

Zur Wirkung von Phospholipiden in der thermisch induzierten Lipidperoxidation

vorgelegt von
Martin Doert
aus Lutherstadt Wittenberg

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende:	Prof. Dr. rer. nat. A. Hartwig
Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. L.W. Kroh
Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. M.A. Glomb
Gutachter:	PD Dr. rer. nat. habil. J.-Th. Mörsel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05.07.2010

Berlin 2010

D 83

$$e^i = -1$$

L. Euler

Abstract

Die antioxidativen Eigenschaften der Phospholipide wurden an Soja-, Raps- und Sonnenblumenlecithin untersucht. Zusätzlich wurden Modelluntersuchungen mit Standardphosphatiden am System Linolsäureethylester / α -Tocopherol durchgeführt.

Phospholipide wirken nicht wie klassische Antioxidantien über die Inaktivierung freier Radikale durch Abgabe von H-Atomen. Zwei Mechanismen konnten herausgearbeitet werden.

1.) Saure Phosphatide besitzen eine Schwermetallaffinität und können prooxidative Übergangsmetalle inaktivieren. Die freie Phosphatidsäure zeigt als einziges Phosphatid eine deutliche Inaktivierung von Eisen- und Kupfer-Ionen. Der Effekt lässt sich durch eine Maskierung über die Bildung von stabilen MePA₂-Komplexen erklären.

2.) Phospholipide sind in der Lage synergistisch den Effekt von phenolischen Antioxidantien, wie z.B. BHA, Tocopherolen oder Flavonoiden zu verstärken. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Phosphatidylethanolamin (PE) in Verbindung mit L-Ascorbinsäure auf der Regeneration von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon zurückgeht. Phosphatidylcholin ist dazu nicht in der Lage, es verbessert aber die Recyclierung von α -Tocopherol aus α -Tocopheryl-Radikalen mit L-Ascorbinsäure [Packer et al. 1979] über einen physikalischen Dispersionseffekt.

Unter Röstbedingungen (5 min, 150°C) werden in Pflanzenlecithinen antioxidative Stoffe gebildet. Gleiches wurde auch im Modellversuch bei der Röstung von Phosphatidylethanolamin mit D-Glucose beobachtet. Die gebildeten reduzierenden Stoffe übernehmen die Rolle der L-Ascorbinsäure und bewirken in Verbindung mit PE / α -Tocopherol eine Stabilisierung von Linolsäureethylester über den beschriebenen Regenerationsmechanismus. Während der Oxidation von (RRR)- α -Tocopherol mit Bleitetraacetat und der Regeneration mit Phosphatidylethanolamin bleibt die Konfiguration am C2 des α -Tocopherols erhalten.

Über MS-Untersuchungen konnten Amino-Carbonyl-Kondensationsverbindungen von Phosphatidylethanolamin mit Hexanal, (E)-2-Octenal, (E,E)-2,4-Decadienal, D-Glucose, L-Ascorbinsäure und α -Tocopherylchinon gemessen werden. Es wird ein Mechanismus für die Regeneration von α -Tocopherol vorgeschlagen. Kern ist hierbei die Aktivierung des α -Tocopherylchinons durch die Kondensatbildung mit Phosphatidylethanolamin. Eine Verifizierung über strukturelle Untersuchungen steht noch aus. Das System Pflanzenlecithin/Ascorbat/ α -Tocopherol eignet sich zur Stabilisierung von Kartoffelpüreepulvern. Signifikante Unterschiede im antioxidativen Verhalten zwischen Soja-, Raps- und Sonnenblumenlecithin wurden nicht beobachtet.

Inhaltsverzeichnis

Abstract

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung.....	5
1.1. Phospholipide – Vorkommen, Zusammensetzung, Herstellung, Einsatz	5
1.2. Problemstellung	15
1.3. Untersuchungen und Ergebnisse – Grundbestimmungen	16
2. Wechselwirkung mit prooxidativen Schwermetallen.....	19
2.1. Lipidautoxidation – Induktion und Katalyse	19
2.2. Ein- und mehrzählige Komplexe	26
2.3. Untersuchungen und Ergebnisse	29
2.3.1. Phosphatid-Standards – 1%ig in Ethyllinolat bei 60°C	29
2.3.2. Komplexierung von Fe ³⁺	33
2.3.3. Einfluß von PE auf den Cu-induzierten Abbau der Tocopherole	35
3. Wechselwirkung mit Lipidperoxidationsprodukten.....	36
3.1. Oxidationsprodukte der Linolsäure – sekundäre Produkte	36
3.2. oxidative Bräunung	43
3.3. Untersuchungen und Ergebnisse	48
3.3.1. Peroxidbildung und Zersetzung	48
3.3.2. flüchtige Verbindungen	52
3.3.3. DPPH-Aktivität und Bräunung	55
3.3.4. Vergleich von Sojalecithin und Soja-PC in Bräunung und Stabilisierung	62
4. Wechselwirkung mit primären Antioxidantien – Synergismus mit Tocopherolen.....	69
4.1. phenolische und polyenische Antioxidantien	69
4.2. Phospholipide als Synergisten – Grundlagen	88
4.3. Untersuchungen und Ergebnisse	100
4.3.1. Einfluß von Lecithinen auf den Abbau von Tocopherolen	100
4.3.2. Regeneration von primären Antioxidantien	106
4.3.3. Ethyllinolat–Modelluntersuchungen an Drei–Komponenten–Systemen	126
5. Wechselwirkung mit Zuckern – Maillard-Bräunung.....	143
5.1. Maillard-Reaktion	143
5.2. Untersuchungen und Ergebnisse	160
5.2.1. -Dicarbonyle	160
5.2.2. MS-Untersuchungen: Amadori-PE	162
5.2.3. Ascobinsäure als Modellreducton, Wechselwirkung mit PE	168
6. Untersuchungen zur oxidativen Stabilisierung von Lebensmitteln.....	174
7. Material und Methoden.....	178
7.1. Untersuchungsmaterial	178
7.2. chromatographische Methoden	179
7.3. nasschemische/ photometrische Methoden	183
7.4. apparative Methoden	185
8. Zusammenfassung und Diskussion.....	187
9. Literatur.....	199
Anhang.....	208
Abkürzungen	
Danksagung	

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Phospholipide – Vorkommen, Zusammensetzung, Herstellung, Einsatz

Pflanzliche und tierische Zellen enthalten neben der äußeren Membran auch im Zellinneren eine Vielzahl von Membranstrukturen. Die wesentlichen strukturbildenden Substanzen dieser hochfunktionalen Einheiten stellen Phospholipide dar. Die wichtigsten kommerziell genutzten Rohstoffe für die Phospholipidgewinnung sind Ölsaaten (2,5% d. Trockenmasse) und Eigelb (17% d. Trockenmasse) [260]. Im Jahre 1846 gewann M. Gobley aus dem Eidotter eine klebrige, orangene Substanz mit emulgierenden Eigenschaften, der er nach dem griechischen Wort „lekithos“ für Eigelb den Namen Lecithin gab [66]. Nach der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV) sind Lecithine unabhängig ihrer tierischen oder pflanzlichen Herkunft unter der Bezeichnung E322 allgemein zugelassene Zusatzstoffe und besitzen den GRAS-Status. Zu dieser rechtlichen Definition von Lecithinen zählen alle in der Zusatzstoff-Verkehrsverordnung (ZVerkV) beschriebenen behandelten Lecithine. Der Begriff Lecithin wird als ein Gemisch aus neutralen und polaren Lipiden verstanden und unterscheidet sich daher von der wissenschaftlichen Definition (= Phosphatidylcholin). Nach dem EU-Lebensmittelrecht sind nur physikalische Herstellungsverfahren und enzymatische Modifizierungen zulässig. In den USA sind dagegen auch Hydrierung, Umesterung, Acetylierung und Hydroxylierung erlaubt [228]. Unter den pflanzlichen Lecithinquellen nimmt die Sojabohne (2-3% d. Tr.) den ersten Platz ein. Andere Quellen sind Raps, Sonnenblumen, Maiskeime, Reiskeime, Lupinen und Erdnüsse [260,149]. Das aus der Sojabohne über die Raffination des Sojaöls gewonnene Sojalecithin enthält kaum störende Inhaltsstoffe, so dass es bereits als Rohlecithin für viele Anwendungsgebiete brauchbar ist. Rapslecithin besitzt dagegen neben einer hohen Farbstoffbelastung (Phäophythin A, 35ppm) auch Thioglucoside, die die Qualität dieses Rohstoffs deutlich mindern [237,11]. Handelsübliches Rohsojalecithin enthält neben Phospholipiden und Glycolipiden noch etwa 7% Triglyceride. Daneben sind Kohlenhydrate, Wasser, Sterine und Tocopherole enthalten [260].

42 %	Eiweiße
26 %	Kohlenhydrate
19 %	Lipide
0,5 %	Phospholipide
11 %	Wasser

Tab. 1.1 Zusammensetzung der Sojabohne [232]

50 %	Phospholipide
37 %	Triglyceride, Sterine, Wachse, Tocopherole
7 %	Glycolipide
5 %	Kohlenhydrate
1 %	Wasser

Tab. 1.2 Zusammensetzung von rohem Sojalecithin [260]

Phospholipide gehören zu den polaren Lipiden und besitzen als solche einige für Neutrallipide untypische Eigenschaften. So verläuft z.B. die Fettfleckprobe negativ. Phospholipide sind nicht in Aceton löslich, sie lassen sich sogar aus ihren Lösungen mit Aceton ausfällen. Bei der Pyrolyse entwickeln sich neben einem stechenden Acrolein-Geruch (Glycerinabbau) basische Dämpfe (N-Verbindungen). Über das enthaltene Phosphat können Lecithine Salze bilden – bsw. einen Niederschlag mit Cu^{2+} . Sowohl bei den Phospholipiden als auch bei den Glycolipiden lassen sich zwei Hauptklassen unterscheiden; die Glycerolipide und die Sphingolipide [80]. Glycerophospholipide enthalten Glycerin als Grundkörper, die Sphingophospholipide das D-Sphingosin (trans-D-erythro-2-Amino-4-octadecen-1,3-diol). In den Sphingolipiden bildet die Aminogruppe mit einer Fettsäure ein Säureamid – ein sogenanntes Ceramid.

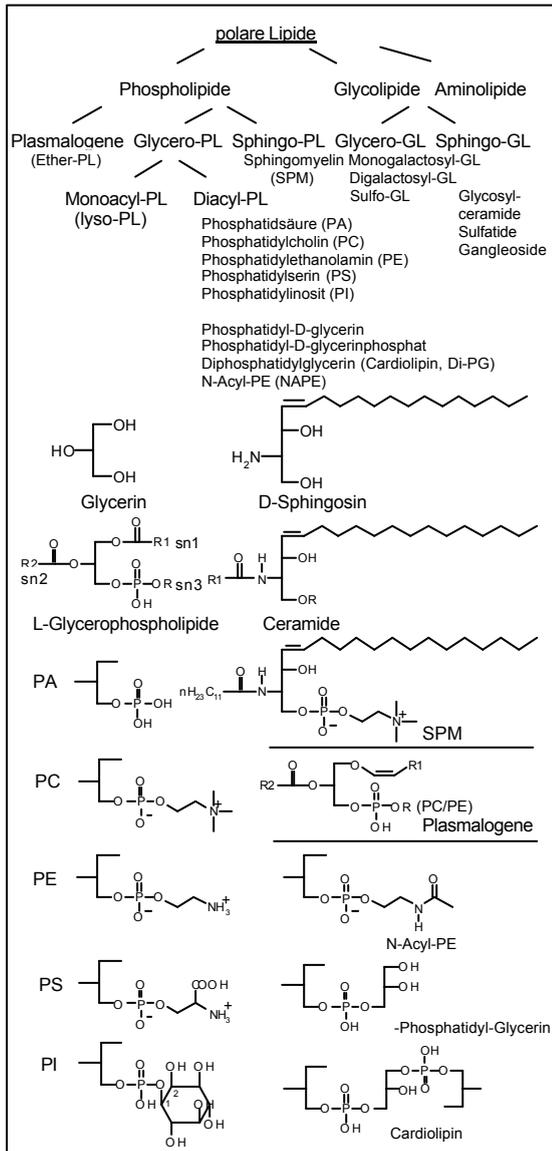


Abbildung 1.1 Phospholipide, Struktur

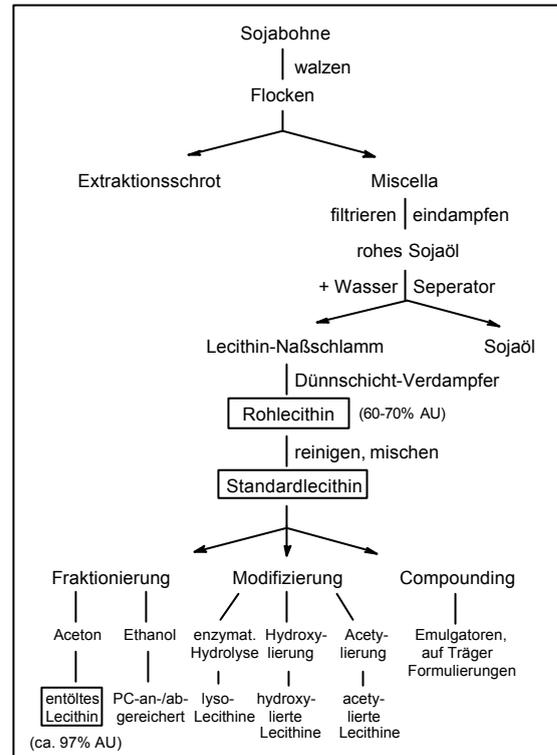


Abbildung 1.2 Herstellung und Verarbeitung von Sojalecithin [232,208]

	Soja	Raps	Sonne	Erdn.	Mais	Ei	Milch
PC	24	25	25	20	30	74	27
PE	22	22	11	8	3	19	31
PI	15	15	19	17	16	1	8
PS			1		1		
Di-PG	2		1		1	1	
PA	7		3	3	9		
NAPE	6		1		3		
SPM							29
LPL's	3	5			5	3	
andere PL's	7	19		12		1	

Tab.1.3 PL-Zusammensetzung ölfreier Lecithine [260,203]

Die primäre HO-Gruppe ist bei den Sphingo-PL's mit Phosphorsäure –bzw. der Phosphorsäure-Basen-Struktur– verestert; bei den Sphingoglycolipiden ist sie glycosidisch an Mono-, Di- oder Oligosaccharide gebunden. Das Sphingomyelin (SPM) ist ein Phospholipid, das nur im tierischem Organismus vorkommt. Es findet sich in den Myelinscheiden der Nerven. Strukturell ist es ein Ceramidphosphocholin und Bestandteil von Milch und Ei-Lecithinen [203]. Die einfachsten Sphingo-GL's liefern bei der Hydrolyse Sphingosin, eine Fettsäure und eine Hexose. Letztere bezeichnete man als Cerebrose und die Sphingo-GL's daher als Cerebroside. Häufig ist D-Galactose gebunden; das 1-O-(-D-galactopyranosyl)-D-erythro-sphingosin heißt Psychosin und sein C24:0-Amid ist das Cerasin [220]. In den Sulfo cerebrosiden –die zu den Sulfatiden gehören– sind einzelne Zucker-OH-Gruppen sulfatiert. Die Ganglioside enthalten ebenfalls einen anionischen Zucker-Bestandteil, die Sialinsäure (Gruppenname für verschieden acetylierte Neuraminsäure). Neben Sphingo-PL's und Sphingo-GL's kommen auch Sphingophosphoglycolipide vor bei denen der Zuckerrest über das Phosphat gebunden ist (Ceramid-Phosphat-Zucker_n) [11]. Sphingoglycolipide findet man insbesondere in Milch und Cerealien, aber auch in tierischen Organismen. Weizenmehl besitzt je nach Ausmahlung bis zu 3% Lipide und davon ca. 25% Glycolipide und ca. 15% Phospholipide (in der Nicht-stärke-gebundenen-Lipidfraktion) [84]. Einige Weizensphingolipide leiten sich von Phytosphingosinen ab. Deren Sphingosin-Alkylkette kann bis zu 4 C-Atome längere sein und die Doppelbindung liegt hier hydratisiert vor (–OH am C4). In den Glyceroglycolipide andererseits ist der Zucker in der sn3-Position des Glycerin gebunden. Häufig ist auch hier D-Galactose -glycosidisch enthalten. In den Galactosyldiacylglyceriden kommen bis zu vier -1,6-verknüpfte D-Galactose-Einheiten vor (Mono-, Di-, Tri-, Tetra-galactosyldiacylglyceride). Glyceroglycolipide kommen vor allem in Chloroplasten vor. Sie sind dort mit den gut wasserlöslichen Sulfolipiden vergesellschaftet, welche sulfatierte Zucker enthalten (Sulfatide). Predominant ist hier die, an der primären OH-Gruppe, sulfatierte Glucose (Sulfochinovose; Chinovose = 6-Desoxy-D-Glucose) [11]. Bei den Glycerolphospholipiden kann in Esterphospholipide und Etherphospholipide (Plasmalogene oder Acetalphospholipide) unterschieden werden. Die Plasmalogene nehmen eine Sonderstellung ein. Sie kommen in geringen Mengen in tierischen

Gewebe und in Milch vor und enthalten eine Enolether-Bindung. Diese wird im Gegensatz zu Esterbindung leicht unter Bildung der entsprechenden Fettaldehyden hydrolysiert. Die Esterglycerolphospholipide leiten sich von der Phosphatidsäure (PA) ab. Man unterscheidet zwei Positions-Isomere: Die α -Phospholipide enthalten die Phosphatgruppe in der sn3-Position und die β -Phospholipide in der sn2-Position des Glycerins. Wird eine der am Glycerin gebundenen Fettsäuren abgespalten erhält man die polareren lyso-Phospholipide. In natürlichen Rohstoffen sind i.A. nur geringe Mengen an lyso-PL's zu finden [260]. Im eigentlichen Lecithin, dem im Eigelb dominierende Phosphatidylcholin (PC), ist die quartäre Stickstoffbase Cholin über ihre OH-Gruppe an der Phosphatidsäure verestert und bildet mit dieser die polare Kopfgruppe des Moleküls. Die Bezeichnung „Phosphatide“ für Phospholipide geht auf J.L.W. Thudichum zurück, der 1847 Substanzen aus der Gehirnmasse isolierte, die dem Lecithin verwandt waren [235]. Das gilt auch für den Namen „Kephalin“ für die beiden Aminophospholipide: Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) [5]. Diese unterscheiden sich von PC in der polaren Kopfgruppe (griechisch: kephalos = Kopf) des Moleküls. Das PE ist mit Ethanolamin verestert, das PS mit der Aminosäure Serin. Beide Stoffe unterscheidet nur die Carboxylgruppe. PS kommt im Gewebe gebunden an Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oder Mg^{2+} vor (ca. 75% K-Salz) [5]. PE ist schlechter in Ethanol löslich als PC, so dass es sich fraktionieren lässt. Folch [52] stellte fest, dass die aus Hirn erhaltene alkoholunlösliche, und als Kephalin bezeichnete Mischung aus drei verschiedenen Substanzen besteht. Über fraktionierte Fällung isolierte er PE, PS und Phosphatidylinosit (PI). Er entdeckte, dass sich PE allein relativ gut in Alkohol löst, dass aber die Löslichkeit durch die anderen PL's herabgesetzt wird. PC und PE liegen bei pH 7 als Zwitterionen vor ($\text{pK}_s = 1-2$) [11]. Bei Anwesenheit monokovalenter Kationen liegen die beiden Phospholipide offenkettig vor; bei Abwesenheit der Kationen bilden sich intramolekulare 6-Ringstrukturen aus, die mit den offenkettigen Formen nicht äquivalent sind [85]. Der Alkohol Inositol (Hexahydroxycyclohexan) existiert in verschiedenen Isomeren. Im scyllo-Inositol liegen alle OH-Gruppen äquatorial und zeigen alternierend nach oben und unten. Bei dem im PI gebundenen myo-Inositol steht dagegen eine OH-Gruppe axial (C2). Diese befindet sich neben der mit der Phosphatidsäure verestert –OH-Gruppe am C1 (vgl. Abb. 1.1). Neben den Hauptphosphatiden PC, PE und PI kommen in pflanzlichen

Lecithinen als Minorkomponenten auch N-Acyl-phosphatidylethanolamin (NAPE), Phosphatidylglycerin (PG) und Diphosphatidyl-glycerin (DPG) vor. Maiskeimlecithin besitzt ein für Pflanzenlecithine untypisch hohes PC/PE-Verhältnis. PS ist in Samenöl-Lecithinen nur gering enthalten. In Sojaöl kommt es nicht vor [208]. Tierische Phospholipide haben nur einen geringen PI-Gehalt, enthalten aber zusätzlich SPM. Eigelb-Lecithin zeichnet sich durch seinen hohen PC-Gehalt aus. Es macht ca. 75% aller Ei-Phospholipide aus. Tierische und pflanzliche Lecithine unterscheiden sich auch in der Fettsäurezusammensetzung. Eigelb-Lecithin enthält ca. 25% PUFA, davon ca. 14% Linolsäure, 1% Linolensäure und 5% Arachidonsäure und 3% DHA. Arachidonsäure (C20:4) findet sich in hohen Konzentrationen in SPM und PE, aber nur in geringen Konzentrationen im PC [234]. Pflanzliche Lecithine enthalten i.A. keine Arachidonsäure, sind aber aufgrund ihres hohen Linolsäuregehalts – welcher nur selten unter 50% liegt (Soja 57%, Raps 48%, Sonnenblume 69%, Mais 48%, Erdnuss 18%, Baumwollsaat 54% [260,237]) – stärker ungesättigt als die Neutralöle, mit denen sie vergesellschaftet sind. Linolensäure macht in der Regel zwischen 5-8% aus. Öl- und Palmitinsäure kommen meist zwischen 10-25% vor. Stearinsäure liegt unter 5%. Erdnusslecithin enthält 20-22% Arachidonsäure (C20:0, Eicosansäure), und Rapslecithin bis zu 2% Erucasäure (C20:1n13) [237]. Palmitin- und Stearinsäure sind im Sojalecithin zu 90% an der sn1-Position verestert, während Linol- und Linolensäure zu etwa 60% an der sn2-Position gebunden sind und nur zu 40% an sn1 [139]. Für Ölsäure wurde keine Stellungspräferenz gefunden. Kommerziell erhältliches rohes Sojalecithin, das bei der Entschleimung des Samenöls anfällt, enthält bis zu 15% gebundene (in GL's) und freie Kohlenhydrate [246]. Bei den Glycolipiden dominieren Sterylglycosidester sowie Mono- und Digalactosylglyceride [249]. An freien Kohlenhydraten wurde im Sojalecithin Saccharose, Stachylose und Raffinose identifiziert [210]. Stachylose ist ein Tetrasaccharid, Raffinose ein Trisaccharid – beide enthalten neben D-Glucose und D-Fructose auch die D-Galactose. Calcium und Magnesium sind im Sojalecithin zwischen 0,1-0,3% enthalten [219]. Bemerkenswert sind die auffallend hohen Schwermetallgehalte in aus Pflanzenölen gewonnenen Lecithinen. In Sojalecithin sind 10-110 ppm Eisen, 3-15 ppm Kupfer und bis zu 5 ppm Nickel enthalten [237,187, 236, 219]. Bei der Fraktionierung der Phosphatide zeigen die verschiedenen Fraktionen sehr unterschiedliche Kupfer-Werte [236]. Durch

Reinigung über Kieselgel kann ca. 50% des Eisens und ca. 90% des Kupfers entfernt werden [219].

Die Herstellung von Sojalecithin ist in Abb. 1.2 schematisch dargestellt. Die hauptsächlich aus Nordamerika und Brasilien importierten Sojabohnen werden geschält, gebrochen und zu feinen Flocken ausgewalzt. Die Flocken werden mit reichlich Lösungsmittel (Hexan) getränkt. Das anfallende Öl-Lecithin-Lösungsmittelgemisch –Miscella genannt– wird filtriert und das Lösungsmittel anschließend unter Vakuum wieder abdestilliert. Zurück bleibt ein rötlich gefärbtes Öl, das etwa 2-3% Lecithin enthält. Es liegt teils koloidal gelöst, teils als feinverteilte Trübung vor. Da es die Raffination des Öls, u.a. die Entsäuerung stört, indem es die Trennung des Öls von den entstehenden Seifen (Soapstock) durch Bildung zäher Emulsionen erschwert, muss es vorher abgetrennt werden. Zur Entlecithinierung (Vorentscheidung) wird das erhaltene Rohöl mit 1-4% Wasser versetzt und bei 70-90°C intensiv gerührt. Das Lecithin fängt an zu quellen, fällt als gallertartige Masse aus und kann mit Hilfe von Separatoren abgetrennt werden. Bei der Hydratation darf nur relativ wenig Wasser verwendet werden, da die Koagulation der Phospholipide sonst ausbleibt. Nur wenn die verwendete Wassermenge dem tatsächlichen Bedarf zur Hydratation entspricht, scheidet sich das Lecithin in einem leicht zu zentrifugierenden Schleim ab [226]. Zur Fällung des Sojalecithins reichen 5 Moleküle Wasser je Atom Phosphor, bei frischen Sojaöl braucht man 7 Moleküle, zur Fällung von PE werden 40 Moleküle Wasser je Atom Phosphor gebraucht [106]. Der Phosphorgehalt des Rohöls kann durch die Vorentscheidung um bis zu 90% reduziert werden. Die Auswahl der Arbeitsbedingungen der Hydratation beeinflusst in hohem Maße die Ausbeute und Qualität des Sojalecithins. Der anfallende Naßschlamm besteht zu ca. 55% aus Wasser und enthält ca. 33% Phospholipide und noch ca. 12% Neutralöl [260]. Im Dünnschichtverdampfer wird der Restwassergehalt auf etwa 2% reduziert. Das so gewonnene Rohlecithin hat die in Tab. 1.2 angegebene Zusammensetzung. Bei der Raffination wird im anschließenden Schritt der Entschleimung, durch Zusatz von 0,1%iger Phosphorsäure, die im Öl fein verteilten Proteine und Kohlenhydrate bei ca. 90°C ausgeflockt und nach Zusatz von Filterhilfsmitteln abgetrennt. Amorphe Schleimstoffe verlieren durch die Säure ihre hydrophilen Eigenschaften und werden ausgesalzt. Dabei werden auch noch enthaltene Phospholipide abgetrennt. Bei

Verwendung von Phosphorsäure ist der Restphosphorgehalt wenig temperaturabhängig. Er beträgt ca. 40 ppm [186]. Mit SO₂-Lösung, Ameisensäure oder Citronensäure als Entschleimungsmittel lässt er sich bei 70°C auf unter 5 ppm reduzieren [186]. Pflanzliche Lecithine enthalten 30-40% Neutrallipide, vorwiegend Triglyceride. Sowohl Glycolipide als auch Phospholipide sind in Aceton fast unlöslich. Diesen Umstand macht man sich zunutze und erhält durch Extraktion mit Aceton entölte Lecithinqualitäten mit einem Restgehalt von nur noch 2-3% Neutrallipiden.

