

Aus der Unilever Forschungsgesellschaft mbH, Hamburg

## Über die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Fritierfetten

### 5. Mitteilung: Untersuchung von Körperfetten der Versuchstiere auf dimere Triglyceride, dimere Fettsäuren und polare Anteile nach Fütterung mit Bratfetten

Von H.-J. Strauß und G. Billek

Mit 8 Abbildungen und 1 Tabelle

(Eingegangen am 9. März 1974)

In einem Langzeitfütterungsversuch mit Ratten konnte gezeigt werden, daß bei Aufnahme von stark belasteten Bratfetten weder das Wachstum und die Protein-Efficiency (1) noch die Fortpflanzung der Versuchstiere und die Aufzucht der Jungen (2) negativ beeinflusst werden. Darüber hinaus war die Gesamtlebensdauer der Versuchstiere bei Fütterung von erhitzten und nichterhitzten Fetten praktisch identisch (3). Die beiden zur Fütterung verwendeten Bratfettarten, partiell hydriertes Erdnußöl und Sojaöl, wurden bereits früher vor und nach der Belastung durch Bestimmung einer großen Zahl von Kenndaten genau charakterisiert (4). Mit der späteren Anwendung der Gelpermeationschromatographie (GPC) auf Fette ergab sich eine schnelle und schonende Methode zur Untersuchung der verfütterten Fette hinsichtlich ihrer Molekülgröße (5). Der Anteil der dimeren und höher molekularen Triglyceride (TG) konnte damit genau bestimmt werden.

Nach Fütterung von unbelastetem und belastetem Sojaöl an Wistar-Ratten haben wir Nieren-, Subkutan- und Leberfett<sup>1)</sup> ohne vorhergehende Verseifung mittels GPC auf dimere Triglyceride untersucht. Darüber hinaus wurden die Nieren- und Subkutanfette in ihre Methylester übergeführt und diese mittels GPC und Dünnschichtchromatographie (DC) auf dimere Fettsäuremethylester untersucht, da die GPC der unverseiften Triglyceride eventuell vorhandene intramolekular vernetzte Triglyceride nicht erkennen läßt.

Schließlich wurden die Nieren- und Subkutanfette noch liquid- und dünnschichtchromatographisch auf polare Komponenten untersucht.

### Experimentelles und Ergebnisse

#### 1. Durchführung der Fütterung und Gewinnung der Tierfette

Folgende Fette wurden zu 20 Gew.-% im Tierfutter angeboten:

BR 4 Sojaöl, nicht küchentechnisch eingesetzt

<sup>1)</sup> Es bedeuten: Nierenfett: aus dem anhaftenden Fettgewebe der Niere isoliert  
Subkutanfett: aus dem Subkutanfettgewebe isoliert  
Leberfett: aus der Leber isoliert

BR 7 Sojaöl, mittelstark belastet, etwa 56 Std. bei etwa 175°C mit Bratgut  
 BR 8 Sojaöl, stark belastet, etwa 72 Std. bei etwa 175 °C mit Bratgut

Die Kennzahlen (1) dieser Fette sowie die Ergebnisse der gelpermeationschromatographischen (5) und liquidchromatographischen (6) Untersuchungen wurden bereits mitgeteilt.

Es wurden 18 etwa 4 Monate alte weiße Ratten, 9 Männchen und 9 Weibchen, vom SPF-Wistar-Stamm eingesetzt. Männchen und Weibchen wurden in je 3 Versuchsgruppen eingeteilt, wobei eine Versuchsgruppe immer aus 3 Tieren bestand. Jeweils eine männliche und eine weibliche Gruppe wurden mit einem Futter, das eines der oben angeführten Fette enthielt, 2 Monate lang ad libitum gefüttert. Nach Tötung wurde den Tieren Nieren- und Subkutanfettgewebe sowie die Leber entnommen. Während das Fettgewebe der Nieren von jedem der Versuchstiere separat aufgearbeitet wurde, wurden Subkutanfett und Leber jeweils von den Tieren einer Versuchsgruppe vereinigt und dann gemeinsam aufgearbeitet. In Tab. 1 ist diese Versuchsdurchführung zusammengefaßt.

