

LIPIDE

Beispiele für Stoffinhalte aus der Chemie als Grundlage für das Verständnis dieses Teiles: Redoxreaktionen und Energiegewinnung, energiereiche Bindungen, Radikalchemie, funktionelle Gruppen und deren Reaktivität (z. B. Esterbildung und Verseifung), Aufbau von Fettstoffen, Doppelbindungen: Bedeutung des Auftretens konjugierter Doppelbindungen, Nomenklatur der Begriffe: hydrophil/hydrophob, lipophil/lipophob sowie Terminologie und Reaktivität der Fettsäuren.

Schlüsselwörter:

Definition der Begriffe "Fette, Öle, Lipide", thermodynamische Erklärung der hydrophoben Wechselwirkung (Beispiel: Zusammenlagerung von Fett-Tropfen auf Wasseroberfläche), Nomenklatur von Fettsäuren (inkl. ungesättigter Fettsäuren und deren Einteilung in ω 3/ ω 6 Fettsäuren), Fettsäurebiosynthese (inkl. Citrat/Malat-Shuttle), Kettenverlängerung und Desaturasereaktion, Bildung von Neutralfetten (Beziehung zur Glykolyse), Glycerophosphatide (Strukturen, Synthese, Abbau, funktionelle Bedeutung; Phospholipasen und Produkte ihrer Reaktionen wie DAG, IP₃ und Arachidonsäure), Cardiolipin, Etherlipide (z. B. PAF), Verankerung von Proteinen und anderen Biomolekülen (Coenzym Q, Dolichol) in die Zellmembran (Verknüpfung mit Fettsäuren, GPI-Anker, Prenylierung), cytoplasmatische Fettsäureaktivierung (Bedeutung von Pyrophosphat für die Lage des Reaktionsgleichgewichtes), Carnitin, β -Oxidation (inkl. Abbau ungesättigter und ungradzahliger Fettsäuren), Ketogenese (Reaktionen und Bedeutung), ketogene Aminosäuren (Abbauwege), das Warum und der Ablauf des Glyoxylatzyklus, Cholesterolsbiosynthese (Verbindung zu Ketogenese, Hemmung durch Statine, hier Erklärung der kompetitiven Inhibition und des Begriffes „Prodrug“), Cholesterolabkömmlinge (Gallensäuren, Steroidhormone, Vitamin D), Isoprenoide, von der Arachidonsäure zu den Eikosanoiden (Strukturen und Wirkung von Aspirin), Sphingolipide (Synthese, Formen wie Glykolipide/Sphingomyelin, Abbau mit klinischem Bezug als Ursache von lysosomalen Speicherkrankheiten bei Abbaustörungen und deren Behandlung), Fettresorption und Fett-Transport (z. B. Lipoproteine), Ursache von und chemische Vorgänge bei hydrolytischem und oxidativem Fettverderb (z. B. Lipidperoxidation).

Literatur:

relevante Abschnitte der empfohlenen Lehrbücher in der jeweils aktuellsten Auflage: LEHNINGER/NELSON/COX „Biochemie“; STRYER „Biochemie“; für klinisch

relevante Fragen DEVLIN „Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations“ und
BUDDECKE/Pathophysiologie: „Störungen des Lipidstoffwechsels.“

Allgemeines zur Analytik:

Abgesehen von den Fettgeweben, die fast reine Triacylglyceride enthalten, liegen die Lipide in den Geweben und Körperflüssigkeiten in Form von Gemischen vor. Zur Abtrennung von andersartigen Gewebestandteilen muss deshalb zunächst eine Extraktion der Gesamtlipide mit organischen Lösungsmitteln (Ether, Petrolether, Chloroform, Dichlormethan, Methanol) erfolgen. Die Trennung der im Rohextrakt vorhandenen Lipidklassen (z. B. Triacylglyceride, Phospholipide, Cholesterolester, freie Fettsäuren) wird durch Säulen- oder Dünnschicht-Chromatographie erreicht.

