

# Die quantitative Bestimmung ausgewählter langkettiger Fettsäuren und sehr langkettiger Fettsäuren (VLCFA) im Serum

The Quantitative Determination of Selected Long Chain and Very Long Chain Fatty Acids (VLCFA) in Serum

Sibylle Streck<sup>1</sup>, K. Winnefeld<sup>1</sup>, Iris Maurer<sup>2</sup>, H.-P. Volz<sup>2</sup>

**Zusammenfassung:** Es wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung langkettiger und sehr langkettiger Fettsäuren im Serum von 22 Blutspendern mit Hilfe der Gaschromatografie mit massenspektrometrischer Detektion beschrieben. Die Präzision über die Zeit beträgt 2,5-8,6%; die Wiederfindungsrate 89-120%. Die Daten werden mit denen der Literatur diskutiert.

**Schlüsselwörter:** Langkettige Fettsäuren; sehr langkettige Fettsäuren; Serum; Präzision; Wiederfindung; Gaschromatografie-Massenspektrometrie.

**Summary:** The paper describes a method for the quantitative determination of long chain and very long chain fatty acids in serum of 22 blood donors with gas chromatography / mass spectrometry.

The day-to-day precision was 2.5-8.6%; the recovery rate 89-120%. The results are discussed with results in the literature.

**Keywords:** Long chain fatty acids; very long chain fatty acids; serum, precision; recovery rate; gas chromatography-mass spectrometry.

Die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren zu Acetyl-CoA erfolgt sowohl in den Peroxisomen als auch in den Mitochondrien der Zellen [1]. Eine Ausnahme bildet hierbei lediglich der Abbau der überlangkettigen Fettsäuren (VLCFA, very long chain fatty acids,  $\geq C_{22}$ ), die ausschließlich in den Peroxisomen oxidiert werden. Sowohl Erkrankungen, die mit einer Störung der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation einhergehen als auch Erkrankungen, die auf einer Störung der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation beruhen, führen somit zu Veränderungen in der Verteilung der Fettsäuren. Ist eine direk-

te Bestimmung des defekten Enzyms (noch) nicht möglich, kann anhand der Bestimmung des Verhältnisses der Fettsäuren untereinander auf den defekten Stoffwechselweg geschlossen werden. So ist beispielsweise auch für die Diagnosestellung der bereits am längsten bekannten und häufigsten peroxisomalen Erkrankung, der Adrenoleukodystrophie (ALD), die Bestimmung der Fettsäuren weiterhin erforderlich [2, 3, 4, 5, 6].

Bei der ALD kommt es aufgrund einer vorwiegend X-chromosomal vererbten Störung in den Peroxisomen zu einer Akkumulation der VLCFA, die u. a. in der weißen Substanz des Gehirngewebes abgelagert werden und zu einer Demyelinisierung führen. Aufgrund einer großen phänotypischen Variabilität, deren Ursache weiterhin unklar ist, kann die Erkrankung nach schwerem Verlauf entweder bereits im frühen Kindesalter zum Tod führen oder - auch bei Mitgliedern derselben Familie - nur geringe Beeinträchtigungen verursachen. Bei ca. einem Viertel der Fälle wird eine nur langsam progrediente Verlaufsform, die sog. Adrenoleukoneuropathie (AMN) beobachtet, die das Gehirn nicht oder nur in sehr geringem Maße betrifft. Die Diagnosestellung dieser Erkrankung erfolgt ausschließlich über den Nachweis erhöhter VLCFA, insbesondere  $C_{26:0}$  und der Bestimmung des Verhältnisses  $C_{26:0} / C_{22:0}$ . Hierbei ist es möglich, anhand der Bestimmungen neben den betroffenen hemizygoten Patienten auch heterozygote Merkmalsträger zu identifizieren und auf diese Weise eine genetische Beratung zu ermöglichen.

