Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 383—386, September 1971

Freie Fettsäuren im Serum

I. Modifikation des Titrationsverfahrens nach DOLE und TROUT

Von J. S. BRAUN¹⁾

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce)
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 19. 2. 1971)

Es wird eine Modifikation der titrimetrischen Bestimmung von freien Fettsäuren im Serum nach DOLE (1, 2) und TROUT (3) beschrieben. Nach Extraktion der freien Fettsäuren aus dem Serum werden diese in einem 1-Phasen-System titriert. Die Vorteile des modifizierten Verfahrens gegenüber der Titration im 2-Phasen-System werden diskutiert.

Free fatty acids in serum. I. Modification of the titration method of DOLE and TROUT

A modification of the titrimetric determination of free fatty acids in serum according to DOLE (1, 2) and TROUT (3) is described. The free fatty acids are extracted from the serum and titrated in a 1-phase system. The advantages of the modified procedure over the titration in a two-phase system are discussed.

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum ist die Titrationsmethode nach DOLE (1, 2), in der Modifikation nach TROUT (3). Sie ist einfacher und weniger aufwendig als es die kolorimetrischen Verfahren sind, bei denen die freien Fettsäuren erst als Schwermetallsalze (Kupfer, Kobalt, Uran) extrahiert und dann nach Überführen des Metalls in ein gefärbtes Chelat photometrisch gemessen werden (4—10). Nachteilig bei der DOLE'schen Methode ist jedoch, daß die in Heptan extrahierten Fettsäuren mit wäßr. NaOH titriert werden, so daß sich ein 2-Phasen-System aus Heptan und Wasser bildet. Der zugegebene Indikator ist in 90proz. Äthanol gelöst. Während der Titration müssen die beiden Phasen unter Durchströmen von Stickstoff gemischt werden, wodurch eine emulsionsähnliche Trübung der Lösung entsteht, die auch bei optimalen und stets gleichbleibenden Beleuchtungsverhältnissen den Umschlagspunkt des Indikators nur schwer erkennen läßt. Da außerdem infolge der 2 Phasen die chemische Reaktion verzögert abläuft, besteht stets die Gefahr der Übertitration.

Es soll deshalb in der vorliegenden Arbeit eine Modifikation der titrimetrischen Bestimmung nach TROUT (3) beschrieben werden, bei der die freien Fettsäuren in einem 1-Phasen-System titriert werden.

Methodik

In ein Schliffzentrifugenglas werden 1 ml Serum und 5 ml Extraktionslösung (Isopropanol/n-Heptan/1N H₂SO₄ 40:10:1; v/v) pipettiert. Nach sorgfältigem Verschließen des Schliffglases mit Glas- oder lösungsmittelbeständigen Kunststoff-Stopfen wird das Gemisch einige Minuten in einer dreidimensionalen Schüttelapparatur geschüttelt; es ist auch ausreichend, das Gemisch von

Hand kräftig zu schütteln (etwa 40 mal). Nach 10 Min. werden 2 ml Wasser und 5 ml n-Heptan dazugegeben und wie oben wieder kräftig geschüttelt. Anschließend wird das Gemisch 5 Min. bei 3000 U./Min. zentrifugiert; es trennen sich eine obere, klare, gelblich gefärbte Heptan-Phase, eine untere klare Isopropanol-H₂O-Phase und ein Bodensatz aus ausgefälltem Eiweiß. Von der oberen Heptan-Phase wird möglichst viel in ein weiteres Schliffzentrifugenglas überführt. Nach Zugabe von 5 ml 0,5proz. wäßr. H₂SO₄ wird die Probe wieder kräftig geschüttelt und 5 Min. bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Es bilden sich 2 Phasen, deren obere aus Heptan besteht und die freien Fettsäuren enthält. 4 ml der oberen Heptan-Phase werden in ein Schliffreagenzglas überführt und am Rotationsverdampfer (Fa. Büchi) unter Vakuum eingedampft. Mit Hilfe einer Destillierspinne ist es möglich, 6 Proben in einem Arbeitsgang einzuengen. Häufig bleiben einige Wassertropfen an der Wandung und am Boden des Reagenzglases zurück. Nach Spülen der Wandung mit 2—3 ml absol. Äthanol und durch Abdampfen des Alkohols lassen sich diese Wasserrückstände entfernen.