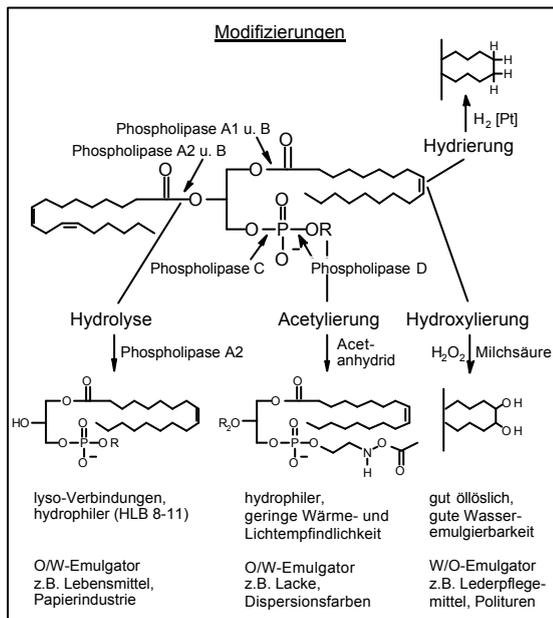


Abbildung 1.3 modifizierte Lecithine [260]

Phospholipide		84 %
	PC	24 %
	PE	22 %
	PI	15 %
	PA	7 %
	NAPE	6 %
	lyso-PL's	3 %
	andere PL's	7 %
Glycolipide		12,5 %
Neutrallipide		2,5 %
	Triglyceride	
	freie Fettsäuren	
	Sterine	
Feuchtigkeit	Wasser	1 %

Tab. 1.4 typische Zusammensetzung eines handelsüblichen entölte Sojalecithins [260]

W/O-Emulgator	Magarine (20% Wasser), Mayonnaise, Schokolade, Backwaren
Oberflächen-Benetzung, Dispergierung	kakaohaltiges Getränkepulver, Milchpulver, kosmetische Mittel (Liposomen)
Trennmittel	Backwaren, z.B. Waffeln
Stabilisator	Backwaren, z.B. Brotteige (Gärverhalten)
Antioxidants	Magarine

Tab. 1.5 Einsatz von Sojalecithin in der Lebensmittelindustrie

Überkritisches Kohlendioxid zeigt bei 40°C und einem Druck von 300-700 bar die Lösungsmiteigenschaften von Aceton und lässt sich ebenfalls zur Abtrennung der Neutrallipide einsetzen [260]. Durch die amphiphile Struktur der Phospholipide, wirkt Sojalecithin als Emulgator. Die hydrophil-hydrophobe-Balance (HLB-Wert), die nach Griffin [71] willkürlich in einer Skala von 1-20 eingeteilt ist, wurde für Sojalecithin von Eichberg experimentell zu 3,9 bestimmt [40]. Bei HLB = 7 halten sich die hydrophilen und hydrophoben Teile eines Moleküls die Waage. Bei kleineren Werten überwiegt der unpolare Teil. Phospholipide lösen sich daher besser in Fetten und Ölen und eignen sich als Emulgatoren für Wasser-in-ÖL-Emulsionen, z.B. für Magarine. Durch die enzymatische Hydrolyse einer Fettsäure mit den Phospholipasen A u. B lässt sich der HLB-Wert über 7 steigern, was den Einsatz von Sojalecithin als Öl-in-Wasser-Emulgator ermöglicht. Kommerzielle Bedeutung hat Phospholipase A2-

Lösung (10.000 – 50.000 IU·kg⁻¹ PL) [208]. Das Standard-Lecithin wird mit Wasser, Enzymlyösung und Calciumchlorid bei 50 – 60°C und pH 8–8,5 10–24h gerührt (20-50% Hydrolysegrad, PC). Auch über Acetylierungen von PE mit Carbonsäureanhydriden oder Hydroxylierungen der enthaltenen Doppelbindungen mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Citronen-, Milch- oder Weinsäure kann die Polarität erhöht werden. Wie bereits eingangs erwähnt, sind nach dem EU-Lebensmittelrecht derartige Modifikationen für den Lebensmitteleinsatz nicht zulässig. In den USA ist die Acetylierung erlaubt, man erreicht damit eine Herabsetzung der reaktiven Aminogruppen und somit eine geringere Tendenz zur Bräunung. Der Effekt kann aber auch mit konventionellen Methoden über die Ethanolanreicherung von PC und die damit verbundene Abreicherung von PE erzielt werden. Besonders polare Eigenschaften können durch zweistufige Modifizierungen erreicht werden. Das von Degussa –ehemals Lucas Meyer– angebotene „Lipothin AH“ wird zunächst acetyliert und danach hydroxyliert. Es zeigt hervorragende Emulgierungseigenschaften („Super-Emulsifier“) und kann bei Leder und Pelzwaren zur Geschmeidigmachung verwendet werden [260]. Enzymatisch hydrolysierte Lecithine können sich mit der Kohlenwasserstoffkette in die Helix-Struktur von Amylose bzw. Amylopectin der Stärke einlagern und dadurch die Kristallisation der Amylose (Retrogradation), die für die Alterung während der Lagerung von Backwaren mitverantwortlich ist, verzögern [42]. Am größten ist dieser Frischhalte-Effekt aber bei Monoacylglyceriden mit gesättigten Ketten, da diese tiefer in die gestreckten Helixes passen [134]. Beim Backen von Waffeln wird der durch die Oberflächenbenetzung hervorgerufene Trenneffekt des Lecithins ausgenutzt. In Hefe-Weizenteigen verbessert das Lecithin die Dehnbarkeit des Klebers, was zu einer verbesserten Gärstabilität und zu einem höheren Volumen bei gleichmäßiger Porung führt [84]. Aufgrund ihrer erhöhten Hydrophilie können hydrolysierte Lecithine andererseits das Wachstum großer Eiskristalle bei der Gärunterbrechung hemmen und so Hefezellen und Klebnetzwerk vor mechanischer Beschädigung schützen [260]. In der Kosmetik hat der Einsatz der Liposomen-Technologie ab 1986 den Lecithinen zu einem bahnbrechenden Einsatz verholfen. Der Erfolg der Liposomen ist darauf zurückzuführen, dass sie in der Lage sind, sowohl wasserlösliche als auch öllösliche Verbindungen einzukapseln.

Liposomen können große Wassermengen zwischen ihren Lipidschichten enthalten und so als Feuchtigkeitsspender dienen.

Reines Dipalmitoyl-PC ist in Wasser nicht molekular löslich, bildet aber ein Gel. Bei unter 40°C (T_m) und mehr als 20% Wasser liegen Gel und Wasser nebeneinander vor. Wird T_m überschritten geht das PC in eine mesomorph-laminare Phase über. Die Übergangstemperatur für das Gel als solches ist von der Wassermenge abhängig und liegt bei 1% über 80°C, fällt aber mit steigender Wassermenge (bis 20%) auf 40°C und bleibt dann konstant [30; Phasendiagramm]. Die CMC für Dipalmitoyl-PC beträgt $5 \cdot 10^{-10}$ M, die von lyso-1-Palmitoyl-PC nur 10^{-3} M [229]. Wenn man die mesomorph-laminare Phase des Dipal.-PC's (über T_m) in Mischung mit z.B. α -Tocopherol ultraschallbehandelt, bilden sich Vesikel von ca. 25nm Durchmesser, die die Komponenten der ursprünglichen Lösung einkapseln: Liposomen [229].

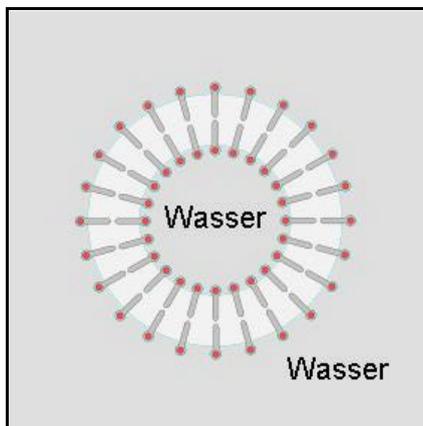


Abbildung 1.4 Phospholipidvesikel: Liposom

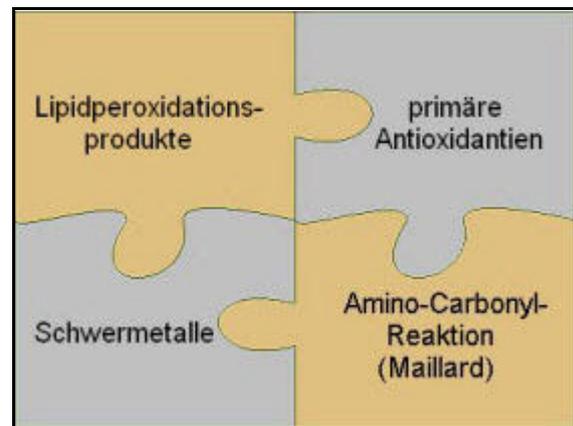


Abbildung 1.5 Phospholipide; komplexe Wechselwirkungen

Für die Stabilität und die Selbstorganisation der Liposome ist wichtig, dass die innere Membran weniger Moleküle enthält als die äußere. Beim Dipal.-PC ist dies gegeben, da die polaren Kopfgruppen weniger Platz beanspruchen als die Alkylketten. Zudem sind die zwitterionischen Kopfgruppen ineinander „verhakt“ [229]. Dazu ist Wasser notwendig, sein Gehalt spielt bei der selbstorganisierten Liposomenbildung eine entscheidende Rolle. Die Liposomen können im Innenraum mit polaren Stoffen beladen werden und innerhalb der Membran mit unpolaren Verbindungen, wie z.B. α -Tocopherol. Liposome schützen empfindliche Inhaltsstoffe und haben Aufgrund ihrer vielschichtigen Struktur eine langanhaltende Wirkung auf der Haut.

Nicht zuletzt sollen Lecithine die Lagerstabilität, etwa von kakaohaltigen Getränkepulvern oder Schokoladen erhöhen indem sie u.a. antioxidativ wirken [260]. Über welchen Mechanismus Phospholipide antioxidativ wirken, und ob sie überhaupt antioxidativ wirken, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist, dass Lecithine trotz ihres hohen Gehalts an Linolsäure und prooxidativen Schwermetallen (Fe, Cu) eine gute Lagerstabilität besitzen [149] und das sie die Wirkung von Antioxidantien synergistisch verstärken [37,38,183]. Die verschiedenen Wechselwirkungsmöglichkeiten der Phospholipide, die im Gesamtprozess des Fettverderbs von Bedeutung sind, wurden schematisch in Abb. 1.5 zusammengestellt.

Weng & Gordon [254] konnten 1993 zeigen, dass PE bei höheren Temperaturen in der Lage ist α -Tocopherylchinon zu α -Tocopherol zu regenerieren und vermuten, dass darauf der synergistische Effekt mit dem primären Antioxidans α -Tocopherol zurückgeht. Untersuchungen von Saito & Ishihara [205] aus dem Jahr 1997 belegen andererseits die Hydroperoxid-zersetzende Wirkung von Phospholipiden, die durch deren Basen-Komponenten verursacht werden soll. Ein dritter in der Literatur diskutierter Wirkungsmechanismus ist die Schwermetall-bindende Wirkung von Lecithinen. Sie ist in Sojaöl bei 60°C gegenüber Eisen bei PE und PA größer als bei PC und PI [256]. El-Tarras et al. [43] entwickelten bereits 1979 eine Hypothese, nach der Phosphatide Schwermetalle als zweizählige Chelat-Liganden maskieren. Allerdings lässt sich mit EDTA zwar die kupferkatalysierte Oxidation von Soja-PE hemmen [167], der Effekt wird jedoch nicht beim Soja-PC beobachtet [168]. Da die Kephaline im allgemeinen eine stärkere Wirkung als das eigentliche Lecithin (PC) entfalten, ist auch versucht worden die Bräunungsreaktionen dieser Amino-phospholipide mit dem stabilisierenden Effekt in Verbindung zu bringen [102,92]. Hierbei ist zwischen einer oxidativen Bräunung, die auf die Reaktion mit Lipidperoxidationsprodukten zurückgeht und der Amino-Carbonyl-Bräunung mit Kohlenhydraten im Sinne der Maillard-Reaktion zu unterscheiden:

Von Pokorný und Janíček et al. [233] wurde die oxidative PE-Bräunung in drei Stufen unterteilt: (1) Entstehung von Hydroperoxiden, (2) Reaktion der sekundär gebildeten Aldehyde mit der Aminogruppe des PE's zu Schiff-Basen und (3) Polykondensationsreaktionen der Schiff-Basen – bzw. Schiff-Basen mit Aldehyden – zu braunen Pigmenten. Nach Pokorný und Janíček et al. [44] können die Bräunungsprodukte Eisen- und Kupfer-Ionen inaktivieren. Sie zeigten aber auch, dass die Schwermetall-bindung allein nicht für die hohe stabilisierende Wirkung verantwortlich sein kann. Husain et al. [102] haben in den 90er Jahren die Bräunung von Dipalmitoyl-PE bzw. -PC und Eigelb-PE bzw. -PC mit deren Wirkung auf Methylchlorid bei 50°C verglichen. Die Dipalmitoylderivate zeigten nur einen geringen Effekt und auch keinen Synergismus mit α -Tocopherol. Die Ei-Phospholipide als solches erwiesen sich als prooxidativ, jedoch beobachteten sie nach Erhitzung auf 180°C – sowohl bei PC als auch PE – einen antioxidativen Effekt. Sie schlussfolgern, dass der Effekt auf die Bräunung der ungesättigten Strukturen zurückgeht und dass die Basenkomponenten der Phospholipide keinen Einfluss haben. Nach neueren Untersuchungen von Hidalgo et al. [92] entwickelt leicht oxidiertes Soja-PE (200ppm) in Sojaöl bei 60°C im Gegensatz zu nativem PE eine antioxidative Wirkung. Der Effekt tritt bei PC und PI nicht auf und wird auf die durch Beteiligung der Aminogruppe gebildeten antioxidativen heterocyclischen Pyrrol-Verbindungen zurückgeführt.

Bezüglich der Maillard-Bräunung von PE ist bekannt, dass in sprühgetrocknetem Eigelb und den daraus gewonnenen Lecithinprodukten ca. 1/4 der im Eigelb enthaltenen Glucose als Amadori-PE vorliegt [239]. Lederer et al. [142] beschrieben 2001 eine prooxidative Wirkung von Amadori-PE, die auch unter Abwesenheit von Fe^{3+} bzw. Cu^{2+} auftritt, und nehmen an, dass die Glykierung der Aminophospholipide mitverantwortlich ist für den oxidativen Stress an Membranen von Diabetes-Patienten. Nach Miyazawa et al. [180] reduziert das Amadori-PE Fe^{3+} zu Fe^{2+} , welches dann prooxidativ wirkt.

1.2. Problemstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, ob Phospholipide antioxidative Eigenschaften besitzen bzw. unter welchen Bedingungen sie antioxidative Eigenschaften entwickeln. Es soll versucht werden einen Mechanismus zu formulieren, der die antioxidativen Effekte der Phospholipide erklärt. Ausgehend vom Literaturstand der Erkenntnisse sollen dazu die *Schwermetall-Inaktivierung*, die *Reaktion mit Lipidperoxidationsprodukten*, der *synergistische Effekt mit primären Antioxidantien* und die *Maillard-Bräunung* untersucht werden.

Neben der komplexen Zusammensetzung der Pflanzenlecithine besteht die wesentliche Schwierigkeit der Arbeit darin, dass sich die verschiedenen Wechselwirkungsmöglichkeiten der Phospholipide auf die Lipidperoxidation nicht separat betrachten lassen (vgl. S.13f). In den einzelnen Gliederungspunkten der Arbeit werden dazu die verschiedenen Wechselwirkungen jeweils in den Mittelpunkt gestellt. Der synergistische Effekt mit primären Antioxidantien soll am wichtigsten natürlichen Antioxidants, dem α -Tocopherol, untersucht werden. Die antioxidativen Eigenschaften der Phospholipide sollen über geeignete Modellsysteme anhand der thermischen Oxidation von Linolsäureethylester erfasst werden.

Es sollen ferner vergleichende Untersuchungen zu Zusammensetzung und antioxidativer Wirkung von Lecithinen aus verschiedenen Pflanzenquellen durchgeführt werden. Neben Soja- und Raps- wurde hierzu auch Sonnenblumenlecithin sowie hochangereichertes Soja-PC eingesetzt. Die anfängliche Idee, die besondere Eignung von Rapslecithin gegenüber Sojalecithin bezüglich der antioxidativen Wirkung herauszuarbeiten –auch im Hinblick auf den vermehrten Rapsanbau (Biodiesel) und den Einsatz der Gentechnik beim Sojaanbau– wurde aufgrund der sensorisch ungenügenden Eignung des Rapslecithins (Soloton-Geruch, bitter/kratziger Geschmack, dunkle Farbe) schnell aufgegeben.

Auch die praktische Anwendbarkeit von Sojalecithin als Antioxidants in Lebensmitteln soll überprüft werden. Ausgewählt wurden hierzu folgende Lebensmittel: handelsübliches Rapsöl bzw. Sojaöl, Butter, ein Buttergebäck und Kartoffelpüree-Pulver. Zudem soll ein Ausblick über weitere Anwendungsgebiete/ Forschungsansätze gegeben werden.

1.3. Untersuchungen und Ergebnisse – Grundbestimmungen

Wie unter Material und Methoden ausgeführt, wurde mit drei verschiedenen Sojalecithinen gearbeitet. SL1 wurde bei Fluka erworben, wo es unter dem Namen Asolectin vertrieben wird. Laut Katalog soll es etwa vergleichbare Gehalte an PC, PE und PI enthalten; 24% gesättigte Fettsäuren, 14% einfach ungesättigte Fettsäuren und 62% PUFA. SL2 und SL3 stammen von der Degussa AG, Hamburg (Degussa Texturant Systems, ehemals Lucas Meyer GmbH). SL2 ist ca. 4,5 Jahre alt (Kühlschranklagerung). SL3 wurde von Peter Köhler, Garching zur Verfügung gestellt. Gleiches gilt für das Raps- (RL) und Sonnenblumenlecithin (SoL). Hierbei handelt es sich um die gleichen entölten Lecithine mit denen Gerhard Helmerich [84] seine Backversuche durchgeführt hat. Von Degussa Texturant Systems wurde zudem Epikuron 200 bezogen; dies ist ein hochangereichertes Soja-PC (S-PC). Es hat eine gelbe Farbe und eine wachsartige Konsistenz. Nach Werksangabe enthält das Produkt mindestens 92% PC, ist mit 0,2% α -Tocopherol stabilisiert und speziell für den Einsatz in pharmazeutischen Präparaten konzipiert. Es eignet sich als Emulgator für die enterale und parenterale Ernährung, als Lösungsvermittler und Emulgator für Arzneimittel in wässrigen Lösungen und als Rohstoff zur Herstellung von Liposomen. Das α -Tocopherol wurde durch 4-fache Fällung aus Ether-Lösung mit Aceton entfernt. Der Wassergehalt der Lecithinpulver wurde mit Karl–Fischer–Titration ermittelt. Die Lipidklassen wurden nach Trocknung bei 40°C über Nacht mittels säulenchromatographischer Fraktionierung an Kieselgel bestimmt (7.2.10.). Die Phosphatide wurden mit NP-HPLC-UV vermessen (7.2.3.). Die Fettsäurespektren wurden nach

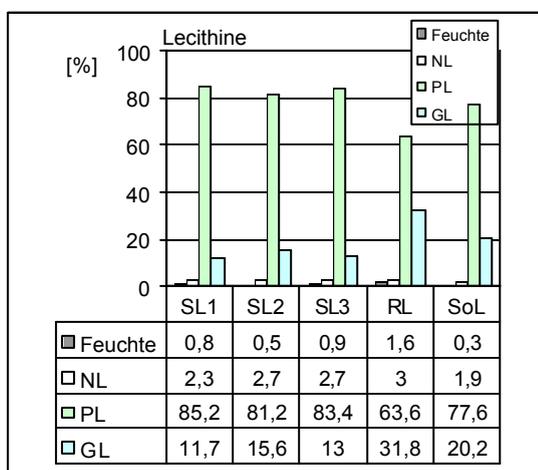


Abbildung 1.5 Lipidklassen und Wassergehalt im untersuchten Soja- (1-3), Raps- und Sonnenblumenlecithin

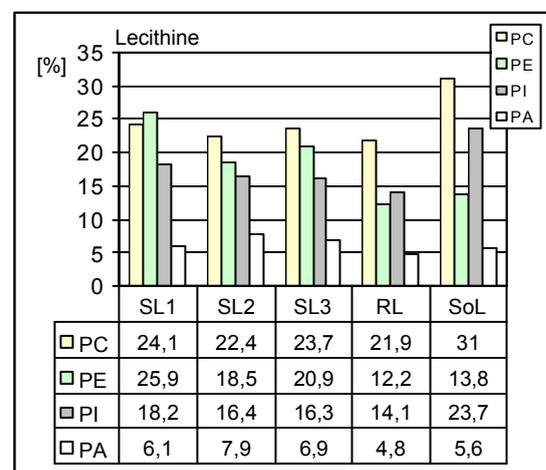


Abbildung 1.6 Phosphatidgehalte im untersuchten Soja- (1-3), Raps- und Sonnenblumenlecithin

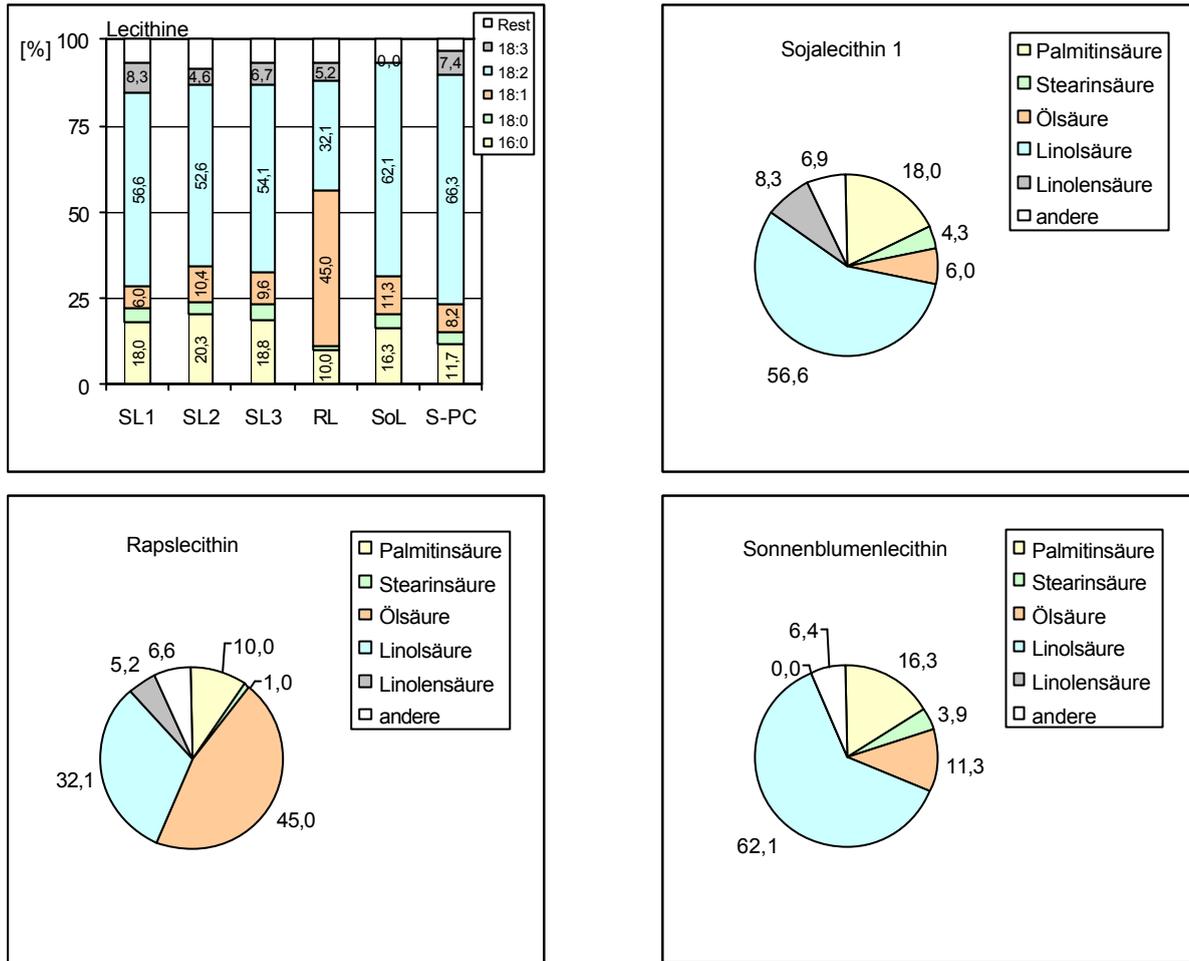


Abbildung 1.7 Fettsäurespektren der Lecithinproben

hochangereichertes Soja-PC	
PC	93,4 %
LPC	2,7 %
andere PL's	2,0 %
Wasser	0,3 %
Neutral-Öl	1,4 %
-Tocopherol	0,2 %
POZ	< 1 μmol O ₂ /g
Fe / Cu	0,8 / 0,52 ppm

Tab. 1.6 Zusammensetzung SPC (Epikuron200, Werksangaben), Fe und Cu nach 7.4.1.

	red. Zucker [%Gal..]	hydrol. Zucker [%Gal..]	POZ μmol O ₂ /g	ffa %	Fe ppm ± 0,1	Cu ppm ± 0,02
SL1	0,05	6,2	< 1	0,3	18,8	1,48
SL2	0,05	6,8	< 1	0,2	64,4	2,25
SL3	0,05	6,4	3	1,3	32,1	3,22
RL	0,1	6,3	< 1	0,5	15,6	4,26
SoL	< 0,01	5,9	< 1	0,2	20,0	3,15

Tab. 1.7 reduzierende Zucker, vor/ nach Inversion; Kennzahlen; Schwermetalle

Überführung in Methylester mit TMSH über GC-bestimmt (7.2.8.). Die reduzierenden Zucker wurden nach Luff-Schorl titriert. Die Hydrolysebedingungen der Glycolipide entsprachen der Saccharosebestimmung mit HCl (7.3.9.). Peroxidzahl und freie Fettsäuren wurden gemäß 7.3.1 und 7.3.3. titriert. Die Schwermetall-Bestimmung erfolgte mit AAS nach Veraschung und Salpetersäure/H₂O₂-Aufschluß (7.4.1.).

Bei der Lipidklassifizierung fällt auf, dass Rapslecithin mit ca. 30% einen hohen Gehalt an GL besitzt. Auch die Phospholipide aus Sonnenblumensaat enthalten mehr GL als Sojalecithin. Nach Helmerich [84] ist auch der Gehalt an Sphingolipiden (Ganglioside, Ceramide) erhöht. In den Phospholipid-HPLC wurde mit Sojalecithin-

Standards (Fluka) kalibriert. Da die Fettsäurezusammensetzungen der einzelnen Lecithine variieren, können bei der UV-Detektion (205nm) verschiedene Responsefaktoren auftreten, so dass es insbesondere zu Fehlern bei Raps- und Sonnenblumenlecithin kommen kann. Ein Vergleich der PL-Bestimmung über DC (Scan), HPLC und ^{31}P -NMR-Spektroskopie über Variationskoeffizienten findet sich bei Helmerich [84]. Wie gezeigt wird, liefern die einzelnen Methoden recht unterschiedliche Ergebnisse. Die Chromatogramme eingescannter DC's variieren in Abhängigkeit vom eingesetzten Sprühreagenz, welches im allgemeinen auch auf die Einzelverbindungen (Basenkomponenten, FS-Spektrum) verschieden anspricht. Die ^{31}P -Methode besitzt die höchste Varianz und wurde daher nicht eingesetzt. Alle untersuchten Lecithine enthalten unter 1% PS. Lyso-Phospholipide sind nur in kleinen Mengen vorhanden. Sie wurden hier nicht quantifiziert. Laut Helmerich liegen sie unter 2% [84]. Der PA-Gehalt liegt in allen Proben um 5%. Der hohe Gehalt an PC und PI im Sonnenblumenlecithin kann durch den höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren vorgetäuscht sein. Gleiches gilt für den geringen Gehalt an PC und PI im Rapslecithin, der wegen des hohen Gehalts an Ölsäure und des geringeren Gehalts an Linolsäure vermutlich zu klein bestimmt wurde. Andererseits wird die höhere Menge an PC und PI im Sonnenblumenlecithin auch über DC und NMR bestätigt [84]. Die Mengen an PE sind in Raps- und Sonnenblumenlecithin kleiner als im Sojalecithin. Diese beiden Lecithine zeigen auch eine stärkere Braunfärbung. Es ist bekannt, dass PE bei thermischer Behandlung bevorzugt (unter Bräunung) abgebaut wird [252]. Die Peroxidzahlen der Lecithine liefern keinen Hinweis auf Verderb. Die Schwermetallgehalte liegen im erwarteten Bereich. Auffällig ist die große Schwankungsbreite von Eisen in den Sojalecithinen. Der geringe Schwermetallgehalt im hochangereicherten Soja-PC erklärt sich über die chromatographische Reinigung. Die Pflanzenlecithine enthalten nur geringe Mengen an reduzierenden Zuckern (= 0,1%). Die Hydrolyse der Glycolipide mit HCl liefert dagegen zwischen 5,9 und 6,8% reduzierende Zucker (berechnet als Galactose). Die Fettsäurespektren zeigen, dass Sonnenblumenlecithin den höchsten Linolsäuregehalt besitzt. Interessanterweise enthält es aber keine Linolensäure. Rapslecithin ist das einzige der untersuchten Lecithine, in dem Ölsäure die Hauptfettsäure ist. Der relative Fehler der Bestimmungsmethode beträgt $\pm 1\%$.

2. Wechselwirkung mit prooxidativen Schwermetallen

2.1. Lipidautoxidation – Induktion und Katalyse

Der Radikalkettenmechanismus der nichtenzymatischen Lipidautoxidation wurde in den 50er Jahren von Farmer et al. [47], Bolland and Gee [19], und Bateman et al. [10] entwickelt. Die Primärprodukte der Reaktion ungesättigter Fette mit Sauerstoff sind Hydroperoxide.