Tab. 1. Einteilung der Versuchsgruppen und Gewinnung der Fette

Verfüttertes Fett	Geschlecht der Tiere	Zahl der untersuchten Tiere und Art der Fettaufarbeitung <sup>1)</sup>		
		Fettgewebe der Niere	Subkutanfettgewebe	Leberfett
BR 4	♂	3	(3)	(3)
	♀	3	(3)	—
BR 7	♂	3	(3)	(3)
	♀	3	(3)	—
BR 8	♂	3	(3)	(3)
	♀	3	(3)	—

<sup>1)</sup> Es bedeuten: Zahl ohne Klammer = getrennte Aufarbeitung pro Tier. Zahl in Klammer = gemeinsame Aufarbeitung pro Versuchsgruppe.

Die Gewinnung der Fette erfolgte nach dem Verfahren von Folch und Mitarb. (7).

## 2. Untersuchung der Tierfette

### 2.1. Untersuchung der Leber-, Subkutan- und Nierenfette auf dimere TG mittels GPC

Zur GPC-Untersuchung (5), bei der polare und apolare dimere TG gemeinsam erfaßt werden, wurden die Leber- und Subkutanfette der Tiere gruppenweise, das Nierenfett jeweils von einem Tier/Gruppe eingesetzt (siehe Tab. 1). Zum Vergleich wurden die verfütterten Fette auf dimere und höher molekulare TG untersucht. Diese TG waren in BR 4 zu 0,8 %, in BR 7 zu 17,2 % und in BR 8 zu 18,3 % enthalten (Abb. 1). Im GPC zeig-

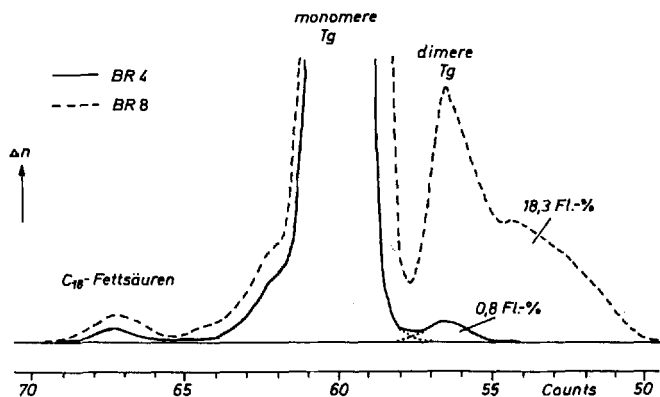


Abb. 1. GPC der verfütterten Fette BR 4 und BR 8.

ten die Leberfette der 3 männlichen Tiergruppen gleichermaßen etwa 0,5 % dimere TG. Neben den monomeren TG als Hauptpeak war ein erheblicher Anteil an Diglyceriden, freien Fettsäuren und Sterinen nachweisbar. Alle drei Chromatogramme waren weitgehend ähnlich, so daß hier nur ein Beispiel wiedergegeben wird (Abb. 2). Unterschiede nach Fütterung mit nichterhitzten und erhitzten Fetten waren nicht erkennbar. Die Leberfette der drei weiblichen Tiergruppen konnten aus technischen Gründen nicht untersucht werden.

Die mittels GPC untersuchten 6 Subkutan- und 6 Nierenfette waren frei von dimeren und höher molekularen TG und bestanden fast ausschließlich aus monomeren TG. Aus den 12 praktisch identischen Chromatogrammen werden hier nur zwei (Abb. 3 und 4) gezeigt.