Zur Titration wird der Trockenrückstand in 3 ml absol. Äthanol aufgenommen; als Leerwert werden 3 ml absol. Äthanol eingesetzt; 1 ml eines Palmitinsäure-Standards, der 1 mMol/l gelöst in absol. Äthanol enthält, wird mit Äthanol auf 3 ml aufgefüllt und dient als Kontrollwert. Als Indikator verwenden wir Nilblau, das 0,05proz. in absol. Äthanol gelöst ist, und wovon 3 Tropfen jeweils zu den Proben gegeben werden. Titriert wird mit 0,01N alkohol. NaOH, die aus einer 4N wäßr. Lösung (Titrisol, Merck) mit absol. Äthanol hergestellt wird. Die Zugabe der NaOH erfolgt mit einem Mikro-Dosimeter (Fa. Ingold), dessen Schlauchverlängerung in die Proben eintaucht. Die Skala des Mikro-Dosimeters hat eine 1 µl-Einteilung. Da die Dosierung kontinuierlich erfolgt, lassen sich 0,5 µl gut ablesen. Das Ende der Titration ist erreicht, wenn der Indikator von blau nach rosa umschlägt.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$(\text{verbr. } \mu\text{l NaOH}_{\text{Probe}} - \text{verbr. } \mu\text{l NaOH}_{\text{Leerwert}}) \times V \times 10^{-2} = \text{mMol freie Fettsäuren/l Serum}$$

V = Verdünnungsfaktor, der im vorliegenden Fall 1,5 beträgt.

Die Berechnung der Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s) und Variationskoeffizienten (VK) wurden nach den Angaben von SACHS (11) durchgeführt.

¹⁾ Gegenwärtige Anschrift: Klinisch-Chemische Abteilung der Urologischen Universitätsklinik, 6650 Homburg/Saar.

Ergebnisse

Wie schon angeführt, ist die Titration im 2-Phasen-System ein erheblicher Unsicherheitsfaktor. Dies dokumentiert Tabelle 1. Zur Titration wurden jeweils 3 ml einer alkohol. beziehungsweise einer Palmitinsäurelösung in Heptan vorgelegt, die $1,2 \mu\text{Mol}/3 \text{ ml}$ enthielt. Im 2-Phasen-System wurden nach den Angaben von DOLE (1) und TROUT (3) mit $0,02N$ wäbr. NaOH titriert, als Indikator diente Nilblau, das mit Alkohol aus einer $0,02\text{proz.}$ wäbr. Lösung 1:10 verdünnt wurde; während der Titration wurde die Probe mit vorgereinigtem Stickstoff durchströmt. Im 1-Phasen-System erfolgte die Titration wie unter Methodik angegeben.

Vier Assistentinnen führten jeweils 20 Titrations durch, wobei zur besseren Objektivierung die Skala des Mikro-Dosimeters verdeckt war, so daß das Ende der Titration nur nach dem Farbumschlag des Indikators beurteilt werden konnte.

Tab. 1

Vergleich der Titration im 2-Phasen-System (Heptan/ H_2O) und 1-Phasen-System (Äthanol). Es wurden jeweils 3 ml mit $1,2 \mu\text{Mol}$ Palmitinsäure titriert. Aus jeweils 20 Einzeltitrations sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen und Variationskoeffizienten angegeben

	2-Phasen-System			1-Phasen-System		
	$\bar{x}$ (μMol)	$\pm s$	VK %	$\bar{x}$ (μMol)	$\pm s$	VK %
Assistentin 1	1,275	0,20	15,7	1,265	0,02	1,6
Assistentin 2	1,065	0,05	4,7	1,245	0,01	0,8
Assistentin 3	0,990	0,08	8,1	1,220	0,01	0,8
Assistentin 4	1,360	0,24	17,6	1,230	0,015	1,2