Start	(1) RH	→	R	H
Kettenreaktion	(2) R	+ $^3\text{O}_2$	→	ROO
	(3) ROO	+ RH	→	ROOH R
Kettenverzweigung	(4) ROOH	→	RO	OH
	(5) 2 ROOH	→	ROO RO	H ₂ O
Kettenabbruch	(6) 2 R	→	R-R	
	(7) R	+ ROO	→	ROOR
	(8) 2 ROO	→	ROOR	O ₂

Abb. 2.1 Radikalkettenmechanismus der Lipidautoxidation

Substrat	k (R + S), [M ⁻¹ s ⁻¹]		
	ROO	RO	OH
Stearinsäure	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴	2,3 × 10 ⁶	~ 10 ⁹
Ölsäure	0,1 – 1	3,3 × 10 ⁶	~ 10 ⁹
Linolsäure	~ 60	8,8 × 10 ⁶	9,0 × 10 ⁹
Linolensäure	~ 120	1,3 × 10 ⁷	7,3 × 10 ⁹
Arachidonsäure	~ 180	2,0 × 10 ⁷	~ 10 ¹⁰
Aldehyde	2,7 × 10 ³	n.g.	~ 10 ⁹

Tab. 2.1 Geschwindigkeitskonstanten in Lösung bei Raumtemperatur [137]

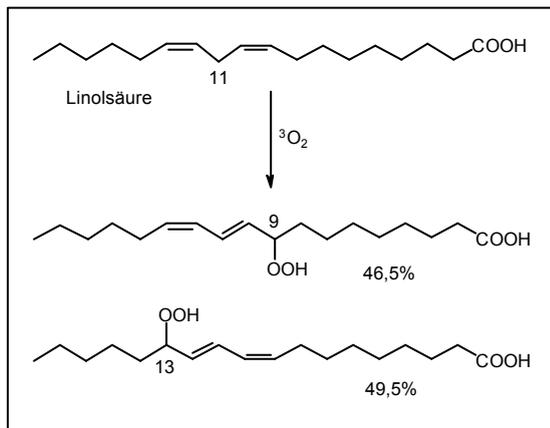


Abb. 2.2 Reaktion von Linolsäure mit Triplett-Sauerstoff [11]

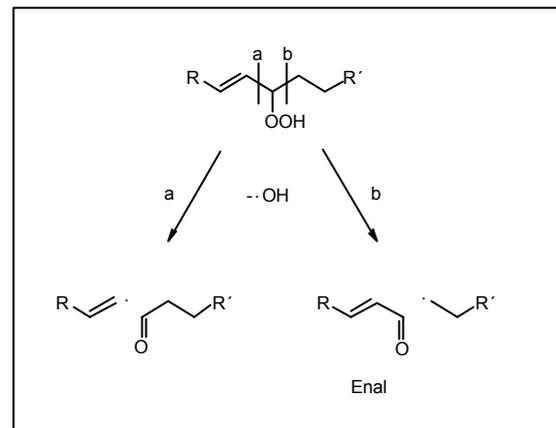


Abb. 2.3 -Spaltung von Hydroperoxiden [11]

Gestartet werden kann die Lipidperoxidation durch radioaktive Strahlung, UV-Strahlung, Mikrowellenstrahlung, Hitze, enzymatische Reaktionen, Schwermetalle, durch strahlenchemisch erzeugten Singulett-Sauerstoff (Typ I) oder durch direkte strahlenchemische Substratsensibilisierung (Typ II) [221]. Singulett-Sauerstoff entsteht auch beim Kettenabbruch nach dem Russell-Mechanismus [75]:



Die Kettenreaktion (2 und 3) befindet sich in der Induktionsperiode solange der Hydroperoxidgehalt gering ist [137,79]. Die Reaktion der freien Radikale mit

Sauerstoff (2) ist sehr schnell ($k_2 = 10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [11,78,113]), daher liegen bei Sauerstoffsättigung alle Fettsäureradikale als Peroxyradikale vor. Reaktion (2) ist ein Gleichgewicht. Im Fall der Linolsäure beträgt $K_2 = 1,3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}$ [209]. Bei geringem Sauerstoffgehalt liegen Pentadienylradikale (Ext.^{280nm}) neben Peroxyradikalen (Ext.^{233nm}) vor (1% O₂-Gehalt ca. 50%). Daher können das 9- und 13-Hydroperoxid der Linolsäure über reversible Anlagerung und Abspaltung von Sauerstoff isomerisieren [198]. Sie sind die Hauptprodukte der Reaktion von Linolsäure mit Triplett-Sauerstoff. Die 8-, 10-, 12- und 14-Hydroperoxide machen zusammen nur ca. 4% aus.

Peroxyradikale abstrahieren nur langsam H-Atome aus anderen Fettsäuremolekülen (3) mit $k_3 = 60 - 180 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sie reagieren damit deutlich langsamer als Alkoxy- oder Hydroxy-Radikale, vgl. Tab. 2.1. Ihr Redoxpotential beträgt 1,0 V (R \cdot ca. 0,6V; RO \cdot 1,6V; \cdot OH 2,31V) [112]. Das hat zur Folge, dass sie bei Temperaturen unter 60°C selektiv die am schwächsten gebundenen H-Atome abstrahieren. Dies sind die biallylische H-Atome (C11-Linolsäure: 272 kJmol⁻¹), bei deren Abstraktion 1,4 – Pentadiensysteme zurückbleiben und solche die Allylradikale hinterlassen (C11-Ölsäure: 322 kJmol⁻¹) [225]. Der Angriff auf gesättigte Fettsäuren (C11-Stearinsäure: 410 kJmol⁻¹) erfolgt erst über 60°C, und dann durch Alkoxy- bzw. Hydroxy-Radikale, die erst beim Zerfall der Hydroperoxide (4) entstehen. Interessant ist diesem Zusammenhang, dass die C10/C12-H-Atome der Linolsäure stärker (ca. 450 kJmol⁻¹) gebunden sind als solche in Methylgruppen (422 kJmol⁻¹)[225,11]. Die Energie die bei der Entstehung einer Wasserstoff-Sauerstoff-Bindung im Hydroperoxid frei wird beträgt demgegenüber nur ca. 379 kJmol⁻¹ [11]. Die H-Abstraktion (3) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Lipidautoxidation, in Verbindung mit der Geschwindigkeit des Kettenabbruchs (8) ($2k_8 = 10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ergibt sich die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses [3].

$$\frac{d\text{O}_2}{dt} = \frac{k_3 \text{RH} [\text{R}\cdot]^{1/2}}{2k_8^{1/2}} \quad (9)$$

Die Oxidationsgeschwindigkeiten von Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure verhalten sich bezüglich der Sauerstoffaufnahme wie 1 : 40-50 : 100 und bezogen auf die

Peroxidbildung wie 1 : 12 : 25 [223]. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional der Anzahl der biallylischen H-Atome im Molekül (Tab. 2.1). Die Reaktion mit angeregtem Singulett-Sauerstoff (92 kJmol^{-1}) [11] ist im Vergleich dazu etwa um den Faktor 10^4 schneller [163]. Durch direkte „Cyclo“-Addition an Doppelbindungen bilden sich im Falle der Linolsäure die 9- und 10- bzw. 12- und 13- Hydroperoxide (konjugierte entstehen in doppelter Menge; 32% : 17% : 17% : 34), die durch ihren Zerfall die Lipidautoxydation starten [55].

Die O-O-Bindung der Hydroperoxide ist mit 184 kJmol^{-1} [12,87] relativ schwach, aber Gleichung (4), die zu den stark oxidierenden RO- und OH-Radikalen führt, ist daher endergonisch und spielt keine große Rolle. Die bimolekulare Reaktion (5) ist energetisch günstiger und wird durch Übergangsmetallionen (Fe, Cu, Mn, Cr, Ni, V, Zn, Al) katalysiert.



Einmal begonnen, wird die Geschwindigkeit der gesamten Lipidperoxidation durch den Abbau von Hydroperoxiden in hochreaktive und unselektive RO- und OH-Radikale bestimmt, die nun wiederum die Reaktionsrate autokatalytisch beschleunigen können. Man spricht bei der Kettenverzweigung auch von sekundärer Initialisierung [45]. Schwermetalle haben in ihrer kleineren Oxidationsstufe eine stärkere Beschleunigungswirkung [69], da hier die aggressiven Radikale entstehen. Die Reaktion von Fe^{2+} mit Wasserstoffperoxid ($\text{R}=\text{H}$), die zu OH-Radikalen und Hydroxid-Ionen führt, ist auch unter dem Namen Fenton-Reaktion bekannt [49]. Die Reaktion ist pH-abhängig und läuft im Sauren schneller (Tab. 2.2)[161].

Schwermetall-Ion	$k_{\text{rel.}}$	
	pH 7	pH 5,5
Fe^{3+} (Bezug)	1	10^2
Fe^{2+}	14	10^3
Cu^{2+}	0,2	1,5
Co^{3+}	6×10^2	1
Hämatin	4×10^3	4×10^4
Methämoglobin	5×10^3	$7,6 \times 10^3$
Cytochrom C	$2,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$

Tab. 2.2 Zersetzung von Linolsäurehydroperoxid emulgiert in einem Puffer bei 23°C [11]

Schwermetall	Konzentration [ppm]
Eisen	0,6
Kupfer	0,05
Mangan	0,6
Chrom	1,2
Nickel	2,2
Vanadium	3,0
Zink	19,6
Aluminium	50,0

Tab. 2.3 Halbierung der Haltbarkeit von Schweineschmalz bei 98°C durch Schwermetalle [69]

Samenöle enthalten 1 – 10 ppm Eisen und 0,001 – 0,01ppm Kupfer [31]. Kupfer wirkt stärker prooxidativ als Eisen (Tab. 2.3). Die Gehalte an Schwermetallen werden durch die Öl-Raffination gesenkt [31]. Die Zersetzung von Hydroperoxiden durch Eisen-(II)-Ionen ($1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [75] ist schneller als durch Eisen(III) [11,122,160].

Bei Eisen-(III)-Ionen wird auch die direkte Initialisierung der Lipidperoxidation durch H-Abstraktion aus ungesättigten Fettsäuren diskutiert.



Für Methylolinolat ist dieser Prozess exotherm (-63 kJmol^{-1}) [82]. Eisen(III) baut auch phenolische Verbindungen, wie etwa Caffee-Säure, im Olivenöl ab und mindert die oxidative Stabilität des Öls [117]. Es ist unklar, ob redox-aktive Übergangsmetalle die Lipidperoxidation direkt durch die Ausbildung von Metall-Lipid-Komplexen starten, oder durch die Generierung von Hydroxy-, Peroxy- oder Alkoxy-Radikalen.

Schwermetalle können auch mit Triplett-Sauerstoff wechselwirken und Peroxy-Anionen erzeugen [32], diese reagieren mit Peroxiden zu Hydroxylradikalen und Singulett-Sauerstoff (Haber-Weiss-Reaktion) [99,118]:



Für die stark prooxidativen Cu^{2+} -Ionen wird die Bildung von Komplexen mit zwei Hydroperoxid-Molekülen: $\text{CuX}_2[\text{ROOH}]_2$ angenommen [192], aus denen unter Abspaltung von Hydroperoxy-Radikalen Cu^+ -Ionen und H^+ -Ionen ($\text{CuX}[\text{ROOH}]$, HX) entstehen. Das Cu^+ überträgt sein Elektron dann auf das zweite Hydroperoxid-Molekül, wobei das Alkoxy-Radikal und das Kupferhydroxid $\text{CuX}(\text{OH})$ entstehen. Unter Bildung von Wasser wird das Kupfersalz (CuX_2) regeneriert.

Die Bildungsrate neuer Startradikale ist bei hinreichend kleinen Konzentrationen proportional der Hydroperoxidkonzentration und der Metallionenkonzentration. Nach Gleichung (9) ist die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion [103]:

$$\frac{d\text{O}_2}{dt} = k [\text{RH}] [\text{ROOH}]^{1/2} [\text{M}]^{1/2} \quad (10)$$

Trägt man den Logarithmus der Sauerstoffaufnahme gegen den Logarithmus der Metallionenkonzentration auf, ergibt sich im Idealfall eine Gerade mit dem Anstieg $\frac{1}{2}$. Die Abnahme der Induktionsperiode ist dem Logarithmus der Metallionenkonzentration proportional [196].

$$I_0 \propto \text{blg}[M] \quad (11)$$

Schwermetalle können die auftretenden Radikale auch zu Carbonylverbindungen abbauen und so antioxidativ wirken [192]. Die Reaktion mit dem Alkoxy-Radikal, in der das Schwermetall reduziert wird, spielt hier die größere Rolle.



Die entstehenden Carbonyle tragen wesentlich zur Ranzigkeit bei. In geringen Konzentrationen wirken Schwermetallionen prooxidativ, dabei spielt es keine Rolle ob sie als Chloride, Sulfate, Oxide, Hydroxide oder Fettsäuresalze vorliegen [192]. Ob bei höheren Konzentrationen pro- oder antioxidative Effekte dominieren, hängt neben der Art des Metalls auch vom Sauerstoff-Gehalt ab. So sind 50 ppm Kupfer in mit Wasser emulgierter Linolsäure bei 1% Sauerstoff stark antioxidativ, während sie unter atmosphärischen Bedingungen (21% Sauerstoff) prooxidativ sind [154]. Eisen ist in höheren Konzentrationen (2 – 50 ppm) stärker prooxidativ als Kupfer (2 – 10 ppm) [27]. Der prooxidative Effekt der Schwermetalle hängt von der Stabilität der gebildeten Hydroperoxidkomplexe ab, die von der Polarität des Lösungsmittels und der damit verbundenen Micelbildung beeinflusst werden. Emulgierte Linolsäure bildet unter Cu-(II)- bzw. Fe-(II)-Katalyse vermehrt das 13-Hydroperoxid, während im homogenes Methyllinolat-System 9- und 13-Hydroperoxid zu fast gleichen Anteilen entstehen [28]. Durch die Ausbildung von fettunlöslichen Hydraten verlieren Metallionen bei Anwesenheit von Wasser in der Regel ihre prooxidativen Eigenschaften. Hämoglobin und Myoglobin andererseits sind starke Prooxidantien in wässrigen Lösungen oder Emulsionen (Tab. 2.2), aber in unpolaren Medien wie Ölen sind sie praktisch inaktiv [192]. Bei der oxidativen Decarboxylierung treten polare Carbonsäuren in Metall-Hydratkomplexen als Ersatz für ein Wassermolekül an das

Schwermetall, das sie unter Aufnahme eines Elektrons reduzieren und dabei selbst CO_2 abspalten. Der Elektronen-Transfer lässt sich durch stark gebundene Liganden, wie etwa EDTA, verhindern. EDTA maskiert Schwermetallionen durch die Bildung thermodynamisch stabiler Komplexe und verhindert so die Hydroperoxid-Zersetzung. Andere Chelat-Bildner sind α -Hydroxycarbonsäuren wie Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure und Weinsäure, sowie deren fettlösliche Monoglyceridester, Phosphorsäure und Polyphosphate. Citronensäure (100ppm) inaktiviert effektiv Spuren (3ppm) von Cu(II), Mn(II) oder Cr(III), wirkt jedoch kaum auf Fe(III) und Co(II) [164]. Die Komplexbildung mit Eisen ist im Bereich zwischen 0,3 – 15 ppm konzentrationsabhängig, auch der Gehalt des gelösten Sauerstoffs spielt eine Rolle [164]. Der Effekt von Phosphorsäure ist seit längerem bekannt, sie wird bei der Raffination der Samenfette eingesetzt um die oxidative Stabilität zu verbessern. Während Phosphate praktisch inaktiv sind, zeigen Oligophosphate gute Metallbindungseigenschaften. Vom Diphosphat zum Hexametaphosphat nimmt die Stabilität der Komplexe zu [248]. Chelatbildner sind in der Lage die Wirkung von phenolischen Antioxidantien synergistisch zu verstärken. 100 ppm Citronensäure verstärkt die Wirksamkeit von 100 ppm Laurylgallat in Anwesenheit von 0,2 ppm Cu bzw. 2 ppm Fe um den Faktor 5; 100 ppm Phosphorsäure hingegen zeigt den gleiche Effekt bei Kupfer, ist bei Eisen aber inaktiv [11]. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Auch Phospholipide [51,256] und Maillard-Reaktionsprodukte [115] werden als Chelat-Bildner diskutiert. Nach Min et al. [256] wirken 5 –10 ppm Phospholipid in Sojaöl antioxidativ, höhere Gehalte wirken prooxidativ. Phospholipide senken die Oberflächenspannung des Öls und erleichtern so die Diffusion von Sauerstoff. Der prooxidative Effekte von 300 ppm Phosphatiden wird nicht beobachtet wenn gleichzeitig 1 ppm Eisen im Öl vorhanden ist, hier wirken die Phospholipide vielmehr antioxidativ. Phosphatidsäure und Phosphatidylethanolamin zeigen in Sojaöl mit 1 ppm Eisen bei 60°C, im Dunkeln die stärkste antioxidative Wirkung, gefolgt von Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinosit [256].

Die Autoxidation ungesättigter Phospholipide wird insbesondere von Fe^{3+} initialisiert. Das Fe(III) bindet an die freien Phosphatgruppen und ist so verfügbar für die katalytische Hydroperoxidzerersetzung. Morrill et al. [169] beobachteten den Effekt in Phospholipiden mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Phospholipide mit einfach

ungesättigten Fettsäuren wurden jedoch nicht oxidiert. Auf die Bedeutung des Fettsäurespektrums des betreffenden Öls im Bezug zu den antioxidativen Eigenschaften der Phospholipide wird auch von Nwosu et al. [178] hingewiesen. Danach zeigen Phospholipide in Lachsöl antioxidative Eigenschaften, nicht aber in Heringsöl. Letzteres enthält aber nur etwa halb soviel mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Mit EDTA lässt sich die kupferkatalysierte Oxidation von PE hemmen [167], der Effekt wird jedoch nicht mit PC beobachtet [168].

2.2. Ein- und mehrzählige Komplexe

Es gibt in der Literatur keine eindeutigen Hinweise auf die Bildung stabiler (maskierender) Phospholipid-Schwermetallkomplexe. Versetzt man eine ethanolische Sojalecithin-Lösung mit einigen Tropfen 1%-iger ethanolischer CuCl_2 -Lösung, so fällt ein Niederschlag aus. Von El-Tarras et al. [43] werden hypothetisch zweizählige Komplexe angenommen.

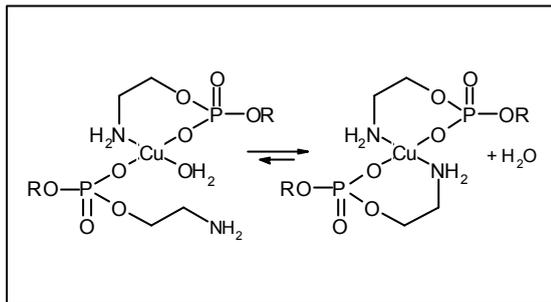


Abb. 2.4 CuPE_2 zweizähliger Komplex [43], kinetischer und entropischer Chelateffekt

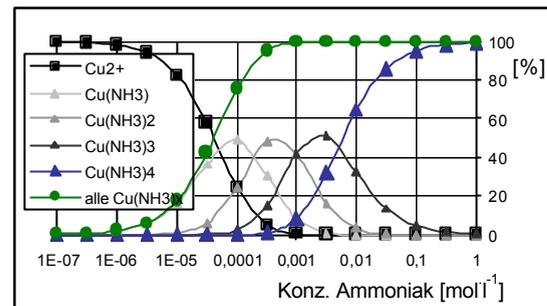


Abb. 2.5 Existenzbereiche der 4 Kupferamin-Komplexe

Auch Ca^{2+} bildet mit Lecithinen schwerlösliche Salze [185]. Sie sind ein nicht unwesentlicher Bestandteil von Gallensteinen, lassen sich aber im Reagenzglasversuch nicht herstellen. Calcium- und Magnesium-Salze erschweren die Analytik der Phospholipide [84]. Auch Schiffbasen-Strukturen, die sich aus PE bei Reaktion mit reduzierenden Zuckern in der frühen Phase der Maillard-Reaktion bilden, sollen mit Cu^{2+} -Ionen Komplexe bilden [44,146]. Besonders stabil sind die Kupfer- und Eisenkomplexe von 3-Hydroxy-4-pyridinon-Strukturen, die bei der Maillard-Bräunung entstehen [217]. Fe^{3+} bildet mit ihnen 1:3 Komplexe.

Allgemein gilt, dass mehrzählige Komplexe stabiler sind als solche einzähliger Liganden. Dieser sogenannte Chelateffekt hat zwei Ursachen. Kinetisch erhöht die Anbindung einer Bindungsstelle eines mehrzähligen Liganden an ein Zentralatom gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit für die Wechselwirkung mit den weiteren Bindungsstellen. Analog ist der Zerfall eines mehrzähligen Schwermetallkomplexes kinetisch erschwert. Thermodynamisch führt der Austausch von einzähligen Liganden durch zwei- oder mehrzählige darüberhinaus zu mehr frei beweglichen Teilchen in der Lösung und damit zu einem Entropiegewinn. Wenn Schwermetallkomplexe farbig sind, lassen sich Komplexbildungskonstanten photometrisch bestimmen. In wässrigen Lösungen kann die Komplexbildung auch über den pH-Wert (frei werdende H^+) oder die Potentialdifferenz zweier entsprechender Halbzellen (Nernstgleichung) verfolgt

werden. Die Komplexbildungskonstante K_B (Bruttokomplexbildungskonstante) ist das Produkt aller Konstanten der Einzelreaktionen. Für den Kupfertetramindiaqua-Komplex $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ z.B. [107]:

$$K_B = K_1 K_2 K_3 K_4 = 10^{4,3} \cdot 10^{3,7} \cdot 10^3 \cdot 10^{2,3} = 10^{13,3} = 2 \cdot 10^{13} \text{ l}^4 \text{ mol}^{-4}$$

Mit zunehmender Ligandenanzahl werden die Einzel-Konstanten im allgemeinen kleiner. In welchem Verhältnis die verschiedenen stöchiometrischen Komplex-Spezies vorliegen ist nicht von der Konzentration des Zentralions abhängig, sondern wird nur von der Konzentration des freien Liganden bestimmt.

$$\text{Anteil MeL}_n[\%] = \frac{K_n [\text{L}]^n}{1 + K_1 [\text{L}] + K_2 [\text{L}]^2 + \dots + K_n [\text{L}]^n} \cdot 100 \%$$

Bei einer freien Ammoniak-Konzentration $[\text{L}]$ von $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ liegt praktisch kein freies Cu^{2+} mehr vor, sondern es liegt zu 0% Monoamin-, 3,2% Diamin-, 32,3% Triamin- und 64,4% Tetramin-Komplex vor. Wie man in Abb. 2.5 sieht, ist die Komplexbildung von $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ eine ausgesprochene Stufenreaktion. D.h. obwohl man bei der Titration von Cu^{2+} mit NH_3 durch das große K_B einen deutlichen Sprung am Äquivalenzpunkt erwarten würde, tritt dieser in Wirklichkeit nicht auf. Anders sieht das bei den Chelatkomplexen mit Ethylendiamin oder EDTA aus. Der Bis-ethylendiamin-Kupfer-Komplex $[\text{Cu}(\text{en})_2]^{2+}$ hat ein K_B von $0,5 \cdot 10^{20} \text{ l}^2 \text{ mol}^{-2}$; der Cu-EDTA-Komplex $[\text{CuEDTA}]^{2-}$ ein K_B von $10^{18,8} \text{ l mol}^{-1}$ [107].

Die Stabilität von Komplexen ist stark vom pH-Wert abhängig. Im allgemeinen ist die Stabilität der Komplexe kleiner je saurer die Lösung ist. Im Sauren liegt z.B. Ammoniak als Ammoniumsalz vor. Die Gleichgewichtskonstante K der Reaktion von Cu^{2+} mit Ammonium (zum Tetramin-Komplex und 4 H^+) ergibt sich aus der Säure/Basenkonstante ($\text{p}K^{\text{B}}_{\text{Ammoniak}} = 4,75$; $\text{p}K^{\text{S}}_{\text{Ammonium}} = 9,25$ [107]):

$$K = 10^{13,3} (10^{9,25})^4 = 10^{23,7}$$

In saurer Lösung existiert der Komplex nicht, da seine Bildungskonstante zu klein ist. Umgekehrt führt die hohe Stabilität der Chelat-Komplexe dazu, dass das Kation aus dem protonierten Liganden das H^+ freisetzt. Mischt man bei pH 7 bsw. Cu^{2+} mit EDTA, so wird die Lösung sauer (EDTA: $\text{p}K^{\text{S}1} = 10,26$, $\text{p}K^{\text{S}2} = 6,16$, $\text{p}K^{\text{S}3} = 2,67$, $\text{p}K^{\text{S}4} = 2,0$ [107]). Aus der EDTA werden 2 H^+ freigesetzt:

K $10^{18,8}$ $10^{10,26}$ $10^{6,16}$ $10^{2,38}$

Natürlich ist auch $[\text{CuEDTA}]^{2-}$ in angesäuerter Lösung weniger stabil. Neben dem Maskierungseffekt haben die Liganden auch ganz allgemein einen Einfluß auf das Redoxpotential des Zentralatoms bzw. -ions. Der Effekt rührt daher, dass die Liganden verschieden stabile Komplexe mit der oxidierten bzw. reduzierten Form eines Metalles bilden. Das Standard-Redoxpotential von $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ beträgt 0,771V [97]. Mit o-Phenanthrolin (phen, Ferroin) bilden sowohl Fe^{3+} als auch Fe^{2+} chirale oktaedrische 1:3-Komplexe.

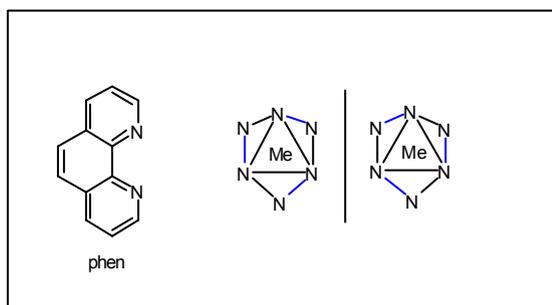


Abb. 2.6 optisch aktive o-Phenanthrolin-Komplexe

Schwermetall	Redoxpotential [V]
$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+} / [\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$	1,15
$[\text{Fe}(\text{bpy})_3]^{3+} / [\text{Fe}(\text{bpy})_3]^{2+}$	0,96
$\text{Fe}^{3+} \text{ aq} / \text{Fe}^{2+} \text{ aq}$	0,77
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}$	0,36
Hämoglobin	0,17
Myoglobin	0,05
Cytochrom a	0,40
Cytochrom c	0,26
Cytochrom b	0,04
Rubredoxin	-0,06
Bakterienferredoxin	-0,42

Tab. 2.4 Redoxpotentiale einiger Eisenkomplexe [97,107]

$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ ist rot und stabiler ($K_B = 10^{20,7}$) als das blaue $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}$ ($K_B = 10^{14,4}$) [107]. Bei Austausch von aq gegen phen erhöht sich das Oxidationspotential:

$$E = E^0 - \frac{0,059 \text{ V}}{n} \lg \frac{[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}}{[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{3+}} = 0,77 \text{ V} - 0,059 \text{ V} \lg \frac{10^{14,4}}{10^{20,7}} = 1,15 \text{ V}$$

Liganden die andererseits Fe^{3+} viel stärker binden als Fe^{2+} – wie z.B. Fluorid oder Cyanid – erniedrigen das Redoxpotential. Eisen(III) ist in der Lage Iodid zu Iod zu oxidieren. Durch Zugabe von Fluorid fällt das Redoxpotential von anfänglich 0,771V unter das von Iod/Iodid ($E^0 = 0,54 \text{ V}$) und die Oxidation findet nicht mehr statt [97]. Für der Lipidperoxidation heißt das, dass Schwermetalle entweder durch stabile Komplexe mit mehrzähligen Liganden (wie EDTA) direkt maskiert werden können, oder andererseits durch Verschiebung des Redoxpotentials sowohl aktiviert als auch inaktiviert werden. Neben den Komplexbildungseigenschaften der Phospholipide als solches, sind auch die Effekte von Reaktionsprodukten, insbesondere beim PE, von Interesse. So bildet bsw. das Maillard-Reaktionsprodukt Maltol nur zweizählige Komplexe, während das -Amino-Lysin-analoge Produkt Maltosin dreizählige Komplexe bildet [217].

