

## **Ein Beitrag zum postmortalen Neutrallipidabbau Einsatz moderner Analysenmethoden (HPLC, Kapillar GC, GC-MS und NMR) bei der Fettwachsbildung\***

**S. Cs. Szathmary<sup>1</sup>, L. von Tamaska<sup>1</sup> und A. Steigel<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institut für Rechtsmedizin der Universität Düsseldorf, Moorenstr. 5, D-4000 Düsseldorf, Bundesrepublik Deutschland

<sup>2</sup> Institut für Organische Chemie der Universität Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-4000 Düsseldorf, Bundesrepublik Deutschland

### **Evaluating the Formation of Adipocere. Investigation of Postmortem Decomposition of Lipids by HPLC, Capillary-GC, GC-MS and NMR (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR)**

**Summary.** The chemical composition of subcutaneous fats was analyzed in a corpse that had died from drowning. The skin of the cadaver examined postmortem showed different stages of adipocere. Samples from these regions were chemically compared with the fatty tissue of a person who had died recently. HPLC, GC, GC-MS, NMR (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR), TLC and titrimetrical methods were used to evaluate the degree of decomposition. The fatty acid pattern of the triglycerides (TG) and the free fatty acids (FFA) obtained by TLC separation was also investigated.

Some discrepancy was observed between the autopsy findings and the results of the chemical analysis.

It is suggested that the autopsy should be supplemented by chemical analysis in order to describe the state of adipocere correctly.

**Key words:** Chemical analysis of subcutaneous human fat – Adipocere – Neutral lipids, decomposition

**Zusammenfassung.** Die chemische Zusammensetzung von Unterhautfettgewebe einer Wasserleiche, deren Körperoberfläche unterschiedliche Vorstufen von Fettwachsbildung aufwies, wurde bestimmt. Ein Hautstück, welches makroskopisch offenbar keine Wachsbildung zeigte, wurde mit zwei anderen Gewebeproben, die zunächst als typische Fettwachse angesehen wurden, und einem Referenzunterhautfettgewebe verglichen. Die Extrakte

\* Auszugsweise vorgetragen auf der 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 12.–15. September 1984 in Gießen. Sonderdruckanfragen an: S. Cs. Szathmary, Fa. Janssen, Postfach 210440, Raiffeisenstr. 8, D-4040 Neuss 21 (Rosellen), Bundesrepublik Deutschland

der Gewebeproben wurden direkt mittels HPLC, Kapillar-GC, GC-MS, NMR ( $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR), DC und titrimetrischen Verfahren untersucht. Nach dünnenschichtchromatographischer Vortrennung wurden die Fraktionen der freien Fettsäuren und der Triglyceride mittels GC analysiert. Die chemischen Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Lipidabbaustufen stimmten nicht immer mit dem makroskopischen Befund überein. Es wurde festgestellt, daß bei der Beurteilung und Beschreibung von Fettwachsbildung des Unterhautfettgewebes eine Unterstützung mit chemischer Feinstrukturanalyse sinnvoll erscheint.

**Schlüsselwörter:** Unterhautfettgewebe, chemische Analyse – Fettwachsbildung – Neutrallipide, Abbau

## 1. Einleitung

Die Problematik der Zusammensetzung von Fettwachs und des Ablaufens des postmortalen Lipidstoffwechsels ist eine der ältesten Fragestellungen der Rechtsmedizin. Die Entwicklung des Leichenlipids ist bis heute noch nicht einwandfrei geklärt. Diese Unklarheiten werden unter anderem durch umstrittene chemische Erklärungen, die Anwendung einer mehrdeutigen Nomenklatur sowie durch die begrenzten Möglichkeiten der früheren Analysenmethoden verursacht. Auf diese Probleme wurde in mehreren Arbeiten [2, 5, 6] hingewiesen.

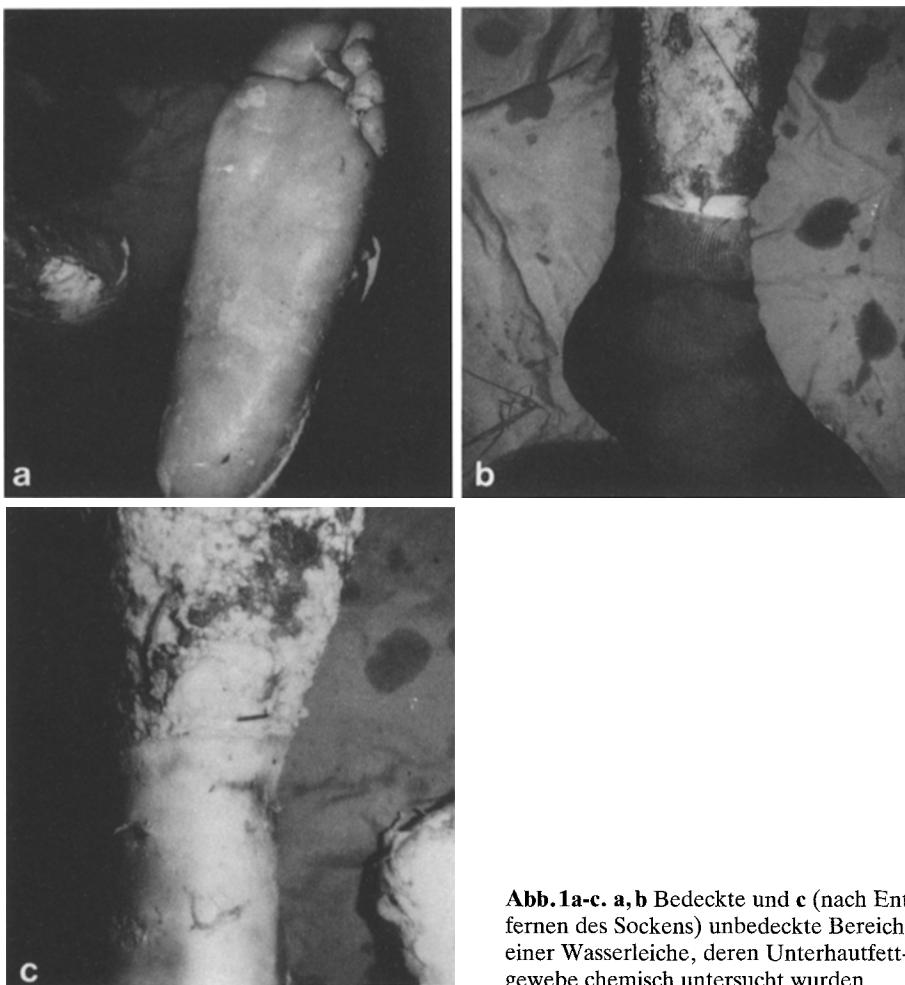
Der postmortale Lipidabbau ist sehr multifaktoriell. Er wird sowohl von den jeweils untersuchten Körperstellen – bzw. Lipidstoffen (z. B. Unterhautfettgewebe, Knochenmark-, Gehirnlipide) und den unterschiedlichen enzymatischen Gegebenheiten als auch von der Umgebung beeinflußt (Luft, Wasser, Angriff der Mikroorganismen).