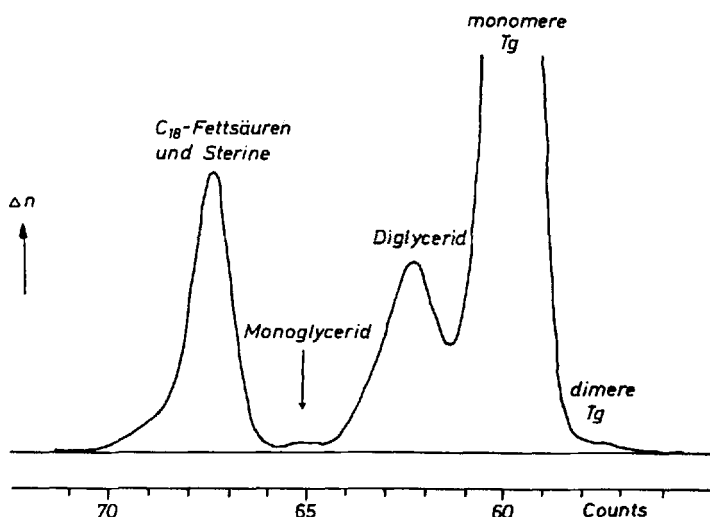


Abb. 2. GPC von Leberfett ♂ nach Fütterung mit BR 7.

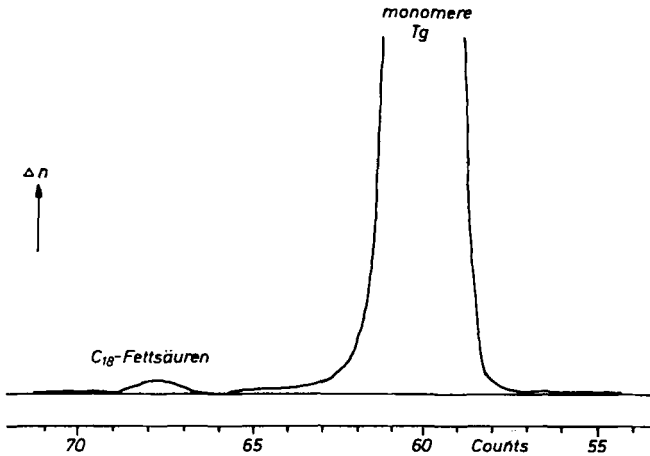


Abb. 3. GPC von Subkutanfett ♀ nach Fütterung mit BR 8.

## 2.2. Untersuchung der Subkutan- und Nierenfette auf polare Anteile mittels DC und Liquidchromatographie (LC)

Zur DC wurden Kieselgel-Fertigplatten von 0,25 mm Schichtdicke verwendet (Merck). Die Platten wurden zuvor 30 min bei 120 °C aktiviert, als Fließmittel diente Petroläther (Siedebereich 40–60 °C) : Diäthyläther : Eisessig 70:30:2. Die Anfärbung erfolgte durch Besprühen mit 10 %iger äthanolischer Molybdätophosphorsäure-Lösung und anschließendes, etwa 3 min. Erwärmen auf 120 °C.

Es wurden die Nierenfette aller Versuchstiere (18 Proben) sowie die Subkutanfette aller Tiergruppen (6 Proben) untersucht. Zum Vergleich wurden die Fette BR 4, BR 7 und BR 8 mit aufgetragen. Während die erhitzten Fette BR 7 und BR 8 sehr stark polare Anteile zeigten, waren diese

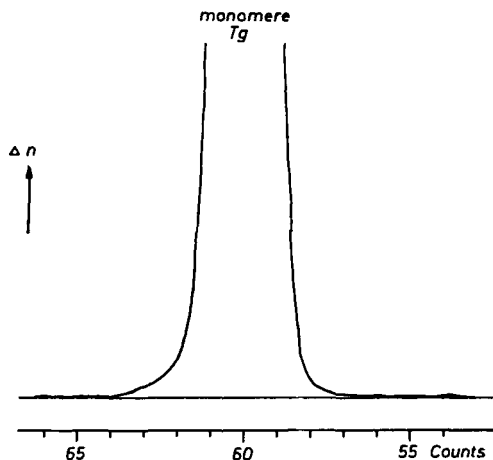


Abb. 4. GPC von Nierenfett ♂ nach Fütterung mit BR 8.

