

Lebensmittelchemie 2000

Konjugierte Fettsäuren (CLA) haben einen physiologischen Einfluß auf den Organismus – das ist bewiesen. Welche Lebensmittel wieviel CLA enthalten, wie man den Gehalt analytisch bestimmen kann und wie CLA im Körper wirken, erforschen die Wissenschaftler derzeit eifrig. In der Analytik konzentriert sich die HPLC-MS-Kopplung auf Rückstände, Spurenkomponenten in komplexen Matrices, schwer zu erfassende Analyte und die Strukturaufklärung.

Neue Erkenntnisse über Fettsäuren

Konjugierte Fettsäuren, insbesondere Isomere der konjugierten Linolsäure (conjugated linoleic acid, CLA), haben innerhalb der letzten Jahre beachtliches wissenschaftliches Interesse gefunden. Neuere Studien haben ergeben, dass einzelne CLA-Isomere, wie C18:2 *cis9trans11* oder C18:2 *trans10cis12* unterschiedlich stark ausgeprägte physiologische Effekte im Organismus hervorrufen können (zur Nomenklatur¹⁾).

Neben diesen Isomeren wurden aber auch zahlreiche weitere positionsisomere konjugierte Fettsäuren in Wiederkäuerprodukten und Nahrungsergänzungsmitteln nachgewiesen, deren physiologische Bedeutung, sofern vorhanden, derzeit noch größtenteils unbekannt ist.

Entstehung und Produktion

Konjugierte Fettsäuren entstehen vorwiegend aus der enzymatischen Hydrierung ungesättigter Fettsäuren im Pansen von Wiederkäuern (Kuh, Schaf, Ziege), z. B. aus α - und γ -Linolensäure (C18:3 n-3 bzw. C18:3 n-6), besonders aber aus Linolsäure (C18:2 n-6). Man geht derzeit davon aus, dass eine Vielzahl von spezifischen *cis,trans*-Isomerasen im Pansen für die Vielfalt der nachgewiesenen konjugierten Fettsäuren in Wiederkäuerprodukten verantwortlich sind. Ferner werden CLA-Isomere auch durch $\Delta 9$ -Desaturierung von Octadecensäuren gebildet.

Neben der „Rumenic acid“ (C18:2 *cis9trans11*) konnten in verschiedenen Lebensmitteln (Käse, Rindfleisch, Milch) bis zu 20 verschiedene CLA-Isomere nachgewiesen werden (Tabelle). Es ist davon auszugehen, dass neben CLA-Isomeren auch konjugierte Triensäuren in Wiederkäuerprodukten vorkommen, die aber aufgrund der deutlich geringeren Gehalte derzeit analytisch schwer quantifizierbar sind. Ein möglicher Stoffwechselweg der COT wurde bereits von Mikko Griinari und Dale Baumann²⁾ vorgeschlagen.

Die industrielle Produktion von CLA erfolgt einerseits auf Basis von alkalischer Isomerisierung linolensäurereicher pflanzlicher Speiseöle (z. B. Sonnenblumenöl oder Sojaöl), andererseits durch den Einsatz von selektiven Lipasen. Je nach Prozessführung können so CLA-haltige Öle produziert werden, die sich z. T. erheblich in ihrem Isomerenprofil voneinander unterscheiden. Während vor etwa fünf bis zehn Jahren fast ausschließlich CLA-Produkte kommerziell erhältlich waren, die aus zwölf CLA-Isomeren bestanden – vor allem C18:2*trans8cis10*; C18:2*cis9-trans11*; C18:2*trans10cis12* und C18:2 *cis11trans13* – enthalten heutige CLA-Präparate wie Clarinol (Loders Croklaan) fast ausschließlich zwei CLA-Isomere – C18:2*cis9trans11* und C18:2*trans10cis12* (Tabelle).

Gesundheitliche Aspekte von CLA

Seit der Entdeckung des antikanzerogenen Potentials von CLA in Tierversuchen durch die Gruppe von Michael Pariza sind zahlreiche Studien über die physiologischen Wirkungen von CLA zunächst *in vitro* und in Tiermodellen (Ratte, Schwein, Kaninchen) publiziert worden;³⁾ wenig später folgten erste Humanstudien (weiterführende Literatur⁴⁻⁶⁾). Mitte der Neunziger Jahre lösten das beachtliche antikanzerogene Potential von CLA in verschiedenen Krebsstadien und Tiermodellen, aber auch die positive Wirkung von CLA auf das Immunsystem, die Körperfettzusammensetzung und die Atherosklerose-entwicklung in verschiedenen Tiermodellen eine fast überschwänglichen CLA-Euphorie aus. Nach der Publikation von ersten Humanstudien folgte dann eine Phase der Ernüchterung, da die im Tierversuch vielversprechenden Effekte im Menschen nicht oder viel schwächer ausgeprägt waren. Desweiteren wurden Ergebnisse von Tierversuchen bekannt, die die Wirkung von CLA in Frage stellten, oder sogar widersprüchlich zum bisherigen Kenntnisstand waren.⁷⁾ Ein entscheidender Grund für diese Situation ist sicherlich die Zusammensetzung der verwendeten CLA-Präparate, die bezüglich der Isomerenverteilung und Applikationsform (Triacylglycerid-CLA versus freie Fettsäuren) erheblich variieren (Tabelle).