Wegen der umfangreichen Einflußmöglichkeiten und des dadurch bedingten Mangels gesicherter Kontrolluntersuchungen wird die Durchführung wissenschaftlich einwandfreier Versuchsanordnungen erheblich beeinträchtigt.

Wir versuchten durch Einsatz moderner Analysenmethoden (HPLC, Kapillar-GC, GC-MS, NMR) bei einem interessanten Fall zur Aufklärung des postmortalen Lipidabbaus beizutragen.

Die Füße einer Wasserleiche waren von Socken bedeckt (Abb. 1a und 1b), die übrigen Körperflächen waren unbekleidet und hatten dadurch direkten Kontakt mit dem Wasser (Abb. 1c). Bei der Obduktion wurde eine frühzeitige Fettwachsbildung am unbedeckten Hautgewebe festgestellt, wogegen die Haut unter den Socken fast unverändert war (Abb. 1a). Das Unterhautfettgewebe der Füße erlaubte daher nach unserer Auffassung eine gewisse Kontrolle. Das Ziel unserer Untersuchung war die chemische Überprüfung der Befunde und der Beurteilung erfahrener Obduzenten bezüglich des Vorliegens einer Fettwachsbildung.

Die Anwendung der HPLC und der gaschromatographischen Kapillartechnik zur Untersuchung von Fetten sind nicht nur von theoretischem, sondern auch von praktischem Interesse. Nur mit hochauflösenden Kapillarsäulen ist es möglich, nicht körpereigene (z. B. ungeradzahlige Fettsäuren, trans-Isomere,



**Abb. 1a-c.** a, b Bedeckte und c (nach Entfernen des Sockens) unbedeckte Bereiche einer Wasserleiche, deren Unterhautfettgewebe chemisch untersucht wurden

verzweigte Fettsäuren) von natürlich vorkommenden Fettsäuren zu trennen und damit einen eventuell vorliegenden bakteriellen Einfluß nachzuweisen. Die neue Säulentechnologie der HPLC bietet eine Möglichkeit, ein breites Lipidpektrum (freie Fettsäuren, Mono-, Di- und verschiedene Triglyceride) nebeneinander auszuwerten, GC-MS bzw. Kernresonanzspektroskopie (NMR) wurden zum Nachweis von Hydroxystearinsäure und von unbekannten Fettsäuren bzw. Propandioldiester-Strukturen [7] eingesetzt.

## 2. Methodik – Materialien

### 2.1. Probenentnahme, Aufarbeitung

Drei Proben (Cutis und Subcutis) wurden von einer unbekannten Wasserleiche (Sekt.-Nr. 421/83) entnommen, und zwar eine vom ungeschädigten Unterhaut-

fettgewebe (Abb. 1a) (Fußsohle: „FS“) und zwei von unterschiedlichen Vorstadien des fettwachsartigen Hautgewebes (Oberschenkel: „O“ und Gesäß: „G“). Außer diesen Proben wurde zur Festlegung der Ausgangspunkte Fettgewebe einer frischen Leiche (Sekt.-Nr. 190/84, zwei Tage alt) untersucht.

Die Proben wurden zerkleinert und im Vakuumexsikkator (über  $\text{CaCl}_2$ - $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sicc.-NaOH-Gemisch) getrocknet (24 Std). Die Gewebeteile wurden im Mörser mit einer Chloroform/Methanol (2:1)-Mischung dreimal zerrieben und extrahiert [9]. Diese Extrakte („Gesamt-Extrakt“) wurden für weitere Untersuchungen aufbewahrt und eingesetzt. Der Rückstand der Extraktionen wurde mit Salzsäure (4%) behandelt ( $80^\circ\text{C}$ , 1 Std) und danach mit Äther extrahiert, um auch die Fettsäuren in der eventuell vorkommenden Seifenfettfraktion zu erfassen.

Da der Extrakt der Probe 190/84 praktisch nur Triglyceride enthielt, wurde dieser Extrakt direkt unter Einsatz von HPLC, GC und NMR untersucht. Die Leichengewebeproben („G“, „FS“ und „O“) wurden nicht nur direkt als „Gesamt-Extrakte“ unter Einsatz von HPLC, GC und NMR analysiert, sondern der Fettsäureanteil der freien Fettsäure- und Triglyceridfraktion nach DC-Trennung erneut gaschromatisch untersucht.

2.2. Die *freien Fettsäuren* wurden titrimetrisch (mit Thymolblau als Indikator) bestimmt. Der *Triglyceridgehalt* wurde sowohl enzymatisch [3] als auch kolorimetrisch [1] gemessen. Der prozentuale Fettsäure- bzw. Triglyceridgehalt wurde auf Palmitinsäure bzw. Triolein bezogen.

2.3. Bei den *dünnschichtchromatographischen* Untersuchungen wurden Kieselgel G-Platten und Hexan/Äther/Essigsäure (90/10/1) als Fließmittel verwendet (Färbungen: Joddampf).