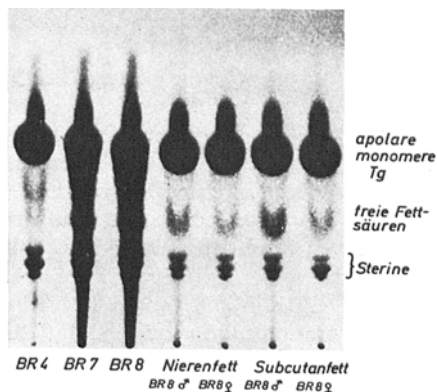


Abb. 5. Dünnschichtchromatographie von Nieren- und Subcutanfetten.

im nichterhitzten BR 4 und in den Tierfetten kaum vorhanden. Ausgewählte Beispiele der Tierfette, die im DC alle gleich aussahen und polare Substanzen fast nur im Sterin- und Fettsäurebereich enthielten, zeigt Abb. 5.

Die Untersuchung im LC, die eine quantitative Aussage über die polaren Anteile ergibt, erfolgte nach (8). Als Detektor wurde ein Pye UNICAM LCM-2 (Methanumwandlung) verwendet; Trägermaterial der Säule war Merckogel S I 50, 26–75  $\mu\text{m}$ . Das Elutionsprogramm wurde so gestaltet, daß nur 2 Peaks auftraten: Im 1. Peak sind Sterinester und unpolare monomere TG enthalten, im 2. Peak dagegen alle Substanzen mit höherer Polarität, wie z. B. unpolare dimere und höhere molekulare TG, oxidierte monomere, dimere und höher molekulare TG, Fettsäuren, Sterine, Mono- und Diglyce-

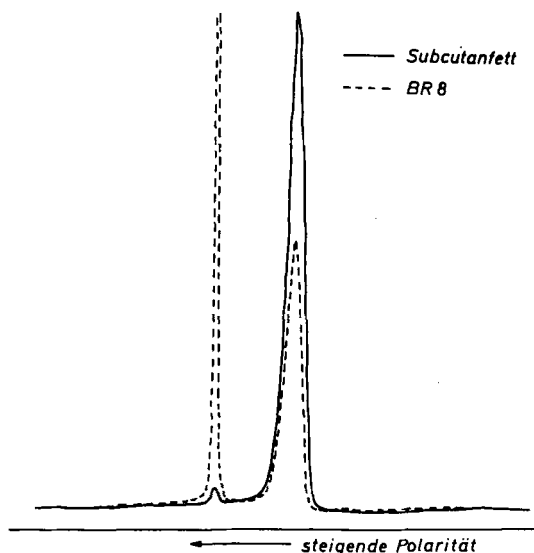


Abb. 6. LC von BR 8 und Subcutanfett ♀ nach Fütterung mit BR 8.

ride usw. Die Auswertung erfolgte durch Ausscheiden der Peaks und Wägung.

Es wurden jeweils das Nierenfett von einem Tier/Versuchsgruppe (gleiches Tier wie GPC-Untersuchung auf dimere TG) sowie die Subkutanfette aller Tiergruppen untersucht. Bei den Nierenfetten betrug der Flächenanteil der polaren Anteile 0,6–0,9%, bei den Subkutanfetten 2–3%. Darin eingeschlossen sind natürlich Mono- und Diglyceride, freie Fettsäuren und Sterine, die auch die GPC's, insbesondere bei Subkutanfett (Abb. 3), zeigen. Dementsprechend waren auch die Werte für polare Anteile im Subkutanfett höher. Vergleichsweise enthielten die verfütterten Fette an polaren Anteilen: BR 4 6,2%, BR 7 26,8%, BR 8 31,4% (Abb. 6).

Diese DC- und LC-Untersuchungen zeigen, daß die lt. GPC praktisch ausschließlich aus monomeren TG bestehenden Subkutan- und Nierenfette im Gegensatz zu den verfütterten Fetten BR 7 und BR 8 auch weitgehend frei von polaren Anteilen sind. Eine gleiche Untersuchung der Leberfette unterblieb, da die lt. GPC (Abb. 2) in sehr erheblicher Menge vorhandenen Diglyceride und freien Fettsäuren infolge ihrer hohen Polarität stören würden.