Im 2-Phasen-System sind die Differenzen der titrierten gegenüber den vorgelegten Säureäquivalenten ganz erheblich, die Abweichungen liegen zwischen $+13\%$ und -18% , der Unterschied zwischen dem höchsten und niedrigsten titrierten Wert beträgt 37% ; innerhalb der einzelnen Serien treten starke Streuungen auf, wie aus den errechneten Variationskoeffizienten zu ersehen ist.

Demgegenüber liegen beim 1-Phasen-System die titrierten Werte sehr dicht beieinander — der Unterschied zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert beträgt 4% — und weichen gegenüber der vorgelegten Konzentration nur geringfügig ab; diese Differenzen liegen zwischen $+1,3$ und $+5,6\%$; die Streuung innerhalb der einzelnen Serien liegt unter 2% .

Zur Überprüfung etwaiger Fettsäure-Verluste, die beim Abdampfen des Heptans auftreten könnten, wurden verschiedene Fettsäuren einzeln und in Mischung sowohl in Alkohol als auch Heptan gelöst. Nach Abdampfen des Heptans und Lösen des Rückstandes in Alkohol wurden beide Proben parallel titriert. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Es besteht kein Unterschied zwischen den titrierten Fettsäure-Konzentrationen mit oder ohne Abdampfen der organischen Phase. Damit ist gesichert, daß die Fettsäuren beim Abdampfen des Heptans quantitativ im Trockenrückstand bleiben und vollständig in Alkohol in Lösung gehen.

Daß die Extraktion der freien Fettsäuren aus dem Serum vollständig ist, zeigen die Wiederfindungsraten. Dazu wurde dem Serum eine Fettsäure-Mischung, die zu gleichen Teilen aus Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure bestand, zugesetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen der Gesamt-Säureäquivalente. Es wurden in jedem Fall mehr als 94% der zugesetzten Fettsäuren wiedergefunden (Tab. 3).

Tab. 3

Wiederfindung eines Fettsäuregemisches, in Heptan gelöst und dem Serum zugesetzt

Freie Fettsäuren im Serum ($\mu\text{Mol}/\text{l}$)	Zugesetzte Fettsäuren ($\mu\text{Mol}/\text{l}$)	Titrierte Fettsäuren ($\mu\text{Mol}/\text{l}$)	Wiederfindung %
810 (n = 6)	500,0	510,0 (n = 10)	102,0
810 (n = 6)	1000,0	1005,0 (n = 8)	100,5
960 (n = 7)	1500,0	1415,0 (n = 9)	94,3
960 (n = 7)	2000,0	1905,0 (n = 8)	95,25

Die für die vorliegende Modifikation ermittelten Wiederfindungsquoten sind damit im Vergleich mit den Angaben anderer Autoren teilweise günstiger (3, 4, 12), teilweise liegen sie im gleichen Bereich (5, 8, 9, 13, 14). PARIJS (16) konnte in seinen Untersuchungen zeigen, daß trotz der Säurewäsche des Heptanextraktes kurzkettige aliphatische Säuren (Essig-, Milch-, Brenztraubensäure), wenn sie vermehrt im Serum vorkommen, im geringen Maße mit erfaßt werden. In der von uns benutzten Modifikation wird keine der genannten Säuren mittitriert, auch dann nicht, wenn sie in extrem hohen Konzentrationen dem

Tab. 2

Titration verschiedener Fettsäuren nach Lösen in Äthanol (A) sowie Heptan, das abdestilliert wurde (B). Eingesetzt wurden jeweils 1 ml Lösung. Angegeben sind Mittelwerte aus je 10 Titrations