#### 2.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Trennbedingungen: Säule: Nucleosil® C-18, 7  $\mu\text{m}$  (Sonderanfertigung) Fa. Macherey-Nagel; Elutionsmittel: Acetonitril/Isopropanol (100:25) isokratisch, Flussgeschwindigkeit: 1,2 ml/min, Gerät: Perkin-Elmer Series 3, Detektor: UV, Wellenlänge: 215 nm (Perkin-Elmer, LC-85). Einspritzmenge: 70 bzw. 200  $\mu\text{g}$ .

2.5. *Gaschromatographie* Säule: CP-Sil 88, 50 m-lang. Quarzkapillare (Fa. Chrompack), Trägergas:  $\text{N}_2$ , Detektor: FID. Temperaturprogramm: 5 min  $170^\circ\text{C}$  isotherm, danach  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  Temperaturanstieg bis  $220^\circ\text{C}$ , danach isotherm. Einspritzsplitter und Detektorblock:  $300^\circ\text{C}$ . Splitter: 8 ml/min, bei 1,75 bar Kopfdruck. Die quantitative Auswertung erfolgte mit einem Spectra-Physics Integrator (Typ: SP 4270). Die Gesamtfläche wurde gleich 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der einzelnen Fettsäuremethylester ermittelt. Zur Herstellung der Methylester wurden 10–20 mg der Direktextrakte bzw. der DC-Fraktionen mit Bortrifluorid/Methanol-Reagenz (Fa. Merck, 14%, 0,5 ml) versetzt und auf  $60^\circ\text{C}$  (15 min) erwärmt. Dann wurden den Lösungen 0,5 ml Wasser zugemischt, 2mal mit 0,5 ml Hexan ausgeschüttelt und die

Hexan-Phase eingedampft. Der Rückstand wurde in 20–200  $\mu$ l Hexan aufgenommen und 1  $\mu$ l in den GC injiziert.

### 2.6. GC-MS

Mass/Varian Ch 7 A, Stoßionisation 70 eV bzw. chemische Ionisation (Methan) mit angekoppeltem Kapillar-GC (50 m/CP-SIL 88), Helium 1 bar, offene Koppelung, Emission 1 mA.

### 2.7. NMR

60 MHz  $^1$ H-NMR: EM-360 (Fa. Varian),  $\text{CDCl}_3$  als Lösungsmittel und Tetramethylsilan als interner Standard. 25,2 MHz  $^{13}$ C-NMR: XL-100 (Fa. Varian),  $\text{CDCl}_3$  als Lösungsmittel und Tetramethylsilan als interner Standard.

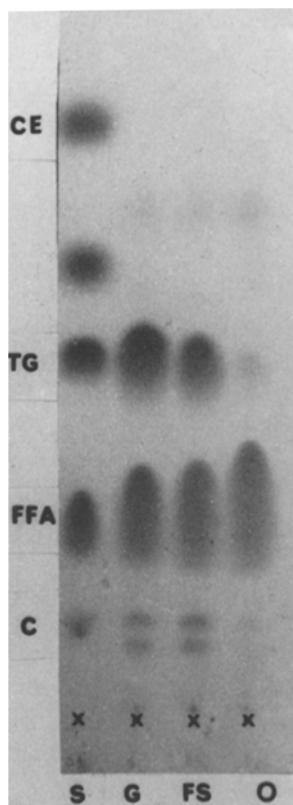
## 3. Ergebnisse

Zur Charakterisierung der Gewebeproben wurden die Chloroform/Methanol-Extrakte mit mehreren analytischen Methoden untersucht und die Extraktionsrückstände auf etwaiges Vorliegen von Fettsäuren geprüft. Die Rückstandsanalysen zeigten, daß in den untersuchten Gewebeproben keine Fettseifen vorgaben. So konnten nach Behandlung der Extraktionsrückstände mit Salzsäure weder mit Dünnschichtchromatographie noch mittels Gaschromatographie Fettsäuren nachgewiesen werden.

Nach DC (Abb. 2) und NMR-Spektroskopie (Tabelle 1) setzte sich der extrahierte Anteil der Unterhautproben aus Gemischen von freien Fettsäuren (FFS) und Triglyceriden (TG) zusammen. In den  $^1$ H-NMR-Spektren konnten die Fettsäuren am Signal bei ca. 11,0 ppm erkannt werden, während für die Triglyceride das bei 4,2 ppm erscheinende Multiplett der diastereotopen  $\text{OCH}_2$ -Protonen charakteristisch ist. Die  $^{13}$ C-NMR-Spektren der Extrakte erlaubten ebenfalls einen eindeutigen Nachweis der freien Fettsäuren und der Triglyceride anhand ihrer gut separierten Carbonyl-Signale und durch die Resonanzen des Glycerinteils der Triglyceride (Tabelle 1).

Die NMR-Spektren offenbarten ferner hohe Anteile ungesättigter Fettsäuren in freier und/oder veresterter Form. Mit Hilfe der  $^{13}$ C-NMR-Spektroskopie konnte neben der vorherrschenden Ölsäure (= CH: 129,8 und 129,5) auch Linolsäure (= CH: 130,0, 129,7, 128,0 und 127,8) nachgewiesen werden.

Obwohl mit der NMR-Spektroskopie prinzipiell auch eine Identifizierung von Glycerin, Mono- und Diglyceriden, Propan-1,3-diol-Fettsäureester und Hydroxystearinsäure in komplexen Lipid-Mischungen möglich ist, wurden keine Hinweise für das Vorliegen dieser Substanzen in den untersuchten Extrakten erhalten. Wie das DC-Chromatogramm (Abb. 2) und die NMR-Spektren zeigen, lagen die freien Fettsäuren und Triglyceride in sehr unterschiedlichen Proportionen vor. Quantitative Analysen wurden titrimetrisch und kolorimetrisch durchgeführt. Die ermittelten Prozentzahlen (Tabelle 2), die jeweils Mittelwerte aus Doppelbestimmungen darstellen, bestätigen den über-



**Abb. 2.** Dünnschichtchromatographische Zusammensetzung der Extrakte, geordnet nach Lipidklassen (Abkürzungen: S = Standard, G = Gesäß, FS = Fußsohle, O = Oberschenkel, C = Cholesterin, FFA = freie Fettsäurefraktion, TG = Triglyceride, CE = Cholesterinesterfraktion)

