

OMEGA-3-FETTSÄUREN IN ALPEN- UND WILDLACHSFILETS: OPTIMIERUNG DER PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE GC-MS ANALYSE

Daniela Hack, Birgit Herbinger und Justyna Rechthaler

Fachhochschule Wiener Neustadt für Wirtschaft und Technik – Studiengang
Biotechnische Verfahren am Standort Tulln, FHWN-Tulln, Österreich

EINLEITUNG

Ernährungsphysiologische Bedeutung von Omega-Fettsäuren

Omega-3-Fettsäuren (ω -3-FS) sind eine spezielle Gruppe innerhalb der essentiellen ungesättigten Fettsäuren. Die Wirkung der ω -3-FS auf den menschlichen Organismus wurde erstmals von den dänischen Forschern Bang und Dyerberg Mitte der siebziger Jahre entdeckt, welche Krebserkrankungen in Grönland lebender Inuit mit jenen von dänischen Staatsbürgern verglichen. Bei dieser Studie stellte sich heraus, dass bei den Eskimos trotz fettreicher Nahrung (Fisch, Robben- und Walfleisch) weit geringere Raten von Myokardinfarkten (Herzinfarkten) und Krebserkrankungen auftraten als bei den Dänen. Die Ursache für das geringere Erkrankungsrisiko der Inuit lag in der fünffach höheren Aufnahme von EPA (Eicosapentaensäure, Abb.1) und DHA (Docosahexaensäure, Abb.2) über die marine Nahrung und dem ausgewogenen Verhältnis zwischen ω -6-FS zu ω -3-FS. Bei den Inuit liegt dieses bei ca. 1:1, bei Europäern zw. 20 und 50:1. Eine weitere Studie, bei welcher japanische Fischer untersucht wurden, die sich ebenfalls vorwiegend von mariner Nahrung ernährten, zeigte ähnliche Ergebnisse [1]. Um jedoch einen positiven physiologischen Effekt durch die Aufnahme von ω -3-FS zu erzielen, sollten durchschnittlich über 2 g ω -3-FS über die Nahrung aufgenommen werden, was einer täglichen Aufnahme von rund 200 g Fisch entspricht. Die hohe Menge an empfohlener Aufnahme von ω -3-FS führte zum vermehrten Angebot von Nahrungsergänzungsmitteln (z.B. Fischölkapseln), welche konzentrierte Formen an ω -3-FS enthalten. Wie oben erwähnt, ist jedoch ein ausgewogenes Verhältnis zwischen ω -6-FS und ω -3-FS zu beachten: Die Deutsch-

Österreich-Schweiz-Gesellschaft für Ernährung empfiehlt ein maximales Omega-6 zu Omega-3-Verhältnis von 5:1 [2,3,4]. EPA und DHA gehören zu den ω -3-FS, die nicht nur mit der Senkung des Krebsrisikos in Verbindung gebracht werden, sondern auch die Senkung des Cholesterinspiegels im Blut und Verbesserung der Sehleistung bewirken können. Der Cholesterinspiegel kann bei einer kontrollierten Einnahme von Fischölen um bis zu 70 % gesenkt werden [5,6].

Fische als Lieferanten von Omega-3-Fettsäuren

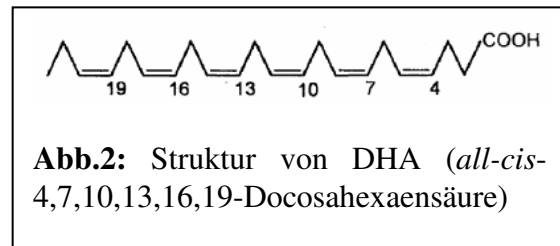
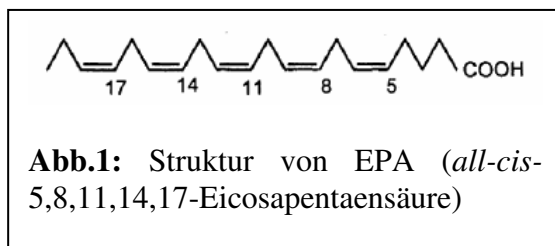
Besonders große Mengen an langkettigen ω -3-FS findet man zum Beispiel in fettreichen Kaltwasserfischen wie Heringen, Makrelen und Lachsen. 100 g Lachs enthalten durchschnittlich 3 g langkettige ω -3-FS (wie die α -Linolensäure, EPA und DHA) [7].