Zur weiterführenden Kennzeichnung einzelner Lipide werden die am Aufbau beteiligten Fettsäuren bestimmt. Dazu erfolgen eine Verseifung der Fettsäuren mit anschließender Methylveresterung und schließlich eine gaschromatographische Identifizierung der entstandenen Fettsäuren-Methylester.

1. Chromatographische Trennung von Serumlipiden

Prinzip:

Die Lipide werden aus dem Serum mit Dichlormethan/Methanol extrahiert, durch Schütteln mit Aqua dest. weitgehend von Methanol und niedermolekularen Bestandteilen befreit und durch Abdunsten des Extrakts eingeeengt. Auf einer Kieselgelschicht erfolgt die chromatographische Trennung der Lipide, welche nach Besprühen mit einer Farblösung (Rhodamin-B) im langwelligen UV-Licht als fluoreszierende Flecken sichtbar werden,

Reagenzien:

Dichlormethan, Methanol, Aqua dest., Fließmittelgemisch (Petrolether/Ethylmethylketon/Eisessig 90:8:2), Rhodamin-B Färbelösung

Durchführung:

1. Extraktion (für den Kurs bereits vorbereitet):

In einen 50 ml Erlenmeyerkolben werden 8 ml Dichlormethan, 8 ml Methanol und tropfenweise 1 ml Serum gegeben. Im Wasserbad wird bis zum Sieden erhitzt, abgekühlt und danach nochmals 8 ml Dichlormethan zugefügt. Nach kräftigem Schütteln wird in ein 50 ml Zentrifugenglas filtriert, zum Filtrat 5 ml Aqua dest. zugegeben, das Glas mit einem Gummistopfen verschlossen und kräftig geschüttelt. Danach wird die Emulsion durch Zentrifugieren getrennt (5 min bei 2000 U/min). Die untere Dichlormethanschicht wird mit einer Pipette entnommen, in ein Kölbchen überführt und auf einem Wasserbad bei 50-60 °C zur Trockne eingedampft; der Rückstand in 0,1 ml Dichlormethan aufgenommen und zum Auftragen verwendet.

2. Chromatographische Trennung:

Auf einer Kieselgel-Fertigplatte (10 x 20 cm) wird die Startlinie 2 cm vom unteren Rand mit Bleistift markiert, 10 cm darüber die Ziellinie, bis zu der man beim Entwickeln die Lösungsmittelfront aufsteigen lässt. Die Positionen der aufzutragenden Proben werden unterhalb der Startlinie markiert. Mittels Glaskapillaren werden je ca. 2,5 µl Probe, sowie Vergleichslösungen verschiedener bekannter Lipide in Abständen von etwa 2 cm auf der Startlinie aufgetragen (zum linken bzw. rechten Plattenrand sollte je ein ca. 1,5 cm breiter Streifen frei bleiben). Die Auftrennung erfolgt in einer mit Filterpapier ausgekleideten Kammer mit einem Gemisch aus Petrolether/Ethylmethylketon/Eisessig (90:8:2) bis die Lösungsmittelfront die markierte Ziellinie erreicht hat. Die aus der Kammer entnommene Platte wird unter dem Abzug luftgetrocknet.

3. Visualisierung und Auswertung:

Die getrocknete Platte wird mit Rhodamin-B Reagenz besprüht und im langwelligen UV-Licht (366 nm) betrachtet. Im Allgemeinen ist - je nach Stärke der UV-Lampe - 1 µg Lipid als gelber/violetter Fleck auf rosa Hintergrund sicher nachzuweisen. Die Lage der einzelnen Flecken wird mit Bleistift gekennzeichnet. Die Auswertung erfolgt durch Ermittlung der relativen Flusswerte (RF):

$$RF = \frac{\text{Entfernung des Fleckmittelpunktes v.d. Startlinie}}{\text{Entfernung der Fließmittelfront v.d. Startlinie}}$$

Die Identifizierung der einzelnen Serumkomponenten wird durch Vergleich mit den Vergleichslösungen vorgenommen: Mit aufsteigenden RF-Werten erscheinen Phospholipide, Cholesterol, Fettsäuren, Triacylglyceride und Cholesterolester.