	Palmitinsäure	Stearinsäure	Ölsäure	Linolsäure	Linolensäure	Mischung d. Fettsäuren zu gleichen Teilen
A						
a) Vorgelegte Konz. (mMol/l)	1,00	1,01	1,00	1,00	1,03	1,00
b) Titrierte Konz. (mMol/l)	0,98	0,99	1,00	1,00	1,04	1,00
Abweichung von b zu a	-2,0%	-2,0%	0,0%	0,0%	+1,0%	0,0%
B						
a) Vorgelegte Konz. (mMol/l)	1,01	1,01	1,01	1,02	1,03	1,00
b) Titrierte Konz. (mMol/l)	0,98	1,00	0,98	1,03	1,02	1,01
Abweichung von b zu a	-3,0%	-1,0%	-3,0%	+1,0%	-1,0%	+1,0%

JUNIOR 15 000 im Astrolook

Eine Raumkapsel?
Nein, nur eine kleine
Winkelzentrifuge, aber mit
der Dynamik einer Rakete!

Bei einer Höchstdrehzahl
von 15 000 U/min erreicht
sie ein maximales
Schwerefeld von 20200 x g.
Dabei ist sie so klein,
daß man sie - wenn nötig -
in einen Kühlschrank
sperren kann. Hier gleicht
sie dann wieder einer
unbemannten Raumkapsel.

Man hat sie in der Hand,
ohne sie zu sehen -
durch Fernbedienung.

In der „Junior 15 000“ kann
auch bei hohen Rotor-
temperaturen zentrifugiert
werden. (50 bis 150 °C).

Außerdem haben unsere
Konstrukteure an Durchlauf-
rotorbetrieb gedacht.
Eine großartige Sache:
man trennt kleine

Feststoffteile aus großen
Flüssigkeitsmengen im
Nonstop-Verfahren.

Nebenbei gesagt:
Die Bedienung ist ein
Kinderspiel. Aber bitte
lassen Sie sich doch
Prospektmaterial kommen.
Daraus können Sie
wesentlich mehr entnehmen
als aus diesen paar Zeilen.

Verlangen Sie einfach
einen Sonderprospekt
unter Kennziffer 12/163

HERAEUS-CHRIST GMBH
336 OSTERODE
Postfach 1220

Heraeus

Christ

HAMILTON

Reproduzierbare Präzision: Hamilton 1 - 5 Mikroliter Spritzen

Das grösste nutzbare Volumen dieser Spritze beträgt ein Mikroliter!

Wie ist das möglich? Es ist ganz einfach, die Kanüle ist die Spritze. Ein feiner Wolframdraht führt bis in die Spitze der Kanüle, und übernimmt die Funktion des Spritzenkolbens. Der Wolframdraht ist durch eine Dichtung geführt, und das gewünschte Volumen wird manuell eingestellt. Der Glaskörper dient nur der Volumenanzeige. Die Genauigkeit beträgt $\pm 2\%$, die Reproduzierbarkeit $\pm 1\%$.

Autorisierter Händler für die BRD:

GÜNTHER SCHMIDT

Hamburg - Frankfurt

Generalagentur für Europa:

HAMILTON

MICROMESURE N.V.
FOR EUROPE, AFRICA AND ASIA

P.O. BOX 205 - THE HAGUE - HOLLAND

Verkauf:

Aachen:
Berlin:
Bonn:
Bremen:
Frankfurt:

Ludwig Mohren KG
H. Windler KG
C. Gerhardt
H. Jürgens & Co.
Willi Fischer KG

73021
131479
54001
314967
701061

Freiburg:
Göttingen:
Hamburg:
Hannover:
Karlsruhe:
Kiel:
Münster:

Bender & Hobein GmbH
Bodo Schmidt
Alfred Hübscher
H. Jürgens & Co.
Bender & Hobein GmbH
Erich Eydam
H. Jürgens & Co.

70349
56421
2209755
15290
60241
44464
54346

Tab. 4

Titration der freien Fettsäuren im Serum nach Zugabe von Milch- bzw. Brenztrauben- bzw. Essigsäure

	Zugesetzt (mMol/l)	Freie Fettsäuren im Serum (mMol/l)
Milchsäure	0	0,558
	8	0,558
	16	0,558
Brenztraubensäure	0	0,558
	0,1	0,564
	0,4	0,564
Essigsäure	0	0,688
	0,4	0,688
	0,8	0,688

Serum zugesetzt werden, wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist.