Weltweit gibt es bereits zahlreiche Aquakulturanlagen, um den wachsenden Bedarf an ω -3-FS aus Fischen abzudecken. Anlagenbetreiber von Aquakulturen züchten unter kontrollierten Bedingungen bestimmte Fischarten wie Lachse und fördern deren ω -3-FS Gehalt durch Fischfutterzusätze wie Fischmehl und Öle pflanzlicher oder tierischer Herkunft. Der steigende Bedarf an entsprechenden Nahrungsergänzungsmitteln und Fütterungszusätzen hat jedoch den Fischbestand in den Meeren drastisch reduziert. Deswegen steigen Anlagenbetreiber von Aquakulturen vermehrt auf alternative Fütterungsmethoden wie der Fütterung mit Lein-, Hanf-, und Rapsölen bei Zuchtlachsen um [8,9].

Omega-3-Fettsäuren Studie an der FHWN-Tulln

Das Ziel der Arbeit war, eine robuste GC-MS Methode zur Bestimmung von EPA und DHA in Lachsfischen an der FHWN-Tulln zu etablieren. Für die gewählte Analysentechnik wurden die zuvor aus den Fischen extrahierten Lipide zu Fettsäuremethylestern umgesetzt. Dabei wurde der Einfluss des Antioxidationsmittels BHT („Butylhydroxytoluol“) auf die Ausbeuten an EPA und DHA in beiden Fischarten (Wild- und Alpenlachs) untersucht. Ausgehend von der AOAC-Methode [10] wurden die Probenvorbereitung und die GC-MS-Methodenparameter systematisch optimiert. Zur Extraktion der Lipide kam vorwiegend ASE (Accelerated Solvent Extraction) zum Einsatz. Die ASE-Methodenentwicklung wurde mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln (Petrolether bzw. Chloroform /Methanol-Gemischen), bei verschiedenen

Temperaturen und statischer Zyklendauer durchgeführt. Bei der GC-MS-Methodenoptimierung wurden verschiedene Temperatur-Programme, Flussraten und Split-Verhältnisse getestet. In der vorliegenden Studie wurden Filets ohne Haut eines pazifischen Wildlachs (*Oncorhynchus keta*) und eines sog. Alpenlachs (Eismeersaibling der Gattung *Salvelinus alpinus lepeschini*) untersucht. Der Wildlachs *Oncorhynchus keta* wird wegen seines hohen Gehalts an ω -3-FS als Speisefisch besonders geschätzt. Der Eismeersaibling zählt zur Gruppe der Salmoiden, das genetische Erbmaterial stammt jedoch nicht von den heimischen Saiblingen, sondern von den arktischen Meeresfischen. Der Alpenlachs zeichnet sich ebenfalls durch einen hohen Gehalt an ω -3-FS aus. Er liefert sowohl im Sommer als auch im Winter gleichbleibende Produkt-Qualität, da er im Gegensatz zu anderen Lachsarten über die Wintermonate gefüttert werden kann [8].



