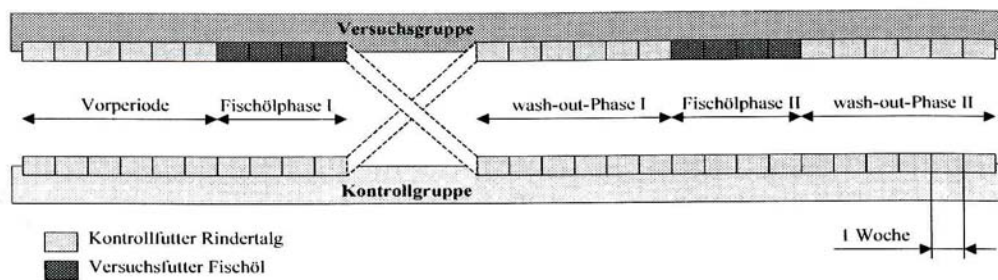


3.1.2.2. Fütterungsstudie mit 16 Katzen, die mit fischöhlhaltiger Diät gefüttert wurden

Der Versuch von Wilhelm (2002) dauerte insgesamt 26 Wochen (Abbildung 10):

6-wöchige Vorperiode mit Anfütterungsphase, 4 Wochen fischöhlhaltiges Futter bei Gruppe A bzw. rindertalghaltiges Futter bei der Kontrollgruppe B, 6 Wochen Wash-out-Phase mit Rindertalg für beide Gruppen. Anschließend erhielt 4 Wochen lang Gruppe A talghaltiges Futter bzw. Gruppe B fischöhlhaltiges Futter. Am Schluss erfolgte eine weitere sechswöchige Wash-out-Phase.

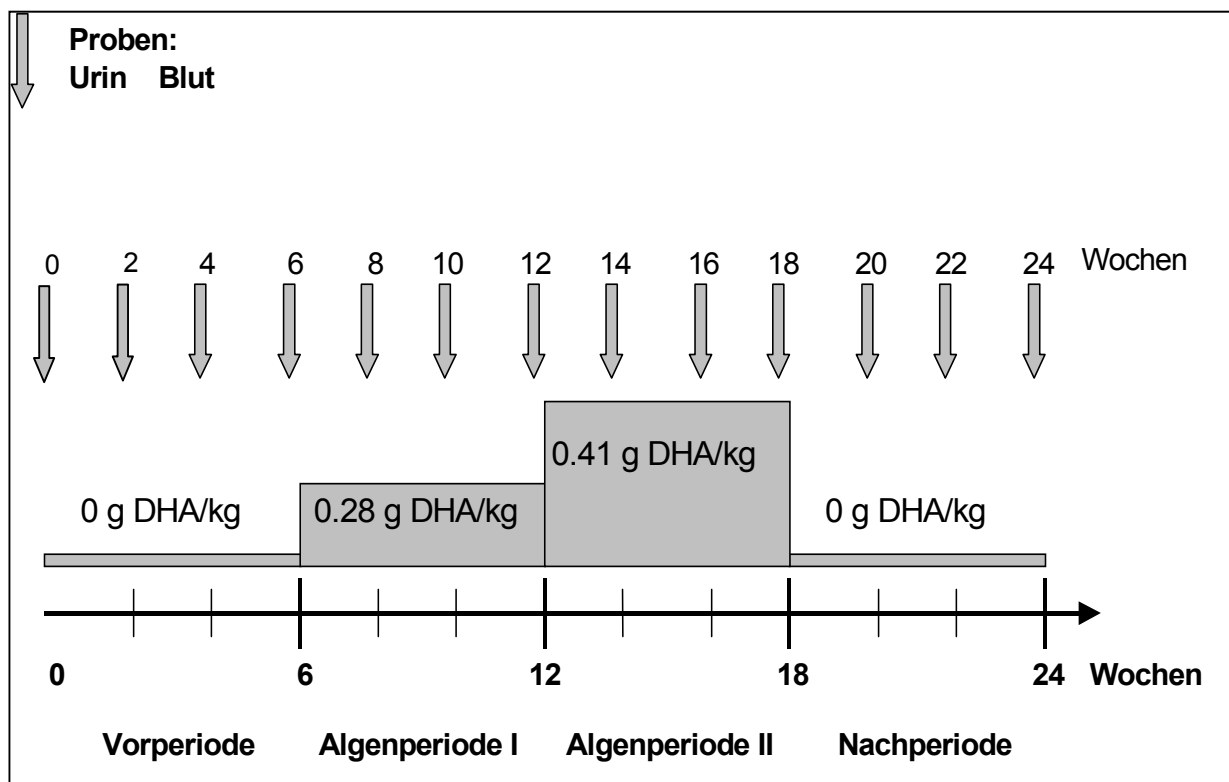
Abbildung 10: Darstellung des Versuchsablaufs der cross-over Studie mit Katzen bei den einzelnen Versuchsphasen und dem jeweils eingesetzten Futter: Versuchsfutter mit Fischöl bzw. Kontrollfutter mit Rindertalg (Wilhelm, 2002)



3.1.2.3. Fütterungsstudie mit Hunden, die mit Omega-3-fettsäurehaltigen Mikroalgen gefüttert wurden

Der Versuch von Frischknecht (2003) war in 4 Zeiträume unterteilt: Vorperiode, Algenperiode I, Algenperiode II, Nachperiode, die jeweils 6 Wochen dauerten (Abbildung 11). Bei Frischknecht wurden allen 8 Tieren in der ersten Phase herkömmliches Hundefutter verfüttert, in der zweiten und dritten Phase wurden Algenpräparate mit einem steigendem hohen DHA -Gehalt hinzugefügt. In der vierten Phase wurde den Tieren zur Kontrolle wieder nur das Hundefutter ohne speziellen DHA -Zusatz verfüttert.

Abbildung 11: Versuchsaufbau der Fütterungsstudie mit Hunden unter Algenzusatz (Frischknecht, 2003)



3.1.3. Versuchsfutter

Bei den 12 Hunden der Fütterungstudie von Adler (2002) wurde speziell ein Alleinfuttermittel für Hunde hergestellt. Versuchsfutter 1 bestand aus 5% Fischöl, Versuchsfutter 2 galt als Kontrollfutter, wobei als Fett Rindertalg zugesetzt wurde. Die prozentuale Zusammensetzung bestimmter mehrfach ungesättigter Fettsäuren im Versuchsfutter ist in Tabelle 4 dargestellt:

Tabelle 4: Prozentuale Zusammensetzung bestimmter mehrfach ungesättigter Fettsäuren im Versuchsfutter (modifiziert nach Adler, 2002)

Fettsäure	Strukturformel	Einheit	Kontrollfutter	Fischölfutter
Linolsäure	18:6 n-6	%	0,554	0,661
α -Linolensäure	18:3 n-3	%	0,060	0,072
Arachidonsäure	20:4 n-6	%	0,030	0,042
Eicosapentaensäure	20:5 n-3	%	0,001	0,108
Docosahexaensäure	22:6 n-3	%	0,004	0,062
Eicosapentaensäure	20:5 n-3	g/MJ ME	0,002	0,241
Docosahexaensäure	22:6 n-3	g/MJ ME	0,009	0,138

Für die 16 Katzen der Fütterungsstudie von Wilhelm (2002) wurde speziell ein Feuchttalleinfuttermittel für Katzen gemischt. Versuchsfutter 1 enthielt Fischöl, Versuchsfutter 2, dem Rindertalg als Fettquelle zugefügt wurde, galt als Kontrollfutter. Der prozentuale Anteil der Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren im Futter sowie ihr Verhältnis sind in Tabelle 5 und 6 gezeigt.

Tabelle 5: Herstellerangaben über die Gehalte der Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren von Versuchs- und Kontrollfutter, ausgedrückt in ihrem prozentualen Anteil an der ursprünglichen Substanz und im Bezug auf den Bruttoenergiegehalt der beiden Futtermittel (modifiziert nach Wilhelm, 2002).

Versuchsfutter			
Fettsäure	Strukturformel	% der uS	g / 400 kcal
Linolsäure	18:2 n6	0,144	0,99
Linolensäure	18:3 n3	0,017	0,12
Arachidonsäure	20:4 n6	0,054	0,37
Eicosapentaensäure	20:5 n3	0,095	0,66
Docosahexaensäure	22:6n3	0,058	0,40
Kontrollfutter			
Linolsäure	18:2n6	0,167	1,15
Linolensäure	18:3n3	0,015	0,10
Arachidonsäure	20:4n3	0,053	0,37
Eicosapentaensäure	20:5n3	0,006	0,04
Docosahexaensäure	22:6n3	0,006	0,04

Tabelle 6: Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollfutter hinsichtlich ihres Gesamtgehaltes an Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren, dem n-6/n-3-Verhältnisses sowie dem Verhältnis von Docosahexaensäure zu Eicosapentaensäure (modifiziert nach Wilhelm, 2002)

	Omega-3 in % uS	Omega-6 in % uS	n-6/n-3	DHA /EPA
Versuchsfutter	0,170	0,198	1,2 :1	0,6 : 1
Kontrollfutter	0,027	0,220	8,2 : 1	1 : 1

Bei den 8 Hunden der Fütterungsstudie von Frischknecht (2003) wurde ein kommerzielles Alleinfutter von Pedigree Pal mit Mikroalgen (DHA GOLD Algen) von der Firma OmegaTech, Colorado, als Omega-3-Fettsäurequelle versetzt. Der DHA - Gehalt lag bei 20 g DHA in 100g TS. Die Algenmenge und DHA-Menge im Versuchsfutter in den verschiedenen Fütterungsperioden sind in den Tabellen 7 und 8 dargestellt.

Tabelle 7: Algenzuteilung in den verschiedenen Fütterungsperioden (modifiziert nach Frischknecht, 2003)

Periode	Algenmenge in g/MJ ME	Algenmenge in g/kg KG
Vorperiode	0	0
Algenperiode I	0,69	0,28 ± 0,025
Algenperiode II	1,035	0,41 ± 0,031
Nachperiode	0	0

Tabelle 8: DHA- Zuteilung in den verschiedenen Fütterungsperioden (modifiziert nach Frischknecht, 2003)

Periode	DHA-Menge in g/MJ ME	DHA-Menge in g/kg KG
Vorperiode	0	0
Algenperiode I	0,138	0,06 ± 0,005
Algenperiode II	0,207	0,08 ± 0,006
Nachperiode	0	0

Das Fettsäuremuster der DHA GOLD Algen ist vom Hersteller wie in Tabelle 9 deklariert worden.

Tabelle 9: Durchschnittliches Fettsäuremuster der DHA GOLD Algen™ laut Deklaration des Herstellers (modifiziert nach Frischknecht, 2003)

Fettsäure	Name	% der Gesamtfettsäuren	in g/100g TS
C12:0	Laurinsäure	0,3	0,1
C14:0	Myristinsäure	8,5	4,5
C15:0	Pentadeconsäure	0,3	0,2
C16:0	Palmitinsäure	23,2	12,2
C18:0	Stearinsäure	0,5	0,3
C18:3 (n6)	Gamma-Linolensäure	0,4	0,2
C18:4 (n3)	Octadecatetraensäure	0,4	0,2
C20:3 (n6)	Homogammalinolensäure	1,6	0,8
C20:4 (n6)	Arachidonsäure	0,8	0,4
C20:4 (n7)	Eicosatetraensäure	0,9	0,5
C20:5 (n3)	Eicosapentaensäure	1,9	1,0
C22:1 (n9)	Docosaensäure	0,3	0,1
C22:5 (n6)	Docosapentaensäure	18,3	9,7
C22:6 (n3)	Docosahexaensäure	42,3	22,8
C24:0	Lignocerinsäure	0,1	0,1

3.1.4. Blutgewinnung

Alle 2 Wochen wurden 10 ml Vollblut in ein Serumröhrchen überführt. Es wurde zunächst 10 Minuten stehen gelassen und dann für 10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Bei – 80°C wurde das Serum gelagert.

3.2. Gewinnung der Gesamtfettsäuren aus dem Serum von Hunden und Katzen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gesamtfettsäuremuster im Serum von Hunden und Katzen nach Fütterung mit Fischöl bzw. Algen untersucht.

3.2.1. Prinzip

Die Lipide werden aus dem biologischen Material (Serum) mit Hilfe eines organischen Lösungsmittelgemisches unter gleichzeitiger Fällung der Serumproteine in Lösung gebracht. Im Blut liegen teilweise Lipide und Proteine miteinander verbunden vor, so dass es durch das Extraktionsmittelgemisch zu einer Spaltung von der Lipid-Protein-Verbindung kommt. Mit Hilfe eines polaren und unpolaren Lösungsmittels wie Chloroform-Methanol (2:1, v/v) können die Lipide aus 1 ml Serum extrahiert werden. Nach der Flüssigphasenextraktion wird der Lipidextrakt am Rotationsverdampfer konzentriert. Anschließend erfolgt die Methylierung und Bestimmung der Gesamtfettsäuren über den Gaschromatographen.

Die Analytik beruht auf einem modifizierten Verfahren nach Folch et al. (1957) und Radke et al (1975).

3.2.2. Reagenzien und Material

- Methanol für die Chromatographie, Merck-Nr.106011, Suprasolv®
- Chloroform für die Chromatographie, Merck-Nr.102432, Suprasolv®
- 0,02 % CaCl-Lösung
- Aqua dest.
- 1 ml Eppendorfpipette für das Serum
- Blaue Pipettenspitzen
- 5 ml und 10 ml Glaspipetten für die Lösungsmittel
- 25 ml Erlenmeyerkolben mit Glasstopfen
- 50 ml Messzylinder mit Glasstopfen
- Glastrichter
- Faltenfilter von der Firma Schleich & Schull 604 ½, ø 125mm

3.2.3. Apparate

- Wasserbad 70°C
- Analysenwaage

3.2.4. Vorbereitung der Glaswaren

Die Glaswaren werden für mindestens 30 Minuten in einer 1% Edinosite-Lösung eingelegt (Edinosite® Schnellreiniger; Merz Consume GmbH, Nr. 60129).

Anschließend werden sie mit Leitungswasser und Aqua dest. ausgespült und getrocknet.

3.2.5. Durchführung der Bestimmung der Gesamtfettsäuren

Alle Arbeiten, bei denen mit Lösungsmitteln gearbeitet werden, müssen unter einem Abzug erfolgen:

Als erstes werden die Serumproben aufgetaut und das Wasserbad auf 70 °C eingestellt. Eine 0,02 % CaCl_2 wird hergestellt, indem 0,02 g CaCl_2 mit Aqua dest. auf 100 ml in einem Messkolben aufgefüllt und geschüttelt wird. Die CaCl_2 -Lösung hält sich, so dass man bei mehreren Analysentagen auch 500 ml herstellen kann.

In einen 25 ml Erlenmeyerkolben werden 8 ml Methanol vorgelegt. Danach pipettiert man 1 ml Serum mit einer Eppendorfpipette tropfenweise unter ständiger Bewegung dazu. Dies führt zu einer Fällung der Proteine und Nukleinsäuren, sichtbar als milchige Flüssigkeit.

9 ml Chloroform werden dem Erlenmeyerkolben hinzugefügt und danach kreisförmig bewegt. Der Erlenmeyerkolben wird mit einem Glasstopfen locker versehen.

Für ca. 5 Minuten werden die beschrifteten Erlenmeyerkolben bei 70 °C bis zur Tropfenbildung am Glasrand ins Wasserbad gestellt. Danach sollen sie für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen und anschließend werden sie 10 Mal hin und her geschwenkt.

Die passende Anzahl an Messzylinder wird beschriftet und mit Trichter und Faltenfilter bestückt. Das Lösungsmittelgemisch wird filtriert und der Erlenmeyerkolben mit 6,5 ml Chloroform ausgeschwenkt und der Filter ebenfalls mit diesem Lösungsmittel ausgewaschen.

Der aufgefangene Rückstand wird mit 8 ml der 0,02 % CaCl_2 -Lösung versetzt.

Der Messzylinder wird mit einem Glasstopfen verschlossen und 1 Minute kräftig geschüttelt. Danach muss der Glasstopfen kurz entfernt werden, damit der Messzylinder entlüftet wird. Die Messzylinder werden über Nacht zur Phasentrennung im Abzug stehen gelassen.