Die nach den Untersuchungen von PARIJS (16) und TROUT (3) nur noch geringen Mengen an kurzkettigen aliphatischen Säuren, die im gewaschenen Heptanextrakt verbleiben, werden im Vakuum mit dem Heptan abgedampft, so daß die im Rückstand titrierten Säureäquivalente allein den extrahierten freien Fettsäuren entsprechen.

Von verschiedenen Seren mit unterschiedlichem Gehalt an freien Fettsäuren wurden Mehrfachanalysen gemacht zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit (Tab. 5).

Tab. 5

Reproduzierbarkeit der Bestimmung freier Fettsäuren in einer Serie von Mehrfachanalysen

	Freie Fettsäuren $\bar{x} \pm s$ [μ Mol/l]	VK [%]
Serum 1 (n = 26)	343,3 $\pm$ 13,4	$\pm$ 3,91
Serum 2 (n = 32)	349,2 $\pm$ 14,9	$\pm$ 4,25
Serum 3 (n = 34)	586,7 $\pm$ 10,7	$\pm$ 1,88
Serum 4 (n = 23)	963,0 $\pm$ 12,1	$\pm$ 1,26
Serum 5 (n = 30)	1908,0 $\pm$ 12,1	$\pm$ 0,63

Während die Fehlerbreite bei niedriger Konzentration an freien Fettsäuren noch um $\pm 4\%$ (VK) liegt, nimmt sie mit steigender Konzentration steil ab bis auf weniger als $\pm 1\%$ (VK). Ein Vergleich mit den Fehlerangaben anderer Autoren (Titrationmethode: 1, 13, 14, 17. Kolorimetrische Methoden: 6, 8, 9, 15) zeigt, daß die Abweichungen — insbesondere im Bereich um 0,3 mMol/l — im Rahmen der üblichen Streuung liegen.

Diskussion

Die Spezifität der kolorimetrischen Methoden beruht darauf, daß nach vollständiger Extraktion (2) nur die Fettsäuren von der Farbreaktion erfaßt werden, allerdings bevorzugt nur Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C_{10} — C_{18} , während die in Spuren vorkommenden

Fettsäuren mit kürzeren Kettenlängen weitgehend nicht erfaßt werden (18). Demgegenüber werden bei dem Titrationsverfahren nach DOLE (1) alle extrahierten Säuren bestimmt, also auch Nicht-Fettsäuren wie Milch-, Essig- und Brenztraubensäure (1, 2, 14, 16, 19). Diese kurzkettigen aliphatischen Säuren können ebenso wie Phosphatide durch eine Säurewäsche des Heptanextraktes (3) weitgehend entfernt werden (3, 16, 20, 21). Damit erreicht die Titrationsmethode die gleiche Spezifität wie die kolometrischen Methoden, wie verschiedene Autoren in Vergleichsmessungen zeigen konnten (3, 6, 8, 9, 22). In unseren Untersuchungen konnten wir keine Differenzen feststellen, auch nicht nach Zugabe derartiger Säuren in sehr hohen Konzentrationen (Tab. 4). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß diese restlichen Nicht-Fettsäuren mit dem Heptan als leicht flüchtige Säuren abgedampft werden.

Die Fehlermöglichkeiten der Titration im 2-Phasen-System können erheblich sein (Tab. 1). Deswegen empfehlen KELLEY (17) und KEUL (13) NaOH als Titrationslösung durch Tetrabutylammoniumhydroxid zu ersetzen, das mit Alkohol als Lösungsvermittler auch in Heptan löslich sein soll. Dadurch wird zwar in einem 1-Phasen-System titriert, das sich jedoch aus einer Mischung von Fettlösungsmitteln (Heptan) und organischen Lösungsmitteln (Isopropanol und Methanol) zusammensetzt.