Die Bestimmung der Fettsäuren wird auch für die Diagnosestellung anderer peroxisomaler Erkrankungen bzw. zu deren Ausschluß herangezogen. Daraüber hinaus konnten in den vergangenen Jahren neben den etablierten peroxisomalen Störungen aber auch weitere Erkrankungen mit Defekten in der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation identifiziert werden, so daß die Bestimmung des Musters der Fettsäuren auch in diesem Bereich eine zusätzliche Bedeutung erhalten hat. Neben den bislang bekannten Störungen als Ursache definierter Erkrankungen werden zudem Störungen des Fettsäuremetabolismus auch bei einer cerebralen Ischämie, bei Anfällen und bei der Entwicklung eines Gehirnödems beobachtet. Besonderes Interesse galt in

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Klaus Winnefeld, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Postfach, D-07740 Jena, Tel. 03641-933127, Fax 03641-934029

<sup>1</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, <sup>2</sup>Klinik für Psychiatrie, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, D-07740 Jena, Fax 03641-934029, Tel. 03641-933127  
Eingegangen: 27. März 2000/Angenommen: 18. Juli 2000

**Tabelle 1** Untersuchte langketige und sehr langketige Fettsäuren, deren Massen und Retentionszeiten (RT)-

Fettsäure		Massen	RT in min
C <sub>16:0</sub>	Palmitinsäure	87	26,29
C <sub>16:1</sub>	Palmitoleinsäure	69	25,48
C <sub>18:0</sub>	Stearinsäure	87	33,89
C <sub>18:1</sub>	Ölsäure	67	33,34
C <sub>18:2</sub>	Linolsäure	67	33,20
C <sub>20:0</sub>	Arachidinsäure	87	36,70
C <sub>20:4</sub>	Arachidonsäure	79	36,04
C <sub>22:0</sub>	Behensäure	87	38,31
C <sub>22:6</sub>	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexansäure	79	37,91
C <sub>24:0</sub>	Lignocerinsäure	87	39,67
C <sub>26:0</sub>	Hexacosansäure	87	41,34

den vergangenen Jahren auch einer möglicherweise pathogenetischen Bedeutung von Veränderungen des Lipidstoffwechsels bei der Schizophrenie [7]. Voraussetzung für die Erforschung der möglichen pathogenetischen Zusammenhänge dieser Erkrankungen ist jedoch die *in vitro* durchführbare Bestimmung der einzelnen Fettsäuren in einem leicht zugänglichen Material und mit nur geringen Probenmengen.

Aus diesem Grund wurde eine Methode modifiziert, um bestimmte lang- und sehr langketige Fettsäuren (C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub>) im Serum quantitativ mit Hilfe der GC/MS zu bestimmen.

## Material und Methode

Die langketigen Fettsäuren werden durch ein Gemisch aus Acetylchlorid und Methanol verestert. Die so gebildeten Fettsäuremethylester lassen sich mit n-Hexan extrahieren und mittels Gaschromatografie quantitativ bestimmen. Mit einem massenselektiven Empfänger ist die Bestimmung von kleinsten Spuren der Fettsäuremethylester möglich.

Zur Probenaufbereitung wurden Methanol und n-Hexan von der Firma Merck (Darmstadt) eingesetzt. Die zur Kalibrierung benötigten Fettsäuren und das Acetylchlorid waren Produkte der Firma Sigma (Deisenhofen). Die quantitative Analyse erfolgte mit dem HP 6890 GC/MS-System mit MSD von Hewlett Packard (Waldbronn).