Am nächsten Tag wird das Volumen der unteren Chloroformphase gemessen und notiert. Man sieht im Messzylinder zwei Phasen. Die obere Phase besteht aus Methanol und der Wasserphase von der CaCl_2 -Lösung. Die untere Phase enthält die Lipide. Am Übergang der beiden Phasen sieht man eine weiße Schicht aus restlichen präzipitierten Proteinen.

Die obere Phase wird mit einer 10 ml Glaspipette bis zur Trennschicht abpipettiert und in einen Lösungsmittelabfallbehälter verworfen.

3.3. Derivatisierung der Fettsäuren zur GC-Bestimmung

3.3.1. Prinzip

Mit der Gaschromatographie können nur Stoffe analysiert werden, die sich bis 350°C ohne Zersetzung verdampfen lassen. Da Fettsäuren bei den Arbeitstemperaturen des Gaschromatographen nicht flüchtig sind, müssen durch Methylierung der Carboxylgruppe Fettsäuremethylester hergestellt werden.

3.3.2. Reagenzien und Material

- Chloroform für die Chromatographie, Merck-Nr.102432, Suprasolv®
- TMSH , Fluka-Nr.92732
- 100 μl Pipette und gelbe Pipettenspitzen

- 10 ml Glaspipetten
- Glasspitzkolben und Ständer für die Spitzkolben
- Probegläser für den Autosampler
- Bördelkappen mit teflonbeschichteter Dichtscheibe
- Verschließ - und Öffnungszangen für die Rollrandflaschen

3.3.3. Apparate

- Rotationsverdampfer mit Wasserbad (Labo-Rota S-300, resona technics)
- Wasserstrahlpumpe
- Analysenwaage

3.3.4. Durchführung der Derivatisierung

Die Arbeiten mit TMSH sind mit geeigneten Handschuhen durchzuführen, weil das Methylierungsmittel gesundheitsschädlich ist.

10 ml der Chloroformphase aus der Flüssigphasenextraktion werden in einen Spitzkolben pipettiert und mit dem Rotationsverdampfer bei ca. 61 °C mit Hilfe einer Vakuumpumpe bis auf ein paar Tropfen (ca. 60 µl) eingedampft. Es muss darauf geachtet werden, dass das Lösungsmittel nicht kocht, denn dies führt zum Siedeverzug. Die Temperatur des Wasserbades am Rotationsverdampfer ist immer auch abhängig vom Vakuum, das mit der Wasserstrahlpumpe erzeugt werden kann.

Mit einer Pasteurpipette wird der Rest des Lipidgemischs aus dem Spitzkolben in ein leeres Probenglas pipettiert. Anschließend wird der Spitzkolben mit ca. 2 x 100 µl Chloroform ausgespült und das Lösungsmittel ebenfalls in das Vial überführt.

Danach werden 100 µl Methanol zum Ausspülen des Spitzkolbens verwendet.

20 µl einer C13:0 Fettsäure werden zusätzlich in das Probenglas pipettiert, um eine Konstanz des Einspritzvolumens vom Autosampler und eine Verschiebung der Retentionszeiten genau überprüfen zu können.

Ganz am Schluss werden 100 µl TMSH dem Probenglas hinzugefügt.

Jedes Probenglas wird vom Bodenrand bis in die Höhe von 1,4 cm markiert und mit Methanol aufgefüllt. Dies entspricht einem Volumen von ca. 550 µl. Das Probenglas wird anschließend zur Kontrolle gewogen und das Gewicht und Höhe des Volumens

notiert, um einen möglichen Ausgleich unterschiedlichen Volumens später bei der Berechnung vornehmen zu können.

Das Probenglas wird mit einer Bördelkappe verschlossen und anschließend findet bald möglichst die GC-Messung statt. Ansonsten müssen die Proben bei Dunkelheit unter Stickstoff bei – 20 °C gelagert werden.

3.3.5. Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Gaschromatograph: Unicam 610 series

Kapillarsäule: SPTM- 2560 FUSED SILICA capillary Column ,

100m x 0,25mm ID, 0,20 µm film , Sulpelco-Nr. 24056

Detektor: FID

Gase:

Funktion der Gase	Name des Gases	Vordruck	Carrierdruck
Trägergas	Stickstoff (N ₂)	4 bar	2 bar
Brenngas	Synthetische Luft	4 bar	2 bar
Brenngas	Wasserstoff (H ₂)	4 bar	2 bar

Temperaturen: Injektor: 260°C, Detektor 260°C

Temperaturprogramm: 100°C , 5 Minuten halten, 3°C / min bis 230°C, 37 min halten,

Gesamtzeit: 85 Minuten

3.3.5.1. Parametereinstellungen der Messung

5 µl der Probe werden mit einem Autosampler injiziert und bei einem Gasdruck von 2 bar bei 260°C in den Injektor injiziert. Das Temperaturprogramm des Säulenofens beginnt bei 100°C mit einer Initialzeit von 5 Minuten. Das Temperaturprogramm wurde mit 3°C / Minute auf 230°C geheizt und 37 Minuten bei der Endtemperatur von 230°C gehalten. Die Gesamtlaufzeit eines Chromatogramms belief sich auf 85 Minuten. Das Splitventil war geschlossen.

3.3.6. Gaschromatographische Bestimmung

qualitative Bestimmung:

Zur qualitativen Bestimmung der Fettsäuremethylester werden Methylester von 37 Fettsäuren einer Standardlösung eingesetzt. Die Peakidentifizierung der Probefettsäuren basiert auf einem Vergleich der Retentionszeiten der Fettsäuren von der Standardlösung mit denen der Probe.

Semi-quantitative Bestimmung:

Der prozentuale Anteil jeder Fettsäure wird berechnet durch die Bestimmung seiner Peakfläche im Verhältnis zur Summe aller Peakflächen der Gesamtfettsäuren. Der ermittelte Wert wird als Fettsäure bezogen auf die Gesamtfettsäuren angegeben.

3.3.6.1. Identifizierung der Fettsäuren

Die qualitative Bestimmung erfolgte über die Gaschromatographie mit einem 37 Komponentenstandard (SupelcoTM 37 Component FAME MIX, 47885-U). Mit diesem Standard konnte man anhand der Retentionszeiten in den Chromatogrammen die entsprechenden Fettsäuren zuordnen. Aufgrund von unterschiedlichen Raumtemperaturen und dadurch bedingten gelegentlichen Druckschwankungen variierten manchmal die Retentionszeiten. Um eine Aussage über die Fettsäuren treffen zu können, wurde die Probe und der Standard 1:1 gemischt und das doppelte Volumen injiziert. Bei den 37 Fettsäuren im Standard sind einige mehr vorhanden, als Fettsäuren im Serum der Tiere nachzuweisen sind. Gleichfalls gilt auch, dass über den Standard nicht alle Fettsäuren aus dem Serum identifiziert werden konnten.

3.4. Messung der Triglycerid-, Phospholipid- und Fettsäurestandards

3.4.1. Prinzip

Die einzelnen Standards wurden methyliert und am Gaschromatographen gemessen. Diese Bestimmung ist notwendig, um einen Ausgangswert zu erhalten, denn in einem weiteren Schritt sollte die Trennung der Lipide über eine Aminopropylsäule durchgeführt und deren Ausbeute damit verglichen werden.

3.4.2. Reagenzien und Material

- Triglyceridstandard (Promochem, USC 2800 MIX TG 12)
- Phospholipidstandard (Promochem, PE ; LA 37-0126)
- Arachidonsäurestandard (Sigma-Nr.:A-9673)
- Docosahexaensäurestandard (Sigma-Nr.:D-2534)
- Chloroform für die Chromatographie, Merck-Nr.102432, Suprasolv®
- TMSH , Fluka-Nr.92732
- 20 µl Glaskapillare
- Pasteurpipetten
- Probegläser für den Autosampler
- Bördekkappen mit teflonbeschichteter Dichtscheibe
- Verschließ - und Öffnungszangen für die Rollrandflaschen

3.4.2.1. Messung des Triglyceridstandards

Der Triglyceridstandard wurde mit Chloroform auf eine Konzentration von 10 mg/ ml verdünnt. 40 µl dieses Standards werden mit einer Glaskapillare in ein Probenglas pipettiert. Anschließend werden ca. 350 µl Chloroform und 100 µl TMSH hinzugefügt und auf eine Höhe von 1,4 cm des Probenglases aufgefüllt (Gewicht als Kontrolle immer notieren). Das Probenglas wird mit einer Bördekkappe verschlossen und ist nun für die GC-Messung bereit.

3.4.2.2. Messung des Phospholipidstandards

Der Phospholipidstandard wurde mit Chloroform auf eine Konzentration von 5 mg/ ml verdünnt. 60 µl dieses Standards werden mit einer Kapillare in ein Probenglas gegeben. Anschließend werden ca. 350 µl Chloroform und 100 µl TMSH hinzu pipettiert und auf eine Höhe von 1,4 cm des Probenglases aufgefüllt. Das Probenglas wird mit einer Bördekkappe verschlossen und ist für die GC-Messung bereit.

3.4.2.3. Messung der freien Fettsäure

Zwei Fettsäurestandards (Arachidonsäure und Docosahexaensäure) wurden mit Chloroform auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt. Je 20 µl jedes Standards werden mit einer Kapillare in ein Probenglas pipettiert. Anschließend wird wie bei den anderen Standards verfahren.

3.5. Auftrennung der Lipidklassen mit Aminopropylsäulen

3.5.1. Reagenzien und Material

- Hexan für die Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv® , Merck-Nr.104391
- Chloroform für die Chromatographie Suprasolv®, Merck-Nr.102432,
- 2-Propanol für die Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv®, Merck-Nr.101040
- Diethylether zur Analyse, ACS,ISO, Merck-Nr. 100921
- Essigsäure (Eisessig) 100% zur Analyse, ACS, ISO, Merck-Nr. 100063
- TMSH , Fluka-Nr.92732
- Lipidstandards siehe 3.4.2.
- Vakuumkammer
- Aminopropylsäulen (Chromobond NH₂, 500mg, 6 ml, Macherey-Nagel 730033)
- 100 µl Pipette und gelbe Pipettenspitzen
- 20 µl Kapillaren
- 10 ml Reagenzgläser
- 10 ml Glaspipetten
- Glasspitzkolben mit Schliff
- Probegläser für den Autosampler
- Bördelkappen mit teflonbeschichteter Dichtscheibe
- Verschließ - und Öffnungszangen für die Rollrandflaschen

3.5.2. Apparate

- Rotationsverdampfer mit Wasserbad (Lako-RotaS-300, resona technics)
- Wasserstrahlpumpe
- Analysenwaage

3.5.3. Durchführung der Lipidklassentrennung mit einer Aminopropylsäule

Die Aminopropylsäulen werden auf die Durchflusshähne einer Vakuumkammer gesetzt.

Zur Konditionierung werden die Säulen mit 5 x 2 ml Hexan gespült und immer wieder trocken gesaugt. Beim letzten Spülvorgang wird ca. 3 mm Hexan über der Fritte stehen gelassen.

Anschließend erfolgt der Probenauftrag mit einer Glaskapillare, wobei die Tropfen nicht die Plastikwand der Säulenkartusche berühren sollen. Es werden 40 µl des Triglycerids, 60 µl des Phospholipids und je 20 µl der Fettsäuren pipettiert.

Reagenzgläser werden unter den Säulen platziert und als erstes wird der Vorlauf aufgefangen. Dieser wird ebenfalls gemessen, um zu testen, ob die gesamten Lipide an der Säule gebunden haben.

Anschließend werden neue Reagenzgläser (RG) unter die dazugehörige Säule im Glastrog positioniert. Die Hähne werden geöffnet und eine Vakuumpumpe am Glastrog angeschlossen. Für die Elution der Triglyceride werden 6 x 1ml Chloroform-Propanol-Gemisch (2:1, v/v) verwendet. Nach jeder Lösungsmittel-elution muss die Säule immer wieder getrocknet werden. Neue Reagenzgläser werden platziert. Für die Elution der freien Fettsäuren werden 6 x 1 ml Diethylether/Eisessig (98:2) durch die Säule eluiert.

Erneut werden Reagenzgläser positioniert und die Elution der Phospholipide mit 6 x 1ml Methanol durchgeführt. Aus den Reagenzgläsern mit Schliff wird der Inhalt in beschriftete Spitzkolben überführt und die RG mit 3 x 2 ml des entsprechenden Lösungsmittels ausgespült und ebenfalls in den Spitzkolben gegeben. Am Rotationsverdampfer werden die Proben zwischen 45 - 65°C bis auf eine kleine Menge (ca. 60 µl = 3 Tropfen) eingedampft. Die Siedepunkte der einzelnen Lösungsmittel liegen bei folgenden Temperaturen: Bei Diethylether verwendet man 45°C, bei Chloroform-Propanol 61°C, bei Methanol 65°C. Die Temperatur ist demnach nicht höher einzustellen, da es ansonsten zu einem Siedeverzug im Spitzkolben kommt und somit zu einem Probenverlust. Mit einer Glaspasteurpipette wird der Rest der Lösung aus dem Spitzkolben in ein Probenglas umgefüllt. Der Spitzkolben wird 2x mit 150 µl des entsprechenden Lösungsmittels ausgespült und ebenfalls ins Probenglas überführt. Anschließend werden 100 µl TMSH dazu pipettiert, bis zur Markierung bei 1,4 cm am Probenglas mit Methanol aufgefüllt, gewogen und mit einer Bördelkappe verschlossen.

3.5.4. Ausbeute mit Standards über die Aminopropylsäule

Die GC-Messungen der 4 Standards werden als 100% gesetzt. Der methylierte Standard wird mit den Werten des Standards, der über die Amniopropylsäule lief, verglichen und die Ausbeute berechnet.

3.6. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Gesamtfettsäuren erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SAS (Statistical Analysis System) für Windows.

Es wurden jeweils der Mittelwert (MW) aller Einzelwerte, sowie die Standardabweichung (Stabw) als Maß für die Streuung der Einzelwerte berechnet.

Für die Unterschiede innerhalb einer Gruppe zwischen den einzelnen Versuchsperiode wurde der Least Squares Means Test angewendet. Signifikante Unterschiede wurden jeweils mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet (a,b).

Die Untersuchung auf Unterschiede zwischen Gruppe A und B in den einzelnen Versuchsperioden erfolgte mit Hilfe des t-Tests. Das Signifikanzniveau wurde von $p < 0,05$ mit *, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit *** gekennzeichnet.

Im Ergebnis- und Diskussionsteil wurden nur die statistischen Unterschiede von den Omega-Fettsäuren AA, EPA und DHA, die von besonderem Interesse waren, eingezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Serumanalysen

4.1.1. Gesamtfettsäuren im Hundeserum unter Fischöleinfluss

12 Hunde nahmen am Fütterungsversuch teil, wovon je sechs Tiere in der Versuchsphase I Fischöl erhielten (Gruppe A) und dem Futter der anderen sechs Tiere Talg als Fettquelle zugegeben wurde. In der Vorperiode und Washout-Phase erhielten alle 12 Hunde Futter mit Talg. In Versuchsphase II erhielten nun die Tiere der Gruppe A nur Talg als Fettquelle und Gruppe B Fischöl. Die Analytik erfolgte jeweils von Serumproben am Ende der jeweiligen Versuchsperiode in der 6. Woche (Vorperiode), 10. Woche (Versuchsperiode I), 16. Woche (Washout-Phase) und 20. Woche (Versuchsperiode II).

In den Tabellen 10 und 11 finden sich die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Gesamtfettsäuren und in Abbildung 12 sind die Gesamtfettsäuren in Prozent aus dem Serum der Hunde graphisch dargestellt. Dabei wurden 20 Fettsäuren detektiert und 15 Fettsäuren konnten mit Hilfe von einem 37 Komponentenstandard eindeutig identifiziert werden. 5 der 20 Fettsäuren machen 89 % der Gesamtfettsäuren aus. Dazu gehören die Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1n9c), Linolsäure (18:2n6c) und die Arachidonsäure (20:4n6). 5 Fettsäuren, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten, entsprechen ca. 4 % der Gesamtfettsäuren.