2. Bestimmung der Cholesterolkonzentration im Blutplasma nach LIEBERMANN-BURCHARD

Cholesterolreagenz:

30 ml Eisessig, 60 ml Essigsäureanhydrid, 10 ml konz. Schwefelsäure, 2 g wasserfreies Na_2SO_4 , 1g 2,5-Dimethylsulfonsäure unter Köhlen langsam und vorsichtig mischen und in dunkler Flasche aufbewahren (Das Reagenz wird von den Kursassistenten vorbereitet).

Prinzip:

- Cholesterol reagiert mit starken Säuren (Säure-Katalysierte Dehydroxylierung) → Cholesta-3,5-dien bzw. das Kation entsteht
- schrittweise Oxidation (durch SO_3 ; Entstehung von weiteren Doppelbindungen)
- Bildung eines farbigen Produkts (homologe Serie von mesomeriestabilisierten Carboniumionen; konjugierte Doppelbindungen in den Polyenen)

Durchführung: In Glasküvetten wird folgendes pipettiert:

	Leerwert	Standard	Probe
Reaktionslösung	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
dest. H ₂ O	100 µl	—	—
Cholesterol-Standard	—	100 µl	—
Serum	—	—	100 µl

Gut mischen (Rührspatel) und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Innerhalb von 5 min wird die Extinktion der Probe gegen den Reagenzienleerwert bei 560 nm gemessen.

Berechnung der Cholesterolkonzentration:

Die Konzentration an Cholesterol wird durch Vergleich der Absorptionen von Probe und Standard mittels Dreisatz errechnet. Die Konzentration des Standards beträgt 200 mg/dl.

3. Fettverderb

Allgemeines zu den Fettkennzahlen:

Die Lagerfähigkeit von Fetten ist infolge des Fettverderbs begrenzt. Ursache des Fettverderbs können zum einen die hydrolytische Spaltung der Esterbindungen zwischen Glycerol und Fettsäuren durch Lipasen, zum anderen Oxidationsreaktionen (Autoxidation) an der Kohlenstoffkette der ungesättigten Fettsäuren sein. Die Bildung charakteristischer Primär- und Zerfallsprodukte wie Hydroperoxide, Peroxide, Säuren, Aldehyde, Ketone und Polymerisate zeigt den Grad des Fettverderbs an.

Fettkennzahlen dienen der Ermittlung der Identität einzelner Fette sowie der Beurteilung des Frischezustands, der Haltbarkeit bzw. Lagerfähigkeit von Fetten und Fettmischungen.

Die wichtigsten Fettkennzahlen sind:

Anisidinzahl:

Maß für die Konzentration der ungesättigten Aldehyde in einem Fett (hat die früher übliche Aldehydzahl oder Benzidinzahl abgelöst).

Jodzahl:

Maß für den Anteil ungesättigter Fettsäuren im Fett.

Peroxidzahl:

Maß für den Gehalt eines Fettes oder Öles an peroxidisch gebundenem Sauerstoff, insbesondere an Hydroperoxiden. Die Peroxidzahl dient neben anderen Kennzahlen der Beurteilung des Oxidationsgrades.

Säurezahl:

Sie gibt die Menge an KOH (in mg) an, die notwendig ist, um die enthaltenen freien organischen Säuren zu neutralisieren. Das gelöste Fett wird mit ethanolischer KOH titriert.

Verseifungszahl:

Maß für die in einem Fett enthaltenen freien und gebundenen Fettsäuren, die bei Verseifung mit Laugen entstehen.

