

4 LIPIDE

4.1 Bestimmung von D-3-Hydroxybutyrat im Rinderblut (vom Schlachthof)

D-3-Hydroxybutyrat (β -Hydroxybutyrat) wird neben Acetoacetat und Aceton - chemisch nicht korrekt - zu den Ketonkörpern gerechnet. Eine pathologisch gesteigerte Ketonkörper-Produktion (Ketogenese) ist bei Hochleistungsmilchkühen eine der wichtigsten und häufigsten Stoffwechselkrankheiten. Sie wird als Ketose oder Acetonämie bezeichnet.

Normalwerte beim Rind: 0,2 – 0,5 mmol/L Blut

Subklinische Ketose: $\geq 1,5$ mmol/L Blut

Werte bei klinisch manifester Ketose: $\geq 2,6$ mmol/L Blut

A. Schnellbestimmung von β -Keton (D-3-Hydroxybutyrat) im Blut

Versuchsprinzip:

Schnelltestverfahren mittels Keton-Teststreifen und Schnellmessgerät (Precision Xceed Fa. Abbott).

Versuchsdurchführung (s. auch Gerätebeschreibung):

Achtung: Vor der Messung erfolgt die Kalibrierung des Messgeräts durch einen speziellen Kalibrationsstreifen (Chargennummer beachten)!

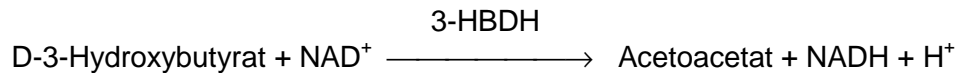
Vorgelegt wird ein Tropfen Rinder-Vollblut (Schlachthofmaterial, gerinnungsgehemmt)

- Entnahme des β -Keton-Teststreifens aus der Verpackung
- Einstecken des Streifens in das Gerät (schwarze Linien nach oben), Gerät schaltet sich ein
- Wenn das Symbol zum Probenauftrag erscheint, kann Blut auf das weiße Ende des Teststreifens appliziert werden
- Messvorgang beginnt automatisch, der Streifen wird nach dem Signalton aus dem Blut gezogen (Countdown-Anzeige zeigt Dauer des Messvorgangs an)
- Nach Ende des Messvorgangs (Signal, Wertanzeige) wird der Wert abgelesen und notiert

B. Enzymatische Bestimmung von D-3-Hydroxybutyrat im Blut (Testbesteck Roche)

Versuchsprinzip:

D-3-Hydroxybutyrat wird in der durch die 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3-HBDH) katalysierten Reaktion durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD⁺) zu Acetoacetat oxidiert. Dabei wird NAD⁺ zu NADH reduziert:



Die gebildete Menge an NADH ist der D-3-Hydroxybutyratkonzentration äquivalent. NADH ist die Messgröße. Die Extinktion von NADH wird bei einer Wellenlänge von 334 nm im Fotometer gemessen.

Versuchsdurchführung:

Lösungen:

Probe enteiweisstes Blut (aus Schlachthofmaterial), mit Carbonatpuffer auf pH 9,5 eingestellt

Lösung 1 NAD⁺ (25 mmol/L)

Lösung 2 3-HBDH (5 mg/mL)

Zentrifugenglas Nr.	Leerwert	1	2	3
Probe	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Lösung 1	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Lösung 2	—	0,01 mL	0,01 mL	0,01 mL
mischen, 30 Minuten ins 37°C-Wasserbad stellen, sofort gegen Leerwert messen				

Berechnung:

Die D-3-Hydroxybutyratkonzentration (c) im Blut wird mittels dem Lambert-Beer'schem Gesetz berechnet:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

ε: molarer Extinktionskoeffizient, ε₃₃₄ für NADH = 6,18 L • mmol⁻¹ • cm⁻¹ bzw.
6,18 mL • μmol⁻¹ • cm⁻¹

d: Schichtdicke in cm

E: Extinktion

4.2 Enzymatische Spaltung von Triacylglycerinen durch Pankreaslipase

Die Pankreaslipase zeichnet sich durch ihre Stellungsspezifität aus. Von ihrem Substrat, den Triacylglycerinen der Nahrung, spaltet sie endständige Fettsäuren ab. Wenn Pankreaslipase längere Zeit auf die Triacylglycerine der Nahrung einwirkt, entstehen vorwiegend Freie Fettsäuren und 2-Monoacylglycerine.

Versuchsprinzip:

Eine Ölemulsion (Triacylglycerin) wird in Gegenwart von Galle mit Pankreaslipase inkubiert. Nach der Inkubation werden die Lipide extrahiert und mit Hilfe von Referenzsubstanzen dünnschichtchromatographisch identifiziert.