Tabelle 10: Mittlerer Flächenanteil (MW \pm Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Hunden in Gruppe A (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte

n=6	Gruppe	A	A	A	A
Fettsäure	Versuchsphase	Vorphase	Versuchsphase I	Wash out	Versuchsphase II
	Fütterung	Talg	Fischöl	Talg	Talg
Myristinsäure	C 14:0	0,24 \pm 0,02	0,28 \pm 0,06	0,26 \pm 0,05	0,25 \pm 0,05
	C 15:0	0,21 \pm 0,03	0,21 \pm 0,06	0,23 \pm 0,03	0,23 \pm 0,06
Palmitinsäure	C 16:0	14,56 \pm 0,78	14,09 \pm 1,23	16,05 \pm 0,61	15,81 \pm 0,50
		0,30 \pm 0,03	0,25 \pm 0,04	0,33 \pm 0,06	0,34 \pm 0,04
Palmitoleinsäure	C 16:1	0,81 \pm 0,07	0,87 \pm 0,12	0,86 \pm 0,10	0,92 \pm 0,04

	C 17:0	0,57 ± 0,06	0,57 ± 0,08	0,60 ± 0,08	0,63 ± 0,04
Stearinsäure	C 18:0	24,87 ± 1,10	24,32 ± 2,12	25,28 ± 1,42	25,12 ± 2,21
		0,65 ± 0,21	0,55 ± 0,09	0,59 ± 0,18	0,55 ± 0,15
Ölsäure	C 18:1n9c	9,74 ± 2,74	7,76 ± 0,73	10,49 ± 2,08	9,21 ± 2,68
		0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,09	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,03
Linolsäure	C 18:2n6c	16,85 ± 2,02	15,70 ± 2,87	15,09 ± 1,51	16,77 ± 2,57
GLA	C 18:3n6	0,31 ± 0,06	0,31 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,21 ± 0,01
α-Linolensäure	C 18:3n3	0,26 ± 0,06	0,31 ± 0,04	0,20 ± 0,06	0,14 ± 0,12
	C 22:0	0,29 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,18 ± 0,03
DGLA	C 20:3n6	0,86 ± 0,07	0,74 ± 0,10	0,75 ± 0,10	0,92 ± 0,17
Arachidonsäure	C 20:4n6	23,75 ± 1,35 ^a	18,99 ± 0,81 ^b	22,14 ± 1,17 ^a	22,23 ± 1,66 ^a
EPA	C 20:5n3	0,48 ± 0,06 ^a	4,49 ± 0,60 ^b	0,57 ± 0,31 ^a	0,33 ± 0,12 ^a
		1,28 ± 0,20	0,36 ± 0,08	1,05 ± 0,18	1,07 ± 0,17
		1,84 ± 0,50	2,41 ± 0,40	1,85 ± 0,35	2,13 ± 0,55
DHA	C 22:6n3	0,93 ± 0,09 ^a	3,52 ± 0,19 ^b	0,94 ± 0,29 ^a	0,70 ± 0,12 ^a

a, b: unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe A zwischen den verschiedenen Fütterungsphasen

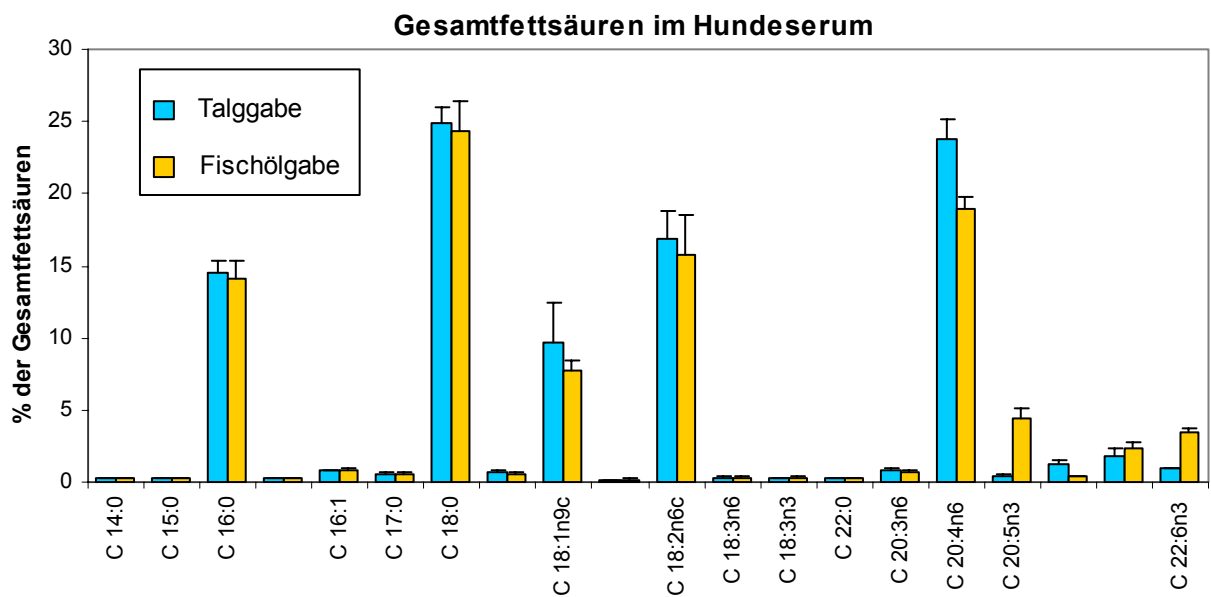
Tabelle 11: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Hunden in Gruppe B (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte

n=6	Gruppe	B	B	B	B
Fettsäure	Versuchsphase	Vorphase	Versuchsphase I	Wash out	Versuchsphase II
	Fütterung	Talg	Talg	Talg	Fischöl
Myristinsäure	C 14:0	0,26 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,23 ± 0,05	0,24 ± 0,03
	C 15:0	0,24 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,04
Palmitinsäure	C 16:0	14,68 ± 0,67	14,27 ± 0,68	14,68 ± 0,91	13,53 ± 0,34
		0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,04	0,26 ± 0,06
Palmitoleinsäure	C 16:1	0,87 ± 0,05	0,85 ± 0,08	0,80 ± 0,14	0,81 ± 0,10
	C 17:0	0,58 ± 0,08	0,55 ± 0,06	0,58 ± 0,04	0,55 ± 0,05
Stearinsäure	C 18:0	24,60 ± 1,34	24,47 ± 1,93	25,43 ± 2,10	25,45 ± 1,97
		0,70 ± 0,09	0,55 ± 0,19	0,72 ± 0,22	0,42 ± 0,06
Ölsäure	C 18:1n9c	9,75 ± 2,64	9,43 ± 2,40	9,77 ± 2,22	7,42 ± 0,35
		0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,15
Linolsäure	C 18:2n6c	16,63 ± 1,91	16,93 ± 2,00	14,47 ± 1,53	15,26 ± 3,22
GLA	C 18:3n6	0,33 ± 0,05	0,26 ± 0,07	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,02

α-Linolensäure	C 18:3n3	0,25 ± 0,10	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,07	0,22 ± 0,09
	C 22:0	0,32 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,25 ± 0,07	0,28 ± 0,06
DGLA	C 20:3n6	0,97 ± 0,10	0,81 ± 0,11	0,87 ± 0,20	0,83 ± 0,13
Arachidonsäure	C 20:4n6	23,75 ± 1,51 ^a	23,57 ± 1,42 ^a	23,01 ± 1,38 ^a	18,45 ± 0,74 ^b
	EPA	C 20:5n3	0,33 ± 0,08 ^a	0,32 ± 0,09 ^a	0,25 ± 0,06 ^a
		1,43 ± 0,18	1,43 ± 0,17	1,44 ± 0,26	0,32 ± 0,10
		1,97 ± 0,34	2,03 ± 0,36	2,32 ± 0,35	2,12 ± 0,32
DHA	C 22:6n3	0,96 ± 0,22 ^a	0,93 ± 0,13 ^a	0,79 ± 0,16 ^a	3,75 ± 1,02 ^b

a , b: unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe B zwischen den verschiedenen Fütterungsphasen

Abbildung 12: Gesamtfettsäuren im Serum von Hunden bei Fütterung von Talg bzw. Fischöl (n=12)



4.1.1.1. Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren

Tabelle 12 und 13 zeigen die Veränderungen der Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren unter dem Einfluss von talg- bzw. fischöhlhaltiger Fütterung.

Bei den Omega-6-Fettsäuren sinkt unter Fischöhlzugabe in Gruppe A die Linolsäure um 6,5 % und die Arachidonsäure um 20 %. In Gruppe B sinken die beiden Fettsäuren ebenfalls um 5 % bzw. 21%. Unter Rindertalgfütterung nähern sich beide Fettsäuren ihren Ausgangswerten in der Vorperiode.

Bei den Omega-3-Fettsäuren steigen sowohl in Gruppe A und B unter Fischöhlzugabe die Eicosapentaensäure um das 10-fache an und die Docosahexaensäure um das 4-fache.

Tabelle 12: Mittlerer Flächenanteil (MW \pm Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren im Serum der Hunde in Gruppe A (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren

Gruppe A	Vorperiode	Versuchsperiode I	Washout	Versuchsperiode II
Fütterung	Talg	Fischöl	Talg	Talg
n-6-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
Linolsäure	16,85 \pm 2,02	15,70 \pm 2,87	15,09 \pm 1,51	16,77 \pm 2,57
Arachidonsäure	23,75 \pm 1,35	18,99*** \pm 0,81	22,14 \pm 1,17	22,23 \pm 1,66
n-3-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
α -Linolensäure	0,26 \pm 0,06	0,31 \pm 0,04	0,20 \pm 0,06	0,14 \pm 0,12
Eicosapentaensäure	0,48 \pm 0,06	4,49*** \pm 0,60	0,57 \pm 0,31	0,33 \pm 0,12
Docosahexaensäure	0,93 \pm 0,09	3,52*** \pm 0,19	0,94 \pm 0,29	0,70 \pm 0,12

Signifikante Unterschiede zum Ausgangswert (Vorperiode), Washout und Versuchsperiode II sind gekennzeichnet mit *(p<0,05), **(p<0,01) und ***(p<0,001)

Tabelle 13: Mittlerer Flächenanteil (MW \pm Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren im Serum der Hunde in Gruppe B (n = 6) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren

Gruppe B	Vorperiode	Versuchsperiode I	Washout	Versuchsperiode II
Fütterung	Talg	Talg	Talg	Fischöl
n-6-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
Linolsäure	16,63 \pm 1,91	16,93 \pm 2,00	14,47 \pm 1,53	15,26 \pm 3,22
Arachidonsäure	23,75 \pm 1,51	23,57 \pm 1,42	23,01 \pm 1,38	18,45*** \pm 0,74
n-3-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
α -Linolensäure	0,25 \pm 0,10	0,23 \pm 0,06	0,23 \pm 0,07	0,22 \pm 0,09
Eicosapentaensäure	0,33 \pm 0,08	0,32 \pm 0,09	0,25 \pm 0,06	3,04*** \pm 0,83
Docosahexaensäure	0,96 \pm 0,22	0,93 \pm 0,13	0,79 \pm 0,16	3,75*** \pm 1,02

Signifikante Unterschiede zu dem Ausgangswert (Vorperiode), Versuchsphase I und Washout sind gekennzeichnet mit *(p<0,05), **(p<0,01) und ***(p<0,001)

4.1.2. Gesamtfettsäuren im Katzenserum unter Fischöleinfluss

16 Katzen nahmen an der Fütterungsstudie teil, die zu je 8 Tieren in Gruppe A und B eingeteilt waren. Die Analytik erfolgte jeweils von Serumproben am Ende der jeweiligen Versuchsperiode in der 6. Woche (Vorperiode), 10. Woche (Versuchsperiode I), 16. Woche (Washout-Phase) und 20. Woche (Versuchsperiode II). In den Tabellen 14 und 15 findet man die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Gesamtfettsäuren und in Abbildung 13 sind die Gesamtfettsäuren in Prozent aus dem Serum der Katzen graphisch dargestellt.

Dabei wurden 26 Fettsäuren detektiert und 14 Fettsäuren konnten eindeutig im Vergleich zum 37-Komponenten-Standard identifiziert werden. 5 der 26 Fettsäuren machen 88 % der Gesamtfettsäuren aus. Dazu gehören die Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1n9c), Linolsäure (18:2n6c) und die Arachidonsäure (20:4n6). 12 Fettsäuren, die man mit dem Standard nicht eindeutig identifizieren konnte, entsprachen ca. 4 % der Gesamtfettsäuren.

Tabelle 14: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Katzen in Gruppe A (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte

n=8	Gruppe	A	A	A	A
	Versuchsphase	Vorperiode	Versuchsphase I	Washout	Versuchsphase II
Fettsäure	Fütterung	Talg	Fischöl	Talg	Talg
Myristinsäure	C14:0	0,14 ± 0,09	0,22 ± 0,02	0,09 ± 0,09	0,11 ± 0,07
	C15:0	0,21 ± 0,05	0,11 ± 0,10	0,19 ± 0,08	0,15 ± 0,03
Palmitinsäure	C16:0	13,79 ± 0,55	13,34 ± 0,66	15,32 ± 0,75	13,06 ± 0,52
		0,52 ± 0,08	0,66 ± 0,06	0,64 ± 0,12	0,46 ± 0,04
Palmitoleinsäure	C16:1	0,57 ± 0,07	0,65 ± 0,10	0,69 ± 0,07	0,59 ± 0,04
	C17:0	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,07	0,08 ± 0,06	0,13 ± 0,07
Stearinsäure	C18:0	26,42 ± 2,01	23,12 ± 2,10	26,06 ± 2,06	26,97 ± 1,30
		0,62 ± 0,08	0,57 ± 0,08	0,56 ± 0,36	0,49 ± 0,23
Ölsäure	C18:1n9c	12,47 ± 1,23	11,72 ± 1,08	13,62 ± 1,56	12,18 ± 0,93
		0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,17 ± 0,07	0,04 ± 0,06
		0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,14	0,21 ± 0,06
Linolsäure	C18:2n6c	12,00 ± 2,52	9,32 ± 1,55	10,54 ± 1,57	9,18 ± 0,85
		0,11 ± 0,06	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,05	0,10 ± 0,02
α-Linolensäure	C18:3n3	0,24 ± 0,07	0,20 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,28 ± 0,03
		0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,06
		0,32 ± 0,09	0,21 ± 0,27	0,26 ± 0,10	0,23 ± 0,17
		0,14 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,07	0,08 ± 0,05
	C22:0	0,25 ± 0,02	0,29 ± 0,12	0,28 ± 0,03	0,29 ± 0,02
DGLA	C20:3n6	1,53 ± 0,36	1,51 ± 0,24	1,59 ± 0,08	1,76 ± 0,06
Arachidonsäure	C20:4n6	22,76 ± 0,50 ^a	21,43 ± 0,77 ^b	22,28 ± 1,54 ^a	24,19 ± 0,82 ^a
EPA	C20:5n3	0,64 ± 0,28 ^a	7,15 ± 1,09 ^b	0,45 ± 0,09 ^a	0,51 ± 0,07 ^a
		0,56 ± 0,29	0,29 ± 0,15	0,43 ± 0,20	0,48 ± 0,04
		0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,04	0,14 ± 0,10	0,51 ± 0,18
		0,16 ± 0,06	0,11 ± 0,14	0,17 ± 0,14	0,13 ± 0,06
		1,44 ± 0,57	0,66 ± 0,08	0,89 ± 0,18	1,08 ± 0,16
DHA	C22:6n3	1,58 ± 0,52 ^a	4,24 ± 0,61 ^b	0,93 ± 0,09 ^a	1,38 ± 0,18 ^a