Ferner haben verschiedene Studien gezeigt, dass individuelle CLA-Isomere den Fettstoffwechsel unterschiedlich stark beeinflussen können. So konnten z. B. Youngjin Choi et al.⁸⁾ zeigen, dass C18:2 *trans*10- *cis*12 (und nicht C18:2 *cis*9*trans*11) verantwortlich ist für die dosisabhängige reduzierte Expression des Stearyl-CoA-Desaturase 1-Gens (SCD1) in isolierten 3T3-L1-Mausadipozyten.

Desweiteren konnten Emil de Deckere et al.¹⁰⁾ belegen, dass C18:2 *trans*10*cis*12 (und wiederum nicht C18:2 *cis*9*trans*11) die Plasmalipide in Hamstern beeinflusst. Beide Isomere erhöhen ferner nicht die Aktivität der Peroxisomen-Proliferationsmarker Cyanidin-unempfindliche Palmityl-CoA-Oxidase und Carnitin-Acetyltransferase. De Deckere et al.⁹⁾ postulierten daher, dass C18:2 *trans*10*cis*12 anstatt von C18:2 *cis*9*trans*11 die Oxidation von mehrfach ungesättigten C18-Fettsäuren erhöht. Für weitergehende Information bezüglich Wirkungsmechanismen und physiologischer Effekte individueller CLA-Isomere sei auf Originalliteratur verwiesen.⁴⁻⁶⁾

Gehalte in Lebensmitteln

Konjugierte Fettsäuren kommen natürlicherweise bevorzugt in Wiederkäuerprodukten vor. Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Gesamt-CLA-Gehalt in deutschen Lebensmitteln. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, unterliegt der Gesamt-CLA-Gehalt in Wiederkäuerprodukten, ähnlich wie der der *cis*-konfigurierten Fettsäuren, erheblichen Schwankungen, die in erster Linie auf Ernährungseinflüsse der Wiederkäuer zurückzuführen sind. So konnten Gerhard Jahreis et al.¹⁰⁾ zeigen, dass der CLA-Gehalt im Milchfett von ökologisch gehaltenen Milchkühen im Vergleich zum Milchfett von stallgehaltenen Milchkühen signifikant erhöht ist. Bemerkenswerterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass nicht nur der Gesamt-CLA-Gehalt des Milchfettes durch die Fütterung beeinflusst werden kann, sondern dass auf diesem Weg auch eine signifikante Verschiebung des CLA-Isomerenmusters möglich ist (u.a. eine signifikante Erhöhung des C18:2 *trans*10*cis*12-Gehaltes).¹¹⁾

Inwieweit verarbeitungstechnische Prozesse, z. B. Wahl der Starterkulturen bei der Joghurtherstellung, einen Einfluss auf den CLA-Gehalt in Milchprodukten haben können, lässt sich derzeit noch nicht abschließend beurteilen, da diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur vorliegen. Es ist aber davon auszugehen, dass der Einsatz von isomerasepositiven Starterkulturen (z. B. *Lactobacillus reuteri*) den CLA-Gehalt in Milchprodukten entscheidend erhöhen kann.

Analytik

Für die Analyse von konjugierten Fettsäureisomeren, die sich aufgrund ihrer Komplexität und des geringen Anteils am Gesamtfett häufig chromatographisch schwierig trennen lassen, sind selektive und sensitive chromatographische und spektroskopische Verfahren notwendig, um diese Verbindungen eindeutig charakterisieren und quantifizieren zu können. Die Entwicklung hoch polarer, relativ hitzestabiler Kapillartrennsäulen für die Gaschromatographie (z. B. Cyanopropyl belegte Kapillarsäulen) hat diesbezüglich die Minorfettsäureanalytik entscheidend vorangetrieben.