Versuchsdurchführung:

In ein 25 mL Zentrifugenglas werden pipettiert:

Lipase-Suspension	1,0 mL
Ammoniumchloridpuffer (pH 8,0; 0,05 mol/L)	2,0 mL
CaCl ₂ (0,1 mol/L)	2,0 mL
Natriumtaurocholat (10%)	0,4 mL
Olivenölemulsion	0,4 mL

Das Zentrifugenglas wird mit einem Stopfen verschlossen, der Inhalt gut durchmischt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden 2 mL H₂SO₄ (0,5 mol/L) und 4 mL Chloroform (CHCl₃) aus der Dispensette dazugegeben und 2 Minuten geschüttelt. Anschließend wird 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen/min (Upm) zentrifugiert. Die überstehende wässrige Phase wird mit einer Pasteurpipette unter Vakuum vorsichtig abgesaugt. Die Chloroformphase (Fettextrakt) wird in ein sauberes Zentrifugenglas filtriert und dünnschichtchromatographisch untersucht.

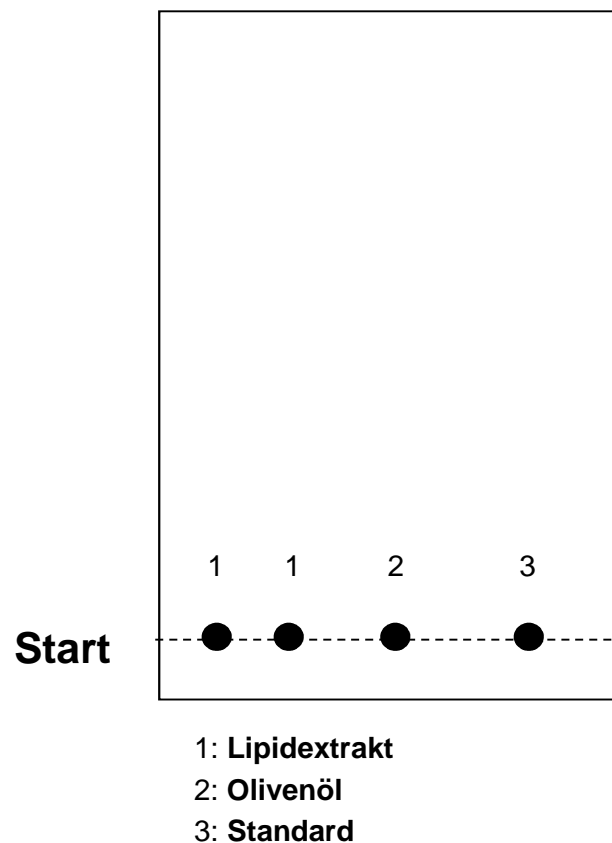
Dünnschichtchromatographie:

Auf die mit Kieselgel beschichteten Folien werden 2 cm vom unteren Rand entfernt nebeneinander zwei einzelne Tropfen des Lipidextraktes aufgetragen. Als Vergleichssubstanz werden je ein Tropfen einer etherischen Olivenöllösung und eines Standards aufgetragen. Die Platten werden 45 Minuten lang in dem folgenden Fließmittel

Petrolether : Diethylether : Eisessig= 80 : 20 : 1 (v/v/v) entwickelt.

Zur Sichtbarmachung der Lipidflecken werden die Platten 15 Minuten in eine mit Joddämpfen gesättigte Chromatographiekammer gestellt.

Abbildung 1: Auftragsschema bei Dünnschichtchromatographie



4.3 Bestimmung der Peroxidzahl eines Fettes

Die Peroxidzahl (POZ) gibt die Anzahl mg peroxidisch gebundenen Sauerstoffs an, die in einem kg Fett enthalten ist. Sie ist ein Maß für die Verderbenheit von Nahrungsfetten mit ungesättigten Fettsäure-Resten. Die Bildung des Fettsäure-Hydroperoxids erfolgt durch eine Radikalketten-Reaktion.

Versuchsprinzip:

Lipidperoxide oxidieren Jodidionen zu elementarem Jod. Die Konzentration des entstandenen Jods wird titrimetrisch mit Natriumthiosulfat bestimmt.

Versuchsdurchführung (Reihenfolge unbedingt einhalten):

- (1) 50 mL H₂O_{dest.} werden in einen Messzylinder gefüllt.
- (2) Dazu gibt man ca. 1 mL Stärkelösung als Indikator.
- (3) In einen Jodzählkolben wird 1 mL Fettstammlösung (enthält 0,2 g Fett pro mL Chloroform) mit einer 1 mL-Vollpipette pipettiert. Dazu gibt man ca. 25 mL Chloroform/Eisessig (1/1), die man mit einem Messzylinder abmisst.
- (4) Anschließend wird die Bürette mit 0,002 mol/L Natriumthiosulfat aufgefüllt und der Meniskus auf null eingestellt.
- (5) In den Jodzählkolben pipettiert man 0,6 mL einer 50% Kaliumjodidlösung, verschließt den Kolben sofort, startet die Stoppuhr und schüttelt den Kolben kräftig exakt 1 Minute lang.
- (6) Dann gießt man das abgemessene Wasser mit der Stärkelösung in den Jodzählkolben und titriert unverzüglich ohne Unterbrechung und unter kräftigem Schütteln bis zur Farblosigkeit.

Berechnung:

$$POZ = \frac{a \cdot c \cdot 1000 \cdot 16}{E}$$

a = verbrauchte mL Natriumthiosulfatlösung

c = Konzentration der Natriumthiosulfatlösung

E = Einwaage in g