### Probenvorbereitung

200 µl Serum oder Mischstandard und 200 µl interner Standard (C<sub>19:0</sub>) werden in ein Kulturröhrchen pipettiert und 5 ml Methanol zugegeben. Das Gemisch wird gut geschüttelt und anschließend im Eiswasser gekühlt, da die Zugabe von 200 µl Acetylchlorid mit heftiger Wärmeentwicklung (ungekühlt kommt es zum Siedeverzug) verbunden ist. Das Kulturröhrchen verschließt man fest und erhitzt es in einem Heizblock auf 80°C. Diese Temperatur beläßt man 90 min. Die Pro-

ben werden dann im Eisbad abgekühlt und 1 ml 12%ige Natriumcarbonatlösung zugegeben. Die Methylester lassen sich nach Zugabe von 1 ml n-Hexan und 2 min Schütteln in die obere Phase überführen. 1 µl dieser Phase wird auf die Säule gegeben und durch GC/MS analysiert.

### Kalibrierung

4 Mischstandards, in denen die zu untersuchenden 11 langketigen Fettsäuren (siehe Tabelle 1) in abgestuften Konzentrationen enthalten waren, dienen zur Kalibrierung. Die Mischstandards werden wie die Proben verestert und anschließend durch GC/MSD vermessen. Die Kalibrationskurven sind für alle untersuchten Fettsäuren linear. Zur Kontrolle des Probenansatzes wird täglich einer der Standards mitgeführt.

### Messung am GC/MS

Da mit dem Massenspektrometer Ultraspuren untersucht werden, ist eine entsprechende Säule mit geringem „Säulenbluten“ erforderlich. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine ZB-5-Säule (5% Phenyl-Polysiloxan) der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) verwendet. Der Säulenofen wird in 5 Temperaturstufen von 80°C auf 325°C geheizt, um eine ausreichende Trennung der einzelnen Fettsäuren zu erzielen. Ölsäure und Linolsäure lassen sich nur schwer zeitlich von einander trennen. Die Datenerfassung erfolgt anhand nur eines für die jeweilige Fettsäure ausgewählten Ions mit der in Tabelle 1 angegebenen Masse. Durch diesen Single Ion Modus reicht die Empfindlichkeit der Methode sogar zur sicheren Bestimmung der im Serum nur in sehr niedriger Konzentration vorhandenen Hexacosansäure aus.

Die Konzentrationsunterschiede der untersuchten Fettsäuren betragen bis zu 4 Größenordnungen. Durch Optimierung des Säulenofenprogrammes, Auswahl eines geeigneten Massenpeaks für jede Fettsäure und zeitliche Änderung der Multiplierspannung gelingt es, alle 11 Fettsäuren in einem Analysenlauf quantitativ zu

**Tabelle 2** Reproduzierbarkeit über die Zeit und Wiederfindung lang- und sehr langkettiger Fettsäuren

	C <sub>16:1</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>22:6</sub>	C <sub>22:0</sub>	C <sub>24:0</sub>	C <sub>26:0</sub>
Mittelwert $\mu\text{mol/l}$	311	2748	2312	2307	679,5	474,8	16,6	165,1	35,5	27,6	0,21
SD $\mu\text{mol/l}$	13,17	68,6	92,3	98	17,1	19,5	1,05	13,5	2,3	1,6	0,02
RSD %	4,2	2,5	3	4,3	2,5	4,1	6,3	8,2	6,5	5,9	8,6
Wiederfindung [%]	98-100	99-101	98	96-98	98-106	99-107	89-118	106-120	101-103	101-102	89-105

**Tabelle 3** Konzentrationen lang- und sehr langkettiger Fettsäuren im Serum von 22 Blutspendern

	C <sub>16:1</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>22:6</sub>	C <sub>22:0</sub>	C <sub>24:0</sub>	C <sub>26:0</sub>
Mittelwert [ $\mu\text{mol/l}$ ]	247	2492	2566	1945	650	605,7	13,8	190	30,75	25,82	0,24
SD [ $\mu\text{mol/l}$ ]	105	636	481	375,5	114,4	198,4	3,57	88	8,97	7,4	0,007
RSD [%]	42,5	25,5	18,7	19,3	17,6	32,8	25,8	46,3	29,2	28,6	29,46
Min [ $\mu\text{mol/l}$ ]	131,1	1184	1717	1241	493,2	340,3	9,3	69,4	19,3	15,4	0,15
Max [ $\mu\text{mol/l}$ ]	526,1	4161	3817	2777	916,4	1051	23,8	400	51,5	42,2	0,39