2.3. Untersuchungen und Ergebnisse

2.3.1. Phosphatid-Standards – 1%ig in Ethyllinolat bei 60°C

Die Wirkung der einzelnen Phosphatide auf Schwermetalle wurde mit Hilfe der Dipalmitoyl-Standard-Verbindungen (PC, PE, PI, PA) an Ethyllinolat bei 60°C untersucht. Die direkte Untersuchung der Pflanzenlecithine liefert aufgrund des unterschiedlichen Anfangsschwermetallgehalts keine aussagekräftigen Ergebnisse [165]. Hier wäre eine Abtrennung der Schwermetalle über Säulenchromatographie –z.B. an Kieselgel– notwendig [5,232]. Um einen Vergleich zu haben, wurde aber auch die Wirkung von zusätzlichen Metallionen auf SL1 bestimmt. Als Schwermetalle wurden wegen der praktische Relevanz Eisen und Kupfer ausgewählt. Eisen wurde als $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ und Kupfer als $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{-COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ in ethanolischer Lösung zu einer 0,1g/ml Ethyllinolat-Lösung (Chloroform/Methanol 3+1) zugesetzt. Vorher wurde das entsprechende Phosphatid in einer Menge von 1% –bezogen auf das EL– zugegeben (333µl einer 3000µg/ml-Lösung in Chloroform/Methanol 3:1). Von der 0,1g/2ml Ethyllinolat Lösung wurden je 100µl in 1,5ml-Vials pipettiert (13 Vials a 5mg EL/Vial). Nach Vertreiben des Lösungsmittels am Stickstoffstrom wurde bei 60°C für 12h gelagert und stündlich der Verderb über die Extinktion bei 233nm verfolgt. Dazu wurde je Vial 1ml Hexan zugegeben und 200µl in der 1cm-UV-Küvette mit 1800µl Hexan auf 2ml aufgefüllt (1mg EL/2ml) und bei 233nm vermessen. Die Extinktion an der Stelle t_0 liegt ohne Metallzugabe üblicherweise im Bereich 0,7 – 0,9 und steigt nach 12h bei 60°C nur um ca. 0,05. Die kritische Peroxidkonzentration, bei deren Erreichen die autokatalytische Verderbsphase startet, liegt zwischen Extinktion: 1,2 – 1,4. Innerhalb von 1-2h steigt die Extinktion dann auf über 2,5. Als kritische Schwermetall-Konzentration für den Versuch wird willkürlich die Metallionen-Konzentration definiert, die nach 10h bei 60°C einen Verderb verursacht (Extinktion >1,4). Dadurch wird ein Vergleich der Eisen- und Kupfer-inaktivierenden Wirkung der einzelnen Phospholipide möglich, ohne die Messzeit verlängern zu müssen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Bei der Arbeit mit Ethyllinolat treten prinzipiell zwei Probleme auf, die an dieser Stelle kurz beschrieben werden sollen.

a.) Alterung

Bei der Lagerung von Ethyllinolat tritt in Abhängigkeit der Temperatur mehr oder weniger schnell der oxidative Verderb ein. Im oberen Versuch äußert sich der Verderb im Anstieg der Extinktion an der Stelle t_0 . Da die kritischen Metallkonzentrationen mit steigendem „Vorverderb“ abnehmen, muss der Frische des Ethyllinolats besondere Beachtung geschenkt werden. Im allgemeinen reicht es, das Linolat bei $< 4^\circ\text{C}$ unter Stickstoff aufzubewahren und strikt Kontaminationen zu vermeiden. Um einen Vergleich der Wechselwirkungen der einzelnen PL mit verschiedenen Schwermetallen zu ermöglichen, müssen alle Versuche mit der gleichen Charge Ethyllinolat durchgeführt werden.

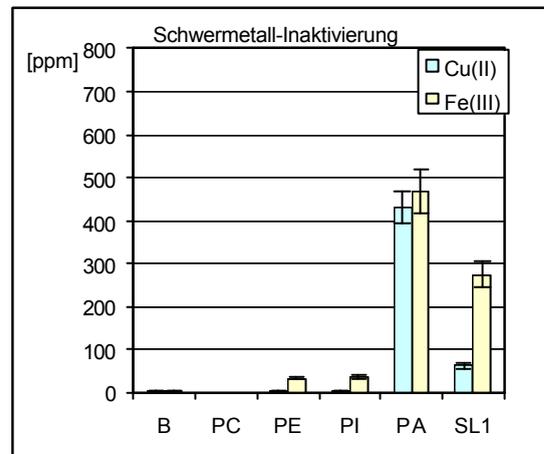
b.) Glaseffekte

Es wurden farblose und braune 1,5ml-Vials aus Duranglas verwendet, die aus Bor-Aluminium-Silikaten bestehen. Die braunen Gefäße haben den Vorteil, dass der lichtinduzierte Verderb unterdrückt wird. Andererseits wird die Braunfärbung durch tempern mit einer Paste aus Mangan und Eisenoxiden erreicht. Tatsächlich lässt sich über das Kochen der Gefäße mit NaOH na chemisch eine Mangan und Eisenlöslichkeit zeigen. Interessanterweise zeigen aber auch neue Weißglas-Vials prooxidative Effekte. Diese müssen mit der Beschaffenheit der Glasoberfläche zu tun haben. So ist bekannt, dass z.B. Aceton sehr stabil als Acetal an der Silikat-Oberfläche gebunden werden kann [207]. Es wurden daher alle Versuche mit den gleichen Vials durchgeführt. Sie werden in der Laborglas-Spülmaschine gespült und bei 550°C für 2h geätzt, nochmals nur mit dest. Wasser (ohne Spülmittel) gespült und wieder geätzt.

Phosphatid	Cu^{2+} [ppm]	Fe^{3+} [ppm]
Blindwert	$1,4 \pm 0,2$	$3 \pm 0,4$
Dipal.-PC	$< 0,1 \pm 0,04$	$< 0,1 \pm 0,06$
Dipal.-PE	$2,5 \pm 0,3$	$32 \pm 3,8$
Dipal.-PI	$3 \pm 0,3$	$37 \pm 4,1$
Dipal.-PA	430 ± 35	465 ± 45
SL1	$62 \pm 5,5$	275 ± 25

Tab. 2.5 kritische Metall-Konzentration (EL/1%PL, 10h, 60°C)

Phosphatid	K_{CuPL_2} [$\text{l}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$]	$K_{[\text{FePL}_2]^+}$ [$\text{l}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$]
Dipal.-PA	$3,0 \cdot 10^8 \pm 2,7 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8 \pm 2,9 \cdot 10^8$
Dipal.-PI	$7,5 \cdot 10^3 \pm 2,5 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^4 \pm 2,0 \cdot 10^4$
Dipal.-PE	$4,0 \cdot 10^3 \pm 2,0 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^4$

Tab. 2.6 K_B hypothetischer MePL_2 -KomplexeAbb. 2.7 kritische Metall-Konzentration (EL/1%PL, 10h, 60°C)

Mit Dipal.-PC lassen sich Spuren von prooxidativem Cu^{2+} bzw. Fe^{3+} nicht inaktivieren, im Gegenteil die Schwermetalle werden sogar aktiviert (prooxidativ). Dipal.-PE und -PI sind nahezu inaktiv und zeigen nur eine schwache Maskierungswirkung. Ihre Wirkung auf Eisen ist etwa um den Faktor 10 größer, als die auf Kupfer. Die freie Phosphatidsäure zeigt als einzigstes Phospholipid eine deutliche Inaktivierungswirkung. Sie ist für Kupfer und Eisen im Rahmen der Fehlergrenzen gleich. Sojalecithin 1 (SL1, Asolectin) inaktiviert Eisen besser als Kupfer. Diese Beobachtung muss mit dem Eigengehalt an Schwermetallen in Verbindung stehen

(vgl. Abs. 1.3.). Interessant ist, dass die Menge an Eisen, die inaktiviert wird, größer ist als bei den Einzelkomponenten ermittelt. Ein Umstand, der sich möglicherweise aus den Bräunungs-Reaktionen des PE's oder einer GL-Schwermetall-Affinität ergibt. Andererseits muss beachtet werden, dass der Effekt auch durch Begleitstoffe (Antioxidantien) oder Begleiterscheinungen vorgetäuscht sein kann. So bewirkt z.B. 0,05% α -Tocopherol im Ethyllinolat schon eine Steigerung des Blindwerts beim Eisen von 3 ppm auf 9,5 ppm (bei 60°C unverdorben bis 10h). Aus der Wirkung der Phosphatidsäure ergibt sich die besondere Bedeutung der anionischen Phosphatgruppe. Sie ist offenbar in der Lage Cu^{2+} – bzw. Fe^{3+} – Ionen in Form inaktiver Salze zu binden. Möglich sind stabile Komplexe oder undissoziierbare Salze. Diese müssen aufgrund der Alkylketten nicht notwendigerweise in der Fettphase unlöslich sein. Wie Abb. 2.7 zeigt, bindet 10.000 ppm Dipal.-PA (1%) ca. 450 ppm Fe bzw. Cu. Das ist etwa der 22ste Teil seiner Eigenmasse. Tatsächlich ist das Molmassenverhältnis von Schwermetall zu PA in CuPA_2 ca. 1:20 und das in $[\text{FePA}_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ ca. 1:23.

$$M_{\text{Cu}}: 63,6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$M_{\text{Fe}}: 55,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$M_{\text{PA}}: 649 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} \quad (M_{\text{PE}}: 691 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}, M_{\text{PI}}: 811 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1})$$

Es lassen sich demnach zweizählige Chelatkomplexe mit PA vermuten. Der Versuch CuPA_2 herzustellen und mit NMR zu charakterisieren schlug allerdings fehl. Eine NMR-Charakterisierung des Eisenkomplexes wurde nicht versucht, da bei octaedrischer Koordination verschiedene Stereoisomere zu erwarten sind – (jeweise noch doppelt wegen der unsymmetrischen Struktur des PA):

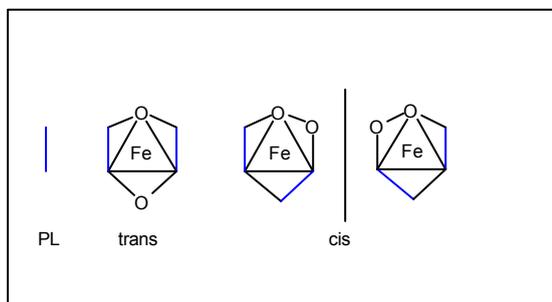


Abb. 2.8 hypothetische Stereoisomere von $[\text{FePA}_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$

Der geringere Inhibierungseffekt mit PE und PI könnte auf eine geringere Komplexstabilität zurückgehen. Unter der Annahme, dass Phospholipide grundsätzlich

als zweizählige Liganden auftreten und mit Kupfer bzw. Eisen MePL₂-Komplexe bilden, lassen sich aus den ermittelten Daten K_B -Werte abschätzen (Tab. 2.6). Alternativ könnte man auch mit den Dissoziationskonstanten über das Löslichkeitsprodukt (K_L) rechnen. Die PA-Komplexe sind mit $K_B \sim 10^8 \text{ l}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ erwartungsgemäß am stabilsten. Die nächststabileren Komplexe bildet PI. Sie sind für Fe^{3+} aber bereits um 3 Zehnerpotenzen (ca. Faktor 4.000), und für Cu^{2+} sogar um 4 Zehnerpotenzen (ca. Faktor 40.000), labiler. Da die Eisenkomplexe stabiler sind, inaktivieren PE und PI Eisen immernoch besser als Kupfer (ca. Faktor 10). Im Falle des PC muss davon ausgegangen werden, dass sich überhaupt keine inaktiven Komplexe bilden. Die beobachtete prooxidative Wirkung könnte darauf zurückgehen, dass z.B. beim Hexaqua-Eisen(III)-Ion die Solvatabschirmung aufgrund einer stärkeren Affinität der Wassermoleküle zum PC-Zwitterion aufgehoben wird. In der Folge würde es zu einen pH-abhängigen Eintrag in die Fettphase kommen. Es stellt sich die Frage, ob es zwischen einer Kupfersulfatlösung und einer darüber liegenden PC-Hexan-Phase zu einem Phasentransfer des Kupfers kommt. Die Frage ist aufgrund der zu erwartenden Ausbildung von dispersen Strukturen (Emulsionen, Liposomen) nicht so ohne weiteres zu beantworten. Von quartären Alkylammonium-Salzen wie Tetrabutylammonium-, Methyltrioctylammonium- oder Hexadecyltrimethyl-Ammoniumchlorid ist die Wirkung als Phasentransfer-Katalysator für Oxidationsreaktionen bekannt. So lässt sich etwa 1-Decenal mit Methyltrioctylammoniumchlorid in Benzol mit wässriger KMnO_4 -Lösung im 2 Phasensystem bei 40-50°C leicht zur Decansäure umsetzen [229]. MnO_4^- bildet mit dem Alkylammonium ein Ionenpaar, das in die organische Phase übergeht. Durch günstige van-der-Waals-Kräfte mit Benzol wird der Verlust der Hydrathülle kompensiert. Eisen(III) bzw. Kupfer(II) sollten an der Phosphatgruppe des PC's binden. Danach liegt das PC als Base vor, welche das verbleibende Anion des Schwermetalls bindet. Das PE den prooxidativen Effekt nicht zeigt, liegt vielleicht daran, dass das PE-Ammonium-Ion eine schwächere Base ist, und deshalb keine ausreichende Menge an undissoziierten (unpolaren) Molekülen entsteht. Andererseits neigen Aminogruppen als solches eher dazu Komplexe mit Schwermetallen durch Donierung ihres freien Elektronenpaars in die unbesetzten d-Orbitale des Metalls zu bilden.

2.3.2. Komplexierung von Fe^{3+}

Die besondere Komplexbildungstendenz der Phosphatidsäure lässt sich auch über die Entfärbung von Fe(III)-chloridlösung erkennen. Jeweils 1000 μg Pflanzenlecithin bzw. Dipal.-Standardphosphatid (je 150 μM) wurden in Chloroform/ Methanol (3+1) mit 0-80 μg (0-143,2 μM) Fe^{3+} (in Ethanol) versetzt und die Gelbfärbung bei 365nm verfolgt. Zum Vergleich wurde neben den Phospholipiden auch 150 μM Citronensäure bzw. L-Ascorbinsäure eingesetzt. Um die freien Eisen(III)-Ionen besser sichtbar zu machen, wurden in einen parallelen Versuch auch die durch Zugabe von 100 μl methanolischer KSCN-Lösung (10 mg ml^{-1}) gebildeten roten Rhodanid-Komplexe bei 503nm vermessen. Die Menge an freien gelben $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ -Ionen wurde über eine Kalibriergerade ermittelt und die Phospholipide dagegen dargestellt. Für die roten Rhodanid-Komplexe wurde die zugegebene Eisen(III)-Menge direkt gegen die gemessene Extinktion aufgetragen.

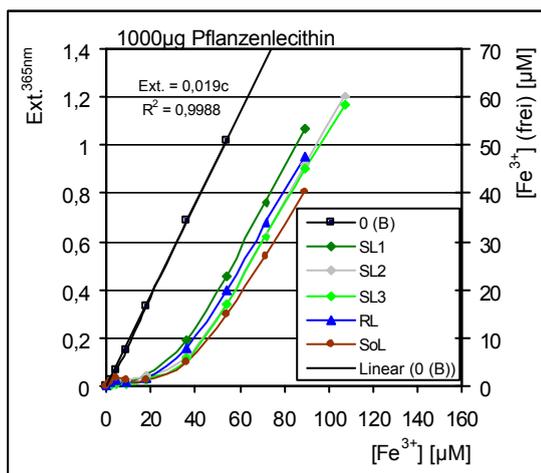


Abb. 2.9 Entfärbung von Eisen-(III)-chlorid

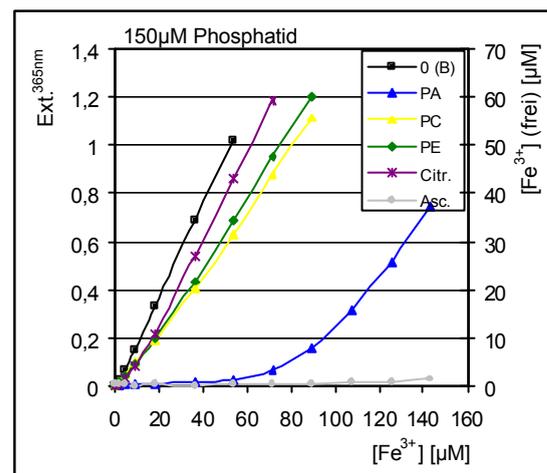


Abb. 2.10 Entfärbung von Eisen-(III)-chlorid

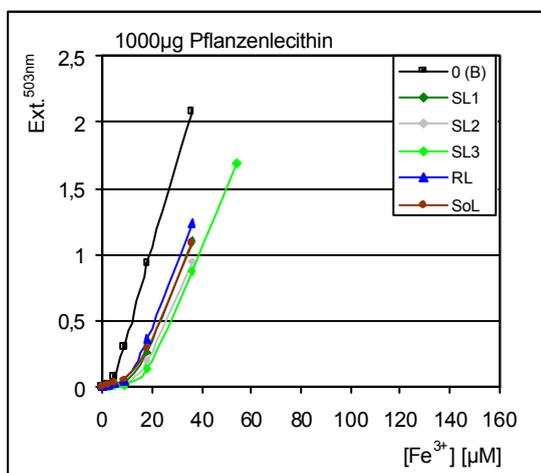


Abb. 2.11 Entfärbung von Eisen-(III)-chlorid + KSCN

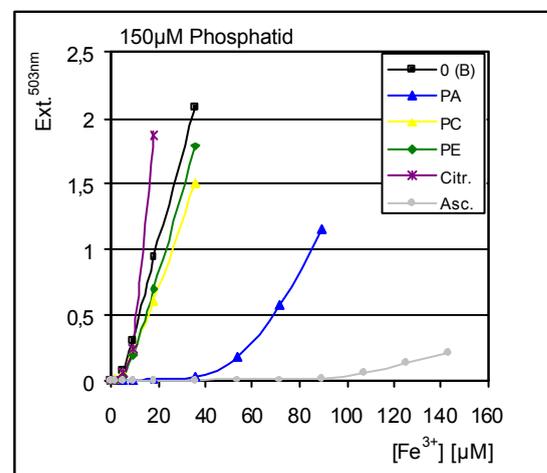


Abb. 2.12 Entfärbung von Eisen-(III)-chlorid + KSCN

Man kann erkennen, dass die Pflanzenlecithine nur einen geringen Schwermetall-Komplexierung zeigen. Betrachten man die Phosphatide selbst, fällt der deutliche Effekt von Dipal.-PA auf. Die Diagramme sind direkt vergleichbar, da $150\mu\text{M}$ PA etwa $1000\mu\text{g/ml}$ entsprechen. $150\mu\text{M}$ PA inaktivieren zwischen 50 bis $70\mu\text{M}$ Fe^{3+} , was gut mit der Vorstellung von 2- bzw. 3-zähligen Komplexen übereinstimmt. Auch Ascorbinsäure entfärbt im Gegensatz zur Citronensäure Eisen(III)-Salzlösung. Sie wirkt aber durch Reduktion.

Mit KSCN ist die Komplexbildung zwar visuell besser zu erkennen, hier treten aber einige zusätzliche Probleme auf: Die Kalibrierfunktion ist aufgrund der Eigendissoziation der Rhodanid-Komplexe keine Gerade. Auch ist die Färbung stärker vom pH-Wert abhängig, wie man bei Citronensäure sieht, welche eine Farbintensivierung bewirkt. Der größere Effekt von PA im Vergleich zu den anderen Phosphatiden ist aber ebenfalls zu erkennen. Die einzelnen Pflanzenlecithine unterscheiden sich nicht signifikant.

In Ethyllinolat bei 60°C wurde weiterhin die Eisen(III)-Inaktivierung durch 1% SL1 nach 15-minütiger Bräunung bei 150°C untersucht. Gearbeitet wurde mit Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat; die Induktionsperiode wurde über die Extinktion bei 233nm bestimmt (7.3.5.). Die Grafik zeigt, dass das Vermögen Fe^{3+} zu inaktivieren mit der Bräunung des Sojalecithins ansteigt. Allerdings ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass die Schwermetallinaktivierung auch durch andere Effekte – etwa durch die Bildung antioxidativer Stoffe während der Bräunung – vorgetäuscht sein kann.

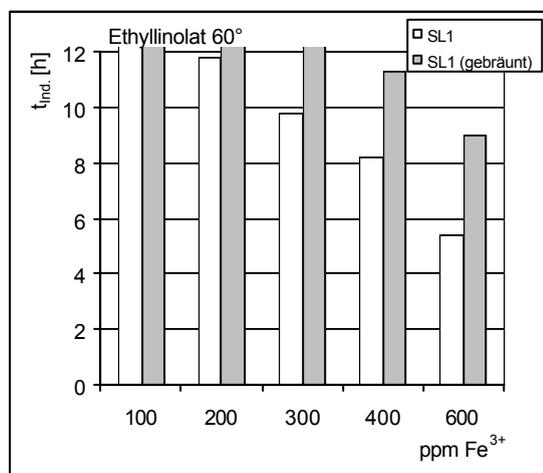


Abbildung 2.13 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 60°C , 1% SL1 gebräunt für 15min bei 150°C

2.3.3. Einfluß von PE auf den Cu-induzierten Abbau der Tocopherole

Die prooxidative Wirkung von Kupfer wurde in einem raffinierten Rapsöl mit und ohne Zugabe von 1% Dipal.-PE bei 110°C verglichen. Als Parameter wurde der Abbau der Tocopherole über HPLC verfolgt (7.2.2.). Mengen von 0 – 4 ppm Kupfer wurden in Form von Kupfer(II)-myristat in Chloroform zu je 0,3g Rapsöl in 1,5-ml-Vials gegeben. Nach Vertreiben des Lösungsmittels am Stickstoffstrom wurde im Trockenschrank auf 110°C erhitzt. Rapsöl enthält α - und γ -Tocopherol. Der synergistischen Schutzeffekt, den Phosphatide auf Tocopherole haben, wird in Abschnitt 4 noch genauer betrachtet. Hier soll zunächst nur geklärt werden, ob der insbesondere beim PE auftretende Effekt mit einer Schwermetallwechselwirkung in Verbindung steht. Im Blindversuch ist zu sehen, dass bereits 0,1 – 0,3 ppm Cu^{2+} einen prooxidativen Effekt haben. Der verzögerte Abbau der Tocopherole infolge der Zugabe von Dipal.-PE wird aber nicht durch eine Schwermetallinaktivierung verursacht, denn die Abbauzeiten reduzieren sich schon mit 0,1 ppm Cu^{2+} wieder deutlich.

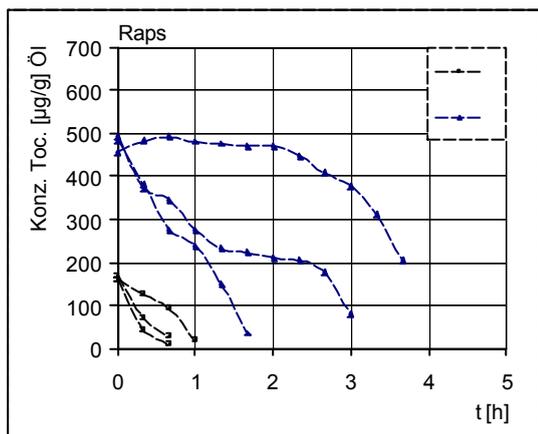


Abbildung 2.14 Toc.-Abbau in raff. Rapsöl (1) nach Zusatz von Cu (gestrichelte Linie: ohne; dünne Linie: 0,1µg/g; dicke Linie: 0,3µg/g)

Konz. Cu [µg/g]	Abbauzeit der Tocopherole [h]			
	ohne PE		mit 1% PE	
0	1,05	4,1	16,5	17,9
0,07	0,95	3,5		
0,1	0,9	3,2	11,0	13,7
0,2	0,8	2,5		
0,3	0,75	1,8	10,6	11,3
0,4	0,7	1,5		

Tabelle 2.7 Abbauzeit der Tocopherole in raff. Rapsöl (1) nach Zusatz von Cu (Cu-(II)-Myristat) bzw. Cu und PE

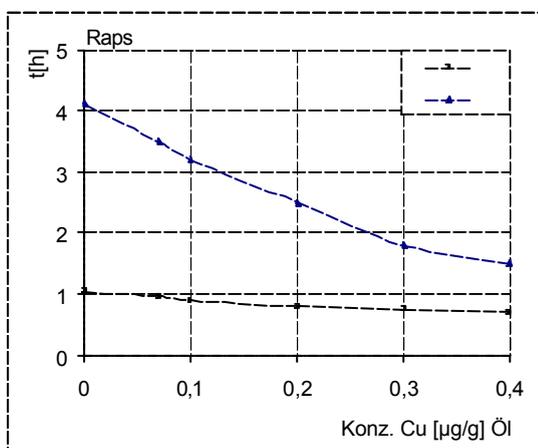


Abbildung 2.15 Abbauzeit der Tocopherole in raff. Rapsöl (1) nach Zusatz von Cu

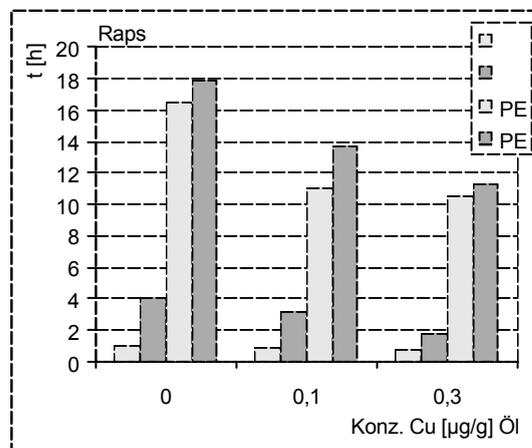


Abbildung 2.16 Abbauzeit der Tocopherole in raff. Rapsöl (1) nach Zusatz von Cu bzw. Cu und 1% PE

3. Wechselwirkung mit Lipidperoxidationsprodukten

3.1. Oxidationsprodukte der Linolsäure – sekundäre Produkte

Die Hauptprodukte des β -Spaltung der Linolsäurehydroperoxide (Abb. 2.2, 2.3, 3.1, Tab. 3.1) sind Hexanal, trans-Heptenal, cis- und trans-Octenal, trans-cis- und trans-trans-2,4-Decadienal, Octansäure, 8-Oxooctansäure und 9-Oxononansäure. Das trans-2-Heptenal und 10-Oxo-8-decenat entstehen aus dem nur bei der Photooxigenierung gebildeten nichtkonjugierten 10- bzw. 12-Hydroperoxid. Sie zeigen das Auftreten von Singulett-Sauerstoff an. Als Zwischenprodukte treten Dioxolane auf. Die Sauerstoffbrücke über C11 ist cis konfiguriert [162].

Verbindung	Methylolinolat	
	Licht	Licht/Methylenblau [%]
Hexanal	11,5	7,1
2-Pentylfuran	2,2	2,1
(E)-2-Heptenal	4,2	18,2
(E/Z)-2-Octenal	0,6	3,0
(E)-2-Nonenal	0,2	0,6
(E)-3-Nonenal	< 0,1	0,9
(E,Z)-2,4-Decadienal	8,5	5,3
(E,E)-2,4-Decadienal	17,8	10,0
1-Octen-3-on	< 0,1	0,5
1-Octen-3-ol	1,2	1,7
Methyloctanat	29,0	18,2
Methyl-8-oxooctanat	2,1	1,3
Methyl-9-oxononanat	13,6	7,5
Methyl-8-(2'-furyl)-octanat	0,2	0,3

Tab. 3.1 Oxidation von Methylolinolat [73]

Verbindung	Rindertalg + PL	
	PC	PE
	[Peak - Area]	
Hexanal	20600	52900
2-Pentylfuran	15600	32200
2-Heptenal	36300	951
2-Octenal	31800	2620
2-Nonenal	13400	171
2-Decenal	32300	214
(E,Z)-2,4-Decadienal	26800	124
(E,E)-2,4-Decadienal	26400	676
1-Octen-3-ol	25500	30700
2-Heptanon	2900	51400
2-Nonanon	417	13600
2-Decanon	486	30000
4-Methyl-2-pentanon	24300	224
Mesityloxid (4-Methylpent-3-en-2-on)	1560	48700

Tab. 3.2 Oxidation von Rindertalg mit Zusatz von Phospholipiden [48]

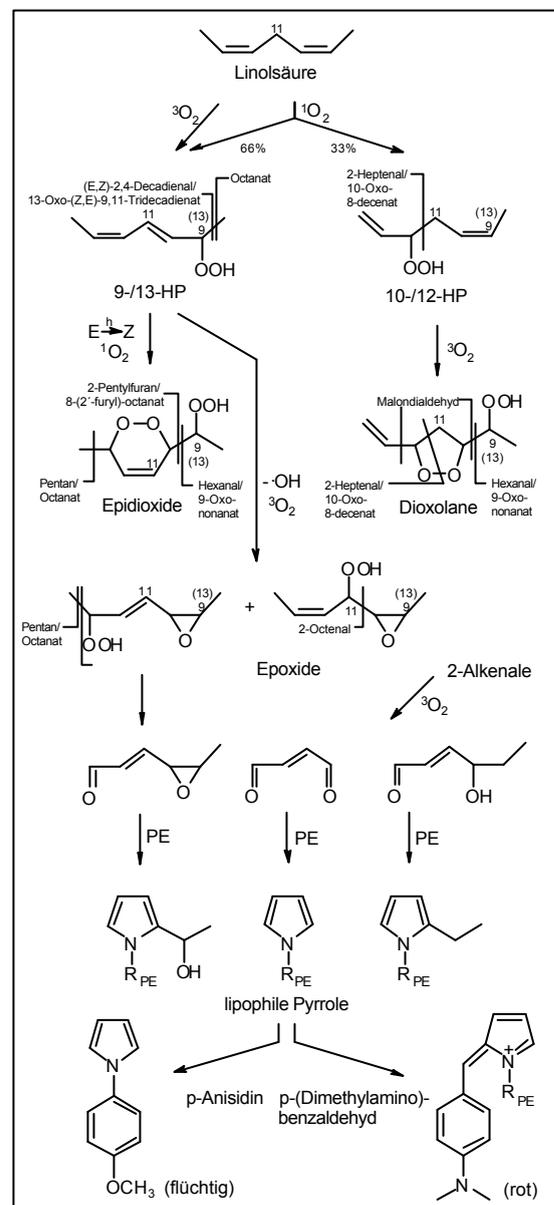


Abb. 3.1 Oxidation von Linolsäure [59,162] und Bildung von Pyrrolen [89]

Singulett-Sauerstoff kann auch direkt an das 9- bzw. 13-Hydroperoxid in der jeweiligen cis-cis-Form addieren. Diese entstehen durch eine elektronische Anregung der p-Elektronen in die nichtbindenden π^* -Orbitale, was eine freie Drehbarkeit ermöglicht. Durch die (2+4)-Cyclo-Addition entstehen Epidioxide, deren β -Spaltung zu Furanderivaten führt [162]. A. Stephan [228] fand in Sojalecithin vergleichbare Mengen von 2-Pentylfuran und Hexanal (300ppm). 2-Pentenylfuran findet man als flüchtige Verbindung bei der Oxidation der Linolensäure [31].