Gesamtlipid			
FFS	TG		
<sup>1</sup> H-NMR δ: 11,0 (CO <sub>2</sub> H)	δ: 4,2 (OCH <sub>2</sub> )		
<sup>13</sup> C-NMR δ: 180,0 (CO <sub>2</sub> H)	δ: 172,9; 172,5 (CO <sub>2</sub> R)		
	δ: 68,9 (OCH)		
	δ: 62,1 (OCH <sub>2</sub> )		

**Tabelle 1.** Charakteristische NMR-Signale der Gesamtlipide

	Gesamtlipid			%
	FFS	TG		
	Titrimetrisch	Enzymatisch	Kolorimetrisch	
„FS“	64	29,7	31,5	30,4
„G“	37,8	55,9	58	57
„O“	80,2	13,7	16	14,8
190/84	0,5	94,2	95,5	94,7
				95,2

**Tabelle 2.** Quantitative Verteilung der freien Fettsäure (FFS)- und Triglycerid-Fraktionen in den Leichenlipidextrakten

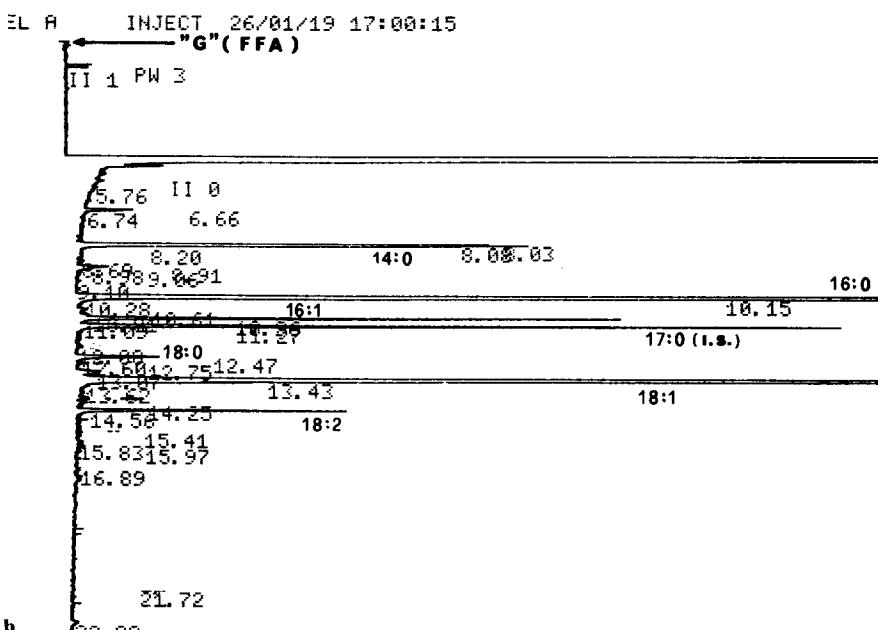
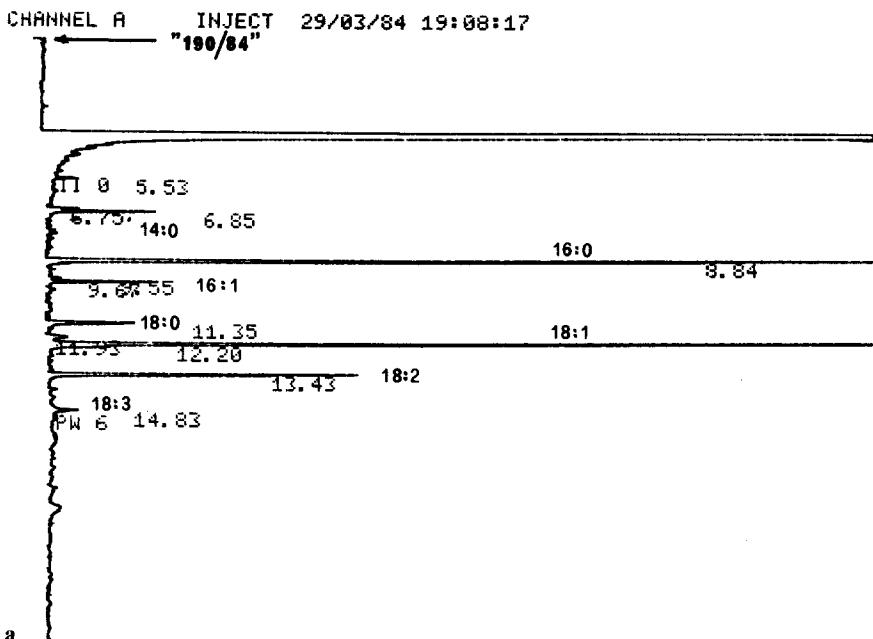
**Tabelle 3.** Auflösungsvermögen der kapillargaschromatischen Methode und Fettsäurezusammensetzung des menschlichen Unterhautfettgewebes

Fettsäuren	RRT (Standards)	190/84 „K“	Den Dooren (human Fett)	Hirsch (human Unterhautfett)
12:1	0,57	0,62	0,5	2
14:0	0,70	0,78	4,6	5,5
14:1 (trans $\Delta^9$ )	0,74	0,84	—	—
14:1 (cis $\Delta^9$ )	0,78	0,88	0,5	—
16:0	0,89	1,00	28,4	28,5
16:1 (cis $\Delta^9$ )	0,97	1,08	3,5	5,0
17:0	1,00	1,11	—	
18:0	1,12	1,25	3,3	3
18:1 (trans $\Delta^9$ )	1,19	1,33	—	7,5
18:1 (cis $\Delta^9$ )	1,22	1,36	50,2	55,5
18:2 (trans $\Delta^{9,12}$ )	1,24	1,39	—	48
18:2 (cis $\Delta^{9,12}$ )	1,30	1,45	9,3	46,7
20:0	1,35	1,50	—	0,5
18:3 (cis $\Delta^{6,9,12}$ )	1,38	1,55	—	1,5
18:3 (cis $\Delta^{9,12,15}$ )	1,42	1,59	0,3	
20:2 (cis $\Delta^{9,12}$ )	1,55	1,73		
22:0	1,61	1,80		
22:1 (cis $\Delta^{11}$ )	1,69	1,89		
20:3 (cis $\Delta^{8,11,14}$ )	1,69	1,89		
20:4 (cis $\Delta^{5,8,11,14}$ )	1,73	1,94		0,2
24:0	1,91	2,16		
24:1 (cis $\Delta^{15}$ )	2,04	2,28		
12—OH—18:0	2,56	2,85		
22:6 (cis $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ )	2,56	2,89		
Anderes			4	1,6
<i>Q</i>		0,57	0,71	0,81
				0,42

raschenden Befund, daß die hydrolytische Spaltung des Unterhautfettes von Oberschenkel („O“) und Gesäß („G“) sehr unterschiedlich war, während die der bedeckten Füße („FS“) dazwischen lag.