### 2.3. Überführung der Subkutan- und Nierenfette in ihre Fettsäuremethylester und Untersuchung der Methylester auf dimere Fettsäuremethylester mittels DC und GPC

Ca. 300 mg des Tierfettes wurden mit 0,8 ml 0.025 n Natriummethylatlösung in einer Ampulle 2 Std. bei 60 °C geschüttelt. Anschließend wurde in wenig 2%ige NaCl-Lösung gegeben und 3mal mit Petroläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Petrolätherphasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Es wurden die Methylester aus den Nierenfetten (jeweils von einem Tier je

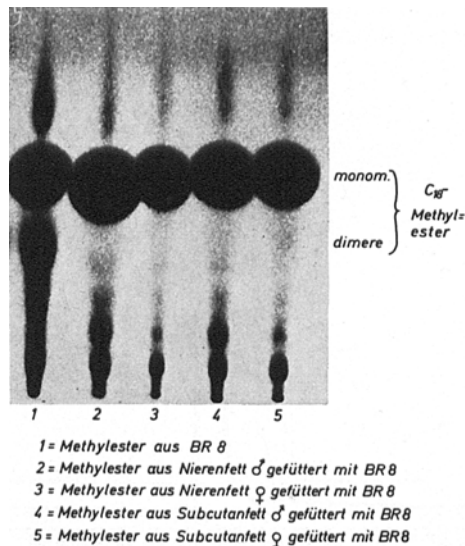


Abb. 7. Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester.

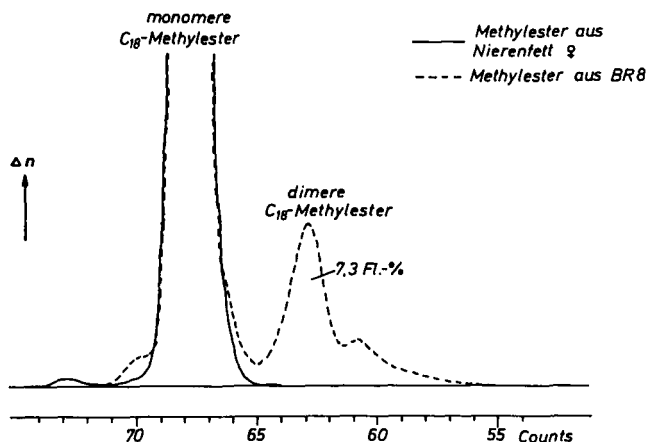


Abb. 8. GPC von Methylester aus BR 8 und von Methylester aus Nierenfett ♀ nach Fütterung mit BR 8.

Versuchsgruppe; gleiches Tier wie unter 2.1 und 2.2), den Subkutanfetten sowie aus BR 8 hergestellt. Die Ausbeuten an Methylester lagen bei den 13 untersuchten Proben zwischen 95 und 99 %.

Die Bedingungen der DC waren bis auf das Fließmittel, das hier zur Erkennung der Methylester dimerer Fettsäuren aus Petroläther : Diäthyläther 80:20 bestand, die gleichen wie unter 2.2. Alle Subkutan- und Nierenfettmethylester zeigten im DC im Gegensatz zum Methylester aus BR 8 keine Methylester dimerer Fettsäuren (Abb. 7).

Für die mit BR 8 gefütterten Tiere wurde dieser Befund noch im GPC geprüft. Die aus den Nieren- und Subkutanfetten hergestellten Methylester zeigten eine Molekulargewichtszusammensetzung von 99,3–99,8 %  $C_{18}$ -Fettsäuremethylester und 0,2–0,7 % Fettsäuremethylester mit niedrigerem Molekulargewicht. Methylester dimerer Fettsäuren waren nicht vorhanden. Der aus BR 8 gewonnene Methylester zeigte 7,3 % Methylester dimerer Fettsäuren (Abb. 8). Eine analoge Analyse der Leberfette auf eventuell vorhandene dimere Fettsäuren konnte aus Substanzmangel nicht durchgeführt werden.

#### Danksagung

Wir danken Herrn Dr. M. Unbehend und Herrn Dr. K. Aitzetmüller für ihre Hilfe bei den GPC- und LC-Untersuchungen, Fräulein H. Galli sowie Herrn K. D. Masch danken wir für die sorgfältige und gewissenhafte Durchführung der Untersuchungen.

Die Tierversuche wurden in der Tierversuchsstation der Deutschen Unilever GmbH, 2 Hamburg 69, Furtredder 13–15, durchgeführt, wofür wir Herrn Dr. J. Henschel und Frau Ch. Erdmenger danken.