Durch Abspaltung von OH-Radikalen können die konjugierte Hydroperoxide der Linolsäure auch Allyl-Epoxide-Radikale generieren, die an C11 oder C9 bzw. C13 Sauerstoff anlagern und Hydroperoxy-Epoxide bilden. Aufgrund von Käfig-Effekten kommt es auch zur direkten Wiederanlagerung der OH-Radikale an die Allylstellen unter Bildung der entsprechenden Hydroxyl-Epoxide [59]. Unter N_2 und unter Anwesenheit von α -Tocopherol bilden die konjugierten Hydroperoxide die Allyl-Epoxy-Radikal-Rekombinationsprodukte mit dem Tocopheryl-Radikal [59].

Über die Entstehung von Pyrrol-Strukturen aus den Epoxiden bei der Reaktion mit PE wird von der spanischen Arbeitsgruppe um F.J. Hidalgo berichtet [89]. Danach reagiert PE mit dem oxidativen Stressprodukt 4,5(E)-Epoxy-2(E)-heptenal zu einem Hydroxyalkylpyrrol (Analog Abb. 3.1)[258]. Für die Farbreaktion mit Ehrlich-Reagenz (p-(Dimethylamino)benzaldehyd) verwendeten sie 1-[1-(2-Hydroxyethyl)-1H-pyrrol-2-yl]propanol als Standard [259]. Die Polymerisation des Stoffes soll zur Bräunung beitragen. Mit p-Anisidin können PE-gebundenen Pyrrole in leichter flüchtige Verbindungen umgewandelt werden. In GC-MS-Messungen fand man neben dem einfachen Pyrrol auch 2-Pentylpyrrol und 2-Pentylfuran [89], ein Indiz dafür dass möglicherweise auch Epidioxide als Precursor in Frage kommen. Die antioxidative Eigenschaften der Verbindungen wurden in Olivenöl untersucht. Sie treten nur in Verbindung mit Tocopherolen (Synergismus) auf und sind bei polaren Pyrrolen, die durch der ϵ -Aminogruppe des Lysins gebildet werden, stärker [89].

Neben der Peroxidumlagerung in Epoxide können Pyrrol-Strukturen auch über eine Peroxidumlagerung in 4-Ring-Epidioxide gebildet werden [114]. Nach Morrill et al. [169] entsteht über diesen Weg bei der durch Eisen(III) katalysierten Oxidation von

Palmitoyl-Arachinoyl-PC unter physiologischem pH u.a. auch 4-Hydroxynonenal. Der formulierte Mechanismus ist auf Linolsäure übertragbar.

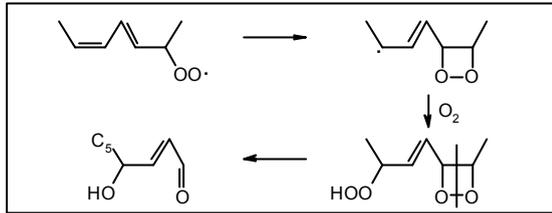


Abb. 3.2 4-Hydroxynonenal über 4-Ringepoxid

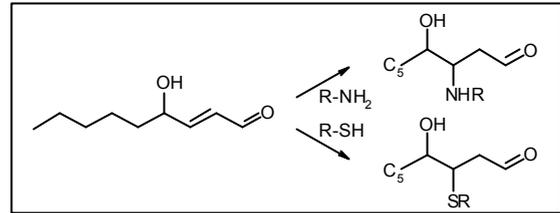


Abb. 3.3 Michael-Addition von Aminen und Thiolen an 4-Hydroxynonenal [197]

Da Sauerstoff die Arachidonsäure auch an C5, C8, C9, C12 oder C15 angreifen kann entstehen eine ganze Reihe -Hydroxy- -ungesättigte Aldehyde. Sie reagieren im Körper weiter zu Schiffbasen oder Michaeladdukten und spielen in der medizinischen Diagnostik eine Rolle [197].

Über die Peroxidzerersetzung können Phospholipide nur dann antioxidativ wirken wenn dabei keine Radikale gebildet werden. Eine solche Heterolyse kann sauer katalysiert, basenkatalysiert oder konzertiert ablaufen. Der protonenkatalysierte Spaltmechanismus wurde 1973 von Ohlhoff formuliert [11].

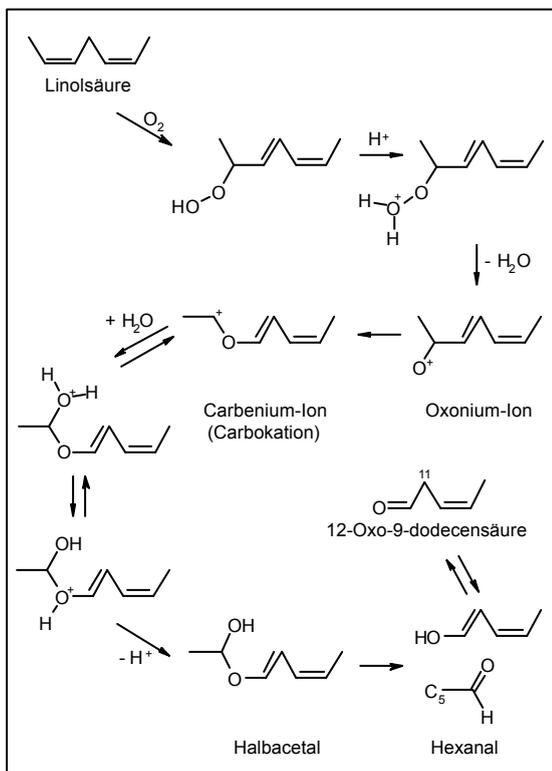


Abb. 3.4 saure Peroxidspaltung [11]

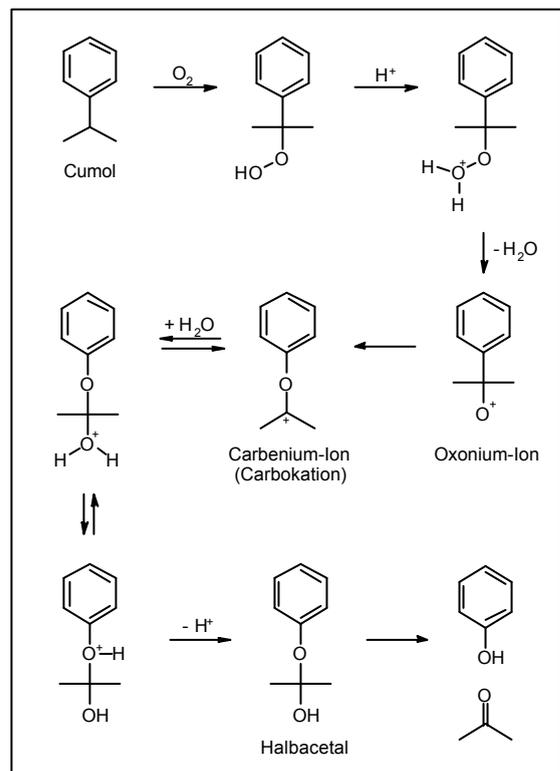


Abb. 3.5 Hock'sche Phenolsynthese [13]

Er entspricht mechanistisch der Hock'schen Phenolsynthese (1954) [13]. Dabei wird Cumol oxidiert und mit verdünnten Säuren in Phenol und Aceton gespalten. Wird anstelle von Cumol Ethylbenzol eingesetzt, enthält das entstehende Hydroperoxid, wie die Hydroperoxide der Fettsäuren noch ein H am Hydroperoxid-C-Atom, durchläuft aber analog die Hock-Fragmentierung und bildet als Hauptprodukte Phenol und Acetaldehyd [120]. Bei erhöhter Temperatur bildet α -Phenyl-Ethylhydroperoxid im Säuren zunehmend Acetophenon, das auch das Hauptprodukt des eiseninduzierten radikalischen Zerfalls ist. Hierbei bildet sich mit der Säure (z.B. Essigsäure) unter Wasserabspaltung ein Peroxyester, der unter Deprotonierung das α -Wasserstoffs in Acetophenon und die entsprechende Säure zerfällt [120].

Bei der Hock-Spaltung bewirkt zunächst das Proton der Säure die Ablösung der Hydroxylgruppe in Form von H_2O aus dem Linolsäure-Hydroperoxid, wobei intermediär eine positive Ladung am Sauerstoff auftritt. In die Octettlücke des Sauerstoffs wandert der Allylrest als Anion – es findet keine Hydrid-Wanderung statt, da diese beim α -Phenyl-Ethylhydroperoxid letztlich Acetophenon bilden würde, das man aber bei niedrigen Temperaturen nicht findet. Über die irreversible Umlagerung des Oxonium-Ions in ein stabileres Carbokation lagert sich Sauerstoff in die C-Kette der Linolsäure ein. Durch die Addition eines Wassermoleküls (oder OH^-) bildet sich ein Halbacetal, das im Fall des 13-Linolsäurehydroperoxids in Hexanal und 12-Oxo-9-dodecensäure (in der Enolform) zerfällt. Tatsächlich fanden Sheldon et al. [34] bei der Peroxidation der Linolsäure ($70^\circ C$; 2,5h) unter Zusatz von PE (2:1) etwa die doppelte Menge Hexanal. Bei Zusatz von PC (2:1) fanden sie immerhin noch ca. 1,5 mal mehr Hexanal als beim Linolsäureblindwert. Zudem verringerte sich parallel die Menge an Pentan, das aus der β -Spaltung des 13-Hydroperoxids resultiert.

Die beschriebene Hock-Spaltung von Fettsäure-Hydroperoxiden in zwei Aldehyde beobachteten Grosch et al. 1981 – allerdings bereits unter aprotischen Bedingungen [72]. Nach Gardner et al. [61] wird das 13-Hydroperoxid der Linolsäure in protischen Lösungsmitteln durch Säuren nur in geringem Umfang gespalten. Sie zeigten weiter, dass das Lösungsmittel – z.B. Methanol – in die Reaktion eingehen kann. So bildet sich nach Protonierung und Wasserabspaltung unter Beteiligung der Allyl-

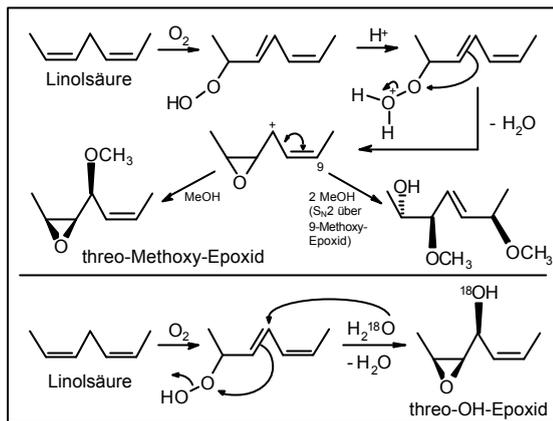


Abb. 3.6 Nukleophile in der sauren Peroxidspaltung und konzertierte Hydrolyse von Hydroperoxiden [61]

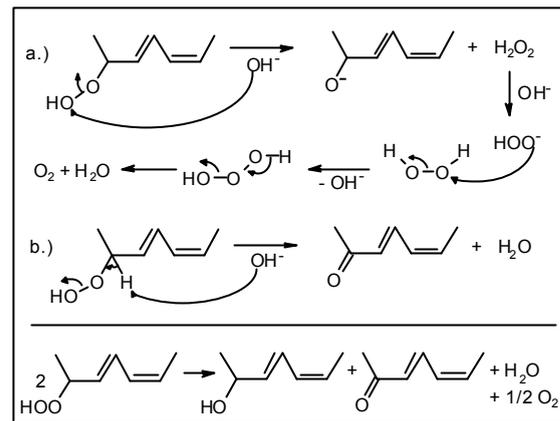


Abb. 3.7 basenkatalysierte Peroxidspaltung [59,97,222]

doppelbindung ein mesomeriestabilisiertes Epoxid-Kation aus, welches nukleophile Lösungsmittel anlagert. Dabei bildet sich bevorzugt die threo-Form des Methoxy-Epoxids. Ein 9-Methoxy-Epoxid – durch die Mesomerie des Kations – konnte zwar nicht direkt nachgewiesen werden, dafür aber die durch Methanol-Hydrolyse daraus resultierende Dimethoxy-Verbindung. Auch phenolische Verbindungen, wie z.B. Tocopherole können derartige Additionsverbindungen bilden [121]. Auffällig ist die Ähnlichkeit zum konzertierten Spaltmechanismus. Nach Hamberg und Gotthammar [76] wird das 13-Hydroperoxid der Linolsäure bei 100°C in Ethanol/Wasser unter O₂-Ausschluss u.A. zur 12,13-Epoxy-threo-11-hydroxy-9-octadecensäure umgesetzt. Durch Isotopenmarkierung konnten die Autoren zeigen, daß die OH-Gruppe zu 90% aus dem zugesetzten Wasser stammt und das Produkt damit nicht über radikalische Peroxidspaltung (Epoxidumlagerung) und den solvent-cage-Transfer von HO[•] entsteht. Nach der threo-Struktur, lagert sich H₂O auf der gleichen Seite an auf der auch die Etherbrücke entsteht.

Basen induzieren die Disproportionierung von Hydroperoxiden. Wasserstoffperoxid selbst zerfällt beim Erhitzen mit Natronlauge in O₂ und H₂O. Der peroxidische Sauerstoff disproportioniert hierbei formal von Oxidationszahl –1 zu 0 und –2. Zunächst wird H₂O₂ zum Hydroperoxid-Ion deprotoniert. Dieses reagiert gemäß einer nukleophilen Substitution mit einem weiteren H₂O₂-Molekül, wobei OH[–] abgespalten wird. Die gebildete „Hydro-Ozon-Struktur“ ist instabil und zerfällt in O₂ und H₂O [97]. Hydroperoxide reagieren unter Baseneinfluss primär zu den korrespondierenden Alkoholen. Frankel [56] formuliert den Mechanismus (a) als nukleophilen Angriff auf die Hydroperoxidgruppe unter Bildung von H₂O₂. Cumol-Hydroperoxid reagiert bei

90°C in konzentrierter Alkalilösung nur langsam. Die Reaktion läuft mit 20mol% Lauge sehr viel schneller ab, als mit einem vollen Alkali-Äquivalent [119]. Das spricht dafür, dass das Hydroperoxid-Anion (ROO^-) das eigentliche reaktive Agens ist, dass –in Analogie zum H_2O_2 – ein weiteres undissoziiertes Hydroperoxid angreift. Unter Sauerstoffentwicklung entstehen neben α -Cumylalkohol als Hauptprodukte auch Acetophenon und Benzoesäure. Im Gegensatz zur Hock-Fragmentierung bleibt im Basischen das C-Gerüst also weitgehend erhalten. Das gilt auch für die unter drastischeren basischen Bedingungen mögliche Eliminierungsreaktion [222], die durch die Deprotonierung des geminalen H-Atoms eingeleitet wird (b). Das entstehende konjugierte Linolsäureketon ist stabiler als der korrespondierende Alkohol und kann daher auch durch Oxidation daraus hervorgehen. Wie Isotopen-Untersuchungen zeigen, können die auftretenden Peroxid-Anionen Sauerstoff direkt z.B. auf Alkohole übertragen [119]. Antioxidantien wie bsw. Ascorbat beschleunigen daher auch die Bildung des Alkoholats. Gleiches gilt für Cystein, das nur im Basischen als Thiolat-Anion nukleophil genug ist, um die Disproportionierung zum Alkohols zu bewirken [59].

Nach Untersuchungen von Saito & Ishihara [205] geht der peroxidzersetzende Effekt der Phospholipide nicht auf deren Phosphorsäuregruppe zurück, sondern wird durch die basischen Aminkomponenten verursacht. An Modelluntersuchungen mit verschiedenen Aminen – 1%ig in Sardinenöl bei 40°C für 5d – erkannten sie eine Abhängigkeit des Effekts vom pK_B -Wert. Anilin und N-Methylanilin mit $\text{pK}_\text{B} > 9$ waren inaktiv, n-Hexylamin, N-Methyl-n-Hexylamin und N,N-Dimethyl-n-Hexylamin (pK_B : 3,4; 3,4 und 3,7) zeigten einen mittleren Effekt, während die starken Basen N-Benzyltrimethylammoniumhydroxid (Triton B) und 1,1,5-Diazabicyclo[4,3,0]non-5-en ($\text{pK}_\text{B} < 2$) auch die stärkste antioxidative Aktivität im untersuchten Sardinenöl besaßen. Für Cholin und Ethanolamin ermittelten sie ebenfalls hohe Effekte. Da Ethanolamin mit $\text{pK}_\text{B} = 4,4$ eine vergleichbar schwache Base wie n-Hexylamin ist, vermuten sie eine Aktivitätssteigerung durch die -OH-Gruppe, die über eine Wasserstoffbrücke zum H der NH_2 -Gruppe deren Nukleophilie erhöht. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs soll dann das -OH des Hydroperoxids (als OH^+) übernehmen und zum Hydroxylamin werden, während das Alkyloxid-Anion das frei

werdende Proton übernehmen und damit zum Alkohol wird. Auch Diethanolamin und Triethanolamin haben vergleichbare antioxidative Wirkung, nicht aber die Phosphatester- und Methylether-Derivate. Nach Tsai & Smith [238] hat Cholin in freier Form oder phosphoryliert in Methyllinolat-Emulsionen sowohl bei pH 7,9 als auch bei pH 10,2 einen geringen prooxidativen Effekt, während Ethanolamin nur bei pH 7,9 prooxidativ ist, mit pH 10,2 aber einen antioxidativen Effekt zeigt. Bei diesem pH-Wert liegt die Aminogruppe unprotoniert vor und das freie Elektronenpaar des Stickstoffs kann eine Wasserstoffbrücke zum Hydroperoxid-H aufbauen. Letztlich soll das Hydroperoxid zum Alkohol disproportioniert werden [34] – im Gegensatz zum oben dargestellten Substitutionsmechanismus entsteht kein H_2O_2 und damit kein Sauerstoff, vielmehr wird PE zum Hydroxylamin oxidiert. Parallel kann argumentiert werden, dass bei diesem pH-Wert das Hydroperoxid als Peroxid-Anion vorliegt, und dieses das PE direkt zum Aminoxid oxygeniert. Aussagen zu welchen Produkten PE hier reagiert sind in der Literatur nicht zu finden.

3.2. oxidative Bräunung

Die Bräunung von Phospholipiden ist nicht auf Reaktionen mit Kohlenhydraten im Sinne einer Maillard Bräunung beschränkt. Die nichtenzymatische Bräunung von PE während der Autoxidation wurde als erstes von Lea [139] beschrieben und in den 80er Jahren von der Prager Arbeitsgruppe um Pokórny, Tái und Janícek an Eigelb-PE näher charakterisiert [193,195,233]. Die im Eigelb-PE enthaltenen ungesättigten Fettsäuren werden bei 40°C leicht oxidiert. Die gebildeten Hydroperoxide werden dann unter Einwirkung der primären Aminogruppe zu farblosen Sekundärprodukten zersetzt, die schnell in gefärbte Stoffe übergehen [193]. Wie aus dem Schema in Abb. 3.9 hervorgeht, werden hier Schiff-Basen als Schlüsselintermediate angesehen.

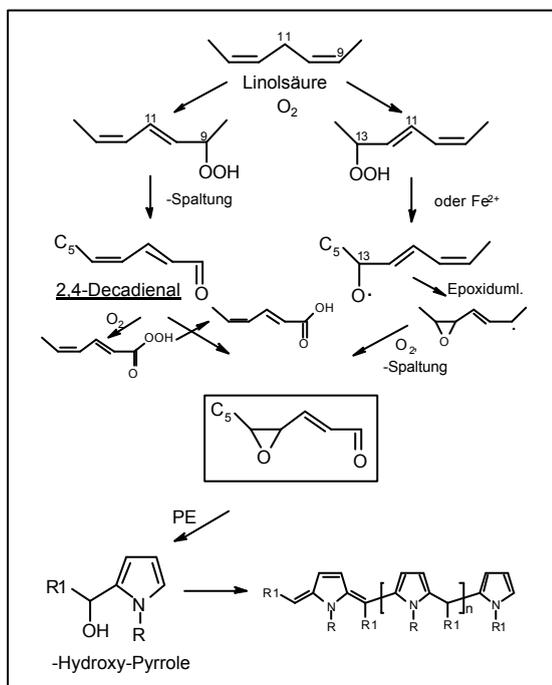


Abbildung 3.8 Bräunung von PE mit Lipidperoxidationsprodukten – Bildung von Pyrrolkondensaten [62,259]

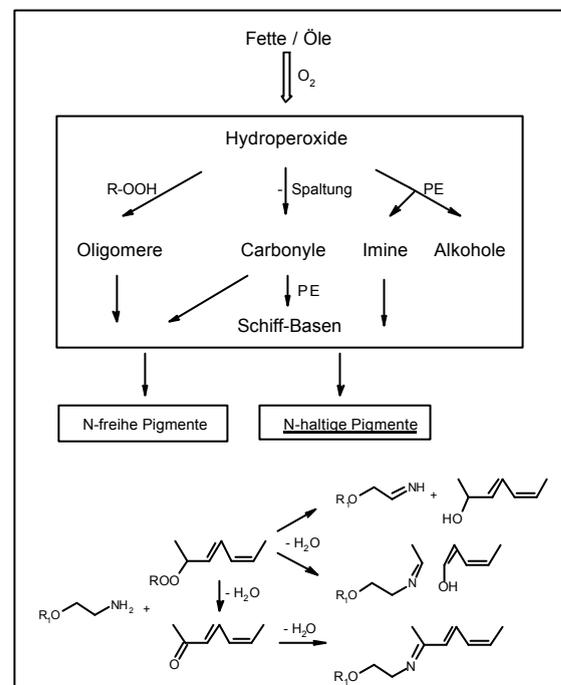


Abbildung 3.9 Bräunung von PE mit Lipidperoxidationsprodukten [193,233]

Es werden fast ausschließlich stickstoffhaltige Pigmente gebildet; daneben bleiben ca. 1/3 der Endprodukte farblos [193,195]. Eine säulenchromatographische Fraktionierung (DEAE-Zellulose mit Chloroform/MeOH) der bei 60°C aus Ei-PE erhaltenen braunen Verbindungen erbrachte für die unpolare Fraktion (Chloroform-Eluat, ca. 15%) ein N : P-Verhältnis von 1,6 : 1, während alle weiteren Fraktionen (85%) ein N : P-Verhältnis von 1 : 1 besitzen [195]. Die IR-Charakterisierung zeigt neben Doppelbindungen ($3000\text{-}3020\text{cm}^{-1}$) und Carbonylgruppen ($1680\text{-}1750\text{cm}^{-1}$) auch Imin-Verbindungen ($1640\text{-}1660\text{cm}^{-1}$), die infolge einer Verschiebung hin zu

kleineren Wellenzahlen ($1620\text{-}1640\text{cm}^{-1}$) als konjugierte ungesättigte Imine interpretiert werden [195]. Etwa die Hälfte der oxidierten Fettsäuren reagiert unter Blockierung der Aminogruppe des Ei-Colamins (negative Ninhydrin-Reaktion) [193]. Durch die Blockierung wird das PE acider und dadurch die saure Peroxidspaltung forciert. Diese sollte bei der predominanten Linolsäure zur verstärkten Hexanalbildung führen. Nach de la Mare et al. [155] reagiert PE mit Hydroperoxiden aber unter Wasseraustritt zum PE-Imin und dem Fettsäurealkohol. Interessanterweise zeigt die oxidative PE-Bräunung keine lag-time. Von Pokorný et al. [233] wurde die oxidative PE-Bräunung in 3 Stufen unterteilt: (1) Entstehung von Hydroperoxide, (2) Reaktion der Folgeprodukte (Aldehyde) mit der Aminogruppe des PE's zu Schiff-Basen und (3) Polykondensationsreaktionen der Schiff-Basen – bzw. Schiff-Basen mit Aldehyden – zu braunen Pigmenten. Bei einer kinetischen Untersuchung wurde die Oxidation über die Sauerstoff-Aufnahme, der PE-Abbau über die ninhydrinreaktive Substanz (R-NH_2) und die Bräunung über die Extinktion bei 400nm verfolgt. Gearbeitet wurde im Temperaturbereich von 30°C – 100°C [233]. Die Oxidation der im Ei-PE enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren verläuft in einer Reaktion 1. Ordnung und damit nicht in einer autokatalytischen Reaktion 2. Ordnung. Als Grund wird u.a. ein niedriger Peroxidgehalt, durch die Reaktion mit Aminogruppen diskutiert. Die Bildung der Schiff-Basen ist 0. Ordnung und abhängig von der Geschwindigkeit der Peroxidzerersetzung (limitierende Aldehydmenge). Es sei angemerkt, dass die Bildung der Schiff-Basen selbst ein zweistufiger Prozess ist. Möglicherweise erklärt diese Zweistufigkeit auch den Knick im $-\lg k - 1/T$ –Diagramm. Dieser befindet sich etwa an der Stelle 0,003, also bei 333K bzw. 60°C . Pokorný et al. selbst erklären den Knick

PE-Abbau	
Temperatur [$^\circ\text{C}$]	k
30	0,004
40	0,016
50	0,091
60	0,23
70	0,38
80	0,54
100	1,2

Tabelle 3.3 Geschwindigkeitskonstanten des PE-Abbaus bei der Bräunung von Ei-PE [233]

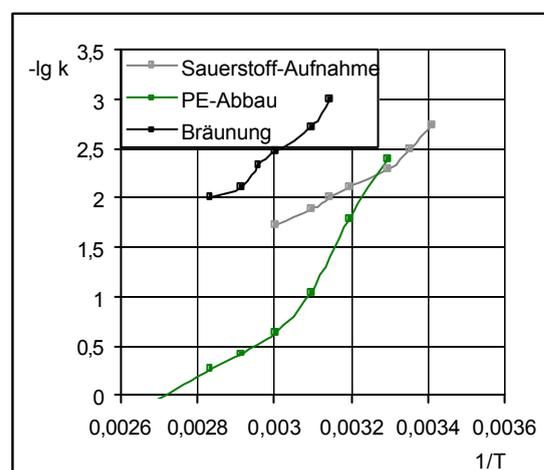


Abbildung 3.10 Kinetik der Bräunung von Ei-PE [233]

mit der einsetzenden thermische Peroxidzerersetzung und dem damit verbundenen Anstieg an Carbonyl-Precursoren. Die Bildung der braunen Pigmente erfolgt dann 1. Ordnung. Aus dem Arrhenius-Verhalten der Reaktionen lassen sich über den Anstieg in den $-\lg k - 1/T$ -Diagrammen für alle 3 Teilprozesse die Aktivierungsenergien berechnen: (1) $46 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, (2) $115 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($30\text{-}60^\circ$) bzw. $40 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($60\text{-}100^\circ$) und (3) $72 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [233]. Bei Raumtemperatur sind Reaktionen mit $E_a = 25 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ schnell [8]. Die hohe Aktivierungsbarriere von Schritt (2) erklärt die geringe Bräunung von Eigelb-PE bei niedriger Lagertemperatur. Ist die Annahme richtig, dass die thermische Peroxidzerersetzung den Wechsel zur niedrigeren Aktivierungsenergie verursacht, so wird die Reaktion durch die PE-induzierte Peroxidzerersetzung limitiert. Es steht demnach in Frage, ob der phospholipidverursachten Peroxidzerersetzung wirklich eine entscheidene Rolle bezüglich der antioxidativen Wirkung zukommt. PS besitzt eine stärkere antioxidative Wirkung als PE – welches aber wesentlich wirksamer ist als PC [233]. Da sich PS von PE nur durch eine zusätzliche Carboxylgruppe unterscheidet, liegt der Verdacht nahe, dass der säurekatalysierte Peroxidspaltung doch die größere Bedeutung zukommt. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass die Blockierung der Aminogruppe des PE's dessen Phosphorsäureacidität erhöht [193]. Ein Indiz für die säurekatalytische Peroxidspaltung ist der Anstieg von Hexanal im Rindertalg bei Zusatz von PE im Vergleich zum PC-Zusatz – vgl. Tab. 3.2 S. 36 [48]. Es wird 2,5mal mehr Hexanal gebildet, obwohl die 2-Alkenale (2-Heptenal und 2,4-Decadienal) mit PE zu Schiff-Basen umgesetzt werden. Warum an deren Stelle die entsprechenden Methylketone (2-Heptanon und 2-Decanon) auftreten ist bislang unklar.