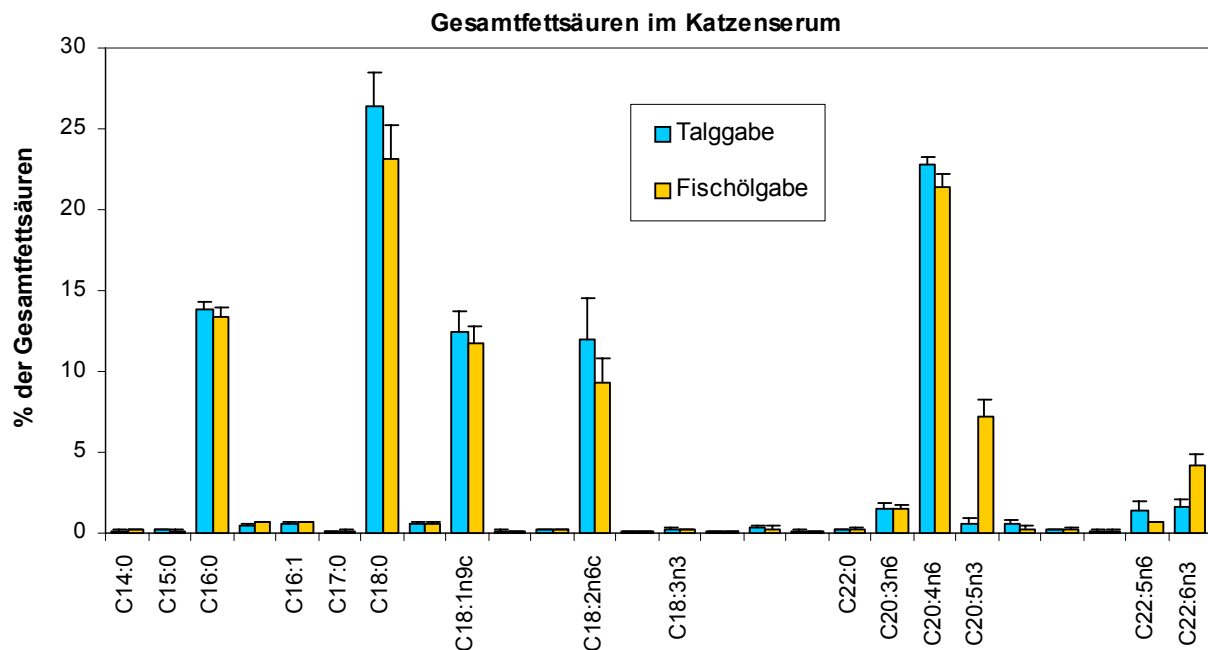
a , b: unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe A zwischen den verschiedenen Fütterungsphasen

Tabelle 15: Mittlerer Flächenanteil (MW ± Stabw) der Gesamtfettsäuren in % aus dem Serum von Katzen in Gruppe B (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte

n=8	Gruppe	B	B	B	B
	Versuchsphase	Vorperiode	Versuchsphase I	Washout	Versuchsphase II
Fettsäure	Fütterung	Talg	Talg	Talg	Fischöl
Myristinsäure	C14:0	0,08 ± 0,06	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,05	0,20 ± 0,02
	C15:0	0,19 ± 0,02	0,07 ± 0,05	0,12 ± 0,09	0,17 ± 0,04
Palmitinsäure	C16:0	13,06 ± 0,83	13,84 ± 0,95	14,04 ± 0,77	13,68 ± 0,35
		0,55 ± 0,13	0,59 ± 0,14	0,44 ± 0,13	0,77 ± 0,09
Palmitoleinsäure	C16:1	0,59 ± 0,05	0,55 ± 0,03	0,67 ± 0,08	0,61 ± 0,04
	C17:0	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,13 ± 0,07	0,13 ± 0,02
Stearinsäure	C18:0	23,78 ± 4,21	23,05 ± 2,39	27,93 ± 0,61	21,89 ± 1,70
		0,50 ± 0,17	0,47 ± 0,20	0,59 ± 0,05	0,56 ± 0,15
Ölsäure	C18:1n9c	13,26 ± 1,74	14,18 ± 1,53	11,91 ± 0,80	11,27 ± 0,57
		0,12 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,05
		0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,04
Linolsäure	C18:2n6c	12,96 ± 2,63	13,00 ± 1,13	9,74 ± 0,94	8,64 ± 1,08
		0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,12 ± 0,07
α-Linolensäure	C18:3n3	0,32 ± 0,02	0,22 ± 0,06	0,27 ± 0,12	0,32 ± 0,09
		0,14 ± 0,09	0,10 ± 0,02	0,04 ± 0,05	0,10 ± 0,03
		0,32 ± 0,22	0,26 ± 0,06	0,31 ± 0,05	0,20 ± 0,05
		0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,14
	C22:0	0,29 ± 0,04	0,26 ± 0,10	0,38 ± 0,08	0,19 ± 0,03
DGLA	C20:3n6	1,80 ± 0,40	1,58 ± 0,08	1,81 ± 0,08	1,14 ± 0,11
Arachidonsäure	C20:4n6	24,34 ± 0,86 ^a	23,12 ± 1,14 ^a	23,45 ± 0,91 ^a	19,74 ± 1,17 ^b
EPA	C20:5n3	0,52 ± 0,09 ^a	0,41 ± 0,18 ^a	0,58 ± 0,13 ^a	6,86 ± 0,57 ^b
		0,61 ± 0,14	0,80 ± 0,41	0,40 ± 0,04	0,29 ± 0,05
		0,19 ± 0,12	0,38 ± 0,24	0,34 ± 0,05	0,96 ± 0,29
		0,08 ± 0,08	0,12 ± 0,12	0,10 ± 0,07	0,19 ± 0,19
		0,95 ± 0,08	1,05 ± 0,16	0,95 ± 0,35	0,68 ± 0,09
DHA	C22:6n3	1,04 ± 0,07 ^a	1,15 ± 0,15 ^a	1,32 ± 0,20 ^a	4,44 ± 0,51 ^b

a , b: unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe A zwischen den verschiedenen Fütterungsphasen

Abbildung 13: Gesamtfettsäuren im Serum von Katzen bei Fütterung von Talg bzw. Fischöl (n=16)



4.1.2.1. Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren

Tabelle 16 und 17 zeigen die Unterschiede der Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren bei Talg- und Fischölgabe in Gruppe A und B.

Bei den Omega-6-Fettsäuren sinkt unter Fischölgabe in Gruppe A die Linolsäure um 11 % und die Arachidonsäure um 7 %. In Gruppe B sinken beide Fettsäuren ebenfalls um 27 % bzw. um 16 %. Bei Talggabe nähern sich beide Fettsäuren ihren Ausgangswerten in der Vorperiode.

Bei den Omega-3-Fettsäuren steigen in Gruppe A und B unter Fischölgabe die Eicosapentaensäure um das 14-fache und die Docosahexaensäure um das 4-fache an.

Tabelle 16: Mittlerer Flächenanteil (MW \pm Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren aus dem Katzenserum in Gruppe A (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren

Gruppe A	Vorperiode	Versuchsperiode I	Washout	Versuchsperiode II
Fütterung	Talg	Fischöl	Talg	Talg
n-6-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
Linolsäure	12,00 \pm 2,52	9,32 \pm 1,55	10,54 \pm 1,57	9,18 \pm 0,85
Arachidonsäure	22,76 \pm 0,50	21,43** \pm 0,77	22,28 \pm 1,54	24,19 \pm 0,82
n-3-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
α -Linolensäure	0,24 \pm 0,07	0,20 \pm 0,05	0,32 \pm 0,04	0,28 \pm 0,03
Eicosapentaensäure	0,64 \pm 0,28	7,15*** \pm 1,09	0,45 \pm 0,09	0,51 \pm 0,07
Docosahexaensäure	1,58 \pm 0,52	4,24*** \pm 0,61	0,93 \pm 0,09	1,38 \pm 0,18

Signifikante Unterschiede zum Ausgangswert (Vorperiode), Washout und Versuchsphase II sind gekennzeichnet mit *(p<0,05), **(p<0,01) und ***(p<0,001)

Tabelle 17: Mittlerer Flächenanteil (MW \pm Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren aus dem Katzenserum in Gruppe B (n = 8) am Ende der Zeitabschnitte in % der Gesamtfettsäuren

Gruppe B	Vorperiode	Versuchsperiode I	Washout	Versuchsperiode II
Fütterung	Talg	Talg	Talg	Fischöl
n-6-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
Linolsäure	12,96 \pm 2,63	13,00 \pm 1,13	9,74 \pm 0,94	8,64 \pm 1,08
Arachidonsäure	24,34 \pm 0,86	23,12 \pm 1,14	23,45 \pm 0,91	19,74*** \pm 1,17
n-3-Fettsäuren	6.Woche	10.Woche	16.Woche	20.Woche
α -Linolensäure	0,32 \pm 0,02	0,22 \pm 0,06	0,27 \pm 0,12	0,32 \pm 0,09
Eicosapentaensäure	0,52 \pm 0,09	0,41 \pm 0,18	0,58 \pm 0,13	6,86*** \pm 0,57
Docosapentaensäure	1,04 \pm 0,07	1,15 \pm 0,15	1,32 \pm 0,20	4,44*** \pm 0,51

Signifikante Unterschiede zum Ausgangswert (Vorperiode), Versuchsperiode I und Washout sind gekennzeichnet mit *(p<0,05), **(p<0,01) und ***(p<0,001)

4.1.3. Gesamtfettsäuren im Hundeserum unter Algeneinfluss

8 Hunde nahmen an der Fütterungsstudie teil. Bei dieser Fütterungsstudie stand das Serum am Ende der Versuchsperioden nicht mehr zur Verfügung. Darum wurde auf Serum ausgewichen, das zwei Wochen früher abgenommen wurde. Die Analytik erfolgte jeweils von Proben aus der 4. Woche (Vorperiode), 10. Woche (Algenperiode I), 16. Woche (Algenperiode II) und 22. Woche (Nachperiode).

In Tabelle 18 findet man die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Gesamtfettsäuren und in Abbildung 14 sind die Gesamtfettsäuren in Prozent aus dem Serum der Hunde graphisch dargestellt.

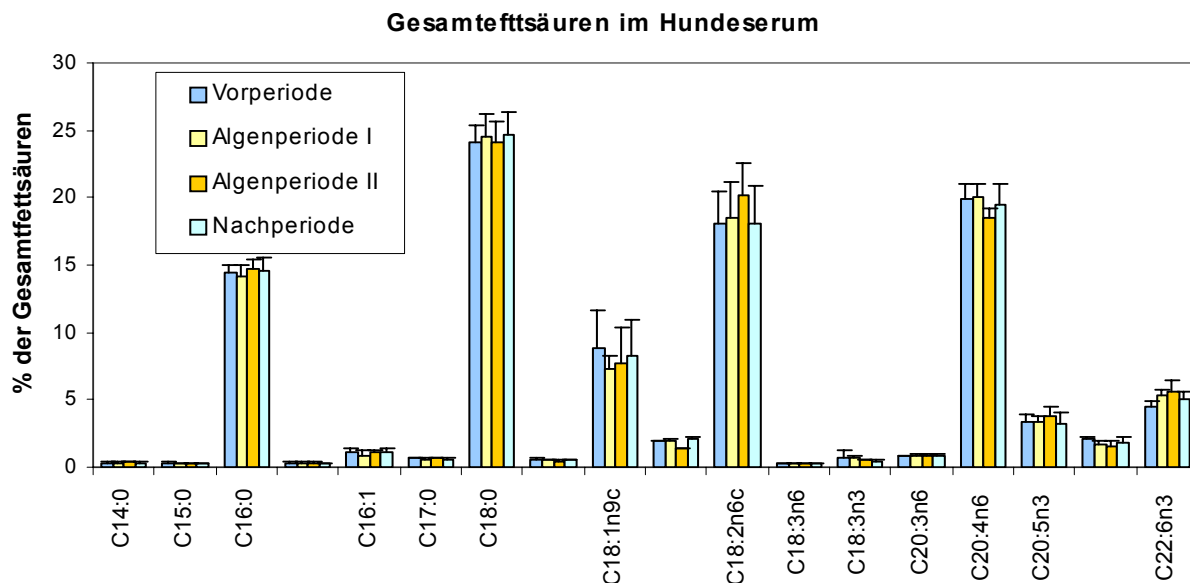
Dabei wurden 18 Fettsäuren detektiert und 14 Fettsäuren konnten mit dem Standard identifiziert werden. 5 der 18 Fettsäuren machen 85 % der Gesamtfettsäuren aus. Dazu gehören die Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1n9c), Linolsäure (18:2n6c) und die Arachidonsäure (20:4n6). 4 Fettsäuren konnten nicht eindeutig identifiziert werden und entsprachen 6 % der Gesamtfettsäuren.

Tabelle 18: Mittlerer Flächenanteil (MW \pm Stabw) der Gesamtfettsäuren in % im Serum der Hunde (n = 8) in den entsprechenden Zeitabschnitte, die an der Algenfütterungsstudie teilgenommen haben

Fettsäure	Versuchsphase	Vorperiode	Algenperiode I	Algeperiode II	Nachperiode
Myristinsäure	C14:0	0,32 \pm 0,07	0,31 \pm 0,07	0,40 \pm 0,06	0,28 \pm 0,08
	C15:0	0,28 \pm 0,08	0,25 \pm 0,04	0,26 \pm 0,05	0,28 \pm 0,03
Palmitinsäure	C16:0	14,50 \pm 0,57	14,15 \pm 0,79	14,77 \pm 0,58	14,62 \pm 0,90
Palmitoleinsäure	C16:1	0,30 \pm 0,06	0,29 \pm 0,06	0,31 \pm 0,06	0,30 \pm 0,04
		1,07 \pm 0,30	0,86 \pm 0,35	1,05 \pm 0,22	1,05 \pm 0,30
	C17:0	0,63 \pm 0,07	0,60 \pm 0,05	0,64 \pm 0,07	0,59 \pm 0,04
Stearinsäure	C18:0	24,05 \pm 1,35	24,48 \pm 1,68	24,05 \pm 1,60	24,68 \pm 1,74
	C18:1n9t	0,51 \pm 0,15	0,53 \pm 0,10	0,45 \pm 0,11	0,54 \pm 0,03
Ölsäure	C18:1n9c	8,77 \pm 2,83	7,34 \pm 0,88	7,69 \pm 2,73	8,30 \pm 2,57
		1,98 \pm 0,02	2,01 \pm 0,10	1,46 \pm 0,00	2,09 \pm 0,13
Linolsäure	C18:2n6c	18,15 \pm 2,34	18,47 \pm 2,73	20,13 \pm 2,39	18,15 \pm 2,79
α -Linolensäure	C18:3n3	0,26 \pm 0,04	0,29 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,23 \pm 0,04
		0,65 \pm 0,56	0,64 \pm 0,22	0,53 \pm 0,01	0,38 \pm 0,13

DGLA	C20:3n6	0,82 ± 0,07	0,90 ± 0,11	0,81 ± 0,11	0,85 ± 0,14
Arachidonsäure	C20:4n6	19,97 ± 1,12	20,03 ± 0,94	18,53 ± 0,62	19,43 ± 1,66
EPA	C20:5n3	3,31 ± 0,57	3,38 ± 0,38	3,77 ± 0,67	3,26 ± 0,76
		2,07 ± 0,13	1,72 ± 0,26	1,59 ± 0,34	1,86 ± 0,33
DHA	C22:6n3	4,51 ± 0,45	5,26 ± 0,49	5,64 ± 0,87	4,98 ± 0,64

Abbildung 14: Gesamtfettsäuren im Serum von Hunden bei Fütterung mit Algen



4.1.3.1. Omega-3 und Omega-6-Fettsäuren

In Tabelle 19 werden zusammenfassend die Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren dargestellt. Die Linolsäure steigt von der Vorperiode bis zur Algenperiode II um 10% und fällt in der Nachperiode wieder auf ihren Ausgangswert. Die Arachidonsäure sinkt bis zur Algenperiode II um 7% und nähert sich in der Nachperiode wieder ihrem Basiswert.

Bei den Omega-3-Fettsäuren steigt die α -Linolensäure minimal während der Algenperioden I und II an. Die Eicosapentaensäure steigt bis zur Algenperiode II um 14 %, bei der Docosahexaensäure stellt man bis zur Algenperiode II einen 25 % Anstieg fest, beide Fettsäuren sinken in der Nachperiode in Richtung ihres Basiswertes.