Die Titration in einem rein alkoholischen 1-Phasen-System zeichnet sich aus durch vergleichbare Dissoziation von Säure und Lauge, durch deutlichen und sofortigen Umschlag des Indikators und durch minimale Störanfälligkeit — infolge Wasserfreiheit des Titrationssystems beeinflusst Luft- CO_2 die Titration nicht —, so daß eine gute Reproduzierbarkeit der Titration erreicht wird. Damit ist das Titrationsverfahren nach DOLE (1) und TROUT (3) mit der von uns benutzten Modifikation eine wenig aufwendige und schnelle Methode; eine eingearbeitete Assistentin kann an einem Arbeitstag bis zu 50 Proben analysieren. Die Genauigkeit und Spezifität der Methode entspricht der anderer, sehr viel arbeitsintensiverer Titrationsverfahren (12, 14); die Empfindlichkeit läßt sich durch Verminderung der Normalität der Lauge noch steigern.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der beschriebenen Methodik bestehen in der Bestimmung von veresterten Fettsäuren nach ihrer Hydrolyse und Extraktion aus verschiedenen biologischen Substraten, z. B. im Serum, in der Lymphe und in Fäces.

Frau PIEPENHAGEN und Fräulein K. OLBRICH danke ich für gewissenhafte Mitarbeit.

Literatur

1. DOLE, V. P., J. Clin. Invest. 35, 150 (1956). — 2. DOLE, V. P. und H. MEINERTZ, J. biol. Chemistry 235, 2595 (1960). — 3. TROUT, D. L., E. H. ESTERS jr. und S. J. FRIEDBERG, J. Lipid Res. 1, 199 (1959). — 4. DUNCOMBE, W. G., Clin. Chim. Acta,

Amsterdam 9, 122 (1964). — 5. ITAYA, K. und T. KADOWAKI, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 25, 401 (1969). — 6. NOVAK, M., J. Lipid Res. 6, 431 (1965). — 7. HOWORTH, P. J. N., S. GIBBARD und V. MARKS, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 14, 69 (1966). —

8. LAURELL, S. und G. TIBBLING, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 16, 57 (1967). — 9. DIETERLE, P., C. WÜLFERT-HELDRIICH, J. HENNER und K. SCHWARZ, diese Z. 6, 153 (1968). — 10. MLYTZ, H. und H. D. METHFESSEL, Dtsch. Gesd.wes. 25, 136 (1970). — 11. SACHS, L., Statistische Auswertungsmethoden, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968). — 12. SVANBORG, A. und L. SVENNERHOLM, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 3, 443 (1958). — 13. KEUL, J., N. LINNET und E. ESCHENBRUCH, diese Z. 6, 394 (1968). — 14. GORDON, R. S. jr., A. CHERKEŞ und H. GATES, J. Clin. Invest. 36, 810 (1957). — 15. KONITZER, K., S. VOIGT, M. SOLLE und D. MÖSCHLER, Acta biol. med. german. 12, 502 (1964). — 16. PARIJS, J., F. BARBIER und A. ELEWAUT, Clin. Chem. (New York) 12, 767 (1966). — 17. KELLEY, T. F., Analytic. Chem. 37, 1078 (1965). — 18. DUNCOMBE, W. G., Biochem. J. 88, 7 (1963). — 19. NELSON, G. H., Amer. J. Obstetr. Gynec. 92, 202 (1965). — 20. LOCHNER, W. und M. NASSERI, Pfügers Arch. Physiol. 271, 405 (1960). — 21. WAREMBOURG, H., G. BISERTE, J. JAILLARD, J. GUIDOLLET-THEVENOT, G. SEZILLE und M. BERTRAND, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 14, 710 (1966). — 22. MÖSINGER, F., J. Lipid Res. 6, 157 (1965).

Dr. J. S. Braun
Klin.-Chem. Abt. der Urologischen Univ.-Klinik
6650 Homburg/Saar