EXPERIMENTELLES

Probenvorbereitung

Die Wildlachs-Probe wurde tiefgefroren aus einem Supermarkt bezogen. Der Alpenlachs wurde frisch von einem niederösterreichischen Züchter zur Untersuchung herangezogen. Die Alpenlachs- und Wildlachsproben wurden homogenisiert, gefriergetrocknet und bis zu weiteren Analysen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Je 5 g getrockneter Probe wurden unter Verwendung eines Chloroform/Methanol-Lösemittelgemisches (2:1, v/v) zur Extraktion (ASE: $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ statische Zyklendauer von 10 Minuten) vorgelegt, danach Lösemittelreste vollständig entfernt (N_2 -Atmosphäre). 25 mg Fischöl wurden zur Umesterung (NaOH/BH_3 in MeOH) vorgelegt (Int. Standard: Heneicosansäure-Methylester; C 21:0). Nach Zugabe von NaCl-Lösung und Isooctan wurde die FSME-Phase abgetrennt, ein exaktes Endvolumen mit Isooctan eingestellt und je $2\text{ }\mu\text{l}$ in die GC-MS-Apparatur injiziert.

GC-MS

Zum Einsatz kam das GC-MS-System von Agilent Technologies (GC 6890N, 5975 Inert MSD). Trennsäule: Thermo TR WAX Kapillarsäule (L 30 m x ID 0,25 mm; FD 0,5 μ m). Stationäre Phase: 100 % Polyethylenglycol. Trägergas: Helium. Messparameter: Anfangstemperatur: 180 °C; 1 °C/Min. auf 190 °C; 2 °C/Min. auf 220 °C; 25 Min. halten; Split: 5:1; Injektionsvolumen: 2 μ l; Flussrate: 1,2 ml/Min.; Gesamtlaufzeit: 50 Min.

ERGEBNISSE

Der Gehalt (im Fischölextrakt) an EPA betrug im Alpenlachs 3,6 g/100 g (RSD 1,6 %) und im Wildlachs 3,9 g/100 g (RSD 1,6 %). Der Gehalt an DHA betrug im Alpenlachs 9,4 g/100 g (RSD 0,2 %) und im Wildlachs 12,0 g/100 g (RSD 2,3 %). Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 94,5 % und 100,2 %. Diese Daten wurden ohne BHT-Zugabe generiert. Die Zugabe von BHT vor der Extraktion der Proben führte zu folgenden Ergebnissen: Der Gehalt (im Fischölextrakt) an EPA mit BHT betrug im Alpenlachs 3,6 g/100 g (RSD 1,1 %) und im Wildlachs 5,3 g/100 g (RSD 6,1 %) bzw. betrug der Gehalt an DHA im Alpenlachs 10,7 g/100 g (RSD 1,2 %) und im Wildlachs 12,2 g/100 g (RSD 4,4 %). Es zeigte sich dabei bei Wildlachs-Proben deutlich, dass bei Zugabe von BHT die Streuung der EPA- und DHA-Werte stärker als ohne BHT war, (Abb.3 und Abb. 4).

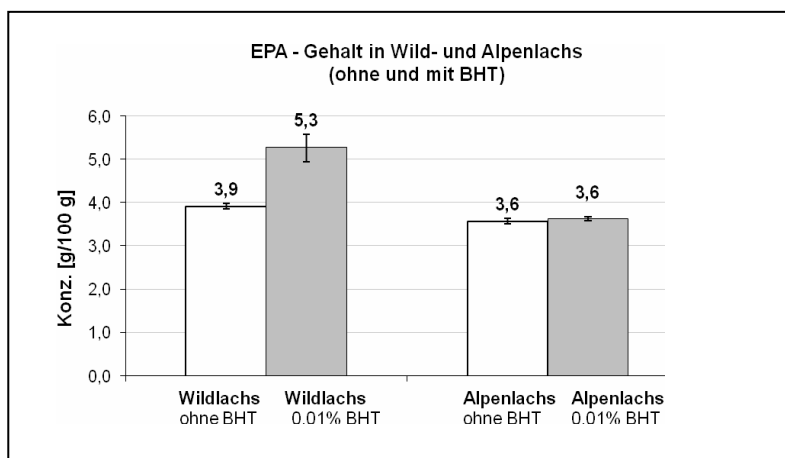


Abb.3: Gehalt (im Fischöl) an EPA in Wild- und Alpenlachsproben mit und ohne BHT.