Tabelle 19: Mittlerer Flächenanteil (MW \pm Stabw) der Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren im Serum der Hunde (n = 8) in den entsprechenden Versuchsschnitten in % der Gesamtfettsäuren

n = 8	Vorperiode	Algenperiode I	Algenperiode II	Nachperiode
n-6-Fettsäuren	4. Woche	10. Woche	16. Woche	22. Woche
Linolsäure	18,15 \pm 2,34	18,47 \pm 2,73	20,13 \pm 2,39	18,15 \pm 2,79
Arachidonsäure	19,97 \pm 1,12	20,03 \pm 0,94	18,53 \pm 0,62	19,43 \pm 1,66
n-3-Fettsäuren	4. Woche	10. Woche	16. Woche	22. Woche
α -Linolensäure	0,26 \pm 0,04	0,29 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,23 \pm 0,04
Eicosapentaensäure	3,31 \pm 0,57	3,38 \pm 0,38	3,77 \pm 0,67	3,26 \pm 0,76
Docosahexaensäure	4,51 \pm 0,45	5,26 \pm 0,49	5,64 \pm 0,87	4,98 \pm 0,64

4.2. Trennung der Lipidklassen mit einer Aminopropylsäule

Zur Isolierung der Lipidklassen wurde an mehreren Aminopropylsäulen folgendes Elutionsschema (Tabelle 20) angewendet:

Tabelle 20: Elutionsschema bei einer Aminopropylsäule

Verwendetes Lösungsmittel	Volumenverhältnis	Elution der Substanzen
Chloroform-Propanol	2:1	Triglyceride
Diethylether-Essigsäure	98:2	Fettsäuren
Methanol		Phospholipide

Bei der Aminopropylsäule werden durch die Elution mit Chloroform-Propanol Triglyceride aus der Säulenmatrix gelöst. Der Triglycerid-Mix bestand aus 5 Fettsäuren, wobei je nach Fettsäure die Ausbeute zwischen 60% -74 % schwankte. Bei 16 Aminopropylsäulen wurden Ausbeute und Verluste des Triglycerid-Mix im Vergleich zum methylierten Standard ausgewertet und in Tabelle 21 aufgelistet. Mit der Elution von Diethylether an 18 Säulen wurden die beiden Fettsäuren Arachidonsäure und Docosahexaensäure eluiert und die Ausbeute mit 91-97% im Vergleich zu den beiden Fettsäurestandards bestätigt. Mit Methanol werden die Phospholipide gelöst. Der

Phospholipid-Mix besteht aus sechs Fettsäuren, wobei die Ausbeute bei 23 getesteten Säulen nur 0% -12 % je nach Fettsäure erreichte.

Tabelle 21: Ausbeute und Verluste in Prozent der Fettsäuren des Lipid-Mix, der auf eine Aminopropylsäulen aufgetragen wurde und mit dem Elutionsschema aus Tabelle 20 eluiert wurde

Lipidklasse	Fettsäure	Ausbeute (%)	Verluste (%)
Triglycerid	C 6:0	74	26
Triglycerid	C 8:0	71	29
Triglycerid	C 10:0	66	34
Triglycerid	C 12:0	65	35
Triglycerid	C 14:0	61	39
Arachidonsäure	C 20:4n6	91	9
Docosahexaensäure	C 22:6 n3	97	3
Phospholipide	C 12:0	11	89
Phospholipide	C 14:0	0	100
Phospholipide	C 16:0	12	88
Phospholipide	C 18:0	4,5	95,5
Phospholipide	C 18:1	3,5	96,5
Phospholipide	C 18:2	9	91

Werden auf Aminopropylsäulen statt einem Mix aus Triglyceriden, Fettsäure und Phospholipiden ausschließlich ein Phospholipidstandard pipettiert und anstelle dem Elutionsschema nur mit Methanol eluiert, so erhält man eine wesentlich höhere Ausbeute von 57 % - 80 % je nach Fettsäure des Phospholipidstandards wie in Tabelle 22 beschrieben.

Tabelle 22: Ausbeute und Verluste in Prozent nach Auftrag nur eines Phospholipidstandards bei alleiniger Elution mit Methanol an Aminopropylsäulen (n=3)

n=3	NH ₂ -Säule	NH ₂ -Säule
Fettsäure	Ausbeute (%)	Verluste (%)
C 12:0	80	20
C 14:0	79	21
C 16:0	77,5	22,5
C 18:0	63	37
C 18:1	71	29
C 18:2	56	43

Mit der Aminopropylsäule lassen sich zwar Triglyceride, freie Fettsäuren und Phospholipide trennen, doch ist nur die Ausbeute bei den Triglyceriden mit ca. 65% und bei den freien Fettsäuren mit ca. 95% akzeptabel. Die Verluste bei den Phospholipiden mit fast 90% sind für die Lipidklassentrennung nicht zufriedenstellend.

4.3. Trennung der Lipidklassen mit einer Silicasäule

An zwei Silicasäulen wurde ebenfalls die Isolierung der Lipidklassen durchgeführt. Mit Chloroform lösen sich gemeinsam Triglyceride mit einer Ausbeute von 88 % - 100% und die Fettsäuren mit einer Ausbeute von 65 %-77 % von der Säule. Mit Methanol erhält man die Phospholipide mit einer Ausbeute von 56 %-70 %, wie in Tabelle 23 gezeigt.

Tabelle 23: Ausbeute und Verluste in Prozent der Fettsäuren des Lipid-Mix, der auf eine Silicasäule aufgetragen wurde

n=2		Silica	Silica
Lipidklasse	Fettsäure	Ausbeute (%)	Verluste (%)
Triglycerid	C 8:0	88	12
Triglycerid	C 10:0	94	6
Triglycerid	C 12:0	95	5
Triglyceird	C 14:0	100	0
Arachidonsäure	C 20:4n6	65	35
Docosahexaensäure	C 22:6 n3	77	23
Phospholipide	C 12:0	70	30
Phospholipide	C 14:0	64	36
Phospholipide	C 16:0	59	41
Phospholipide	C 18:0	63	37
Phospholipide	C 18:1	59	41
Phospholipide	C 18:2	56	44

Bei der Silicasäule werden mit diesem Elutionsschema die Triglyceride nicht von den freien Fettsäuren getrennt. Bei den Phospholipiden belaufen sich jedoch die Verluste nur bei ca. 40%.

5. Diskussion

5.1. Serumanalysen der Fütterungsstudien

Für die Analytik der Gesamtfettsäuren stand das Serum von drei Fütterungsstudien zur Verfügung. Mit der in dieser Arbeit etablierten Methode sollten die Gesamtfettsäuren im Serum bestimmt werden und dabei eventuelle Veränderungen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren erfasst werden.

5.1.1. Fettsäureanalyse von Hundeserum nach fischöhlhaltiger Fütterung

Bei den Tieren dieser Fütterungsstudie handelt es sich um 12 institutseigene, weibliche Beagles, die zu Versuchsbeginn 10 Monate alt waren. Für die Studie wurde ein Crossover-Verfahren gewählt (Adler, 2002).

Um eine Änderung im Fettsäuremuster bei den Omega-3- und Omega-6- Fettsäuren zu erhalten, war eine 4-wöchige Gabe von Fischöl ausreichend. Hansen et al. (1998) konnten bereits nach 1 Woche Fischölfütterung einen signifikanten Anstieg von EPA und DHA im Serum nachweisen, 3 Wochen sind jedoch nötig, um eine Abnahme der Arachidonsäure beobachten zu können.

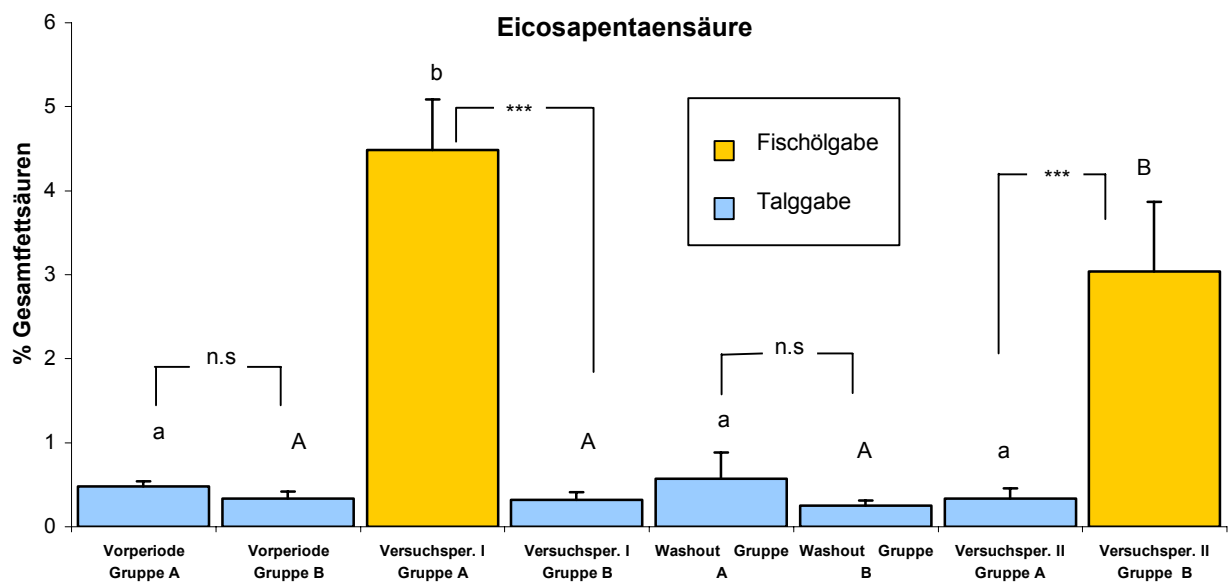
Kearns et al. (1999) beobachteten bei gleicher Fütterung rasse- und altersspezifische Unterschiede im Fettsäuremuster von Tieren. Während des Geschlechtszyklus kommt es zu Veränderungen im Triglycerid- und Cholesterolspiegel (Downs et al., 1994) und deshalb nimmt man auch Unterschiede im Fettsäuremuster durch verschiedene Zyklusphasen an. Da jedoch unter den Versuchstieren keine Unterschiede bezüglich Rasse, Geschlecht und Alter vorlagen, sind aus diesen Gründen keine Veränderungen im Fettsäuremuster zu erwarten.

In der Arbeit von Adler (2002) wurde der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel untersucht. Dazu wurden der Knochenformationsmarker Alkalische Phosphatase im Serum und die Knochenresorptionsmarker Pyridinolin sowie Calcium im Urin bestimmt. Die Gabe des fischöhlhaltigen Futters zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Parametern des Knochenstoffwechsels.

Bei den Omega-6-Fettsäuren wurden durch die 4-wöchige Fischölfütterung die Linol- und Arachidonsäure gesenkt, wobei der Abfall der Linolsäure in den vier Fütterungsperioden nicht signifikant war. Für die Arachidonsäure konnte jedoch ein hoch signi-

fikanter Unterschied zwischen der talghaltigen Fütterung und der fischöhlhaltigen Diät festgestellt werden. Im Vergleich dazu steigen die Omega-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure hoch signifikant ($p < 0,001$) unter Fischölgabe an. In Gruppe A und B steigt die EPA um das 10-fache an und die DHA erhöht sich um das 4-fache. Der deutliche Anstieg von EPA und DHA unter fischöhlhaltiger Diät sind in Abbildung 15 und 16 dargestellt.

Abbildung 15: Anstieg der Eicosapentaensäure bei 12 Hunden nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung



Versuchsp.: Versuchsperiode

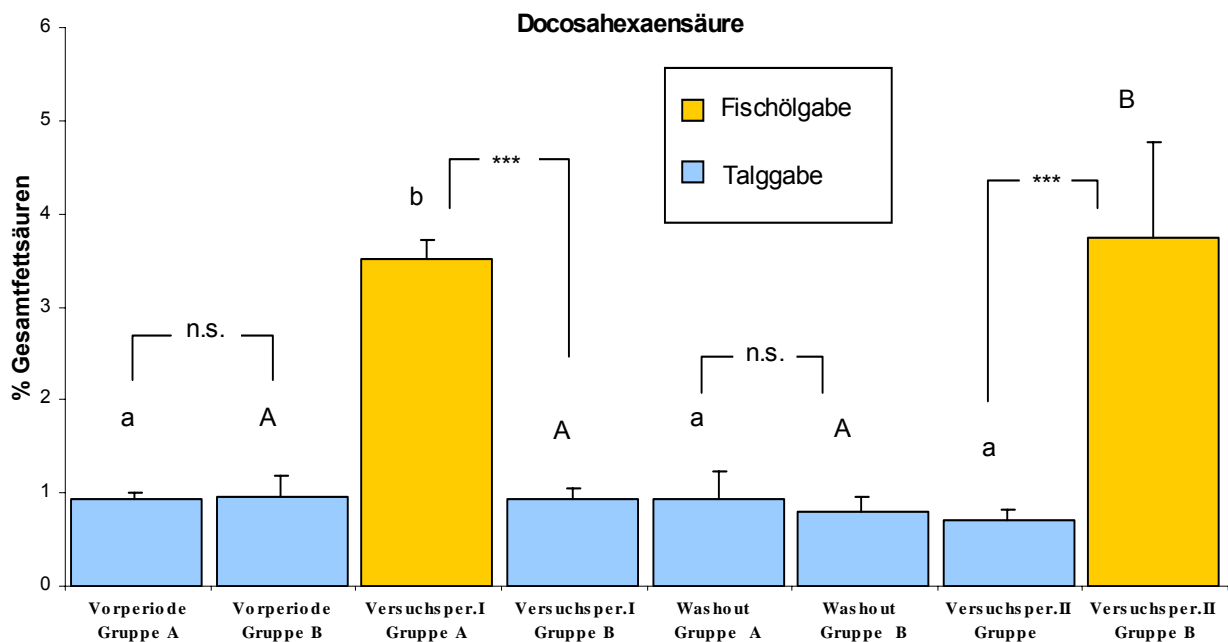
a, b : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe A

A, B : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe B

n, s: nicht signifikant

*** ($p < 0,001$): hoch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und B zu den verschiedenen Zeitpunkten

Abbildung 16: Anstieg der Docosahexaensäure bei 12 Hunden nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung



Versuchsp.: Versuchsperiode

a, b : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe A

A, B : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe B

n, s: nicht signifikant

*** ($p < 0,001$): hoch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und B zu den verschiedenen Zeitpunkten

In der Doktorarbeit von Adler (2002) sind die im Analysenlabor von OmegaTech gemessenen Werte dargestellt. Deren Ergebnisse sind bezüglich der Linolsäure -, Arachidonsäure und Docosahexaensäure mit unseren Befunden nahezu konform. Bei der Eicosapentaensäure wurden jedoch vor zwei Jahren etwas höhere Werte gefunden. Der Grund dafür könnte sein, dass die extern gemessenen Werte von OmegaTech direkt anschließend am Ende der Fütterungsstudie 2001 bzw. Anfang 2002 stattfanden (Tabelle 24). Unsere Analysen erfolgten im September 2003, also 1 ½ Jahre später. Möglicherweise sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren anfällig gegen Oxidation und die Verluste sind mit der längeren Lagerungszeit zu erklären. Dies wäre eine Erklärung für die abweichenden Werte bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Tabelle 24: Vergleich der Ergebnisse der externen Analysen mit den eigenen Untersuchungen nach fischöhlhaltiger Fütterung bei Hunden

Fettsäure	Gruppe	Externe Untersuchungen	Eigene Untersuchungen
Eicosapentaensäure	A	11 fach erhöht	10 fach erhöht
Eicosapentaensäure	B	15 fach erhöht	10 fach erhöht
Docosahexaensäure	A	4 fach erhöht	4 fach erhöht
Docosahexaensäure	B	4 fach erhöht	4 fach erhöht
Linolsäure	A	8 % gesunken	7 % gesunken
Linolsäure	B	3 % gesunken	5 % gesunken
Arachidonsäure	A	21 % gesunken	20,0 % gesunken
Arachidonsäure	B	14 % gesunken	21 % gesunken

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Omega-3-Fettsäuren aus dem Futter mit Fischölgabe in das Fettsäuremuster des Serums der Tiere aufgenommen wurden, d.h. die mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurden prozentual im Gesamtfettsäuremuster erhöht. Bei dieser Fütterungsstudie kann man also zeigen, dass obwohl die Aufnahme der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Blut nachgewiesen wurde, die Parameter des Knochenstoffwechsels beim Hund nicht beeinflusst wurden.