Qualitätskriterien von Futterfetten:

Ein Qualitätskriterium von Futterfetten, das besonders bei der Schweinemast von Bedeutung ist, betrifft den Anteil von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Pflanzliche Öle mit hohen Gehalten an Polyenfettsäuren sind bei der Lagerung im Mischfutter besonders oxidationsanfällig. Verfütterte Polyenfettsäuren werden in hohem Maße in das Körperfett eingelagert. Hierdurch kommt es zu einer unerwünscht weichen Fettkonsistenz, die Lagerstabilität dieser Veredlungsprodukte ist vermindert (Vitamin E - *in vivo* Oxidationsschutz).

Eine Säurezahl über 50 wird als kritisch bewertet. Freie Fettsäuren haben normalerweise keinen Einfluss auf den Veredlungserfolg. Sind jedoch die freien Fettsäuren durch hydrolytischen Fettverderb entstanden, so kann es zu Geruchs- und Geschmacksminderung der Futterfette kommen. Wasser- und petroletherun-

lösliche Verunreinigungen sollen überwiegend auf 1 % begrenzt werden. Beide vermindern den Energiegehalt des Fettes und begünstigen den Verderb von Fetten während der Lagerung.

Die Peroxidzahl wird heute als Qualitätskriterium bei Futterfetten weniger beachtet. Ein negativer Einfluss oxidierter Fette kann nur selten experimentell nachgewiesen werden. Die zugelassenen Antioxidantien (Ethoxyquin, Butylhydroxytoluol) haben einen recht unterschiedlichen Wirkungsgrad. Dazu kommt der variable Einfluss der verschiedenen Einzelfuttermittel und Zusatzstoffe (insbesondere Spurenelemente) auf Oxidationsprozesse, die zudem zur Senkung des Gehaltes an Vitamin A und E sowie der Carotinoide führen können.

Ein unverseifbarer Anteil (UV) ist praktisch in allen natürlichen Fetten enthalten. Ein hoher UV vermindert jedoch den Energiegehalt. Erhöhte UV-Gehalte beruhen auf Zusätzen und müssen als Verfälschungen gewertet werden.

Frittier- und Bratenfette, die unerlaubt in Futterfetten vorhanden sind, zeichnen sich durch hohe Gehalte an Di- und Polymeren aus. Eine Toxizität dieser Verbindungen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Die Absorption im Darm ist jedoch herabgesetzt, so dass ein geringerer energetischer Effekt eintritt. Ein Anteil von 3 % Polymerisaten sollte generell nicht überschritten werden.

Bestimmung der Peroxidzahl nach WHEELER

Vorbemerkung:

Die Peroxidzahl (POZ) kann Aufschluss über den Beginn des Fettverderbs eines Futtermittels geben. Eine generelle Beziehung zwischen der Höhe der POZ und der organoleptisch nachweisbaren Ranzigkeit des in einem Futtermittel enthaltenen Fettes besteht nicht. Da Fette Stoffgemische sind, gibt es keine allgemein gültigen Zahlen, sondern im Prinzip für jede Sorte eine spezifische Zahl, die auch von der Jahreszeit beeinflusst werden kann.

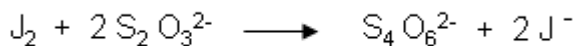
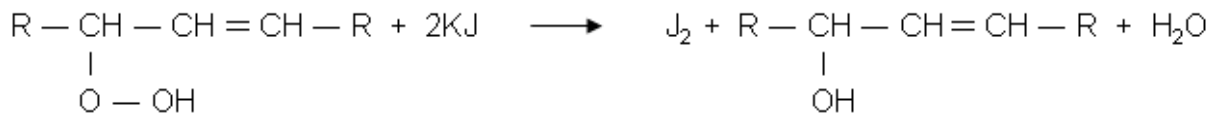
Richtwerte: - native und nicht raffinierte Speisefette und -öle: max. 10

- raffinierte Speisefette und -öle: max. 5

(aus: Leitsätze für Speisefette und Speiseöle; Deutsches Lebensmittelbuch)

Prinzip:

Die bei der Fettautoxidation entstehenden Peroxide (Peroxigruppe –O–O–) oxidieren das Jodid zu Jod, das anschließend mit Natriumthiosulfat titriert wird (R = Rest).