Die wohl verbreitetste Derivatisierungsmethode ist die säure- (z. B. BF₃ in Methanol) oder basenkatalysierte (z. B. Natriummethylat) Umwandlung der Fettsäuren in Fettsäuremethylester (FSME). Beide Verfahren haben Vor- und Nachteile, wobei es bei der säurekatalysierten Umesterung konjugierter Fettsäuren zu einer Verschiebung des Isomerenmusters zugunsten der *trans,trans*-konfigurierten Fettsäuren kommen kann. Ferner begünstigt die säurekatalysierte Umesterung eine Methoxyartefaktbildung. Höhere Umesterungstemperaturen (> 50 °C) begünstigen erfahrungsgemäß diese Isomerenverschiebung bzw. Artefaktbildung.¹²⁾

Alternativ findet auch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) für die Analyse von Fettsäuren Anwendung, besonders dann, wenn wie im Fall der konjugierten Fettsäuren, eine funktionelle Gruppe im Molekül vorhanden ist, die eine UV-spezifische Detektion bei 233 nm zulässt. Die Silberionen-Chromatographie, entweder als HPLC oder DC, hat sich für die Trennung von geometrischen Fettsäureisomeren (*cis/trans*-Differenzierung) besonders bewährt. Häufig erfolgt auch die Isolierung komplexer Isomerenmischungen mit Hilfe von Reversed-phase-HPLC oder semipräparativer Ag⁺-HPLC. Dadurch werden einerseits störende Begleitfettstoffe entfernt, andererseits erfolgt eine Konzentrierung der Minorisomere. Die Charakterisierung der Minorisomere erfolgt mit Hilfe von massenselektiven und infrarotspektroskopischen Detektoren (GC-(HR)-MS; GC-FTIR).

Die Lokalisierung der Doppelbindungsposition erfordert eine zusätzliche Derivatisierung, da die FSME aufgrund der Doppelbindungsmigration während des Ionisationsprozesses eine Lokalisierung der Doppelbindung nicht einwandfrei zulässt. Häufig werden daher 4,4-Dimethyl-oxazolin(DMOX)-Derivate der Fettsäuren und/oder der Methylester hergestellt, da die DMOX-Derivatisierung relativ einfach umzusetzen ist. Ein weiterer Vorteil der DMOX-Derivatisierung ist das zu den FSME analoge Elutionsprofil, was die Interpretation der Analysenergebnisse vereinfacht.

Ferner finden auch andere Remote-site-Derivate wie Picolinyl-Ester oder On-site-Derivate (4-Methyl- 1,2,4-triazolin-3,5-dion, MTAD) Verwendung. MTAD-Addukte sind besonders für die Analyse von Minor-isomeren in biologischen Matrices geeignet, da diese intensive Fragmente oberhalb des Massenbereichs der ursprünglichen Fettsäuren aufweisen,

und ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis besitzen. Die MTAD-Derivatisierung wurde bereits für die Charakterisierung von CLA-Metaboliten (z. B. C20:4 5,8,12,14 und C20:4 5,8,11,13) eingesetzt.¹³⁾

Mit Hilfe der GC-DD-FTIR (DD = direct deposition GC-FTIR interface) kann eine Bestimmung der Doppelbindungskonfiguration im CLA-Molekül erfolgen, d. h. es können *trans,trans*; *cis/trans*; und *cis,cis* konfigurierte Doppelbindungen aufgrund ihrer unterschiedlichen relativen Intensität der CH-Streckschwingung im Bereich von 3040 bis 3000 cm⁻¹ unterschieden werden (Abbildung 2).¹⁴⁾ Eine Differenzierung zwischen *cis,trans*- und *trans,cis*-Isomeren ist hingegen mit der GC-FTIR nicht möglich. Für eine eindeutig Bestimmung der *cis/trans*-Konfiguration sind weitere traditionelle, nasschemische Verfahren wie die partielle Hydrazinreduktion der konjugierten Fettsäuren zu den korrespondierenden Monoensäuren notwendig. Die erhaltenen Monoensäuren lassen sich dann direkt oder – im Falle von unbekanntem Ausgangsprodukt – nach DMOX-Derivatisierung gaschromatographisch trennen und identifizieren, wodurch indirekt eine weitestgehende Aufklärung der ursprünglichen Doppelbindungskonfiguration möglich ist. Lediglich *trans*-isomere Octadecensäuren mit Doppelbindungen zwischen Δ6 und Δ8 können bislang nicht chromatographisch getrennt werden.