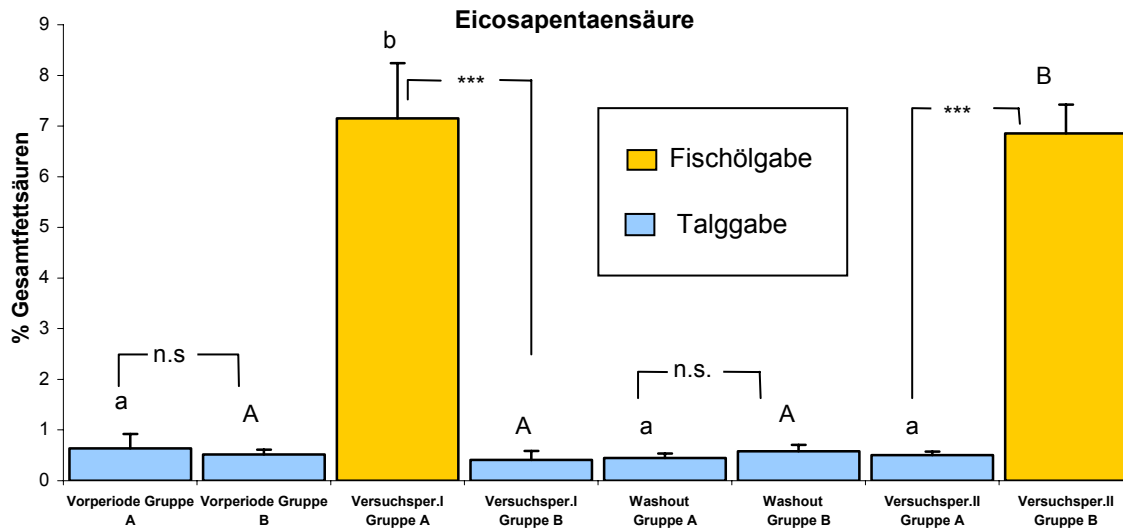
5.1.2. Fettsäureanalyse von 16 Katzen nach fischöhlhaltiger Fütterung

Für diese Fütterungsstudie standen 16 institutseigene, adulte, weibliche und männliche Europäisch Kurzhaarkatzen zur Verfügung. Das Alter variierte von 1 $\frac{3}{4}$ bis 7 $\frac{1}{2}$ Jahren. Es wurden sowohl weiblich und männlich intakte Tiere als auch weiblich und männlich kastrierte Tiere mit unterschiedlichem Gewicht eingesetzt. Für die Studie wurde ebenfalls ein Crossover-Verfahren gewählt. Das Versuchsfutter mit Fischölzusatz und das Kontrollfutter mit Rindertalg als Fettquelle wurde von den Katzen gut akzeptiert (Wilhelm, 2002).

Bei den Omega-6-Fettsäuren sinken unter Fischölgabe in Gruppe A und B Linolsäure und Arachidonsäure, wobei nur bei der Arachidonsäure statistisch signifikante Unterschiede gezeigt werden konnten. In Abbildung 17 und 18 wird der hoch signifikante

Anstieg unter Fischölgabe bei der Eicosapentaensäure um das 14-fache und bei der Docosahexaensäure um 4-fache dargestellt.

Abbildung 17: Anstieg der Eicosapentaensäure bei 16 Katzen nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung



Versuchsp.: Versuchsperiode

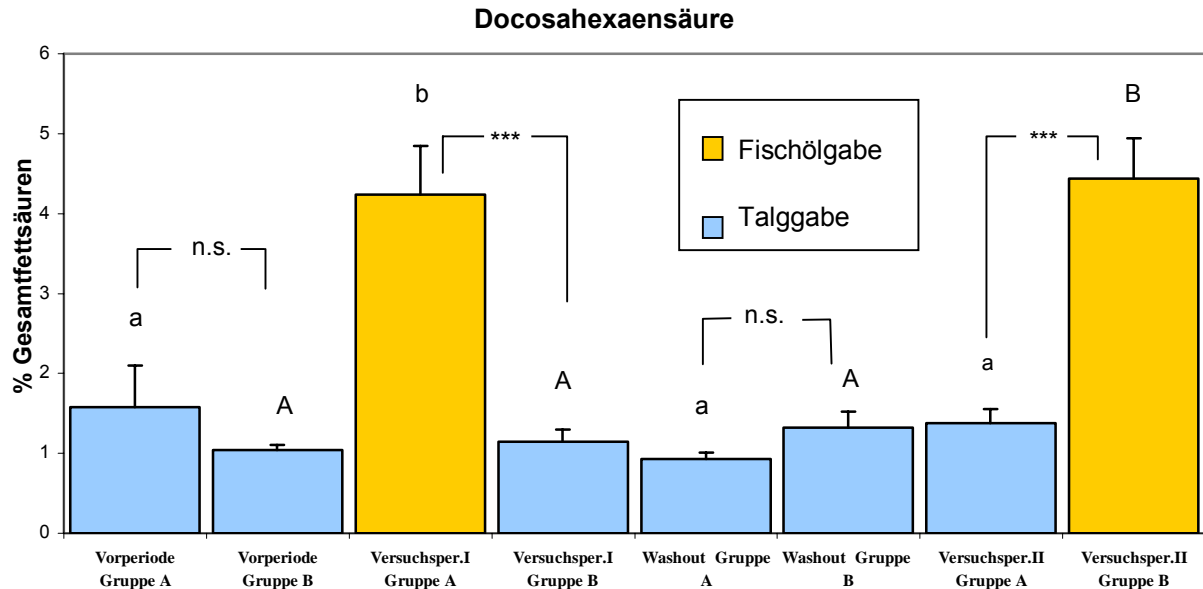
a, b : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe A

A, B : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe B

n, s: nicht signifikant

*** ($p < 0,001$): hoch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und B zu den verschiedenen Zeitpunkten

Abbildung 18: Anstieg der Docosahexaensäure bei 16 Katzen nach vierwöchiger fischöhlhaltiger Nahrung



Versuchsp.: Versuchsperiode

a, b : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe A

A, B : unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb Gruppe B

n, s: nicht signifikant

*** ($p < 0,001$): hoch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und B zu den verschiedenen Zeitpunkten

In der Doktorarbeit von Wilhelm (2002) sind die ebenfalls vom Analysenlabor von OmegaTech gemessenen Werte in % Gesamtfettsäuren aufgelistet (Tabelle 25). Die Werte von OmegaTech wurden sofort nach Ende der Fütterungsstudie 2001 bzw. Anfang 2002 gemessen. Unsere Untersuchungen erfolgten im Oktober 2003, also ca. 1 ½ Jahre später. Hierbei sieht man, dass sowohl bei der Eicosapentaensäure als auch bei der Docosahexaensäure etwas geringere Werte gemessen wurden. Die Werte der Linol- und Arachidonsäure sinken auch innerhalb der einzelnen Gruppen. Betrachtet man die Gruppenzusammensetzung war Alter und Gewicht in beiden Gruppen ausgeglichen.

Auch nach 1 ½ Jahren Lagerung können Anstiege bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren nach Fischölgabe nachgewiesen werden, wobei die Verluste durch Lagerung relativ gering ausfallen.

Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse der externen Analysen mit den eigenen Untersuchungen nach fischöhlhaltiger Fütterung bei Katzen

Fettsäure	Gruppe	Externe Untersuchungen	Eigene Untersuchungen
Eicosapentaensäure	A	16-fach erhöht	14-fach erhöht
Eicosapentaensäure	B	16-fach erhöht	14-fach erhöht
Docosahexaensäure	A	5-fach erhöht	3-fach erhöht
Docosahexaensäure	B	4-fach erhöht	4-fach erhöht
Linolsäure	A	27 % gesunken	11 % gesunken
Linolsäure	B	40 % gesunken	27 % gesunken
Arachidonsäure	A	8 % gesunken	7 % gesunken
Arachidonsäure	B	23 % gesunken	16 % gesunken

Das Ziel dieser Fütterungstudie (Wilhelm, 2002) war, den Einfluss von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel und Lipidstoffwechsel der Katze zu untersuchen. Dabei konnte man unter fischöhlhaltiger Diät keinen Einfluss auf die Parameter Alkalische Phosphatase, Pyridinolin und Kalzium feststellen. Es sinken jedoch die Serumkonzentrationen von Cholesterin und Triglyceriden signifikant. Die alimentäre Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren führt zum Anstieg der EPA und DHA im Blut bei Katzen und daraus ist zu schließen, dass die Abnahme von Serumtriglyceriden und Cholesterin mit diesem Effekt in Zusammenhang zu bringen ist.

5.1.3. Fettsäureanalyse von 8 Hunden mit Algenfütterung

In den 80er Jahren wurde jährlich 1 Million Tonnen Fischöl mit 100 000 –250 000 Tonnen EPA und DHA produziert. Der Bedarf an diesen Fettsäuren ist jedoch allein für die Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen 10-fach höher (Bimbo, 1987).

Als Alternative zum Fischöl wurde die Verarbeitung von arktischem Krill verfolgt, der noch unbegrenzt zur Verfügung steht. Denn 100g Krill enthalten etwa 1,5 g PUFA, davon 800 mg EPA und 500 mg DHA (Metz,2000).

Die Industrie konzentrierte sich als weitere Möglichkeit zur Herstellung dieser Fettsäuren auf die Anzucht von Mikroalgen wie Diatomeae, Chryso-, Rhodo- und Dinophyceae, die natürlicherweise einen relativ hohen Gehalt an AA, EPA, und DHA besitzen (Cohen et al., 1995).

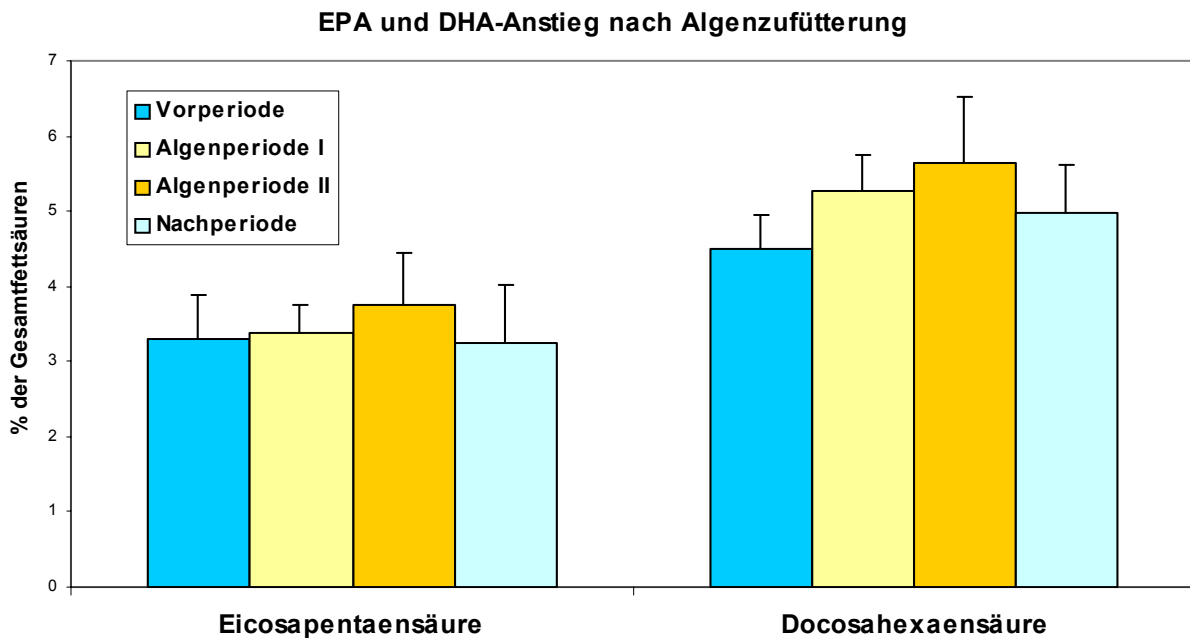
In der Fütterungsstudie von Frischknecht wurden solche Mikroalgen mit einem erhöhten DHA-Gehalt von 0,28 g/kg Versuchsfutter in Algenperiode I und 0,41 g DHA/kg Versuchsfutter in Algenperiode II verwendet (Frischknecht, 2003).

Die Tiere dieser Fütterungsstudie sind 8 institutseigene Beagle, im Alter zwischen 1 $\frac{3}{4}$ und 6 $\frac{1}{4}$ Jahren. In dieser Gruppe befanden sich weiblich intakte, männlich intakte und männlich kastrierte Tiere. Da unter den Versuchstieren Unterschiede in Geschlecht und Alter und somit auch unterschiedliche Zyklusphasen vorlagen, könnten aus diesen Gründen höhere Streuungen im Fettsäuremuster der einzelnen Tiere auftreten.

Bei den Ergebnissen des externen Labors sinkt die Linolsäure um 10 %, jedoch steigt die Arachidonsäure um 4 %. Die Eicosapentaensäure steigt um 150 % und die Docosahexaensäure um 118 %. Bei unseren Untersuchungen steigt die Linolsäure bis zur Algenperiode II um 10% während die Arachidonsäure um 7 % sinkt. Bei den Omega-3-Fettsäuren erhöht sich die Eicosapentaensäure bis zur Algenperiode II um 14 %, bei der Docosahexaensäure um 25 %.

Einen deutlichen Anstieg im Bereich der Eicosapentaensäure und der Docosahexaensäure (Abbildung 19) konnten nach 1 $\frac{1}{2}$ Jahren Lagerung der Serumproben nicht mehr nachgewiesen werden. Da bei allen Analysen bei den oben erwähnten Studien EPA und DHA ebenfalls geringgradig unter den extern gemessenen Werten von OmegaTech lagen, ist es erklärbar, dass bei der Algenstudie ebenfalls weniger bestimmt wurde. Als weitere Ursache für die niedrigen Werte ist festzuhalten, dass bei der Algenstudie das Serum der Versuchsperioden nicht mehr zur Verfügung stand, welches OmegaTech untersuchte. Darum wurde auf Serum ausgewichen, das zwei Wochen früher abgenommen wurde. Dadurch lässt sich ebenfalls der niedrigere Wert erklären, da eine 2 Wochen kürzere Algenaufnahme stattfand.

Abbildung 19: Verlauf der Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure während den vier Versuchsphasen der Algenstudie mit Hunden



Bei der Fütterungsstudie (Frischknecht, 2003) sollten Algen als Quelle für die beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren EPA und DHA dienen. Es wurde der Einfluss der Omega-3-Fettsäuren auf den Knochenstoffwechsel und die Serumkonzentration von Triglyceriden und Cholesterin beim Hund untersucht. Dabei wurden während der Fütterungsstudie keine Veränderung bei den Cholesterin und Triglyceridwerten sowie der Alkalischen Phosphatase bei den Hunden festgestellt. Ein signifikanter Abfall der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin, sowie eine Verringerung der Calciumausscheidung über den Urin wurden jedoch beobachtet. Die verminderte Knochenresorption weist somit auf einen Einfluss der Mikroalgen auf den Knochenstoffwechsel hin. Da jedoch bei der Algenstudie kein signifikanter Anstieg der EPA und DHA im Blut nachgewiesen werden konnte, könnte es sein, dass vielleicht andere Komponenten in den Mikroalgen den Knochenstoffwechsel beeinflussen.

5.1.4. Vergleich der Fütterungsstudien

In der Vorperiode der Algenstudie ist der Serumbasiswert von EPA 10-fach und von DHA 5-fach höher als bei der Fischölstudie, denn diese Hunde erhielten ein kommerzielles Alleinfutter, welches schon Fischöl mit Omega-3-Fettsäuren enthielt.

Für die Vorperiode der Fischölstudie wurde ein eigens dafür hergestelltes Alleinfutter mit Talg als Fettquelle verfüttert. Dies erklärt die unterschiedlichen Basiswerte von EPA und DHA in den Vorperioden der beiden Fütterungsstudien.

Bei der Fischölstudie konnte ein 14-facher EPA-Anstieg und ein 4-facher DHA-Anstieg im Blut gemessen werden, während bei der Algenstudie nur eine Zunahme der EPA um 14% und der DHA um 25% zu beobachten war. Der geringe Anstieg der DHA und EPA im Serum der Algenstudie ist vielleicht damit zu erklären, dass bei der Algenstudie aufgrund des höheren Basiswertes der EPA und der DHA, die weitere Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren nicht mehr stattfindet. Zusätzlich ist noch zu beachten, dass eine 2 Wochen kürzere Algenaufnahme stattgefunden hat.