Mit Hilfe der Kapillar-Gaschromatographie konnten Informationen über die Verteilung der Fettsäuren sowohl in den Gesamtlipiden als auch in den FFS- und TG-Anteilen erhalten werden. Hierzu wurden die Lipidextrakte bzw. deren FFS- und TG-Fraktionen mit Bortrifluorid/Methanol in Fettsäuremethylester überführt, die durch Vergleich mit Standard-Mischungen (Tabelle 3) identifiziert und durch Integration quantitativ bestimmt wurden.

Das Fettsäremuster (Abb. 3a) des zugrundegelegten und als normal bezeichneten Unterhautfettgewebes (190/84) ist in Tabelle 3 den in der Literatur sehr reichlich aufzufindenden Werten [11, 4] gegenübergestellt. Wie ersichtlich, stimmen die Werte gut überein.



**Abb.3.** Fettsäurezusammensetzung der Triglyceridfraktion des normalen Unterhautfettgewebes (Probe „190/84“) und der freien Fettsäurefraktion des Gesäßes (Probe „G“) mittels Kapillar-Gaschromatographie

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchung der „Gesamt-Extrakte“ der Leichenproben „O“, „FS“ und „G“ und der durch DC-Trennung erhaltenen FFS- (vgl. Abb. 3b) und TG-Fraktionen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die ermittelten Werte bestätigen den aufgrund der NMR-Spektren vermuteten hohen Gehalt an Ölsäure in den untersuchten Fettpolen. Der bemerkenswert ähnlich hohe prozentuale Anteil der Ölsäure in den Extraktten und deren Fraktionen sowie das gleichzeitige Fehlen der Hydroxystearinsäure weisen auf eine sehr kurze Liegezeit der Wasserleiche hin [4, 6]. Durch Vergleich mit den Prozentzahlen der frischen Leiche 190/84 (Tabelle 3) lassen sich jedoch bereits deutlich die für eine Fettwachsbildung erwarteten Veränderungen erkennen. So ist das Verhältnis  $Q$  der gesättigten zu den ungesättigten Fettsäuren in allen drei Extraktten größer als in der frischen Leiche. Die unterschiedlichen  $Q$ -Werte für die Fettpolen der Wasserleiche deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Fettsäurezusammensetzung und dem Hydrolysegrad des Unterhautfettes hin: die stärker hydrolysierten Proben „O“ und „FS“ zeigen höhere  $Q$ -Werte als die Probe „G“. Auffallend ist ferner bei den Proben „G“ und „FS“, daß die  $Q$ -Werte der FFS-Fraktionen wesentlich größer sind als die der TG-Fraktionen.

Die gaschromatographischen Ergebnisse wurden mittels der GC-MS-Methode überprüft. Hierin bestätigte sich, daß außer den normalerweise in höheren Lebewesen vorhandenen keine anderen (ungeradzahligen, verzweigten, hydroxy-substituierten) Fettsäuren vorlagen.

Eine weitere für die Fettuntersuchungen sehr wichtige Analysenmethode, das HPLC-Verfahren, wurde bisher offenbar noch nicht zur Untersuchung der Fettwachsbildung eingesetzt. Da es sich insbesondere zur Untersuchung der Frühstadien der Fettwachsbildung, in denen noch hohe Anteile an nicht zerstörten Triglyceriden vorliegen, eignen sollte, wurden die drei Unterhautfett-Extrakte mit dieser Methode analysiert. Wie kürzliche Publikationen [10, 13, 14] zeigten, kann durch das HPLC-Verfahren mit „Umkehrphasen“ eine sehr gute Auf trennung der verschiedenen Triglyceride erzielt werden. Während zuvor die Trennbarkeit durch die Zahl der Kohlenstoffatome ( $n$ ) und Doppelbindungen ( $m$ ) der Fettsäuren entsprechend der Verteilungszahl  $c_w = n - 2m$  charakterisiert war, lassen sich mit der verbesserten Methodik auch Triglyceride mit gleichem  $c_w$ -Wert auf trennen. Die in dieser Arbeit erzielte Trennleistung geht aus dem Chromatogramm von Olivenöl (Abb. 4a) hervor. Entsprechend der Literatur [8] werden separate Peaks für die folgenden Triglyceride gleicher Verteilungszahl beobachtet, wobei jeweils die Triglyceride mit der größeren Doppelbindungszahl kleinere Retentionszeiten aufweisen:

$$c_w = 48 : \text{POP, POO, OOO}^1$$

$$c_w = 46 : \text{PLP, LPO, LOO}^1$$

$$c_w = 44 : \text{LPL, LOL}^1$$

Wie erwartet zeigt das Chromatogramm des menschlichen Depotfettes (Probe 190/84, Abb. 4b) insbesondere aufgrund des höheren Anteils der Palmitinsäure ein zu Olivenöl deutlich unterschiedliches Muster. Die Chromatogramme der

1 (P = Palmitinsäure, C<sub>16:0</sub>, ohne Doppelbindung; O = Ölsäure, C<sub>18:1</sub> und L = Linolsäure, C<sub>18:2</sub>, mit 1 bzw. 2 Doppelbindungen)