#### Zusammenfassung

Zwei belastete sowie ein unbelastetes Sojaöl wurden über zwei Monate bei einem Anteil von 20 Gew.-% im Futter an Ratten verfüttert. Anschließend wurden die Nieren-, Subkutan- und Leberfette der Tiere untersucht. Während die verfütterten belasteten Bratfette lt. Gelpermeationschromatogramm (GPC) 17 und 18 % dimere und höher molekulare Triglyceride enthielten, waren Sub-

stanzen dieses Molekulargewichts in den Nieren- und Subkutanfetten nicht und in den Leberfetten nur mit weniger als 0,5 % vorhanden. Mittels Liquid-(LC)- und Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Nieren- und Subkutanfette auf polare Anteile untersucht. Sie waren in den verfütterten belasteten Bratfetten zu 27 und 31 % enthalten, im unbelasteten Bratfett zu 6 % und in den Körperfetten zu maximal 3 %.

Dimere Fettsäuren ließen sich auch in den als monomer erkannten Triglyceriden der Nieren- und Subkutanfette nicht nachweisen: Die aus diesen Fetten hergestellten Methylester enthielten lt. DC und GPC im Gegensatz zu dem Methylester aus einem belasteten Bratfett keine Methylester dimerer Fettsäuren. Damit ist auch eine intramolekulare Vernetzung der Fettsäuren auszuschließen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die in belasteten Bratfetten vorhandenen Artefakte sich nach dem Verfüttern der Fette nicht in den Körperfetten der Versuchstiere anreichern.

### Summary

Two under deep frying conditions heated soyabean oils and the unheated oil were fed to rats at a concentration of 20 % (w/w) in the food for 2 months. The animals were sacrificed and kidney fat, subcutaneous fat, and fat extracted from the liver were analysed. Whereas the heated frying fats contained 17 % and 18 % of dimeric triglycerides, as could be shown by gel permeation chromatography, the kidney as well as the subcutaneous fat was completely free of dimeric triglycerides. Fat isolated from the liver showed small amounts (< 0.5 %) of these compounds which, as far as we believe, do not originate from the heated fat fed to the animals since these compounds were present even in case of the animals which received the unheated oil.

Kidney and subcutaneous fats were analysed by liquid chromatography and thin-layer chromatography w. r. t. the presence of polar components (total polar artefacts). The heated fats contained up to 27 % and 31 % of total polar artefacts, the unheated soyabean oil 6 %, whereas in the body fats isolated only up to 3 % could be detected.

Kidney and subcutaneous fats were interesterified with methanol and the methylesters analysed by thin-layer and gel permeation chromatography. Dimeric fatty acid methyl-esters could be detected in the heated fats only but not in the body fats. This shows that intramolecular links between two fatty acids do not occur in the body fats.

From all these results it is concluded that artefacts occurring in heated frying fats do not accumulate in adipose tissue after feeding them to the test animals.

### Literatur

1. Lang, K., E. H. von Jan, J. Henschel, Z. Ernährungswiss. 9, 363 (1969). –
2. Lang, K. und J. Henschel, Z. Ernährungswiss. 10, 234 (1971). – 3. Lang, K., J. Henschel, J. Waibel und G. Billek, Z. Ernährungswiss. 12, 241 (1973). – 4. Lang, K. und E. H. von Jan, Fette, Seifen, Anstrichmittel 71, 1027 (1969). – 5. Unbehend, M. und H. Scharmann, Z. Ernährungswiss. 12, 134 (1973). – Scharmann, H., M. Unbehend und H. J. Strauß, Fette, Seifen, Anstrichmittel 75, 689 (1973). – 6. Aitzetmüller, K., Fette, Seifen, Anstrichmittel 75, 14 (1973). – 7. Folch, J., M. Lees und G. H. Sloan-Stanley, J. biol. Chem. 226, 497 (1957). – 8. Aitzetmüller, K., J. Chromatogr. 79, 329 (1973).

Anschrift der Verfasser:

Unilever Forschungsgesellschaft mbH, 2000 Hamburg 50  
Behringstraße 154