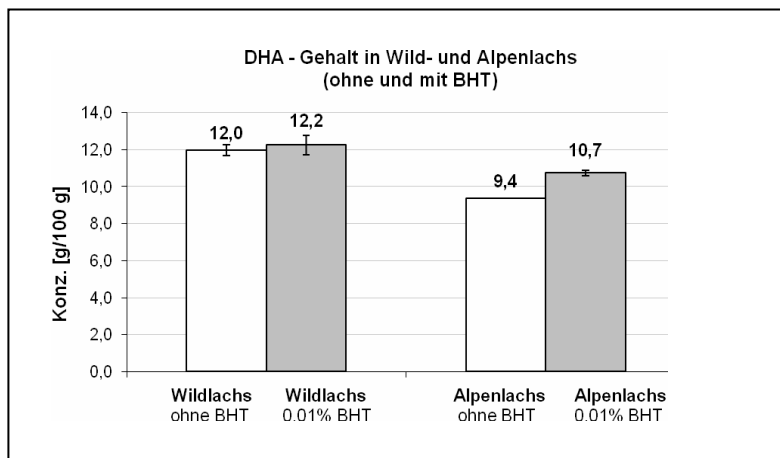


Abb.4: Gehalt (im Fischöl) an DHA in Wild- und Alpenlachsproben mit und ohne BHT.

SCHLUSSFOLGERUNG

Die beschriebenen Methodenparameter führten zu einer robusten Bestimmungsmethode von EPA und DHA in Lachsfischen an der FHWN-Tulln. Als Extraktionsmethode zur Gewinnung der Lipide aus den Proben hat sich die zeit- und lösungsmittelsparende ASE bewährt. Es zeigte sich, dass die zur ASE verwendete Probenmenge (5 g) zur Gewinnung der Lipide künftig sogar halbiert werden kann. Zu beachten ist auch, dass die Fettgehalte und FS-Zusammensetzung von Fischen starken Schwankungen unterliegen und von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden (Alter, Fütterung, Lipid-Verteilung im Fisch, Geschlecht, Reifezyklus, Jahreszeit des Fanges, Herkunft des Fisches, etc.), weshalb bei künftigen FSME-Analysen von Lachsen genauere Spezifikationen der Proben zu beachten sind.

LITERATUR

- [1] Yamori, Y., Nara, Y., Iritani, N., Workman, R., Inagami, T. (1985). Comparison of serum phospholipid fatty acid among fishing and farming Japanese populations and American Islanders. *J. Nutr. Science Vitaminol.* p. 417 – 22, 31.
- [2] Bockisch, M. (1993). *Handbuch der Lebensmitteltechnologie. Naturfette und -öle.* Eugen Ulmer GmbH. & Co. Stuttgart. Deutschland. p. 17 – 55.

[3] Connor, W. E. (2001). n-3 Fatty acids from fish and fish oil: panacea or nostrum? American Society for Clinical Nutrition 74, p. 415–6.

[4] Österreichische Apotheker Zentrale. (2005).
http://www.oeaz.at/zeitung/3aktuell/2005/20/haupt/haupt20_2005oele.html (14.2.2008).

[5] Augustsson, K., Michaud, D. S., Rimm, E. B., Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., Willett, W.C., Giovannucci, E. (2003). A prospective study of intake of fish and marine fatty acids and prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 12, p. 64–67.

[6] Undurti N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. Biotechnol. J. 1. p. 420 – 439

[7] Bundesamt für Risikobewertung. (2006).
http://www.bfr.bund.de/cm/208/muessen_fischverzehrer_ihre_ernaehrung_durch_fisch_oel_kapseln_ergaenzen.pdf (21.4.2008).

[8] Brauchl, P. (2007). <http://www.alpenlachs.at/> (19.2.2008).

[9] Pickova, J., Turid Mørkøre, T. (2007). Alternate oils in fish feeds. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109 (2007), p. 256–263.

[10] AOAC. (1990). In: Helrich, K. Ed. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edn. AOAC, Arlington, VA, USA.