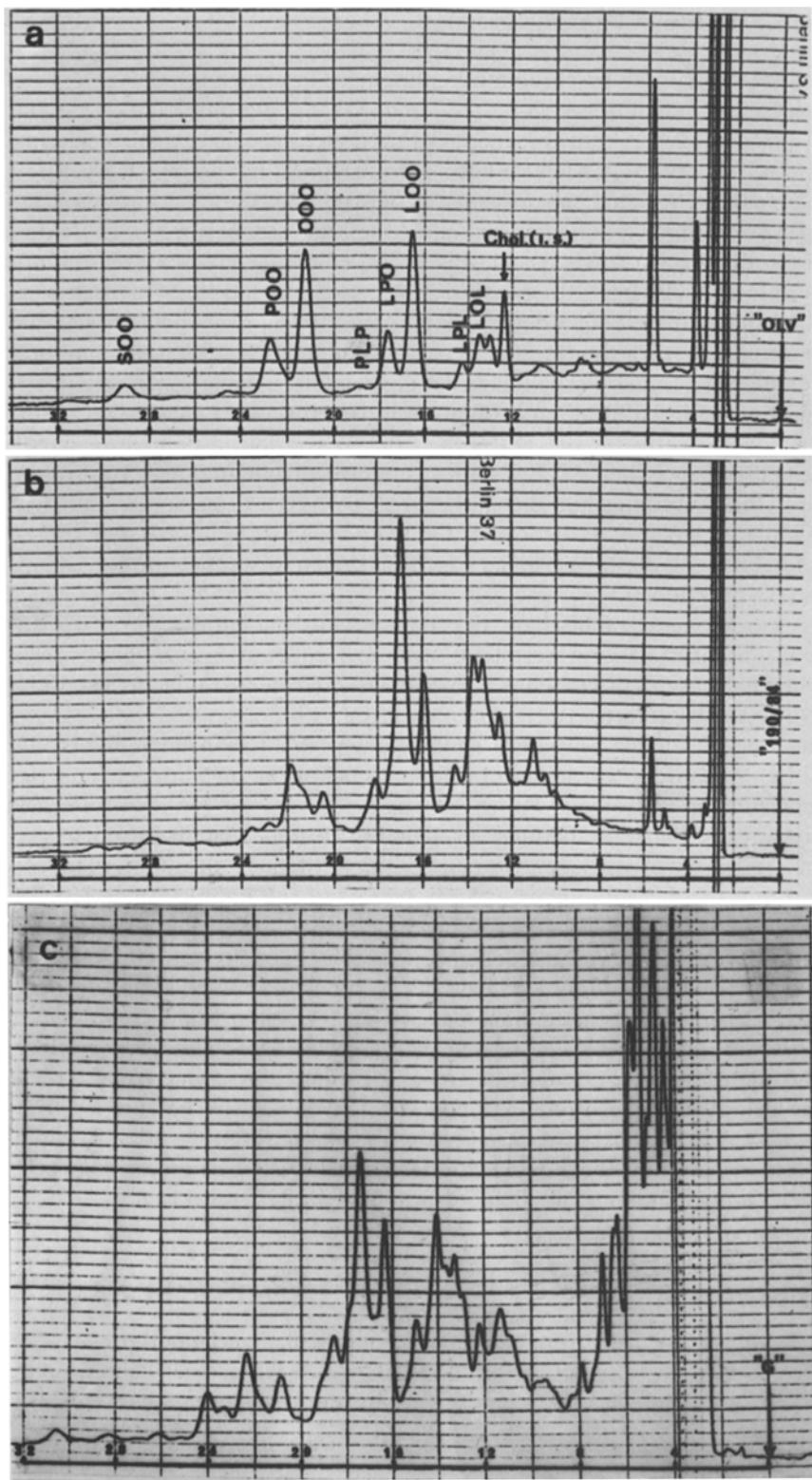


Abb. 4a-e.

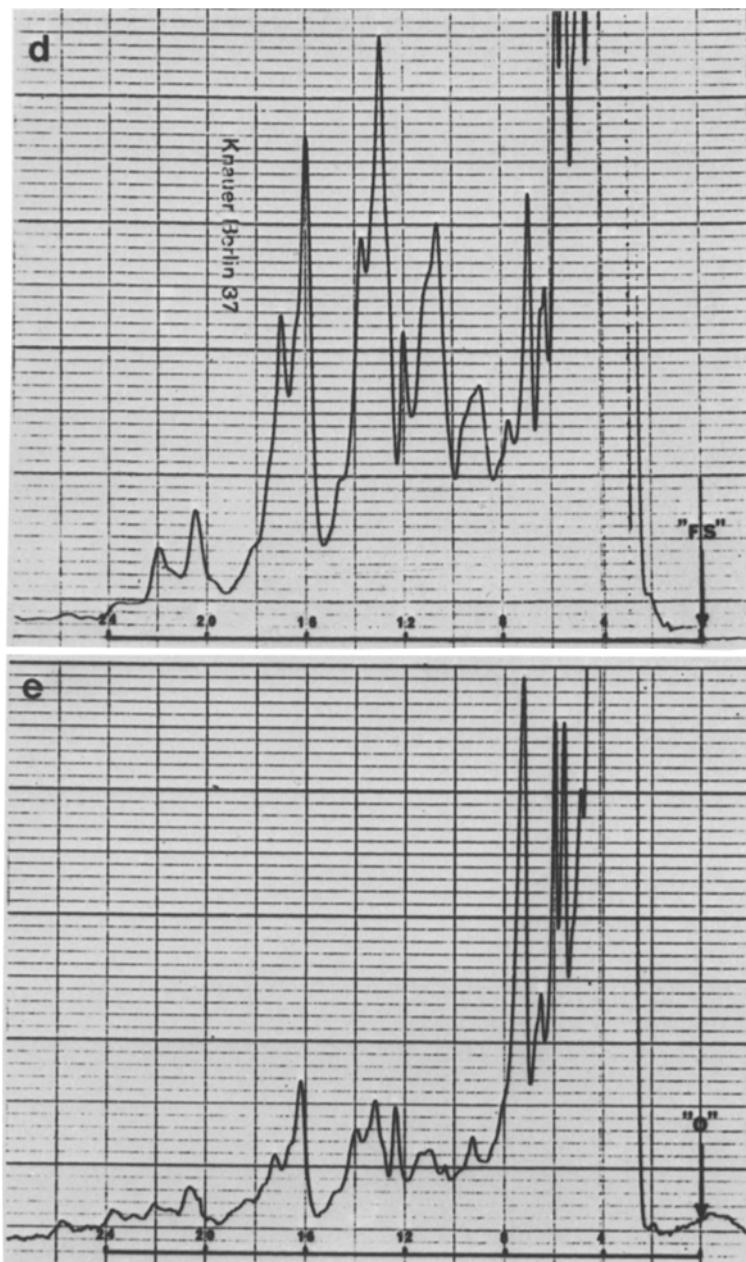


Abb. 4a–e. HPLC-Chromatogramme von a Olivenöl, b des Fettgewebes einer frischen Leiche und c, d, e der Fettextrakte der Wasserleiche