Neuere Untersuchungen von Hidalgo und Zamora et al. [93] beschäftigen sich mit der Untersuchung von fluoreszierenden Strukturen während der oxidativen PL-Bräunung. Die Fluoreszenz, die eine Excitation von 345-350nm und eine Emission von 420-430nm besitzt, entsteht hauptsächlich durch die Wechselwirkung zwischen den Amino-gruppen des PE's und den durch Hydroperoxid-Spaltung entstehenden gesättigten Aldehyden. PC entwickelt bei 37°C weder Fluoreszenz noch Bräunung; PE bildet dagegen mit Butanal leicht die beschriebene Fluoreszenz. Über eine Sepharyl S-200 –Säule konnten die aus Soja-PE-Hydroperoxiden entstandenen fluoreszierenden Verbindungen in 2 Fraktionen aufgetrennt werden. Die braune Fraktion hat ein

Molekulargewicht von ca. 90.000D und wird aufgrund der gleichen Fluoreszenz als Polymer der anderen Fraktion angesehen [93]. Die Fluoreszenz kann mit Natriumborhydrid nicht zerstört werden. Da die spektralen Charakteristika beider Fraktionen – auch eine UV-Absorption bei 280nm – mit denen übereinstimmt, die man bei Inkubation von Glutathion mit gesättigten Aldehyden erhält, werden als Struktur entsprechende trisubstituierte Pyridiniumsalze diskutiert. In Modelluntersuchungen mit 4,5-Epoxy-2-heptenal (Abb. 3.8, $R=C_2H_5$) konnten Hidalgo et al. [259] Pyrrolverbindungen nachweisen. Diese reagieren mit Ehrlich-Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) zu roten Produkten. In raffiniertem Sojaöl, versetzt mit 100-1000ppm PE, wurde bei 80°C die Entwicklung von pyrrolisiertem-PE parallel zur Bräunung beobachtet. Die Pyrrol-Polymerisierung, die zu den braunen Pigmenten führen soll, ist in Abb. 3.8 dargestellt. Als Precursor kommt das aus der Linolsäure gebildete trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal in Frage. Der Stoff entsteht insbesondere über das 9-Hydroperoxid aus dem (E,E)-2,4-Decadienal, kann aber auch aus dem 13-Hydroperoxid gebildet werden [62]. Ungesättigte Aldehyde werden schneller autoxydiert als Linolsäure [11]. Die Oxidation von 2,4-Decadienal durch Peroxide –z.B. Peroxydecadiensäure oder 9- bzw. 13-Linolsäurehydroperoxid– führt in der sogenannten Prilezhaev-Reaktion zu 4-Epoxy-2-decenal [62]. Die Linolsäurehydroperoxide werden dabei zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Das 13-Hydroperoxid spielt als Vorläufer des Epoxids eine geringere Rolle. Die gebildete Menge erhöht sich aber durch Zusatz von Fe^{2+} -Ionen, weshalb mechanistisch eine Epoxidumlagerung des Alkoxy-Radikals angenommen wird [62].

Es ist vielfach versucht worden, die oxidative Bräunungsreaktion mit den antioxidativen Eigenschaften der Phospholipide in Verbindung zu bringen. Nach Hidalgo et al. [92] entwickelt leicht oxidiertes Soja-PE (200ppm) in Sojaöl bei 60°C im Gegensatz zu nativem PE eine antioxidative Wirkung. Der Effekt tritt bei PC und PI nicht auf und wird daher auf die durch Beteiligung der Aminogruppe gebildeten antioxidativen heterocyclischen Verbindungen (Pyrrole) zurückgeführt. Die Wirkung ist nur in der frühen Phase der Oxidation beschränkt. Später wird die Amino-Carbonyl-Reaktion durch die Fettperoxidation dominiert. Ein Zusammenhang zwischen Bräunungsgrad und Induktionsperiode konnte ebenfalls hergestellt werden [90]. Ein Vergleich zwischen den PE-Pyrrol-Strukturen und denen, die sich bei

Reaktion von Epoxyaldehyden mit Lysin ergeben zeigte, dass die hydrophileren Lysin-Pyrrole bessere Antioxidantien in Ölen sind. So zeigt die Kombination PC/Lysin eine bessere Wirkung als PE/Lysin. Die PC/PE-Mischung besitzt nur einen geringen Effekt, da keine polaren Pyrrole entstehen können. Lysin-Pyrrole haben sich auch als gute α -Tocopherol-Synergisten erwiesen [89].

Nach Pokorný und Janíček et al. [44] können die Bräunungsprodukte Eisen- und Kupfer-Ionen inaktivieren. Die Schwermetallbindung lässt sich aber nicht notwendigerweise mit dem antioxidativen Effekt korrelieren. Die antioxidative Wirkung brauner Pigmente aus Glyoxal/Ethylamin in Schweineschmalz (60°C) ist nur gering. Der Effekt wird durch Zugabe von Cellulose aber wesentlich erhöht. Die Schwermetallbindung allein kann aber nicht für die hohe stabilisierende Wirkung verantwortlich sein.

Husain et al. [102] haben in den 90er Jahren die Bräunung von Dipalmitoyl-PE bzw. -PC und Eigelb-PE bzw. -PC mit deren Wirkung auf Methyllinolat bei 50°C verglichen. Die Dipalmitoylderivate zeigten nur einen geringen Effekt und auch keinen Synergismus mit α -Tocopherol. Die Ei-Phospholipide als solches erwiesen sich als prooxidativ, jedoch beobachteten sie nach Erhitzung auf 180°C – sowohl bei PC als auch PE – einen antioxidativen Effekt. Sie schlussfolgern, dass der Effekt auf die Bräunung der ungesättigten Strukturen zurückgeht und dass die Basenkomponenten der Phospholipide keinen Einfluss haben. Auch hier wird eine Schwermetallbindung diskutiert. Die Zugabe von 0,1% Ei-PC bzw. Ei-PE zu Methyllinolat hat auch bei vorheriger Bräunung bei 180°C (1h, 2h, 3h) keinen Einfluss auf den Verderb. Mit Zusatz von 1% beobachteten Sie beim Ei-PC erst nach 3 stündiger Vorerhitzung niedrigere Peroxidwerte (nach 2d). Beim Ei-PE wurden dieser Effekt schon nach einstündiger Erhitzung erzielt. Interessant ist, dass eine längere Vorerhitzung (2h, 3h) keinen zusätzlichen Effekt bringt; d.h. die Peroxidzahlen sind nach 2 Tagen bei 50°C nicht niedriger, sondern praktisch gleich denen der 1h-Vorerhitzung (sie steigen sogar leicht an). Das legt den Verdacht nahe, dass die antioxidativen Stoffe bereits in der frühen Phase der oxidativen Bräunung gebildet werden.

3.3. Untersuchungen und Ergebnisse

3.3.1. Peroxidbildung und Zersetzung

a.) PL: 1%ig in oxidationsbelastetem Ethyllinolat (12h, 25°C)

Um zu bestimmen ob Phospholipide Hydroperoxide zersetzen können, wurden die einzelnen Dipalmitoyl-Standardverbindungen bzw. SL1 1%ig zu einem oxidationsbelasteten Ethyllinolat zugegen. Hierfür wurde 2g Etyllinolat 1h unter Luftzutritt in einem 20ml-Kolben auf 110°C erhitzt. Mit Chloroform/Methanol (3+1) wurde bis zur Marke aufgefüllt. In 25ml-Vials wurden je 1ml der Lösung vorgelegt und jeweils 100µg Phospholipid in Chloroform/Methanol (3+1) zugesetzt. Nach Abpusten des Lösungsmittels mit N₂ wurde 12h bei Raumtemperatur in Dunkeln aufbewahrt und im Anschluss die Peroxidzahl titriert (7.3.1.). Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

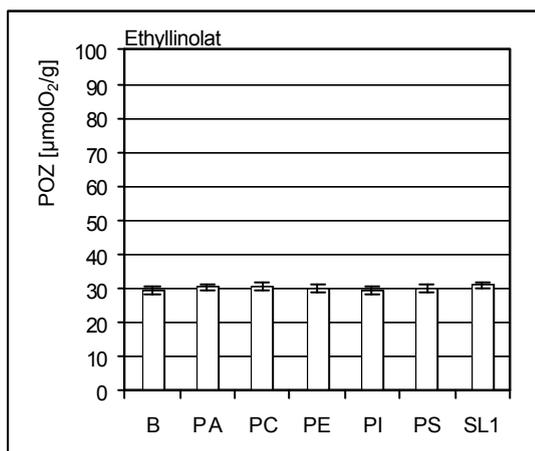


Abbildung 3.11 POZ von oxidiertem Ethyllinolat (1h, 110°C) mit 1% Dipalmitoyl-Phosphatiden sowie techn. Sojalecithin (SL1, Asolecithin)

Die POZ aller Proben liegt im Bereich 30 ± 1 . Ein Abbau von Hydroperoxiden ließ sich hier nicht beobachten.

b.) PL: 1%ig in EL–Einfluss auf die Bildung von Hydroperoxiden, HPLC

Der Einfluss der verschiedenen Phosphatide auf die Bildung der 4 Linol-säurehydroperoxide wurde an Ethyllinolat mittels HPLC verfolgt. Die Dipalmitoyl-Standardverbindungen von PA, PC, PE, PI und PS wurden 1%ig zu Ethyllinolat zugegeben und bei 110°C erhitzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Hydroperoxide mit HPLC-UV bei 233nm gemessen. Zusätzlich wurden die sekundären

Zersetzungsprodukte bei 268nm bestimmt. Die eingesetzte HPLC-Methode (7.2.6.) entspricht der nach Pekkarinen et al. [191]. Das Ethyllinolat wurde noch zusätzlich mit 0,05% α -Tocopherol stabilisiert. Als Vergleichswerte wurden die Peroxidgehalte für die Systeme EL^{-Toc}/PE/D-Glucose und EL^{-Toc}/PE/L-Ascorbinsäure (vgl. 4.3.3.) vermessen. Diese Systeme enthalten darüberhinaus noch 0,5% D-Glucose bzw. L-Ascorbinsäure und sind –wie in Abs. 4 und 5 noch gezeigt wird– besonders oxidationsstabil und sollten daher kleine Peroxidwerte liefern.

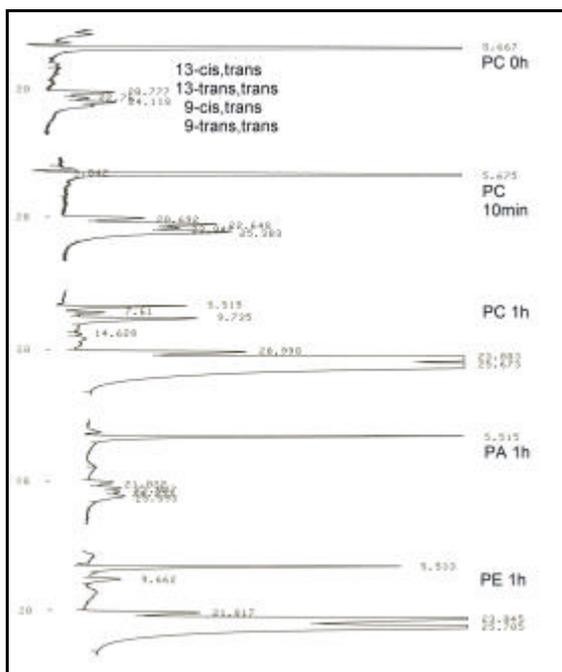


Abbildung 3.12 HPLC-UV-Trennung der Linolsäure-Hydroperoxide (233nm)

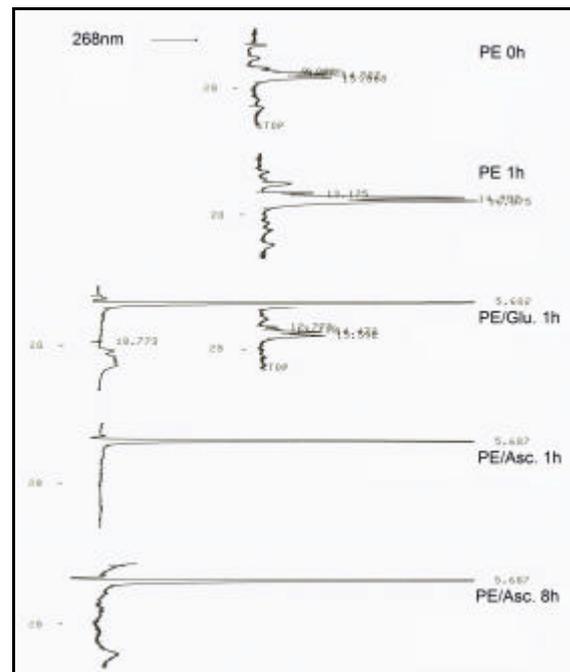


Abbildung 3.13 HPLC-UV-Trennung der Linolsäure-Hydroperoxide (233nm) und der Oxodiene (268nm)

Bei der Auftrennung der Linolsäurehydroperoxide wurden keine Grundlinientrennung erreicht. Da die qualitative Auswertung keinen Hinweis auf eine peroxidzeretzende Wirkung ergab, wurde auf die weitere Optimierung der HPLC-Trennung verzichtet. Anhand der ersten drei Chromatogramme, die die Peroxidbildung der PC-Probe zeigen, ist eine bevorzugte Bildung der beiden trans,trans-Isomere zu erkennen. Der Verderb der PC-Probe ist nach 1h bereits deutlich fortgeschritten, gleiches gilt für PE, PS und PI nicht aber für PA. Die Phosphatidsäure zeigt erst nach ca. 2,5h vergleichbar hohe Hydroperoxidgehalte (nicht dargestellt). Als Grund für den langsameren Verderb kann die bereits dokumentierte Wechselwirkung mit Schwermetallspuren angesehen werden. In Abb. 3.13 oben sind die bei 268nm erfassbaren sekundären Oxodiene der PE-Probe dargestellt. Durch Zusatz von Glucose oder auch Ascorbinsäure in

Verbindung mit PE sind diese nach einer Stunde noch nicht erhöht. Obwohl die Peroxidwerte der PE/Glu.-Probe nach 1h deutlich kleiner sind, als in der Vergleichsprobe ohne Glucose ist kein Anstieg der Oxodiene zu messen. Der stabilisierende Effekt lässt sich daher nicht einfach mit einer Peroxidzerersetzung begründen. Bei Zusatz von Ascorbinsäure und PE sind nach 1h überhaupt keine Hydroperoxide messbar. Dies ist auch nach 8h bei 110°C noch so. Da auch die Oxodiene hier nicht signifikant ansteigen, ist eine peroxidzersetzende Wirkung entweder nicht vorhanden, oder es entstehen Produkte, die mit diesem Versuch nicht erfasst werden können, z.B. Hexanal.

c.) Effekt von 1% SL1 auf POZ und ANZ in Rapsöl bei 110°C

t [h]	POZ		t [h]	POZ	
	R1	R1+SL		R1	R1+SL
0	3,5	3,35	9	11,3	4,6
1	5,3	3,4	10	11,3	5,2
2	7,0	3,5	11	11,8	5,2
3	8,2	3,9	12	12,3	5,4
4	9,3	4,0	13	12,8	5,9
5	9,8	4,1	14	13,0	5,9
6	10,2	4,2	15	14,1	6,4
7	10,2	4,3	16	14,5	6,8
8	10,9	4,5	17	14,6	7,0

Tabelle 3.4 POZ von raff. Rapsöl (1) gelagert bei 110°C, ohne und mit 1% techn. Sojalecithin (Asolectin)

t [h]	ANZ		t [h]	ANZ	
	R1	R1+SL		R1	R1+SL
0	0,4	0,4	7	3,8	1,5
1	0,9	0,4	8	3,5	1,8
2	2,0	0,4	9	2,9	2,0
3	2,7	0,4	10	2,5	2,2
4	3,3	0,5	11	2,1	2,3
5	3,7	0,7	12	1,9	2,3
6	3,8	1,1			

Tabelle 3.5 ANZ von raff. Rapsöl (1) gelagert bei 110°C, ohne und mit 1% techn. Sojalecithin (Asolectin)

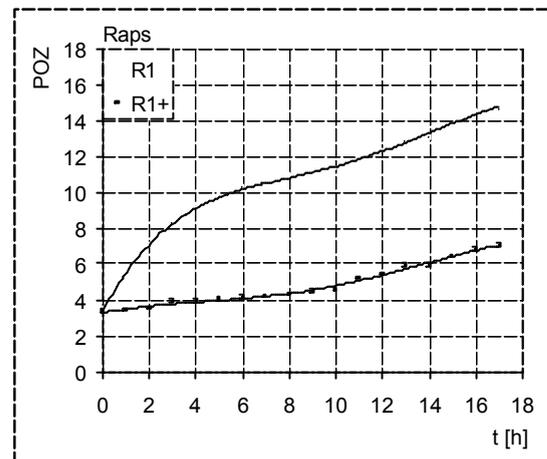


Abbildung 3.14 POZ von raff. Rapsöl (1) gelagert bei 110°C, ohne und mit 1% techn. Sojalecithin (Asolectin)

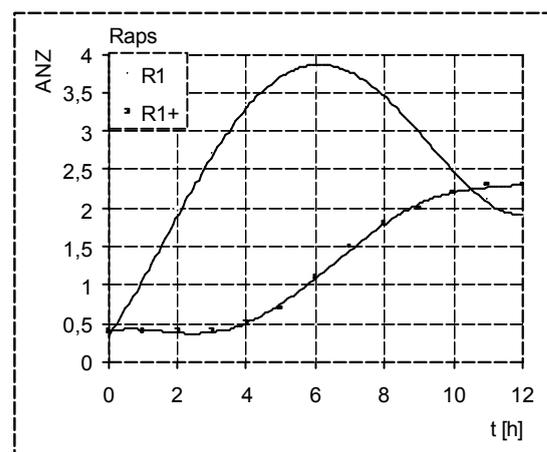


Abbildung 3.15 ANZ von raff. Rapsöl (1) gelagert bei 110°C, ohne und mit 1% techn. Sojalecithin (Asolectin)

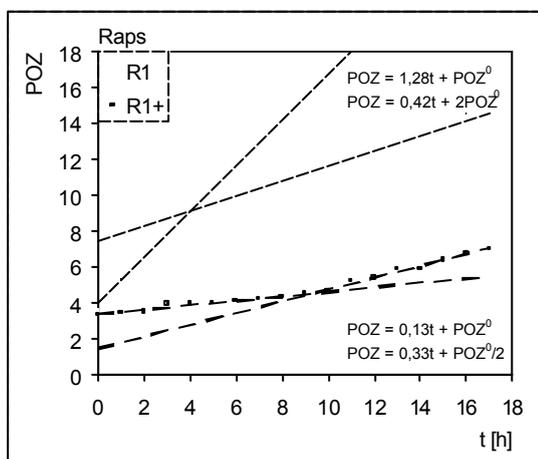


Abbildung 3.14a POZ von raff. Rapsöl (1) gelagert bei 110°C, ohne und mit 1% techn. Sojalecithin (Asolectin)

Der Einfluss von 1% SL1 auf die Entwicklung von Peroxiden und die Bildung von anisidinreaktiven Sekundäraldehyden –darunter Hexanal– wurde in Rapsöl bei 110°C verfolgt. Dazu wurden 0,1g SL1 und 10g Öl auf 25ml Chloroform aufgefüllt und je 0,5ml in 5-ml-Vials pipettiert. Nach dem Abpusten des Lösungsmittels mit Stickstoff wurden die Vials unverschlossen im Trockenschrank auf 110°C erhitzt. Die POZ wurde über 17h, die ANZ über 12h verfolgt (7.3.1.; 7.3.2.). Wie an der Grafik zu sehen ist, steigt die POZ des Blindversuchs (ohne SL1) in den ersten Erhitzungsstunden zunächst schnell an. Ab einer POZ von ca. 10 $\mu\text{mol O}_2/\text{g}$, die nach 5-6 h erreicht wird, steigt sie dann nur noch mit etwa 1/3 der vorherigen Geschwindigkeit. Ein derartiger Effekt wird in der Literatur auch für Olivenöl beschrieben [15] und hier auf dem prooxidativen Effekt des α -Tocopherols zurückgeführt. Tatsächlich enthält Rapsöl vergleichbare Mengen an α -Tocopherol und auch einen hohen Ölsäureanteil. Der Effekt ist aber auch mit der höheren Effektivität der Tocopherole gegenüber Hydroperoxy-Radikalen im Vergleich zu Inaktivierung anderer Starter-Radikale erklärbar. Die Blindprobe zeigt in der Anfangsphase der Erhitzung auch einen entsprechenden Anstieg der Anisidinzahl. Sie durchläuft bei ca. 6h ein Maximum und nimmt auch bei Erreichung von POZ 10 wieder ab. In der SL1-Probe steigt die POZ in den ersten 9h nur sehr langsam an. Dann kommt es zu einem 2,5-fach schnelleren Anstieg. Demgegenüber beginnt die ANZ schon ab ca. 4h anzusteigen. Der Anstieg der ANZ bei praktisch konstanter POZ ist ein erstes Anzeichen für einen peroxidzersetzenden Effekt von Phospholipiden. Dennoch stellt sich die Frage, warum die ANZ erst vergleichsweise spät ansteigt. Möglicherweise tritt schon zu Beginn eine Peroxidzerersetzung ein, deren Produkte –vermutlich vor allem Hexanal– aber zunächst von PE abgefangen werden. Man könnte den Versuch jetzt mit allen Standard-Phosphatiden wiederholen, da aber die Anisidinzahl als Summenparameter nur wenig Information liefert, ist es sinnvoller die flüchtigen Aldehyde direkt über Headspace-GC zu messen.

3.3.2. flüchtige Verbindungen

a.) im System Ethyllinolat^{0,05%} -Toc. / 0,5% Ascorbinsäure / 1% PL bei 110°C

Um eine definierte Zusammensetzung des Meßsystems zu gewährleisten, wurde statt einem Pflanzenöl mit 0,05% -Tocopherol versetztes Ethyllinolat als Modellsubstrat eingesetzt. Untersucht wurde der Einfluss verschiedener Phospholipide (1%) auf die Bildung von flüchtigen Verbindungen nach 10-stündiger Erhitzung auf 110°C. In Verbindung mit dem peroxidzersetzenden Effekt sollte geklärt werden, ob die für Rindertalg beschriebene Verschiebung: 2-Alkenal ? Methylketon bei Zusatz von PE im Vergleich zu PC-Zugabe [48] in einem Linolsäure-System auch vorkommt. Neben Dipalmitoyl-PE und Dipalmitoyl-PC wurden auch Dipalmitoyl-PA und Sojalecithin1 eingesetzt. Da das verwendete Ethyllinolat bei 110°C nur eine Induktionsperiode von ca. 2h besitzt, wurde das System zusätzlich mit 0,5% Ascorbinsäure stabilisiert (vgl. 4.3.3.). Um ggf. gebildete Pyrrolstrukturen zu erfassen, wurde in Anlehnung an [89] zu den beiden Proben die PE enthalten in einem weiteren Ansatz auch noch 1% p-Anisidin zugegeben. Die Erhitzung erfolgte in verschlossenen 20ml-Vials unter Luftatmosphäre. Die im Luftüberstand bei 60°C enthaltenen Verbindungen wurden mit Heatspace-GC-MS im m/z-Bereich 40Da – 550Da im Scan-Modus (EI) vermessen (7.2.9.). Die Peakzuordnung erfolgte über die Spektrenbibliotheken: [NIS_054k.L] bzw. [Wiley_7.L].

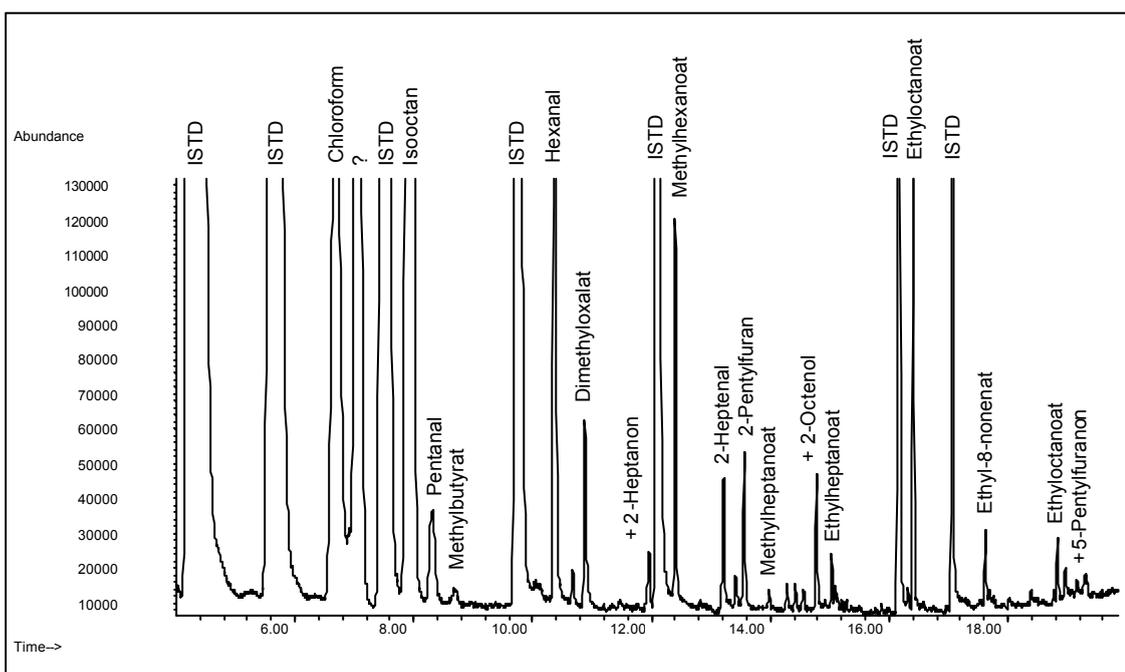


Abbildung 3.16 flüchtige Verbindungen in EL^{-Toc.}/Ascorbinsäure/SL1 nach 10h bei 110°C, TIC (ISTD: innere Standards)

Probe	Pentanal [ppm]	Hexanal [ppm]	2-Heptenal [ppm]	2-Heptanon [ppm]	Heptenal/ Heptanon
SL1	6,8	128	17	2,3	7
PE	36	703	53	1,7	31
PC	10	319	21	1,4	15
PI	16	397	37	1,6	23
PA	21	543	45	1,9	24
SL1- Anisidin	0,3	1	0,7	2,3	0,3
PE- Anisidin	0,5	0,9	0,8	1,1	0,7

Tab. 3.6 flüchtige Verbindungen in EL^{-Toc}/Ascorbinsäure/SL1 bzw. -PE, -PC, -PA, -SL1-Anisidin oder -PE-Anisidin nach 10h bei 110°C

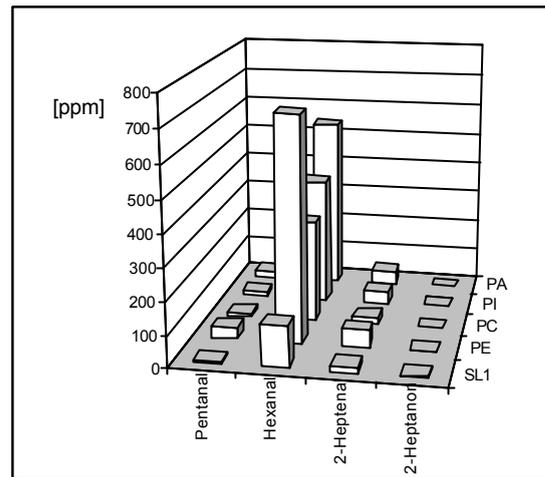


Abbildung 3.17 flüchtige Verbindungen in EL^{-Toc}/Ascorbinsäure/-SL1 bzw. -PE, -PC, -PA, -SL1-Anisidin oder -PE-Anisidin nach 10h bei 110°C