**Tabelle 4** Normalbereiche sehr langkettiger Fettsäuren (Angaben in  $\mu\text{mol/l}$ ) und deren Quotienten untereinander; Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturangaben

Quelle	Material (n)	C <sub>22:0</sub>	C <sub>24:0</sub>	C <sub>26:0</sub>	C <sub>24:0</sub> /C <sub>22:0</sub>	C <sub>26:0</sub> /C <sub>22:0</sub>
Vallance et al. [8]	Serum (33)			0,428 0,144-0,712	0,673 0,541-0,805	0,012 0,004-0,02
Moser et al. [9]	Plasma			0,803 0,438-1,169	0,84 0,68-0,98	0,010 0,00-0,02
Garside et al. [2]				0,83±0,46	0,84±0,08	0,013±0,009
Caruso [10]	Plasma weibl. (9) männl. (11)	19,9-39,3 18,1-42,7	13,1-35,1, 13,6-28,5	0,21-0,52 0,22-0,43	0,66-0,89 0,54-0,97	0,008-0,13 0,008-0,017
Tan et al. [3]		< 96,3	< 91,4	< 1,3	< 1,39	< 0,023
eigene	Serum (22)	30,75 19,3-51,5	25,82 15,4-42,2	0,24 0,15-0,39	0,84 0,66-0,94	0,008 0,005-0,012

bestimmen. Wichtig dabei ist, daß sowohl Kalibration als auch Konzentrationsbestimmung in den Serumproben unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Die Analysenzeit für eine Probe beträgt 43,13 min. Zu Kalibrierstandards und Serumproben wird immer die gleiche Menge eines internen Standards zugegeben, damit Abweichungen bei der Probenvorbereitung bzw. der Injektion von 1  $\mu\text{l}$  Probe kalkuliert werden können.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 und 3 zusammengefaßt. Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit für die Bestimmung der langkettigen Fettsäuren kam ein Poolserum zum Einsatz. An fünf verschiedenen Tagen wurden die Konzentration der VLCFA und der LCFA in diesem Serum ermittelt und der Mittelwert sowie Standardabweichung und relative

Standardabweichung (2,5 bis 8,6%) berechnet. Die Wiederfindung erfolgte durch Zugabe bekannter Konzentrationen der langkettigen Fettsäuren zum Serum. Diese liegt im Bereich von 89 bis 120% (Tabelle 2).

In Seren von 22 Blutspendern (anonym - Alter und Geschlecht nicht bekannt) wurden die langkettigen Fettsäuren analysiert. Die Mittelwerte bzw. die Bereiche für die einzelnen Fettsäuren sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

## Diskussion

Die lang- und sehr langkettigen Fettsäuren C<sub>16:1</sub> bis C<sub>26:0</sub> lassen sich mit der hier vorgestellten Methode relativ einfach quantitativ bestimmen. Dabei liegen die Werte für die relative Standardabweichung (RSD) über die Zeit bei 2,5 bis 8,6% und die Wiederfindungsraten zwischen 96 und 120% (Tabelle 2).

Die Konzentrationsbereiche für diese Fettsäuren wurden in den Seren von 22 Blutspendern ermittelt. Aufgrund der noch zu geringen Anzahl der Probanden lässt sich für die in Tabelle 3 zusammengefaßten Mittelwerte keine Verteilungsfunktion ermitteln und damit kein Normalbereich angeben.