Die Verwendung der GC-FTIR Spektroskopie stellt somit eine äußerst sensitive und selektive Technik dar, die in Kombination mit GC-MS, ein wertvolles Instrument für die Bestimmung der Doppelbindungskonfiguration von konjugierten Fettsäuren ist. Ferner können so nützliche Strukturinformationen über Fettsäurereaktionsprodukte, z. B. Furanfettsäuren oder Methoxyfettsäuren, erhalten werden.¹⁴⁾

Ausblick

Obwohl CLA als natürlicher Bestandteil von Wiederkäuerprodukten seit Jahrtausenden Bestandteil menschlicher Ernährung ist, und erste Humanstudien mit CLA-Präparaten (3 bis 7 g CLA/Tag) keine sicherheitsbedenkliche Aspekte lieferten,^{6,15)} kann auf Basis des heutigen Erkenntnisstandes noch keine eindeutige Ernährungsempfehlung für eine tägliche CLA-Aufnahme abgeleitet werden.¹⁶⁾ Durch die Entwicklung von zuverlässigen und empfindlichen Methoden zur quantitativen Bestimmung von individuellen CLA-Isomeren stehen die notwendigen analytischen Verfahren zur Verfügung (Ag⁺-HPLC-DAD in Kombination mit GC-FID oder GC-MS und/oder GC-FTIR), mit deren Hilfe weitere Humanversuche mit definierten CLA-Präparaten analytisch begleitet werden können.

Jan Fritsche, Unilever Research Vlaardingen, Niederlande; E-Mail: Jan.Fritsche@unilever.com

- 1) zur Nomenklatur: „C18:2 cis9trans11“ ist eine Fettsäure mit 18 C-Atomen und 2 Doppelbindungen, eine in cis-Stellung an Position 9, eine in trans-Stellung an Position 11.
- 2) J. M. Griinari, D. E. Baumann, in: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research Volume 1*, (Hrsg.: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, G. J. Nelson), AOCS Press, Champaign, Illinois, 1999, 180–200.
- 3) <http://www.wisc.edu/fri/clarefs.htm>
- 4) J. A. Scimeca, G. D. Miller, *J. Am. Coll. Nutr.* 2000, 19, 470–493.
- 5) J. Fritsche, H. Steinhart, *Fett/Lipid* 1998, 100, 190–210.
- 6) G. Jahreis, J. Kraft, F. Tischendorf, F. Schoene, C. v. Loeffelholz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000, 102, 695–703.
- 7) G. I. Stangl, H. Muller, M. Kirchgessner, *Eur. J. Nutr.* 1999, 38, 271–277.
- 8) Y. J. Choi, Y. C. Kim, Y. B. Han, Y. Park, M. W. Pariza, J. M. Ntambi *J. Nutr.* 2000, 130, 1920–1924.
- 9) E. A. M. de Deckere, J. M. M. Amelvoort, G. P. McNeill, P. Jones, *Brit. J. Nutr.* 1999, 82, 309–317.
- 10) G. Jahreis, J. Fritsche, H. Steinhart, *Fett/Lipid* 1996, 98, 356–359.
- 11) L. S. Piperova, B. B. Teter, I. Bruckental, J. Sampugna, S. E. Mills, M. P. Yurawecz, J. Fritsche, Y. Ku, R. A. Erdman, *J. Nutr.* 2000, 130, 2568–2574.
- 12) J. K. G. Kramer, V. Fellner, M. E. R. Dugan, F. D. Sauer, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, *Lipids* 1997, 32, 1219–1228.
- 13) J. L. Sébédio in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research Volume 1* (Hrsg.: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, G. J. Nelson), AOCS Press, Champaign, Illinois, 1999, 319–326.
- 14) M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, J. K. G. Kramer, K. D. Eulitz, J. Fritsche, N. Sehat, J. A. G. Roach, Y. Ku in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research Volume 1* (Hrsg.: M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, G. J. Nelson), AOCS Press, Champaign, Illinois, 1999, 141–151.
- 15) H. Blankson, J. A. Stakkestad, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein, O. Gudmundsen, *J. Nutr.* 2000, 130, 2943–2948.
- 16) W. O. Richter, *Biological Effects of Conjugated Linoleic Acids*, DGF-AFECG Joint Congress, Würzburg, 8.-10.10.2000.
- 17) J. Fritsche, H. Steinhart, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 1998, 206, 77–82.
- 18) M. P. Yurawecz, N. Sehat, M. M. Mossoba, J. A. G. Roach, J. K. G. Kramer, Y. Ku, *Fett/Lipid* 1999, 101, 277–282.
- 19) R. Rickert, H. Steinhart, J. Fritsche, N. Sehat, M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. A. G. Roach, K. Eulitz, Y. Ku, *J. High Resol. Chromatogr.* 1999, 22, 144–148.
- 20) J. Fritsche, S. Fritsche, M. B. Solomon, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, K. Morehouse, Y. Ku, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2000, 102, 667–672.

Abb. 1. Gesamt-CLA-Gehalt in deutschen Lebensmitteln (n= 136) nach Fritsche & Steinhart (FSME = Fettsäuremethyl-ester).¹⁷⁾

Abb. 2. GC-MS-Spektrum (A) und GC-DD-FTIR-Spektrum (B) von C18:2 trans7cis9 nach Mossoba et al.¹⁴⁾

Tabelle CLA-Isomerenverteilung in Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln bestimmt mit Ag⁺-HPLC.