Bei der Aufnahme der Omega-Algen wurden keine signifikanten Veränderungen des Gesamtfettsäuremusters der Hunde festgestellt, jedoch wurde ein Einfluss auf den Knochenstoffwechsel beschrieben (Frischknecht, 2003).

Die Aufnahme der mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus dem Futter mit Fischölgabe konnte mit der Messung der Gesamtfettsäuren in den Seren von 12 Hunden und 16 Katzen durch den signifikanten Anstieg der mehrfach ungesättigten Fettsäuren EPA und DHA deutlich gezeigt werden. Dieser Omega-3-Fettsäure-Spiegel beeinflusste jedoch den Knochenstoffwechsel der Tiere nicht (Adler, 2002; Wilhelm, 2000).

5.2. Trennung der Lipidklassen

Nach Aufnahme von EPA und DHA aus der Nahrung steigt der Gehalt dieser Fettsäuren besonders in den Phospholipiden an (Malle und Kostner, 1993).

Brown et al. (1991) beobachteten nach Fischölgabe einen Anstieg der EPA und DHA in der Erythrozytenmembran beim Menschen.

In seinen Arbeiten beschreibt Laszlo et al. (1993) ein zeitabhängiges Verteilungsmuster von 3^H -markierter Ölsäure, Linolsäure und Arachidonsäure in verschiedenen Phospholipiden der Zellmembran. Anfänglich war die Arachidonsäure hauptsächlich in Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol eingebaut, nach 24 h enthielt Phosphatidylethanolamin den höchsten Anteil der markierten Arachidonsäure. Bei Fischölfütterung konnten Clark et al. (1993) noch nach 10 Wochen einen Effekt auf die Phospholipidzusammensetzung von den Thrombozyten feststellen. Bauer et al. (1998) beschreiben in ihrer Fütterungsstudie mit Hunden bei einer mäßig erhöhten Gabe von α -Linolensäure einen Anstieg von EPA in den Plasmalipiden.

Um den Gehalt der Omega-3-Fettsäuren in den Phospholipiden bestimmen zu können, sollten vorbereitende Arbeiten zur Trennung der Lipidklassen im Serum durchgeführt werden.

Zur Trennung der Lipidklassen kann man die Festphasenextraktion mit einer Aminopropylsäule anwenden. Mit dem Elutionsschema von Kaluzny et al. (1985) lösen sich bei der Aminopropylsäule mit einem Chloroform-Propanol-Gemisch (2:1) alle neutralen Lipide (Cholesterin, Cholesterinester, Triglyceride, Diglyceride, Monoglyceride) von der Säule. Fettsäuren werden mit Diethylether-Essigsäure (98:2) und Phospholipide mit Methanol eluiert. Das gleiche Elutionsschema wird in einem Katalog zur Isolierung verschiedener Lipidklassen angegeben (NN, 2001). Die Wiederfindung betrug bei der Untersuchung von Kaluzny et al. bei den neutralen Lipiden 98%, bei den freien Fettsäuren 101,4 % und bei den Phospholipiden 97,3%.

Um eine Berechnung der Ausbeute über die Aminopropylsäule vornehmen zu können, wurden die Werte nach Elution bei gleicher Konzentration mit dem Originalstandard verglichen. Bei der Messung des methylierten Triglyceridstandards erhält man 5 Fettsäurepeaks, bei den Fettsäuren jeweils 2 und beim Phospholipidstandard jeweils sechs. Bei der Aminopropylsäule variierten die Verluste nach Auftrag eines Lipid-

gemisches im Vergleich zum methylierten Lipidstandard je nach Fettsäure der Lipide. Bei den AA und DHA lagen die Verluste im Bereich von 4%-9%, bei den Triglyceridfettsäuren zwischen 27% - 40% und bei den Phospholipidfettsäuren zwischen 88-100%.

Bei der Anwendung des Elutionsschemas von der Aminopropylsäule sind jedoch zusätzliche Peaks aufgetreten. Man erhielt oft bestimmte Peaks mit Chloroform-Propanol und Diethylether im Chromatogramm, die den Retentionszeiten der Fettsäuren des methylierten Phospholipidstandards entsprachen. Bei Chloroform-Propanol wurden häufig 2 Peaks bei den Retentionszeiten von 44,6 und 49,8 Minuten detektiert. Diese Zeiten entsprachen bei der alleinigen Messung eines methylierten Phospholipidstandards ebenfalls den Retentionszeiten von Phospholipidfettsäuren. Um zu überprüfen, ob die Trennung von Triglyceriden, freien Fettsäuren und Phospholipiden exakt erfolgte, wurde die Aminopropylsäule unterschiedlich beladen, um auszuschließen, dass durch die Lösungsmittel Phospholipide frühzeitig herausgelöst werden.

Es wurden fünf Testläufe vorgenommen, wobei die Säulen jeweils unterschiedlich beladen waren: ohne Lipidauftrag, nur mit Fettsäuren, nur mit Triglyceriden, nur mit Phospholipiden und einem Lipidgemisch.

Bei allen 5 Säulen erschienen diese Peaks, wobei bei den Phospholipiden und beim Lipidgemisch die Peaks deutlich größer waren.

Dies spricht dafür, dass aufgrund des Lösungsmittels etwas aus der Säule gelöst wird, was bestimmte Peaks hervorruft, die bei unserer Analyse zufällig mit den Retentionszeiten der Phospholipidfettsäuren übereinstimmen.

Um eine Kontamination der Hähne bzw. Schläuche der Apparatur auszuschließen, wurden 6 Säulen auf einer weiteren Apparatur getestet, die noch nie mit einem Lipidgemisch in Berührung gekommen war. Die Säulen wurden ohne Lipidauftrag nur mit den verschiedenen Lösungsmitteln eluiert und auch hier konnte man diese 2 Peaks wiederfinden. So wurde an 12 getesteten Säulen das Auftreten dieser Peaks bestätigt. Um eine Kontamination des Lösungsmittels auszuschließen, wurde dies separat gemessen.

Das gleiche Bild ergab sich auch bei Diethylether-Eisessig-Gemisch, wobei hier drei Peaks festzustellen waren.

Insgesamt erschienen die Peaks zwar häufig, aber nicht immer, so dass man von unterschiedlicher Beschaffenheit der einzelnen Säulen ausgehen muss.

Aufgrund dieser Untersuchung kann man annehmen, dass zufällig zu gleichen Retentionszeiten zweier Fettsäuren des Phospholipidstandards etwas aus der Aminopropylsäule gelöst wurde. Bei der Lipidklassentrennung ist das Erscheinen von zusätzlichen Peaks, die aus der Matrix der Säule gelöst werden, jedoch nicht akzeptabel, da sie ansonsten als Fettsäuren identifiziert werden.

Der Vorteil der Aminopropylsäule liegt darin, dass Fettsäuren und Triglyceride gut getrennt werden. Fettsäuren erhält man mit einer Ausbeute von 91-96% je nach Fettsäure und Triglyceride erreichen 60 –73% je nach Triglyceridfettsäure. Zur Trennung von Phospholipiden aus einem Lipidgemisch kann man die Aminopropylsäule mit Verlusten von 88-100% bei 23 getesteten Säulen nicht empfehlen. Hierbei wurden Säulen von 4 verschiedenen Firmen getestet (Macherey-Nagel, Agilent, Alltech und Sulpelco).

Interessant ist jedoch, dass bei alleinigem Auftrag von einem Phospholipidstandard mit einer einzigen Elution von Methanol nahezu 56-80% wiedergefunden wurden und somit der Verlust bei 20-44% lag. Beide Male wurden die Phospholipide mit Methanol eluiert, der Unterschied bestand jedoch darin, dass bei den Säulen (n=23) mit Verlusten zwischen 88-100% vorher mit Chloroform-Propanol und Diethylether eluiert wurde und bei den Säulen (n=3) mit Verlusten von 20-44% nur alleine mit Methanol eluiert wurde. Bei der schlechten Ausbeute der 23 Säulen können verschieden Gründe die Ursache sein. Aufgrund eines Lipidgemischs können sich die Bindungsverhältnisse der Phospholipide zur Matrix der Säule so verändern, dass die Phospholipide nicht mehr eluiert werden können. Auch kann die vorherige Elution mit Chloroform-Propanol bzw. Diethylether die Bindung der Phospholipide an die Matrix so beeinflussen, dass sie mit Methanol nicht mehr heruntergespült werden können.

Die Auswertung zeigt, dass bei dieser durchgeführten Analyse zur Isolierung der Lipidklassen nur befriedigende Ergebnisse im Bereich der Triglyceride und Fettsäuren zu erreichen sind. Ursprünglich wurde die Aminopropylsäule deshalb zur Trennung herangezogen, weil sie laut Literatur eine strikte Isolierung der neutralen Lipide, Fettsäuren und Phospholipide erreichen sollte.

Zusätzlich wurde auch mit einer Silicasäule die Trennung eines Lipidgemischs durchgeführt. Bei der Silicasäule (Adamitz, 1997) können mit der Elution von Chloroform sowohl die Triglyceride als auch die Fettsäuren herausgelöst werden. Mit an-

schließender Elution von Aceton erhält man Glycolipide, mit einer weiteren Elution von Methanol lösen sich die Phospholipide von der Säule.

Bei der Silicasäule wurde kein Glykolipid aufgetragen, weil ein reines Glycolipid nicht zu erhalten war und das Interesse sich bei unseren Untersuchungen auf die Trennung der Triglyceride, Fettsäuren und Phospholipide beschränkte. Somit wurde auf den Auftrag eines Glykolipides verzichtet und die Elution mit Aceton entfiel.

Nach der Elution von Chloroform werden die Triglyceride und die freien Fettsäuren gemeinsam aus der Säule herausgelöst. Die Ausbeute betrug bei den Silicasäulen (n=2) für die Triglyceride 87-100% und für die freien Fettsäuren zwischen 64-76%. Die Phospholipide erreichten nach Elution mit Methanol eine Ausbeute von 56-70%. Wurde nur der Phospholipidstandard auf die Säule pipettiert und anschließend als einziger Elutionsschritt mit Methanol eluiert, erhielt man eine Ausbeute von 66-89% je nach Phospholipidfettsäure.

Auch durch die Chloroformelution erhielt man bei der Silicasäule die fraglichen Peaks. Insgesamt jedoch sind die Verluste bei den Phospholipiden über die Silicasäule im Vergleich zur Aminopropylsäule viel geringer, wobei die Anzahl von zwei getesteten Silicasäulen nur einen Hinweis geben können. Der Nachteil bei der Silicasäule liegt jedoch darin, dass man die Fettsäuren nicht von den Triglyceriden trennen kann.

Bei der Trennung der Lipidklassen über eine Festphasensäule an unserem Institut konnte man keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen, so dass nach einer weiteren Alternative zur Lipidklassentrennung mit der Dünnschichtchromatographie oder HPLC gesucht werden muss.

5.3. Analysentechnische Hinweise

Um reproduzierbare Ergebnisse bei der Analyse zu gewährleisten, sind folgende Probleme auszuschalten. Eine Kontamination der Lösungsmittel, der Lipidstandards und Glaswaren sind zu vermeiden. Die Glaswaren sind speziell - wie auf Seite 45 beschrieben- zu reinigen. Die Bördekkappen müssen eine Teflonbeschichtung haben, da andere Kunststoffe von den Lösungsmitteln angegriffen werden und dabei Bestandteile aus dem Deckel in die Probe entweichen können.

Bei der Flüssigphasenextraktion darf es beim Abpipettieren der oberen Chloroformphase nicht zu einer Kontamination mit der unteren Phase kommen, die Proteine und Wasser enthält. Diese verschmutzen einmal die Kapillarsäule des Gaschromatographen und der Wasserdampf schadet der Matrix der Kapillarsäule.

Die SPE-Säulen sollen immer aus der Verpackung verwendet und schnellst möglich aufgebraucht werden, da zu hohe oder zu niedrige Luftfeuchtigkeit die Matrix verändern, sie sollten bei Raumtemperatur in einem Schrank gelagert werden.

Der Auftrag der Lipide sollte mit einer Glaskapillare und nicht mit einer Plastikpipettenspitze erfolgen, da die Affinität der Lipide zu Plastik höher ist als zu Glas.

Des Weiterem ist beim Auftrag der Lipide auf die Säulen darauf zu achten, dass die Lipide langsam, direkt auf den Lösungsmittelüberstand oberhalb der Fritte pipettiert werden. Falls mit der Glaskapillare Lipidspritzer an der Wand haften bleiben, können diese nicht in das Kieselgel eingesaugt werden und dort binden. Es sollten sich keine Tropfen an der Plastikwand der Säulenkartusche befinden, denn dies verringert die Ausbeute.

Zu hohe Temperaturen im Wasserbad können zu einem Siedeverzug im Spitzkolben und damit zu einem Probenverlust führen.

Empfehlenswert ist es, graduierte Probenfläschchen zu verwenden, da diese bei einer quantitativen Untersuchung genauer sind.

Die Messung am Gc ohne Zusatz von BHT muss am gleichen oder nächsten Tag der Analyse erfolgen. Die Proben werden solange bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Am Gaschromatographen kann schwankender Gasdruck zur Verschiebung der Retentionszeiten führen, was die Identifizierung mit einem Standard erschwert.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren im Futter auf das Fettsäuremuster im Serum von Hunden und Katzen untersucht werden. Dazu wurde erfolgreich eine gaschromatographische Methode für die Bestimmung der Gesamtfettsäuren, einschließlich der besonders interessanten Omega-3-Fettsäuren, etabliert.

Zur Untersuchung der Fettsäuren standen Serumproben von drei früher durchgeführten Fütterungsstudien an Hunden und Katzen zur Verfügung, in denen der potentielle Einfluss von Omega-3-Fettsäuren aus Fischöl bzw. aus Mikroalgen auf den Knochenstoffwechsel der Tiere untersucht worden war.

Bei der Bestimmung des Gesamtfettsäuremusters unter Fischöleinfluss wurde sowohl bei den Hunden als auch bei den Katzen ein hoch signifikanter Anstieg der beiden Omega-3-Fettsäuren Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure festgestellt. Bei den Hunden stieg die Eicosapentaensäure um das 10-fache und bei den Katzen um das 13-fache an. Bei beiden Tierarten erhöhte sich die Docosahexaensäure um das 4-fache.

Weder bei den Hunden noch bei den Katzen, die Fischöl erhielten, hat sich dieser deutliche Anstieg der Omega-3-Fettsäuren auf die in den früheren Untersuchungen bestimmten Parameter des Knochenstoffwechsels der Tiere ausgewirkt. In der Katzenfütterungsstudie trat jedoch unter dem Einfluss des Fischöls eine signifikante Abnahme des Serumcholesterins und der Triglyceride auf.

Unter Omega-Algenzusatz konnte ein geringer, aber nicht signifikanter Anstieg der Eicosapentaen- und Docosahexaensäure im Hundeserum festgestellt werden. Gleichzeitig führte die Supplementierung des Futters mit den Algen zu einer Abnahme der Knochenresorptionsmarker Pyridinolin und Desoxypyridinolin und beeinflusste damit offensichtlich den Knochenstoffwechsel der Hunde.

7. Summary

Natalie Zorn

Analysis of serum lipids in dogs and cats feeding unsaturated fatty acids

The aim of this study was to examine the effect of polyunsaturated fatty acids on the serum fatty acid pattern in dogs and cats.

Therefore a gas chromatographic method was successfully established for the determination of the total fatty acids, including the especially interesting n-3-fatty acids.

For the investigation of the fatty acids, serum samples of three earlier performed feeding studies with dogs and cats were available. The potential influence of n-3-fatty acids in fish oil and microalgae on the bone metabolism was determined in these feeding studies.

The application of fishoil supplements led to a significant increase of the two n-3-fatty acids eicosapentanoic and docosahexanoic in the total fatty acid pattern. The eicosapentanoic acid increased 10 fold in the dogs, and 13 fold in the cats. In both animal species the docosahexanoic acid increased 4 fold.

This distinctive increase in n-3-fatty acid level did not have any influence on the earlier determined parameters of bone metabolism in dogs and cats.

The fish oil supplementation in the cat feeding trial resulted in a significant decrease of serum cholesterol and triglycerides.