Eines der wichtigsten diagnostischen Hinweise für eine peroxisomale Störung sind die Konzentrationen der sehr langketigen Fettsäuren ( $C_{22:0}$ ,  $C_{24:0}$ ,  $C_{26:0}$ ) im Serum oder Plasma sowie deren Konzentrationsverhältnisse. Eine veränderte Verteilung im Vergleich zu Normalpersonen (Blutspendern) kann Aufschluß für eine derartige Störung geben, wie bereits in einer Reihe von Veröffentlichungen gezeigt wurde [2, 8, 9, 10].

Die mit der vorliegenden Methode bestimmten Konzentrationen der sehr langketigen Fettsäuren im Serum von 22 Blutspendern und die sich daraus ergebenden Verhältnisse sind mit den in der Literatur gefundenen Angaben vergleichbar (Tabelle 4). Dabei wurde sowohl Serum als auch Plasma untersucht. Über Unterschiede in der Verteilung der Fettsäuren im Serum und Plasma liegen keine Erfahrungen vor. Moser [9] und Garside [2] finden höhere Gehalte an  $C_{26:0}$ . In den Quotienten aus den Fettsäuren  $C_{24:0}$  und  $C_{22:0}$  bzw.  $C_{26:0}$  und  $C_{22:0}$  sind jedoch sehr gute Übereinstimmungen sowohl in den Literaturangaben als auch zu den eigenen Werten erkennbar [2, 11]. Offenbar werden Unterschiede in den Bestimmungsverfahren durch die Quotientenbildung größtenteils eliminiert.

Die in dieser Arbeit beschriebene Bestimmung der lang- und sehr langketigen Fettsäuren im Serum von Blutspendern liefert eine Grundlage für die Untersuchung von peroxisomalen Störungen. Zur Manifestie-

rung der Normalbereiche sollten weitere Normalpersonen untersucht werden. Weiterhin ist zu prüfen, ob Unterschiede in der Fettsäureverteilung zwischen Serum und Plasma vorliegen.

## Literatur

1. Schulz H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1991;1081:109-120.
2. Garside S, Rosebush PI, Levinson AJ, Mazurek MF. Late-onset adrenoleukodystrophy associated with long-standing psychiatric symptoms. *J. Clin. Psychiatry* 1999;60:460-468.
3. Tan E-K, Lim S-H, Chan L-L, Wong M-Ch, Tan K-P. X-linked adrenoleukodystrophy: spinocerebellar variant. *Clin. Neurol. Neurochir.* 1999;101:137-140.
4. Inoue K, Suzuki Y, Yajima S, Shimozawa N, Orii T, Kondo N. Very long chain fatty acids analysis of dried blood spots on filter paper to screen for adrenoleukodystrophy. *Clin. Chem.* 1997;43:2197-2198.
5. van Geel BM, Assies J, Havercort EB, Koelman JTHM, Verbeeten B, Wanders RJA, Barth PG. Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1999;67:290-299.
6. Coria F, Garcia-Viejo MA, Delgado JA, Duarte J, Claveria LE, Giros M, Pampols T. Diagnosis of X-adrenoleucodystrophy phenotypic variants. *Acta Neurol. Scand.* 1993;87:499-502.
7. Walker NP, Fox HC, Whalley LJ. Lipids and schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 1999;174:101-104.
8. Vallance H, Applegarth D. An improved method for quantification of very long chain fatty acids in plasma. *Clin. Biochem.* 1994;27:183-186.
9. Moser HW, Moser AB. Measurement of saturated very long chain fatty acids in plasma. In: *Techniques in diagnostic human biochemical genetics* (Ed.: F A Hommes). Wiley Liss., Inc. New York 1991.
10. Caruso U. Determination of very-long-chain fatty acids in plasma by a simplified gas chromatographic-mass spectrometric procedure. *J. Chromatography* 1991;562:147-152.
11. Korenke GC, Roth C, Krasemann E, Hüfner M, Hunneman DH, Hanefeld F. Variability of endocrinological dysfunction in 55 patients with X-linked adrenoleucodystrophy: clinical, laboratory and genetic findings. *Eur. J. Endocrinol.* 1997;137:40-47.