Tabelle 4. Gaschromatographisch ermittelte prozentuale Fettsäurezusammensetzung des Unterhautfettgewebes von Wasserleichen

Fettsäuren	„O“		„FS“		„G“		FFS-Fraktion	Gesamt-Extrakt	Gesamt-Extrakt	TG-Fraktion	FFS-Fraktion	Gesamt-Extrakt	FFS-Fraktion	TG-Fraktion
	Gesamt-Extrakt	FFS-Fraktion	TG-Fraktion	Gesamt-Extrakt	TG-Fraktion	Gesamt-Extrakt								
14:0	4,6	2,9	6	4,5	6,8	4,5	—	—	2,3	6,5	2	—	—	—
14:1	0,4	0,2	—	0,5	—	0,5	—	0,3	0,3	0,2	—	—	0,5	—
16:0	41,6	44	38	37,5	40	35	29	29	38	38	—	—	25	—
16:1	2,5	2	4,5	2	0,5	2	6,5	6,5	9	9	—	—	10	—
18:0	4	4	8	7	9,5	5,2	6	6	3,5	3,5	7	—	—	—
18:1	39,5	41	34	42	38	46,5	43	43	40	40	45	—	—	—
18:2	3,7	1,8	5	1,5	—	2	6,5	6,5	0,5	0,5	6	—	—	—
Sonstige	3,7	4,1	3,5	5	5,2	4,3	6,4	6,4	2,3	2,3	4,5	—	—	—
<i>Q</i>	1,09	1,13	1,19	1,06	1,46	0,87	—	—	0,66	0,96	0,55	—	—	—

*Q* = gesättigte Fettsäuren/ungesättigte Fettsäuren

Sonstige: 12:0, 18:1T, 18:3, 20:0, 20:4

drei Unterhautfett-Extrakte der Wasserleiche sind in Abb. 4c–e wiedergegeben. Abgesehen von der Anwesenheit der freien Fettsäuren (RT: 4–6 min) sind die Chromatogramme des Fettextraktes der frischen Leiche (Abb. 4b) und der Probe „G“ der Wasserleiche (Abb. 4c) sehr ähnlich. Dieser Befund spiegelt die Tatsache wider, daß die Fettsäurezusammensetzung des TG-Anteils von „G“ (Tabelle 4) nahezu identisch ist mit der von 190/84 (Tabelle 3). Die zu den Proben 190/84 und „G“ im Triglycerid-Bereich veränderten Peak-Muster der Chromatogramme der Extrakte „FS“ und „O“ scheinen eine Konsequenz der unterschiedlichen Fettsäureverteilungen zu sein, da bei der GC-Analyse (Tabelle 4) der stärker hydrolysierten Proben „FS“ und „O“ größere *Q*-Werte für die TG-Fraktionen ermittelt wurden.

#### 4. Diskussion

Die mesenterialen, epicardialen und subcutanen Fette bestehen fast ausschließlich (95–98%) aus Triglyceriden und können daher, abgesehen von den unterschiedlichen Fettsäureestern, als chemisch einheitlich angesehen werden. Der postmortale autolytische und/oder durch Bakterien verursachte heterolytische Abbau von Lipiden ist schon lange bekannt [5, 6] und besteht darin, daß die Fettsäuren aus den Triglyceriden des Fettgewebes freigesetzt werden. Unter normalen Lebensbedingungen sind die Positionen 1 und 3 ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ) des Glyceridgerüstes die bevorzugten Stellen der enzymatischen Hydrolyse [12]. Postmortal können durch vermutlich bakterielle Einwirkungen auch 1,3-Propandiol-Fettsäureester als Abbauprodukte entstehen [7]. In unserem Fall konnten solche Propandioldiester weder mit NMR- noch mit HPLC-Messungen nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Unterhautfettgewebeproben wiesen sehr unterschiedliche Hydrolysegrade auf, wobei neben den Triglyceriden jeweils nur die freien Fettsäuren aufgefunden wurden. Aus der Abwesenheit der intermediären Spaltprodukte (Di- und Monoglyceride) könnte man folgern, daß diese rascher weiter abgebaut werden als die Triglyceride. Da jedoch ebenso das zweite Endprodukt der Hydrolyse, nämlich Glycerin, nicht nachgewiesen werden konnte, besteht auch die Möglichkeit, daß die intermediären Spaltprodukte zusammen mit Glycerin während der Hydrolyse abfließen oder ausgespült werden. Die letztere Alternative steht in Beziehung zu einer der Theorien der Fettwachsbildung, die weiter unten diskutiert werden.

Anhand der relativ geringen Fettspaltungsgrade läßt sich eine sehr kurze Liegezeit der Wasserleiche ableiten, da normalerweise die Triglyceridhydrolyse schon nach wenigen Monaten zu mehr als  $\frac{1}{2}$  abgeschlossen ist [5]. Die hier beobachteten sehr unterschiedlichen Triglycerid/Fettsäure-Zusammensetzungen der drei Proben zeigen, daß eine genaue Altersbestimmung mittels des Hydrolysegrades der Triglyceride nicht möglich ist. Bemerkenswerterweise wurde für die Unterhautprobe „FS“ ein zwischen den anderen zwei Proben liegender Hydrolysegrad ermittelt, obwohl die Haut der Fußsohlen aufgrund der Bedeckung mit Socken makroskopisch unverändert war.