Reagenzien:

1. Eisessig, p.a. (konz. Essigsäure)
2. Trichlormethan, p.a. (Chloroform)
3. Kaliumjodid, p.a.
4. Natriumthiosulfatlösung, 2 mmol/l
5. Stärkesuspension, ca. 0,5 %ig
6. Proben verschiedener Fette zur Analyse

Ausführung:

Fettproben (Kokosfett: 5 g; frisches Öl: 2,5 g; altes Öl: 0,5 g) werden in einem 250 ml Erlenmeyerkolben in 30 ml eines Gemisches von Eisessig:Trichlormethan (3:5) gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml einer frisch bereiteten, gesättigten wässrigen Kaliumjodidlösung wird der Kolben verschlossen (Alufolie) und 1 Minute intensiv geschüttelt. Anschließend werden 30 ml Aqua bidest. hinzugefügt und mit Natriumthiosulfatlösung unter Verwendung von ca. 2 ml Stärkesuspension als Indikator das ausgeschiedene Jod titriert. Parallel zu den einzelnen Fetten wird ein Blindwert ermittelt, der vom jeweiligen Probenwert abgezogen wird.

Die Peroxidzahl, definiert als Verbrauch an Thiosulfat (in mmol) pro kg Fetteinwaage, wird aus den ermittelten Werten berechnet.

4. Herstellen eines Polyesters aus Zitronensäure und Sonnenblumenöl

Geräte:

Becherglas (100 ml), Glasstab, Dreifuß, Bunsenbrenner

Chemikalien:

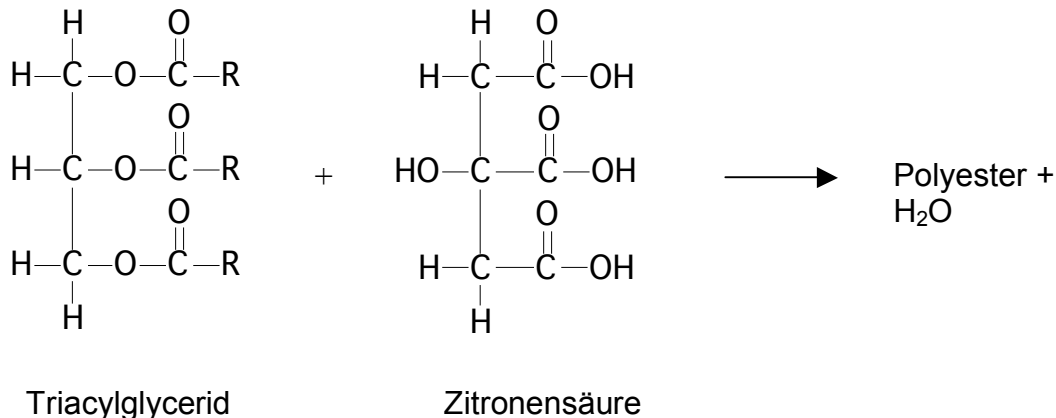
Zitronensäure, Speiseöl

Durchführung:

Man erhitzt ca. 3 g Zitronensäure und etwa 5-10 ml Speiseöl in einem Becherglas so lange über dem Bunsenbrenner, bis sich ein zäher Schaum bildet. Dabei kann gelegentlich mit einem Glasstab umgerührt werden. Sobald keine feste Zitronensäure mehr sichtbar ist, lässt man abkühlen und erhält ein bernsteinfarbenes, etwas klebriges, weiches Harz, das wasserunlöslich ist.

Auswertung:

Bei der beobachteten Reaktion handelt es sich um eine sog. *Polykondensation*, also eine Esterbildung zwischen mehrwertigen Alkoholen und mehrwertigen organischen Säuren. Frage: Welche chemische Reaktion müssen die Triacylglyceride des Speiseöls dazu zuvor als erstes durchlaufen?



R = gesättigte (z. B. Palmitin-, Stearinsäure) oder ungesättigte (z. B. Öl-, Linolsäure) Fettsäuren