The application of microalgae supplement, containing n-3-fatty acids, led to a slight but not significant increase of the eicosapentanoic and docosahexanoic acids in dog serum. At the same time supplementation of the mircoalgae caused a decrease of the bone markers pyridinoline and desoxypyridinoline and thus apparently influence the bone metabolism of the dogs.

Literaturverzeichnis

Adamitz E (1997)

Einfluss der Prozessführung bei biologischer Behandlung von Papierfabrikabwasser auf die Zusammensetzung organischer Stoffe im Ablauf und der Biomasse
Berichte aus Wassergüte und Abfallwirtschaft, Berichtsheft 134
Tech Universität München

Adler KA (2002)

Der Einfluss von n-3-Fettsäuren aus Fischöl auf den Knochenstoffwechsel des Hundes
Vet Med Diss, München

Bang HO, Dyerberg J (1972)

Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic Westcoast Eskimos
Acta Med Scand 192: 85-94

Bang HO, Dyerberg J and Hjerne N (1976)

The composition of food consumed by Greenland Eskimos
Acta Med Scand 200: 69-73

Barclay W, Abril R, Abril P, Weaver C and Ashford A (1998)

Production of docosahexaenoic acid from microalgae and its benefits for use in animal feeds
World Rev Nutr Diet 83: 61-76

Bauer JE (1992)

Diet-induced alterations of lipoprotein metabolism
J Am Vet Med Assoc 201: 1691-1694

Bauer JE (1997)

Fatty acid metabolism in domestic cats (*Felis catus*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*)
Proc Nutr Soc 56: 1013-1024

Bauer JE, Dunbar BL and Bigley E (1998)

Dietary flaxseed in dogs results in differential transport and metabolism of (n3) polyunsaturated fatty acids

J nutr 128: 2641-2644

Bauer JE, Markwell PJ, Rawlings JM and Senior DF (1999)

Effects of dietary fat and polyunsaturated fatty acids in dogs with naturally developing chronic renal failure

JAVMA 215 (11): 1588-1591

Bimbo, AP (1987)

The emerging marine oil industry

J Am oil Chem Soc 64: 706-715

Bond R and Lloyd DH (1994)

Combined treatment with concentrated essential fatty acids and prednisolone in the management of canine atopy.

Vet Rec 134: 30-32

Brown AJ, Pang E and Roberts DC (1991)

Erythrocyte eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid as a marker for fish and fish oil consumption.

Prostaglandin Leukot Essnet Fatty Acids 44: 103-106

Brown SA, Brown CA, Crowell WA, Barsanti JA, Allen T, Cowell C and Finco DR (1998)

Beneficial effects of chronic administration of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency.

J Lab Clin Med 131:447-455

Brown SA, , Brown CA, Crowell WA, Barsanti JA, Kang CW, Allen T, Cowell C and Finco DR (2000)

Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation in early renal insufficiency in dogs

J Lab Clin Med 135: 275-286

Calder PC (2001a)

Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity

Lipids 36:1007-1024

Calder PC (2001b)

n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale?

Nutr Res 21 : 309-341

Chang KJ, Saito H, Tamura Y, Watanabe K and Yoshida S (1989)

Effect of oral ingestion of eicosapentaenoic acid-ethyl

Ester on natural killer cell activity in rat spleen cells

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 37: 31-35

Chi-Lang EY, Zeisel SH

Choline Phospholipids and Cell suicide

in: Choline, Phospholipids, Health, and Disease, (Eds: Zeisel SH and Szuhaj BF),

AOCS Press Champaign, Illinois

Chiu C-C, Huang S-Y, Shen WW, Su K-P (2003)

Omega-3 fatty acids for depression in pregnancy

AM J Psychiatry 160: 385-386

Clark WF, Parbtani A, Naylor CD, Leviton CM, Muirhead N, Spanner E, Huff MW, Philbrick DJ, and Holub BJ (1993)

Fish oil in lupus nephritis: clinical findings and methodological implications.

Kidney Int 44: 75-86

Cleff-Matzak C and Reinhart GA (1999)

Fettsäuren in der Nahrung - Ihr Einfluss auf entzündliche Erkrankungen der Haut.

Vortrag von der Iams Company in Hohenheim

Cohen Z, Norman HA, Heimer YM (1995)

Microalgae as a source of n-3 fatty acids: Plants in Human Nutrition

World Rev Nutr Diet 77: 1-31

Downs LG, Zani V, Wills JM, Crispin SM and Bolton CH (1994)

Changes in plasma lipoprotein during the oestrous cycle of the bitch

Res Vet Sci 56: 82-88

Eaton SB and Konner M (1985)

Paleolithic Nutrition – A consideration of its nature and current implications

N Engl J Med 312: 283-289

Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957)

A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues

J Biol Chem 226: 497-509

Frischknecht Y (2003)

Wirkung von omega-3-fettsäurehaltigen Mikroalgen auf den Knochenstoffwechsel des Hundes.

Vet Med Diss, München

Hall JA, Wander RC, Gradin JL, Du SH and Jewell DE (1999)

Effect of dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio on complete blood and total white blood cell counts, and T-cell subpopulations in aged dogs.

Am J Vet Res 60: 319-327

Hansen A and Wiese H (1951)

Fat in the diet in relation to nutrition of the dog. I. Characteristic appearance and gross changes of animal fed diets with or without fat.

Texas Repo Biol and Med 9: 491-515

Hansen RA, Ogilvie GK, Davenport DJ, Gross KL, Walton JA, Richardson KL, Mallinckrodt CH, Hand MS and Fettman MJ (1998)

Duration of effects of dietary fish oil supplementation on serum eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid concentrations in dogs

Am J Vet Res 59: 864-868

Herslöf BG (1993)

Analysis of Industrial Phospholipid Materials

In: Phospholipids: Characterization, Metabolisms, and Novel biological applications (ed.: Cevec G and Paltauf F), 1-14

Hamburg, 6th international colloquium on Phospholipids

Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azura M, Sekiguchi K, Murata N, Ohtani T, Toguri T (1996)

Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase.

Nat Biotechnol 14: 1003-1006

Kaluzny MA, Duncan LA, Meritt MV and Epps DE (1985)

Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns.

J Lipid Res 26:135-144

Kearns RJ, Hayek MG, Turek JJ, Meydani M, Burr JR, Greene RJ, Marshall CA, Adams SM, Borgert RC and Reinhart GA (1999)

Effect of age, breed and dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid peroxidation in young and aged dogs.

Vet Immunol Immunopathol 69: 165-183

Kelly FJ (1991)

The metabolic role of n-3 polyunsaturated fatty acids: relationship to human disease.

Comp Biochem Physiol 98 : 581-585

Kolb B (1999)

Detektoren der Gaschromatographie

In: Gaschromatographie in Bildern, 1st edition, Wiley-VCH, Weinheim :184-185

Laszlo FJ, Heravi JD, Fonteh AN and Chilton FH (1993)

Trafficking of polyunsaturated fatty acids in resting mouse bone marrow derived mast cells.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 91: 332

Lechowski R, Sawosz E, Klucinski W (1998)

The effect of the addition of oil preparation with increased content of n-3 fatty acids on serum lipid profile and clinical condition of cats with miliary dermatitis

J Vet Med A 45: 417-424

Liu, KS (1994)

Preparation of fatty methyl esters for Gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials

JAOCS 71 (11): 1179-1187

Logas D and Kunkle GA (1994)

Double-blinded crossover study with marine fish oil supplementation containing high dose eicosapentaenoic acid for the treatment of canine pruitic skin disease

Vet Dermatol 5: 99-104

Lottspeich F and Zorbas H (1998a)

Chromatographische Trennmethode 195-215

Bioanalytik, Spektrum Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag

Lottspeich F and Zorbas H (1998b)

Lipidanalytik 537-567

Bioanalytik, Spektrum Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag

Malle E and Kostner GM (1993)

Effects of fish oils on lipid variables and platelet function indices

Prostaglandis leukot Essent Fatty Acids 49: 645-663

Maynar M, Mahedero G, Maynar I, Maynar JI, Tuya IR, Caballero MJ (2001)
Menopause-induced changes in Lipid fractions and total fatty acids in plasma
Endocr Res 27: 357-365

Metz G (2000)

Omega-3-Fettsäuren: eine Standortbestimmung zum Millenium.
Stockdorf, Forum-Medizin-Verl.-Ges.

Mimouni V, Christiansen EN, Blond JP, Ulmann L, Poisson JP, Bezard J (1991)
Elongation and desaturation of arachidonic and eicosapentaenoic acids in rat liver
Biochem Biophys Acta 1086: 349-353

Mooney MA, Vaughn D, Reinhart GA, Powers RD, Wright JC, Hoffman CE, Swaim SF
and Baker HJ (1998)

Evaluation of the effects of omega-3-fatty acid-containing diets on the inflammatory
stage of wound healing in dogs
Am J Vet Res 59:859-863

Müller M and Novak A (1978)

Chromatographische Verfahren der Plasmalipidanalyse.
Med Labor BD 31 (2): 40 -54

Müller T (2000)

Der Einfluss von omega-3-Fettsäuren in der Ernährung auf die quantitative Ausprägung
von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und das mitogene Potential von humanem
Serum
Med Diss, München

NN (2001)

Macherey-Nagel GmbH & Co.KG
Katalog zur Probenvorbereitung: Festphasenextraktion und Membranfiltration
Postfach 10 1352 , D-52313 Düren

NN (2002)

Macherey-Nagel GmbH & CO. KG

Katalog für die Chromatographie

Postfach 10 1352 , D-52313 Düren

Olsson NU and Salem N (1997)

Molecular species analysis of phospholipids

J Chromatogr 692: 245-256

Ogilvie GK, Fettman MJ, Mallinckrodt CH, Walton JA, Hansen RA, Davenport DJ, Gross KL, Richardson KL, Rogers Q and Hand MS (2000)

Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma: a double-blind, randomized placebo-controlled study.

Cancer 88: 1916-1928

Pepeu G, Vannucchi MG, Di Patre PL (1990)

Pharmacological actions of Phospholipids

In: Phospholipids (Eds: Hanin I and Pepeu G), Plenum Press, New York

Radke M, Schäfer H, Kruse-Jarres JD (1975)

Gaschromatographische Bestimmung von Lipiden in Blut, Plasma oder in Organgewebe

Z Klin Chem Klin Biochem 13: 231-237

Raper NR, Exler J (1991)

Omega-3-fatty acids in the U.S. food supply.

In: Health effects of ω -3-polyunsaturated fatty acids in seafoods, (Eds: Simopoulos AP and Kifer RR) 66: 514-515

Ruppin DC, Middleton WRJ (1980)

Clinical use of medium chain triglycerides

Drugs 20: 216-224

Rutz G M (2001)

Klinischer Einfluss von mittelkettigen Triglyceriden im Futter bei Hunden mit exokriner Pankreasinsuffizienz.

Vet Med Diss , München

Sassen LMA, Lamers JMJ and Verdouw PD (1994)

Fish oil and the prevention and regression of atherosclerosis

Cardiovasc Drugs Ther 8: 179-191

Schaky C von and Weber PC (1985)

Metabolism and effects on platelet function of the purified Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic acids in Humans.

J. Clin. Invest. 76 : 2446-2450

Schaky C von (1987)

Prophylaxis of atherosclerosis with marine omega-3 fatty acids

Ann Intern Med 107: 890-899

Schmelz EM, Nikolova-Karakashian M, Wang E and Merrill AH (1998)

Sphingomyelin and other Sphingomyelin metabolites in cell signaling and Disease

in: Choline, Phospholipids, Health, and Disease, (Eds: Zeisel SH and Szuhaj BF),

AOCS Press Champaign, Illinois

Sherma J and Fried B (1996)

Basic Techniques, Materials, and Apparatus

In: Handbook of Thin-Layer Chromatography, second edition, New York, 11-14

Simopoulos AP (1991)

Omega-3-fatty acids in health and disease and in growth and development

Am J Clin Nutr 54: 438-463

Simopoulos AP (1994)

The future of fatty acids in human nutrition: Health and policy implications

In: Fatty acids and Lipids: Biological Aspects, (Eds.: Galli C, Simopoulos AP and Tremoli E), World review of nutrition and Dietetics, Karger, 75: 15-19

Simopoulos AP (1998)

Overview of evolutionary aspects of omega-3-fatty acids in the diet

World Rev Nutr Diet 83: 1-11

Simopoulos AP (1999a)

Evolutionary aspects of omega-3-fatty acids in the food supply.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 60 : 421-429

Simopoulos AP (1999b)

Essential fatty acids in health and chronic disease

Am J Clin Nutr 70: 560-569

Simopoulos AP (2000)

Human requirement for N-3-polyunsaturated fatty acids

Poult Sci 79 : 961-970

Simopoulos AP (2002)

Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases

J Am Coll Nutr 21 (6): 495-505

Taugbol O, Baddaky-Taugbol B and Saarem K (1998)

The fatty acid profile of subcutaneous fat and blood plasma in pruritic dogs and dogs without skin problems

Can J Vet Res 62: 275-278

Trautwein EA (1999)

Fette und Fettbegleitstoffe : Omega-3-Fettsäuren

In Praxishandbuch Functional Food, Grundwerk 12/99

van Fliet T and Katan MB (1990)

Lower rations of n-3 to n-6 fatty acids in cultured than in wild fish.

Am J Clin Nutr 51 : 1-2

Vaughn D, Reinhart G, Swaim S, Lauten S, Garner C, Boudreaux M, Spano J, Hoffman C and Corner B (1994)

Evaluation of effects of dietary n-6 to n-3 fatty acid ratios on leukotriene B synthesis in Dog skin and neutrophils

Vet Dermatol 5:163-173

Wander RC, Hall JA, Gradin JL, Du SH and Jewell DE (1997)

The ratio of dietary n-6 to n-3-fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs.

J Nutr 127: 1198-1205

Wilhelm S (2002)

Untersuchungen zum Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf den Knochstoffwechsel der Katze.

Vet Med Diss, München

Wiesner F (2001)

Beitrag zur Analytik von Phospholipiden im Muskelgewebe von Rindern

Chem Diss , Hamburg

Yeo KY and Horrocks LA (1998a)

Determination of phospholipid composition of bovine muscle by high performance liquid chromatography with emphasis on the choline and ethanolamine plasmalogens

Food Chem.28, 197-205

Yeo KY and Horrocks LA (1998b)

Analysis of phospholipids classes in various beef tissues by high performance liquid chromatography.

Food Chem. 29,1-6

Zeisel SH and Szuhaj BF (1998)

in: Choline, Phospholipids, Health, and Disease

AOCS Press Champaign, Illinois

Zöllner N and Tato F (1992)

Fatty acid composition of the diet: impact on serum lipids and atherosclerosis.

Clin. Investig. 70: 968-1009

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rambeck danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine freundliche und hervorragende Betreuung.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Ulrich Wehr, der mir mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Hesselbach bedanken. Er half mir stets bei praktischen und technischen Problemen am Gaschromatographen und stand mir bei Reparaturen mit seinem handwerklichen Geschick zur Seite.

Danken möchte ich auch Dipl. Biol. Lisa Müller. Sie gab mir fundierte Tipps für meine praktische Arbeit und war stets hilfsbereit.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Prof. Dr. K. Osterkorn und Herrn J. Stangelmeier.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für den Zuspruch und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Vielen Dank, dass ihr mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit immer finanziell unterstützt habt.

Für die gute Verköstigung in meinen stressigen Examens- und Doktorarbeitszeiten danke ich Fanni und Pit.

Ein dickes Dankeschön geht an meinen lieben BO. Vielen Dank, dass Du mich während der letzten 5 1/2 Jahre meines Studiums und meiner Dissertation begleitet, motiviert und unterstützt hast.

9. Lebenslauf

Natalie Zorn

- 05.01.1976 geboren in Freiburg im Breisgau als Tochter von Karin Zorn, geb. Ksiensik und Herbert Zorn
- 1982-1986 Besuch der Grundschule in Waldkirch
- 1986-1995 Besuch des St. Ursula Gymnasium in Freiburg
- 29.06.1995 Allgemeine Hochschulreife
- 1995-1997 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin in Überlingen
- 1997-2003 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- September 2001 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation
- 08.04 2003 3. Staatsexamen
- Juni 2003 Approbation als Tierärztin