Für die Altersbestimmung [5, 6] und für die Untersuchung des Mechanismus der Fettwachsbildung sind die typischen Verschiebungen der Fettsäurezusammensetzung während der Zersetzung des Unterhautfettgewebes von besonderem Interesse. Die Entstehung des ausgeprägten Fettwachs ist immer mit einer Verminderung des Anteils der flüssigen Ölsäure zugunsten der festen Palmitinsäure verbunden. Das Verhältnis  $Q$  der gesättigten zu den ungesättigten Fettsäuren kann sich bei der Fettwachsbildung gegenüber dem normalen Wert ( $Q < 1$ ) je nach der Liegezeit der Leiche erheblich erhöhen ( $Q = 2-20$ ). Solche Fettsäurezusammensetzungen wurden nicht nur bei Fettwachsanalysen [4, 5, 6], sondern auch bei bakteriellem Fettabbau *in vitro* [4] festgestellt. Die gleichzeitige Anwesenheit von Hydroxystearinsäure scheint dafür zu sprechen, daß durch bakteriellen Einfluß Fettsäureumwandlungen stattfinden, wobei als Hauptprozeß die Ölsäure durch  $\beta$ -Oxidation, Abspaltung von Essigsäure und Hydrierung in die Palmitinsäure übergeführt werden soll [4]. Alternativ zu diesem Fettsäureumwandlungsmechanismus könnte der Fettsäurewanderungsmechanismus [5] eine Rolle spielen, nach dem die flüssigen Spaltprodukte Glycerin und Ölsäure während der Zersetzung des Fettgewebes abfließen oder ausgespült werden.

Da im vorliegenden Fall am unbedeckten Hautgewebe der Wasserleiche (Proben „G“ und „O“) eine fettwachsartige Konsistenz festgestellt wurde, die Liegezeit der Leiche jedoch aufgrund der unvollständigen Fetthydrolyse offensichtlich relativ kurz war, stellte sich die Frage, ob die vermutete Fettwachsbildung durch den Nachweis einer Verschiebung der Fettsäurezusammensetzung bestätigt werden könnte. Unsere Fettsäureanalysen mit Hilfe der Kapillar-Gaschromatographie zeigten unterschiedliche, doch relativ geringe Abweichungen von der Fettsäurezusammensetzung des normalen menschlichen Depotfettes (Probe 190/84). Die Richtung der Abweichungen, nämlich Verminderung des Ölsäuregehalts und Erhöhung des Palmitinsäuregehalts ist im Einklang mit einer beginnenden Fettwachsbildung. Überraschenderweise zeigte aber nicht, wie aufgrund der Obduktion erwartet, die Probe „FS“ die kleinste Fettsäureverschiebung, sondern die am wenigsten hydrolysierte Probe „G“. Die Fettsäureverschiebung scheint nach den GC-Befunden in den Fraktionen der freien Fettsäuren größer zu sein als in den Triglyceridfraktionen. Daß auch bei den Triglyceridanteilen der Proben „FS“ und „O“ Verschiebungen der Fettsäurezusammensetzung vorliegen, konnte mittels der HPLC-Methode bestätigt werden. Während die weniger hydrolysierte Probe „G“ im Triglyceridbereich ein ähnliches Peakmuster zeigte wie Probe 190/84 der frischen Leiche, waren die Peak-Intensitäten bei den stärker hydrolysierten Proben „FS“ und „O“ deutlich verändert.

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, den postmortalen Lipidabbau des Unterhautfettgewebes, der äußerlich sehr unterschiedliche Erscheinungsformen zeigen kann, genauer zu untersuchen. In unserem Fall weisen die Ergebnisse darauf hin, daß der Spaltungsprozeß der Lipide unabhängig von dem Schädigungsgrad der Haut (Abb. 1a, b) ist. Man muß davon ausgehen, daß die auch von erfahrenen Obduzenten erhobenen Befunde zwar das wesentliche, aber nicht das alleinige Kriterium für eine Fettwachsbildung sein können. Die Vermutung des Vorliegens von Vorstufen der Fettwachs-

bildung sollte in jedem Fall durch chemische Feinstrukturanalyse des Lipidgewebes überprüft werden.

## Literatur

1. Bauer FC, Hirsch EF (1949) A new method for the colorimetric determination of the esterified fatty acids in human sera. *Arch Biochem* 20:242-250
2. Berg S (1975) Leichenzersetzung und Leichenzerstörung. In: Mueller B (ed) *Ger. Medizin*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 62-103
3. Bucolo G, David H (1973) Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 476-482
4. Den Dooren de Jong LE (1961) On the formation of adipocere from fats. *Antonie van Leeuwenhoek, J of Microbiol and Serology* 27:337-361
5. Döring G (1973) Die chemischen Altersveränderungen des Leichenlipids. *Med Diss* Göttingen
6. Döring G (1975) Postmortaler Lipidstoffwechsel. *Beitr zur Ger Med* 33:76-84
7. Döring G, Lackner H, Mieskes G, Vogel R (1976) Propandiol-(1,3)-Fettsäureester als Metaboliten der postmortalen Fettpaltung. *Z Rechtsmed* 78:285-296
8. El-Hamdy AH, Perkins EG (1981) High performance reversed phase chromatography of natural triglyceride mixtures. *J of Am Oil Chem Soc* 58:867-872
9. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GM (1957) Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509
10. Herslöf B, Podlaha O, Töregard B (1979) HPLC of triglycerides. *J of Am Oil Chem Soc* 56:864-866
11. Hirsch J (1965) Fatty acid patterns in human adipose tissue. In: Renold A, Cahill GF Jr (eds) *Handbook of physiology*. Am Physiological Soc, Washington DC, pp 181-190
12. Jeanrenaud B (1965) Lipid components of adipose tissue. In: Renold A, Cahill GF Jr (eds) *Handbook of physiology*. Am Physiological Soc, Washington DC, pp 169-176
13. Plattner RD, Spencer GF, Kleiman R (1977) Triglyceride separation by reverse phase high performance liquid chromatography. *J of Am Oil Chem Soc* 54:511-515
14. Schulte E (1981) Trennungsgrad von Triglyceriden nach Kettenlänge und Sättigungsgrad durch HPLC. *Fette Seifen Anstrichmittel* 83:289-291

Eingegangen am 17. Dezember 1984