Das Verhältnis von 2-Alkenal zu 2-Keton lässt sich über die Verbindungen 2-Heptenal (13,27min) und 2-Heptanon (11,96min) verfolgen. Das 2-Heptenal überwiegt aber bei allen Phospholipiden; d.h. PE bewirkt keine Verschiebung hin zum Methylketon. Bemerkenswert ist der unerwartet hohe Gehalt an Hexanal, insbesondere in den PE- und PA-Proben. Dieser könnte von einer sauren Peroxidzerersetzung herrühren (PE>PA>PI>PC). Die p-Anisidin-Ansätze zeigen die erwarteten geringen Carbonylgehalte. Entsprechende Derivate konnten hier aber nicht gefunden werden.

b.) Reaktion von o-PE mit Aldehyden

Ziel dieser Versuchs war es zu klären, ob bei der Reaktion von PE mit ungesättigten Aldehyden Schiffbasen entstehen oder Michael-Addukte. Neben (E)-2-Octenal und (E,E)-2,4-Decadienal wurde auch Hexanal mit Phosphoethanolamin (ortho-PE) zu Reaktion gebracht. Der jeweilige Aldehyd wurde im Überschuss zugesetzt. Erhitzt wurde in Wasser/Isopropanol/2-Butanol (1+1+0,4) für 2h bei 90°C. Die Zugabe von Wasser ist nötig, um das polare o-PE zu lösen. Isopropanol dient als Lösungsvermittler um eine homogene Lösung zu erhalten. Nach dem Abkühlen wurde am Stickstoffstrom zur Trockene eingengt. Anschließend wurde mit gleichen Teilen Chloroform und Methanol bei 60°C gelöst. Nicht umgesetztes o-PE geht dabei nicht in Lösung und kann abgetrennt werden. Nach weiterer Zugabe von Wasser (1+1+1) bilden sich 2 Phasen aus. Die oberen Phasen zeigen bei 366nm eine Fluoreszenz (Abb.3.20) und enthalten die polareren Umsetzungsprodukte. In der unteren

Chloroformphase lösen sich noch vorhandene Restaldehyde bzw. deren unpolare Aldolprodukte. Die UV-Absorptionsmaxima wurden bestimmt. Sowohl das 2-Octenal als auch das 2,4-Decadienal-Produkt zeigen eine starke Absorptionsbande bei 228nm. Das Hexanal-Produkt absorbiert bei 279nm. Die Molmassen wurden über MS-Scans bei positivem Potential bestimmt. Anhand der aufgenommenen Fragmentierungsmuster (7.4.2.) konnten alle 3 Verbindungen als Schiffbasen identifiziert werden. Beispielhaft sind die Ergebnisse für 2,4-Decadienal-o-PE dargestellt. Die Konzentration der Messlösung betrug ca. $0,1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

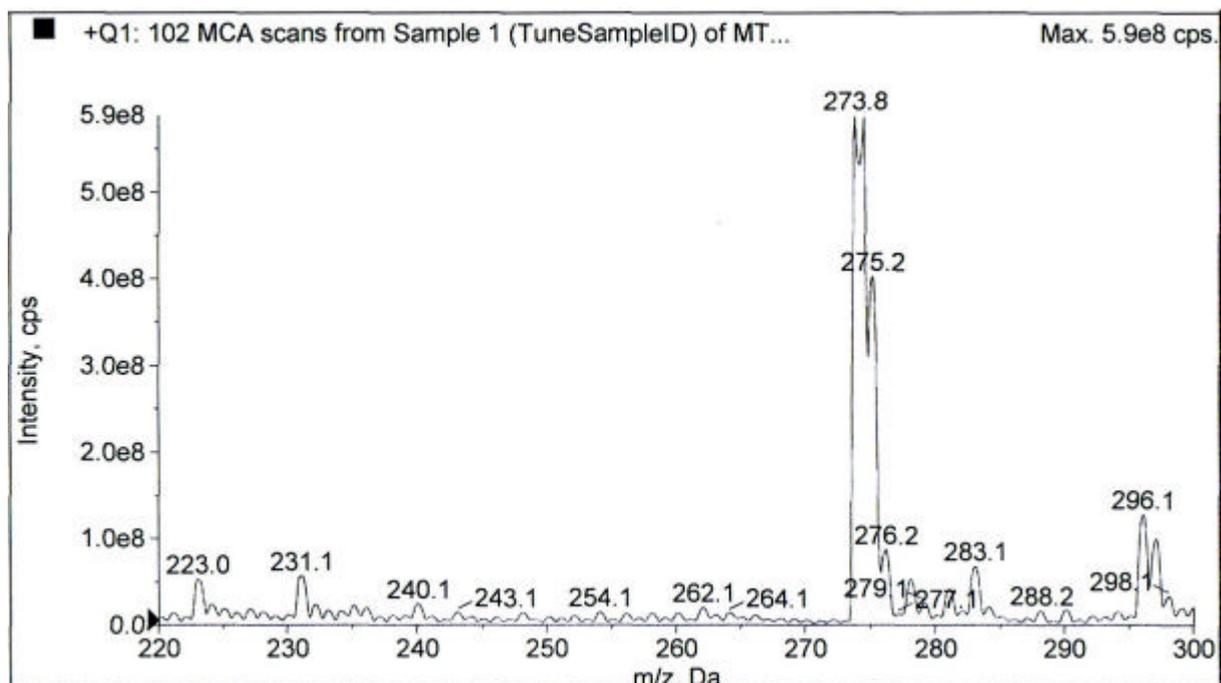


Abb. 3.18 MS-Scan der 2,4-Decadienal-Probe, pos. Potential (DP: 50, EP: 10; GS1: 40, GS2: 35, 500°C)

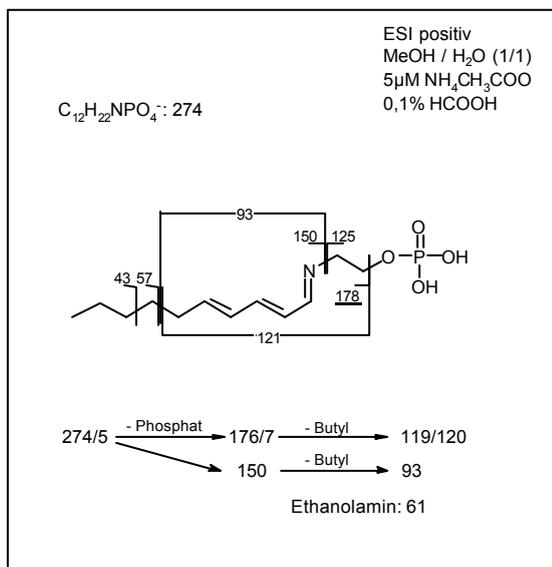


Abb. 3.19 Fragmentierung (E,E)-2,4-Decadienal-o-PE

Fragmentierung 274 Da		Fragmentierung 275 Da	
Konz.: ca. 0,4µg/ml		Konz.: ca. 2µg/ml	
Tochter-Ion	Intensität	Tochter-Ion	Intensität
176,3	102860	62,0	80700
119,2	51880	177,3	72300
125,2	18520	120,2	23460
93,0	17390	119,6	15260
150,2	15100	44,1	14700

Tab. 3.7 Fragmentierung 2,4-Decadienal-o-PE, pos. Potential

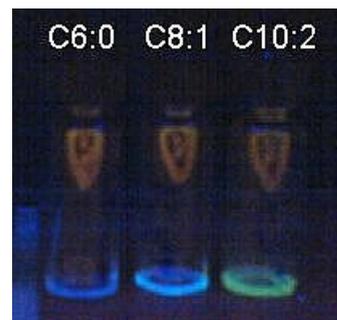


Abb. 3.20 Fluoreszenz der o-PE-Schiff-Basen bei 366nm

3.3.3. DPPH-Aktivität und Bräunung

a.) Vorversuch mit Tocopherolen zur Kinetik der DPPH-Reaktion

Der Abbau (Entfärbung) des in Lösung stabilen violetten DPPH-Radikals durch die einzelnen Tocopherole wurde in Toluol bei Raumtemperatur über eine Zeit von 2h photometrisch bei 520 nm verfolgt (7.3.4.). Der DPPH-Abbau ist in den Diagrammen

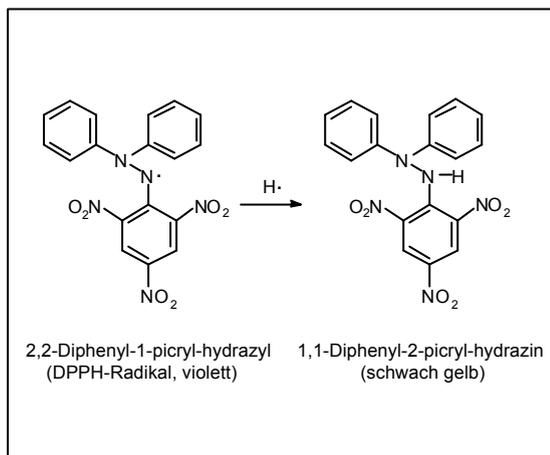


Abbildung 3.21 Reduktion von DPPH durch Antioxidantien

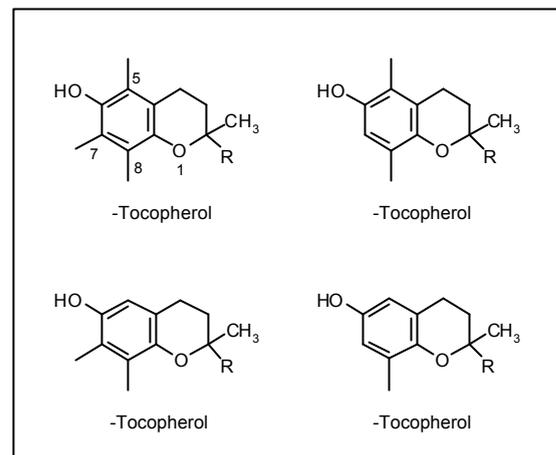


Abbildung 3.22 Struktur der Tocopherole

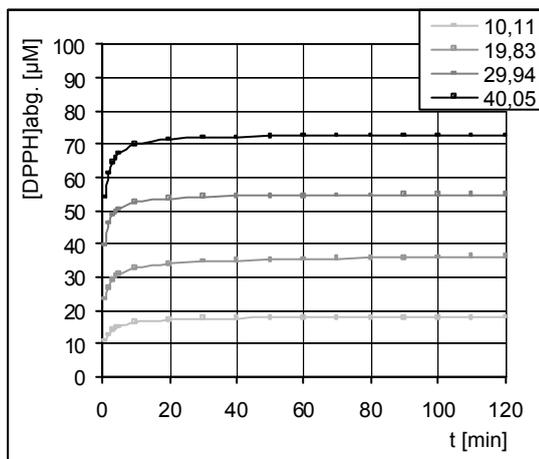


Abbildung 3.23 DPPH-Abbau durch α -Tocopherol [μ M]

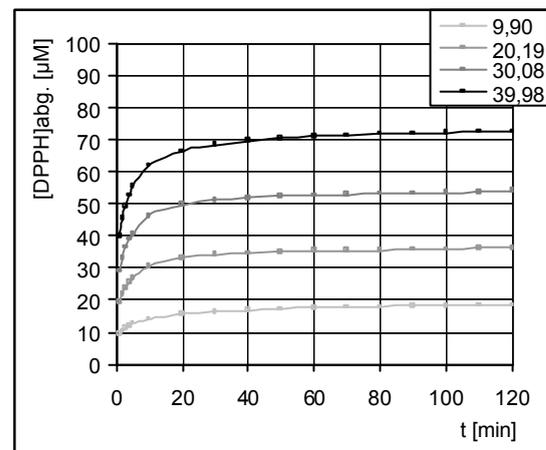


Abbildung 3.24 DPPH-Abbau durch β -Tocopherol [μ M]

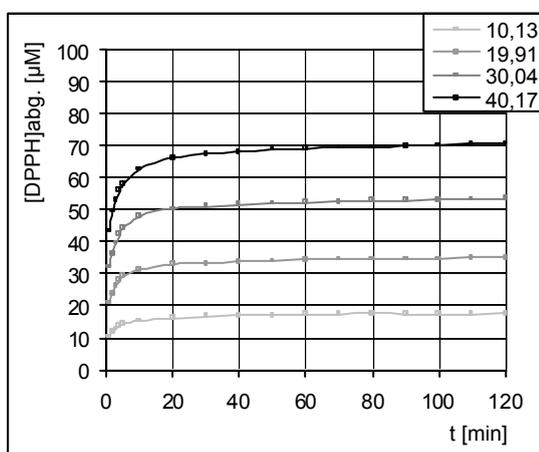


Abbildung 3.25 DPPH-Abbau durch γ -Tocopherol [μ M]

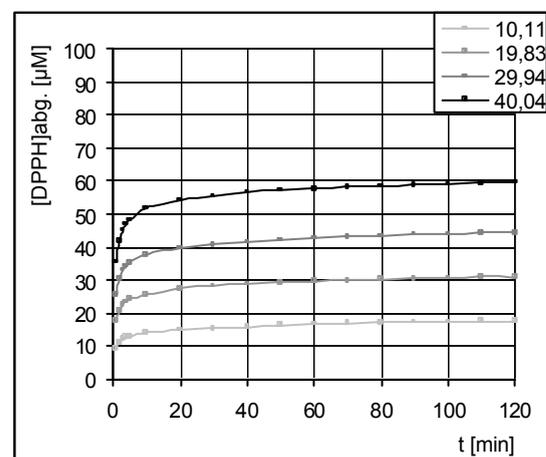


Abbildung 3.26 DPPH-Abbau durch δ -Tocopherol [μ M]

aufsteigend dargestellt. Es handelt sich jeweils um Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Alle Tocopherole zeigen bereits nach wenigen Sekunden einen deutlichen Umsatz, was ihre Eigenschaft als primäre Antioxidantien aufzeigt. Jedes Tocopherol-Molekül kann prinzipiell zwei Moleküle DPPH inaktivieren. Für α -Tocopherol ergab sich ein etwas kleinerer Umsatz:

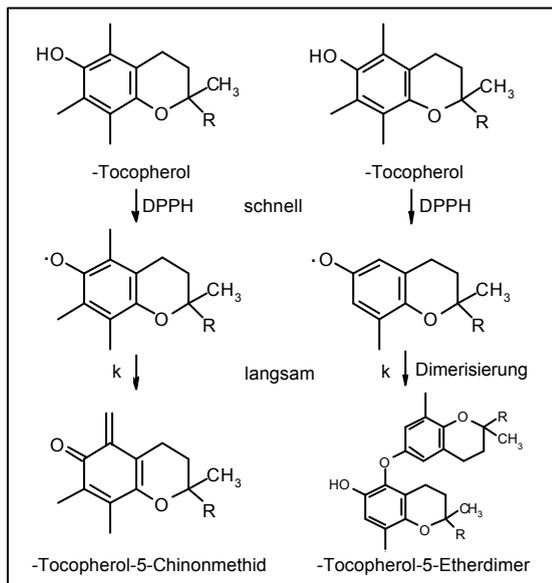


Abbildung 3.27 Reaktion von α - und γ -Tocopherol mit DPPH [16,112,130]

Tocopherol	Verhältnis [Toc. : DPPH]	k [$\mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$]
	1:1,8	0,007
	1:1,8	0,002
	1:1,8	0,0025
	1:1,7	0,003

Tab. 3.8 DPPH-Abbau durch Tocopherole; Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von DPPH mit Tocopheryl-Radikalen

Kinetisch betrachtet reagiert α -Tocopherol schneller als γ - und δ -Tocopherol, die sich mit etwa gleicher Geschwindigkeit umsetzen. β -Tocopherol reagiert merklich langsamer. Jedes Tocopherol-Molekül hat sich aber am ersten Messpunkt ($t = 1\text{min}$) schon mit einem DPPH-Radikal umgesetzt. Auf diese schnelle Reaktion beruht die antioxidative Wirksamkeit. Für die zweite Umsetzung ist:

$$v_R = k [T] [DPPH]; \text{ wobei gilt: } [T^0] = [T^0], \text{ und: } [DPPH^0] = [DPPH^0_{\text{abs.}}] + [T^0]$$

$$[DPPH](t) = \frac{(e^{k t [DPPH^0] [T^0]} - 1) [DPPH^0] [T^0]}{e^{k t [DPPH^0] [T^0]} [DPPH^0] [T^0]}$$

Gleiches gilt für β - und δ -Tocopherol. Das β -Tocopheryl-Radikal kann kein Wasserstoff-Atom direkt auf DPPH übertragen, da es keine ortho-Methylgruppen besitzt. Es muss zuerst dimerisieren. Als Hauptprodukte dieser Dimerisierung entstehen Etherdimere [112].

$$v_R = k [T]^2; \text{ wobei gilt: } [T^0] = [T^0], \text{ und: } [DPPH^0] = [DPPH^0_{\text{abs.}}] + [T^0]$$

$$[DPPH](t) = \frac{k t [T^0]^2}{1 + k t [T^0]}$$

Diese enthalten phenolische HO-Gruppen und können wieder mit dem DPPH-Radikal reagieren. Da die Dimerisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, ist die Reaktion langsamer und unabhängig von der DPPH-Konzentration ($[DPPH]$). Die -Umsatzrate ist geringer, da im Ether-Dimer nur noch eine reaktive OH-Gruppe enthalten ist. Aus den gemessenen Graphen können die k -Werte abgeschätzt werden (Tab. 3.8); -, - und -Tocopherol reagieren mit dem zweiten Molekül DPPH wie:

1 : 0,3 : 0,4.

Die etwa doppelt so schnelle -Reaktion erklärt sich mit dem Vorhandensein von zwei reaktiven ortho-Methylgruppen im Molekül. Die schnellere Reaktion von gegenüber stimmt mit der, in der Literatur beschriebenen, besonderen Aktivierung der -Position durch den Nachbar-Ring [112] überein. Der schneller Abbau der Tocopherole in Fettproben, d.h. gegenüber aggressiveren Radikalen, wird auf die bevorzugte Ringöffnung zum p-Chinon zurückgeführt (vgl. Abs 4.1.) Sie spielt bei der Reaktion mit DPPH nur in polaren Lösungsmitteln (EtOH) eine zunehmende Rolle [130].

b.) PL-Standards

Im weiteren wurde die Wirkung der Dipalmitoyl-Phosphatid-Standards (PC, PE, PI, PS und PA) auf das DPPH-Radikal untersucht. Die eingesetzte Konzentration betrug 100 μ M, gearbeitet wurde wieder mit Toluol. Für keines der Phospholipide wurde ein DPPH-Abbau beobachtet. Phospholipide können daher keine Radikale direkt inaktivieren und wirken nicht wie primären Antioxidantien als Wasserstoffdonoren. Für die sauren Phosphatide (PA, PS und PI) wurde gefunden, dass die Reaktion der Tocopheryl-Radikale mit DPPH beschleunigt wird und dadurch „glatter“ verläuft. In den beiden Diagrammen ist exemplarisch der Effekt von PA und PS zu sehen. Es ist $[DPPH]$, also der zusätzliche Effekt durch 30 μ M Phospholipid dargestellt. Der katalytische Effekt ist für die nicht permethylierten Homolgen größer. Bei - und -Tocopherol tritt zudem nach anfänglich beschleunigtem Abbau desöfteren ein Regenerationsphänomen von DPPH-Radikalen auf. Dafür verantwortlich könnte ein pH-abhängiges Gleichgewicht sein, dessen Einstellung sich aber nur schwer reproduzieren lässt.

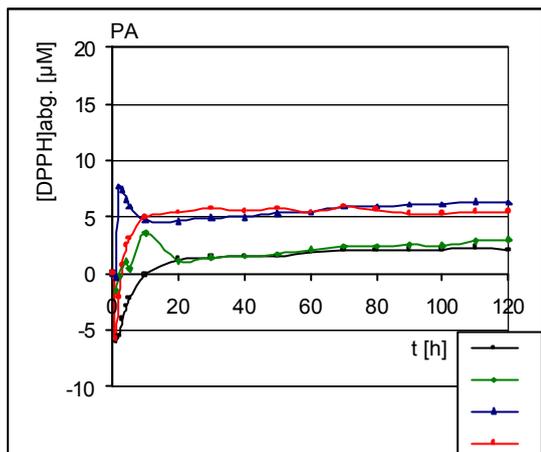


Abbildung 3.28 DPPH-Abbau, durch -, -, -, bzw. - Tocopherol (je 30µM), Katalyse von PA (30µM)

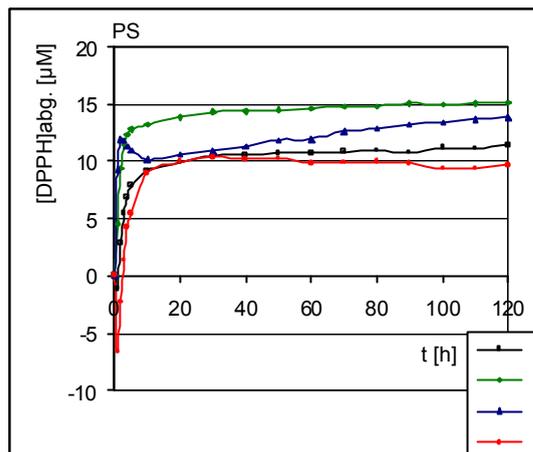


Abbildung 3.29 DPPH-Abbau durch -, -, -, bzw. - Tocopherol (je 30µM), Katalyse von PS (30µM)

c.) SL1 und Soja-PC

Der Abbau von DPPH durch SL1 und Soja-PC ist in den folgenden Abbildungen einander gegenübergestellt. Durch Fällung mit Aceton nimmt bei SL1 der Abbau

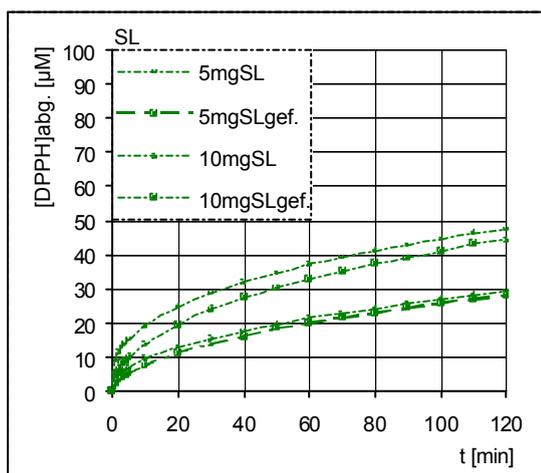


Abbildung 3.30 DPPH-Abbau durch techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin, 5mg/ml und 10mg/ml)

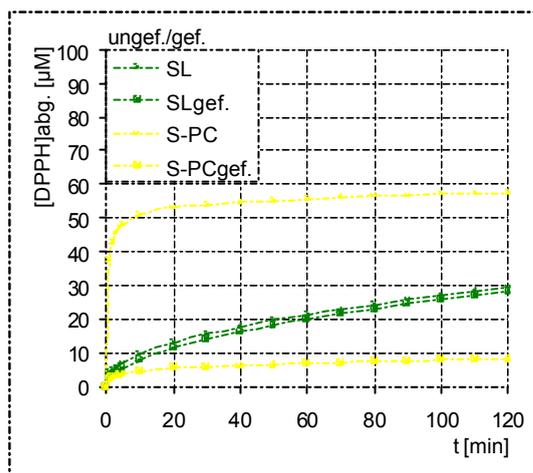


Abbildung 3.31 DPPH-Abbau durch Asolectin, (5mg/ml) bzw. Soja-PC (Epikuron, 5mg/ml), jeweils ungefällt und gefällt

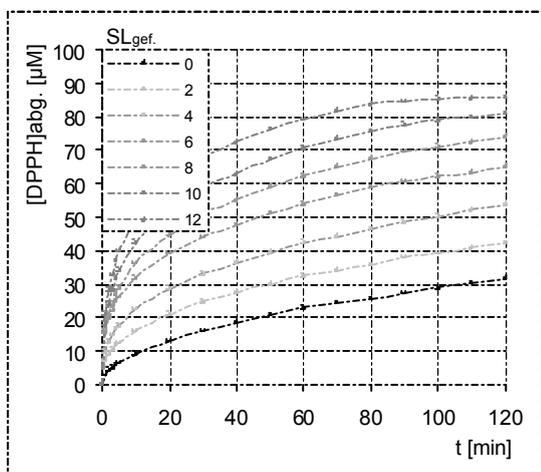


Abbildung 3.32 DPPH-Abbau durch techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin^{gef.}, 5mg/ml) in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer (0-12h) bei 110°C unter N₂

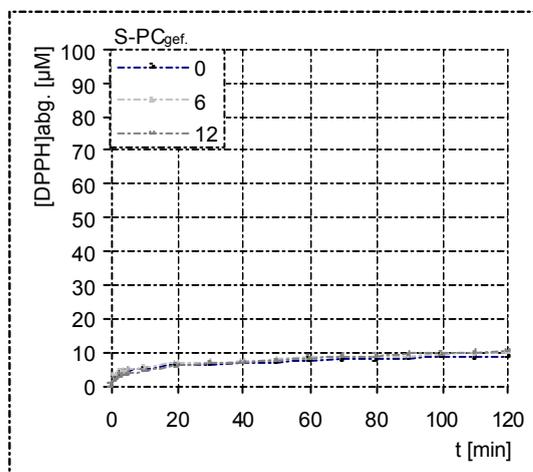


Abbildung 3.33 DPPH-Abbau durch hochangereichertes Soja-PC (Epikuron^{gef.}, 5mg/ml) in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer (0-12h) bei 110°C unter N₂

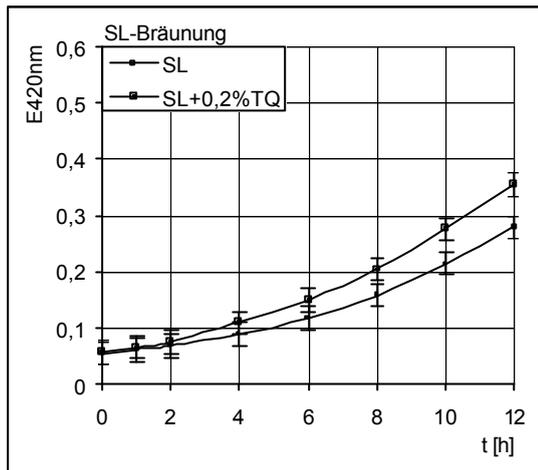


Abbildung 3.34 Bräunung von techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin, 5mg/ml) mit Zusatz von 0,2% α -Tocopherylchinon in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer (0-12h) bei 110°C (N₂)

erwartungsgemäß nicht signifikant ab. Anders beim Soja-PC. Dieses enthält zur Stabilisierung ca. 0,2% α -Tocopherol, das auch für den beobachteten DPPH-Abbau verantwortlich ist. Durch die Fällung (4-fache Fällung, vgl. 7.3.7.) wurde das α -Tocopherol praktisch vollständig abgetrennt. S-PC zeigt nun sogar wie keinen DPPH-Abbau mehr. In den darunter dargestellten Diagrammen wird der Effekt der zunehmenden Bräunung bei 110°C (0-12h) deutlich. Mit der Erhitzungszeit (unter N₂) nimmt die DPPH-Aktivität von SL1 linear zu. Soja-PC entwickelt dagegen nur eine geringe Bräunung und bleibt –auch nach 12 stündiger Erhitzung– inaktiv. Die Ergebnisse zeigen klar die Entwicklung von antioxidativen Stoffen während der thermischen Bräunung von Sojalecithin. Kinetisch entsprechen die erhaltenen Kurven eher einer Schleichreaktion ähnlich der von α -Tocopherol, als der von α -Tocopherol. Dennoch ist der Abbau von DPPH schon zu Beginn der Messung (1min.) so deutlich, dass antioxidative Stoffe dafür verantwortlich sind. Die Bräunung selbst verläuft über den Erhitzungszeitraum nicht linear, sondern mit wachsendem Anstieg. Durch Zugabe einer kleinen Menge α -Tocopherylchinon (0,2% TQ) konnte die Bräunung weiter forciert werden. Welche Bedeutung α -Tocopherylchinon bei der Entstehung des antioxidativen Effekts der Phospholipide zukommt, wird im Abschnitt 4.3.2. ausführlich diskutiert. Hier stellt sich zunächst die Frage: Warum verstärkt es die Bräunung? Möglicherweise wirkt es als Oxidationsmittel. In diesem Zusammenhang ist auch von Bedeutung wie O₂ die Bräunung beeinflusst. Auf der anderen Seite ist eine starke Bräunung von Sojalecithin in keinem Fall wünschenswert.

d.) Effekt von kurzzeitiger starker Erhitzung (unter Luft)

Die Wirkung einer kurzzeitigen, aber starken thermischen Behandlung von Sojalecithin auf den DPPH-Abbau wurde untersucht, um die Bräunung, die bei langem Erhitzen mit zunehmender Erhitzungszeit entsteht, zu umgehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bräunung bei kurzer Erhitzungsdauer auch bei 150°C vernachlässigbar klein bleibt. Im folgenden Versuch wurde Sojalecithin bzw. Soja-PC (ungefällt) bei 100°C bzw. 150°C für 5min. erhitzt und der DPPH-Abbau verglichen. Der DPPH-Versuch wurde mit 10mg/ml SL1 und 5mg/ml S-PC durchgeführt (7.3.4.). Zum Vergleich wurde auch ein Wert; 10mg/ml SL1, 30min. bei 110°C unter N₂ erhitzt, vermessen. Zunächst einmal fällt auf, dass die DPPH-Aktivität des Tocopherols im ungefällten Soja-PC durch Erhitzung praktisch nicht geändert wird.

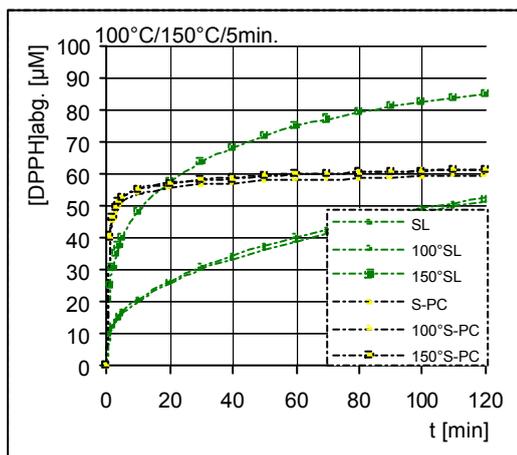


Abbildung 3.35 DPPH-Abbau durch techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin, 10mg/ml) bzw. hochangereichertes Soja-PC (Epikuron, 5mg/ml), Änderung durch Erhitzung für 5min auf 100°C bzw. 150°C unter Luftzutritt

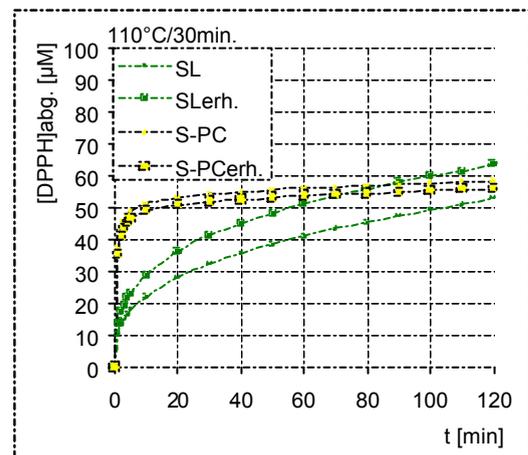


Abbildung 3.36 DPPH-Abbau durch techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin, 10mg/ml) bzw. hochangereichertes Soja-PC (Epikuron, 5mg/ml), Änderung durch Erhitzung für 30min auf 110°C unter N₂

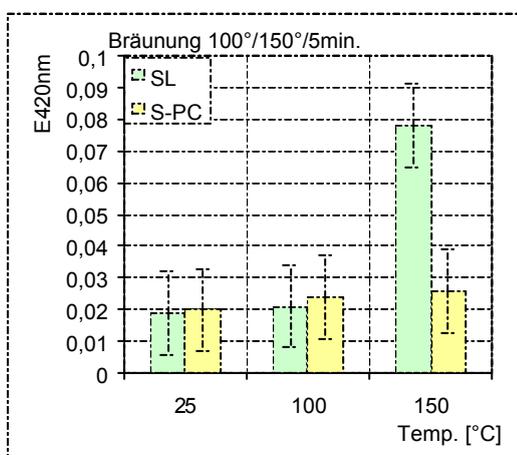


Abbildung 3.37 Bräunung von techn. Sojalecithin (Asolectin, 10mg/ml) bzw. hochangereichertes Soja-PC (Epikuron, 5mg/ml) durch Erhitzung für 5min auf 100°C bzw. 150°C unter Luftzutritt

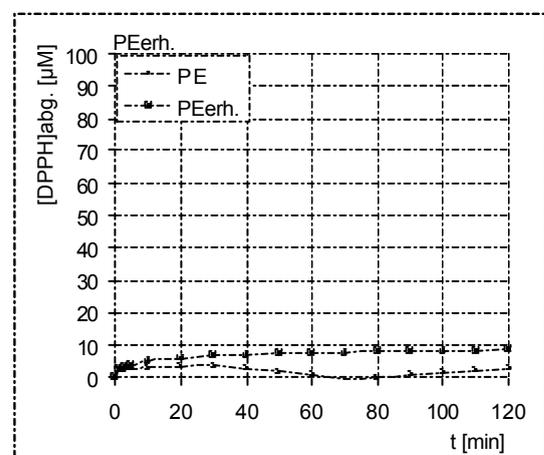


Abbildung 3.38 DPPH-Abbau durch PE (2,5mg/ml) und erhitztes PE (2,5mg/ml, 15min, 150°C, unter Luftzutritt)

Soja-PC selbst zeigt bei 5 minütiger Erhitzung, sowohl bei 100° als auch bei 150°C, nur eine sehr schwache Bräunung und entwickelt deshalb auch keinen zusätzlichen Effekt. Die 100°C-Behandlung von SL1 zeigt ebenfalls weder eine Bräunung, noch einen erhöhten DPPH-Abbau. Interessant ist das Ergebnis der 150°C-Erhitzung. Bereits nach 5min. ist beim SL1 ein deutlich erhöhter DPPH-Abbau messbar und das, ohne dass die Bräunung über eine Extinktion von 0,1 steigt. Die Probe bleibt nahezu farblos. Der starke Anfangsabbau zeigt das antioxidative Potential der gebildeten Strukturen. Allerdings zeigt Dipalmitoyl-PE als solches –auch bei 15min Erhitzung auf 150°C– keinen vergleichbaren Effekt. Die eingesetzte Menge entspricht etwa der im Sojalecithin enthaltenen PE. Der Wirkung geht demnach nicht allein auf PE zurück. Ein Vergleich der Bräunung von SL1 bei 150°C unter N₂ und unter Luft zeigt, dass offenbar Sauerstoff die Bräunung beschleunigt. Im Hinblick auf die Fehlerbreite ist eine genaue Aussage unmöglich. Der O₂-Einfluss wird noch unter 3.3.4. betrachtet.

d.) saure Katalyse

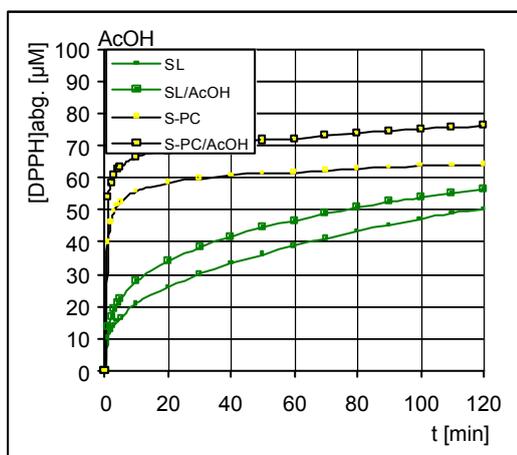


Abbildung 3.39 DPPH-Abbau durch techn. Sojalecithin (Asolecithin, 10mg/ml) bzw. hochangereichertes Soja-PC (Epikuron, 5mg/ml), Einfluss von AcOH (100µl/ml)

Wie die Grafik zeigt, wird der DPPH-Abbau durch 10%ige Essigsäurezugabe zur Messlösung ganz allgemein verstärkt. Die Beobachtung steht im Einklang mit dem unter Punkt b.) beschriebenen Effekt der sauren Phospholipide. In Bezug zu c.) ist zu bemerken, dass der gemessene Anstieg der DPPH-Aktivität auch über die Entstehung von sauren Verbindungen erklärbar ist; etwa durch die Blockierung die Aminogruppe des PE's, die dann nicht mehr die Phosphatgruppe neutralisiert. Für Soja-PC spricht andererseits nichts für die Entstehung von Säuren bei Kurzeiterhitzung auf 150°C.

3.3.4. Vergleich von Sojalecithin und Soja-PC in Bräunung und Stabilisierung

a.) 1%ig in Rapsöl bei 110°C, Einfluss von Sauerstoff

Der Einfluß von Sauerstoff auf Bräunung, POZ, ANZ, konjugierte Oxidene und 2,4-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz wurde bei 110°C für 24h an Rapsöl untersucht. Dazu wurde 99g Rapsöl (Charge: R2) mit 1g SL1 bzw. 1g Soja-PC^{gef.} versetzt, mit Chloroform auf 200ml aufgefüllt und 24mal je 8ml in 25ml-Vials pipettiert. Ein Blindwert wurde analog mit 100g Rapsöl angesetzt. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff vertrieben. Für die Untersuchung unter Sauerstoff wurden die Vials offen im Trockenschrank erhitzt. Die Proben unter Luftausschluss wurden direkt nach der Stickstoffbegasung verschlossen und erhitzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden 2 x 3 Proben entnommen und anhand der oben genannten Parameter charakterisiert (7.3.). Über die Reaktion mit Ehrlichs's-Reagenz (2,4-(Dimethyl-

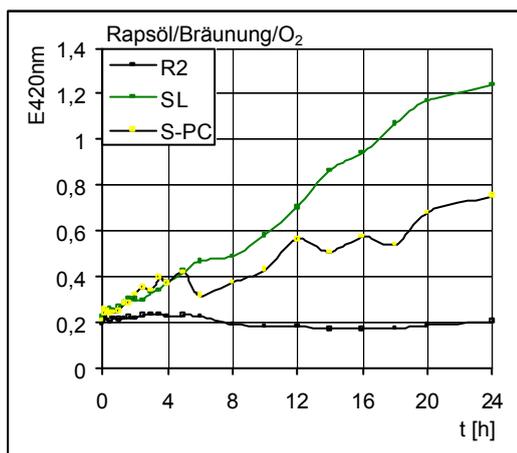


Abbildung 3.40 Bräunung von Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), unter Luftzutritt bei 110°C

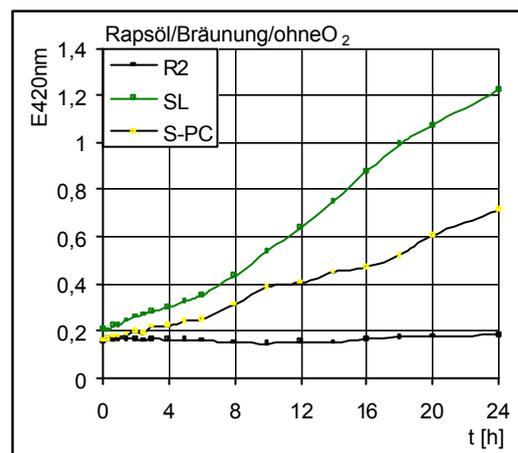


Abbildung 3.41 Bräunung von Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), unter Luftausschluss bei 110°C

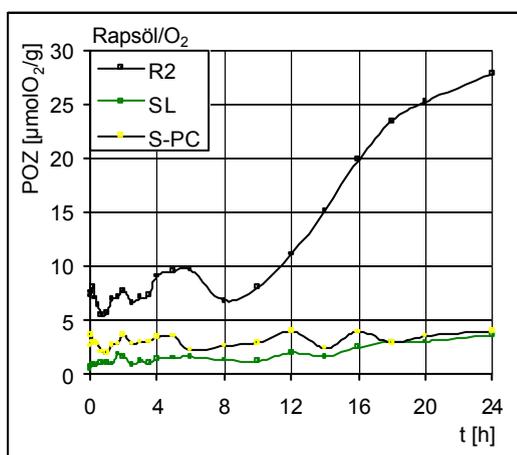


Abbildung 3.40a Peroxidzahl von Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), unter Luftzutritt bei 110°C

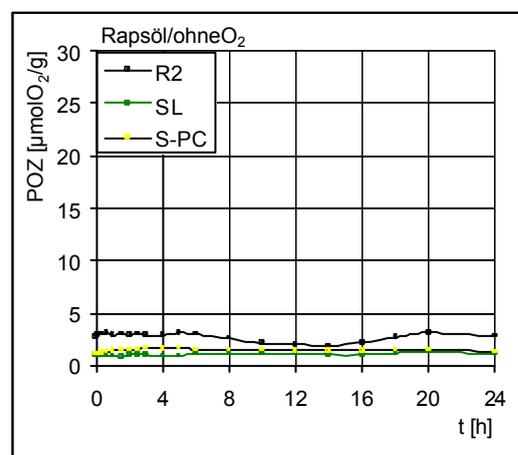


Abbildung 3.41a Peroxidzahl von Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), unter Luftausschluss bei 110°C

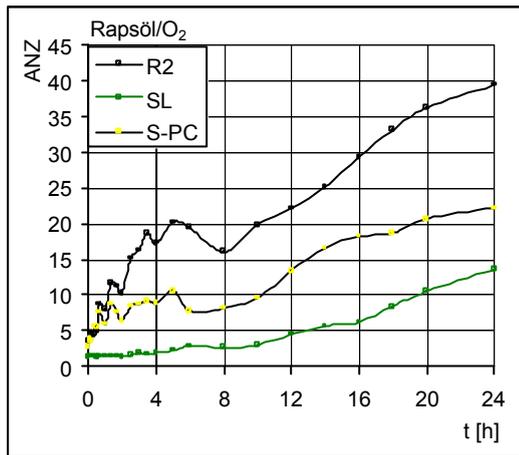


Abbildung 3.40b Anisidinzahl von Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef}), unter Luftzutritt bei 110°C

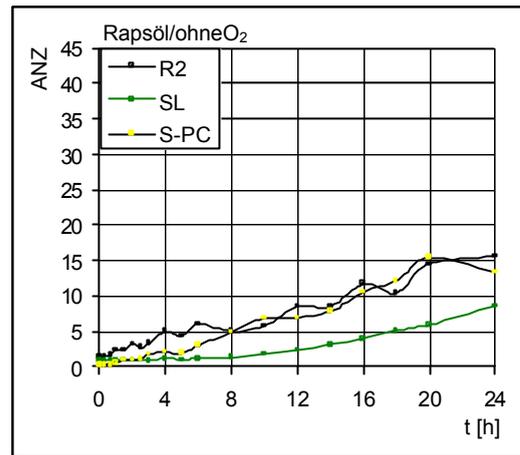


Abbildung 3.41b Anisidinzahl von Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef}), unter Luftausschluss bei 110°C

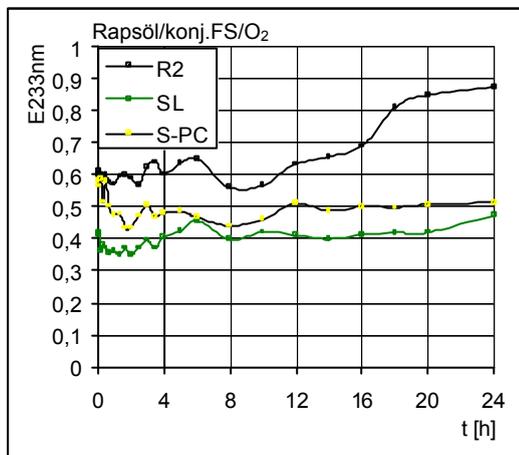


Abbildung 3.40c konjugierte Fettsäuren in Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef}), unter Luftzutritt bei 110°C

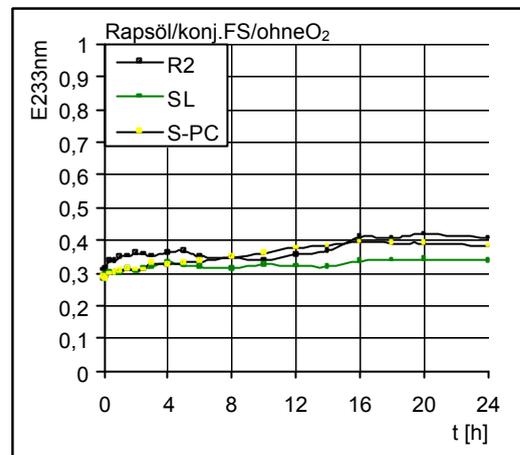


Abbildung 3.41c konjugierte Fettsäuren in Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef}), unter Luftausschluss bei 110°C

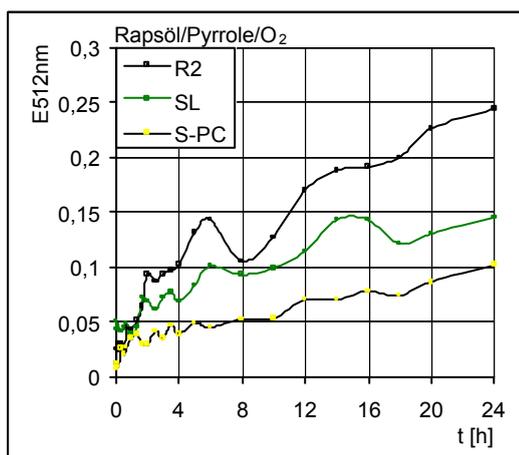


Abbildung 4.40d p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz (Pyrrrole) in Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef}), unter Luftzutritt bei 110°C

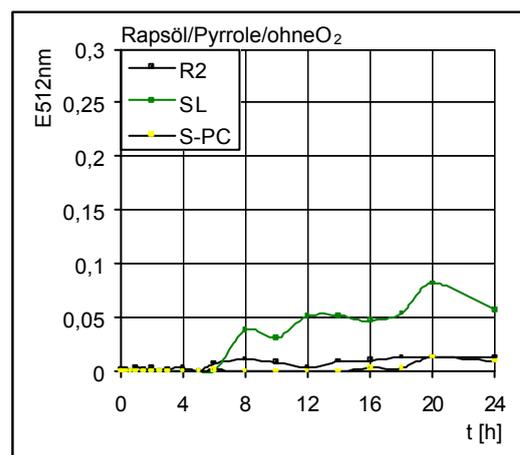


Abbildung 3.41d p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz (Pyrrrole) in Rapsöl (R2) bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef}), unter Luftausschluss bei 110°C

amino)-benzaldehyd werden über eine Rotfärbung u.a. Pyrrolstrukturen erfasst –vgl. Abb. 3.1 S.36 [91,92]. Kalibriert wurde mit N-Methylpyrrol (7.3.6.).

Der Versuch hat gezeigt, dass die Bräunung beider Proben nicht vom Sauerstoffgehalt beeinflusst wird. Es handelt sich daher nicht einfach um eine oxidationsbedingte Bräunung. Die relativ hohen Werte, die in der frühen Erhitzungsphase bei Soja-PC unter Luft gemessen wurden, sind innerhalb der Schwankungsbreite –welche hier höher ist als unter N₂– nicht signifikant größer. SL1 verursacht etwa die doppelte Bräunungsintensität verglichen mit Soja-PC. Der Grund könnte eine Maillard-Bräunung von Glycolipiden mit PE sein. Erhöhte Pyrrol-Werte in der SL1-Probe sprechen dafür. Anhand der POZ und der konjugierten Oxidene (Ext.^{233nm}) ist zu erkennen, dass unter N₂ innerhalb von 24h kein Verderb stattfindet. Interessant an den Unter-Luft-Proben ist, dass nur die Blindprobe (ohne Zusatz von PL) ab ca. 8h zu autoxidieren beginnt. Die konjugierten Oxidene bestätigen das Phänomen. Auch die ANZ der Blindprobe ist entsprechend erhöht. Aber auch sämtliche anderen Proben zeigen mit zunehmender Erhitzungszeit mehr Anisidin-reaktive Verbindungen. Die gemessenen Werte mit Soja-PC sind größer als die mit SL1. Sie sind etwa doppelt so hoch und zeigen eine vermehrte Bildung von Carbonyl-Verbindungen mit PC an. Bei SL1 können diese mit PE über Schiff-Basen zu Folgestrukturen abreagieren. Unter N₂ ergab sich tatsächlich eine vermehrte Pyrrolbildung. Die Pyrrole können hier aber nicht über den oxidativen „Hidalgo-Zamora-Weg“ [89] entstanden sein. Vermutlich stammen sie aus der Maillard-Bräunung. Auf der anderen Seite muss beachtet werden, dass die Rotfärbung von Ehrlichreagenz nicht spezifisch für Pyrrole ist. So ergeben sich bereits erhöhte Werte im oxidationsbelasteten Blindwert. Obwohl die Unter-Luft-SL1-Probe die kleinste Oxidationsbelastung zeigt, hat sie doch höhere Pyrrol-Gehalte als die Soja-PC-Probe. Damit zeigt sich, dass die p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz nicht nur auf Oxidationsprodukte zurückgeht.

Der Versuch wirft zwei Fragen auf. Zum einen; wodurch erzeugt Soja-PC unter O₂-Abwesenheit eine Bräunung, und zum anderen; welche Rolle spielt die Bräunung der Phospholipide im Bezug auf die verbesserte Oxidationsstabilität? Gibt es einen Zusammenhang mit den im Rapsöl enthaltenen Tocopherolen? Im nächsten Versuch wird daher die Bräunung von Soja-PC und SL1 in Ethyllinolat ^{-Toc.} bestimmt.

b.) 1%ig in Ethyllinolat bei 110°C, Einfluss von 0,05% -Tocopherol

Der Versuch wurde analog a.) durchgeführt. Anstelle von Rapsöl wurde aber Ethyllinolat als Modellsubstanz benutzt. Durch Zugabe von 0,05% -Tocopherol lässt sich dessen Einfluss auf Bräunung und Verderb bestimmen. Gearbeitet wurde unter Luftzutritt. Die Messung der Pyrrole wurde zudem optimiert. Bei Hidalgo et al. [92] werden die Proben nach der Zugabe von Ehrlich-Reagenz 1h auf 60°C erhitzt. Wie sich gezeigt hat, ist die Umsetzung von N-Methylpyrrol besser, wenn die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur belassen wird (vgl. Abbildungen d und e).

Wie man sieht, zeigt in Ethyllinolat Soja-PC so gut wie keine thermische Bräunung, es ist also anzunehmen, dass im Rapsöl sekundäre Inhaltsstoffe an der Bräunung beteiligt sind. Der oxidative Verderb der Blindprobe tritt unabhängig von -Toc. nach ~ 8h ein.

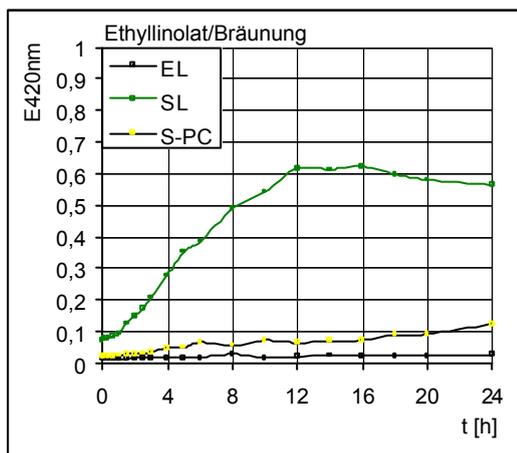


Abbildung 3.42 Bräunung von Ethyllinolat bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

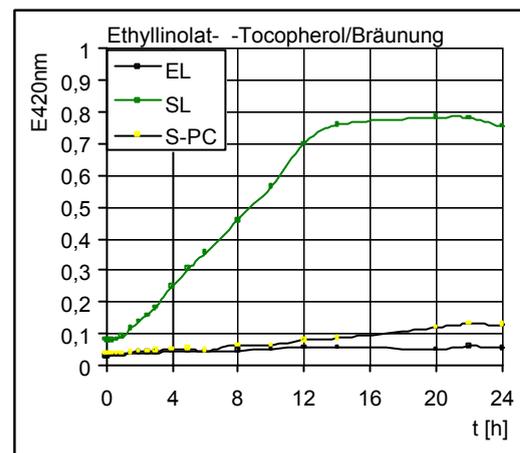


Abbildung 3.43 Bräunung von Ethyllinolat/Tocopherol bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

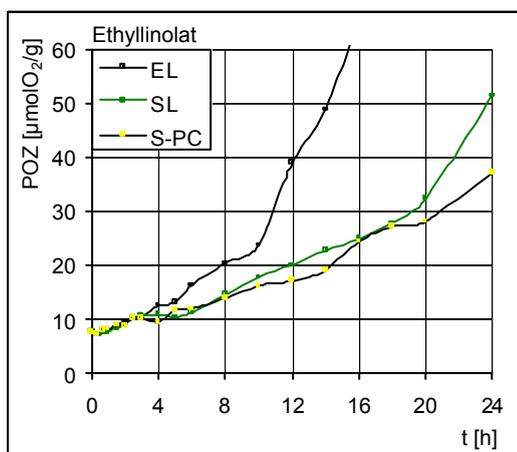


Abbildung 3.42a Peroxidzahl von Ethyllinolat bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

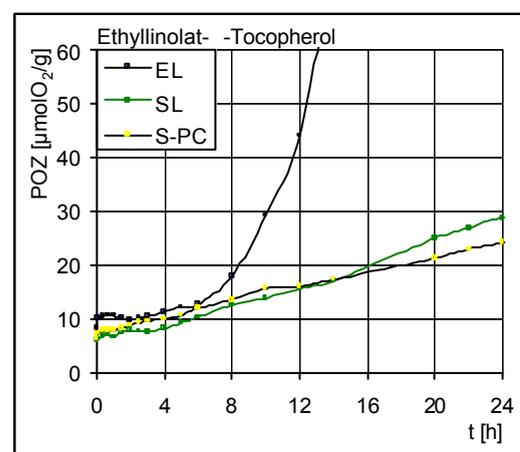


Abbildung 3.43a Peroxidzahl von Ethyllinolat/Tocopherol bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

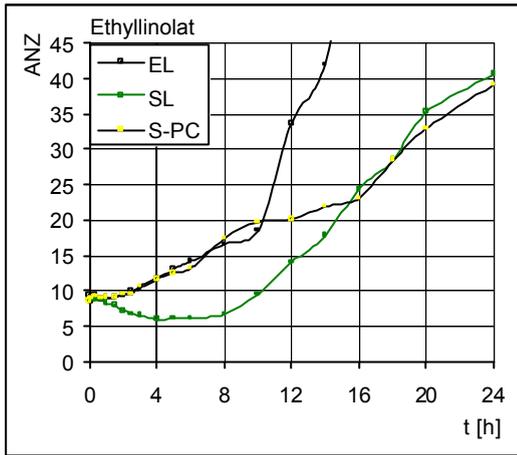


Abbildung 3.42b Anisidzahl von Ethyllinolat bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

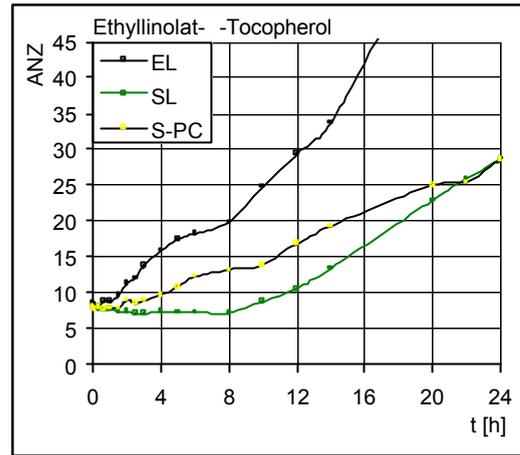


Abbildung 3.43b Anisidzahl von Ethyllinolat/Tocopherol bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

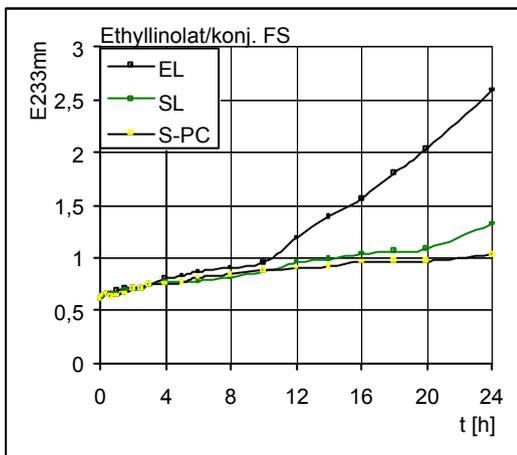


Abbildung 3.42c konjugierte Fettsäuren in Ethyllinolat bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

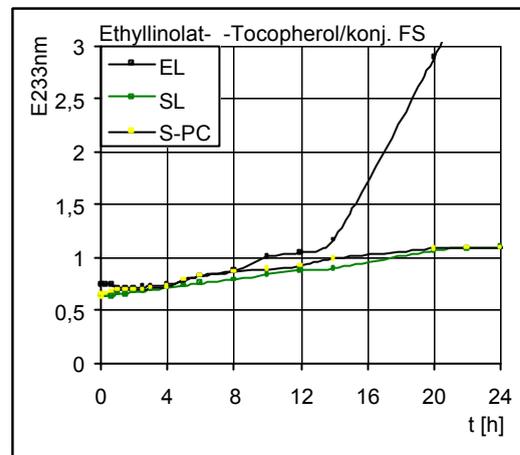


Abbildung 3.43c konjugierte Fettsäuren in Ethyllinolat/Tocopherol bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

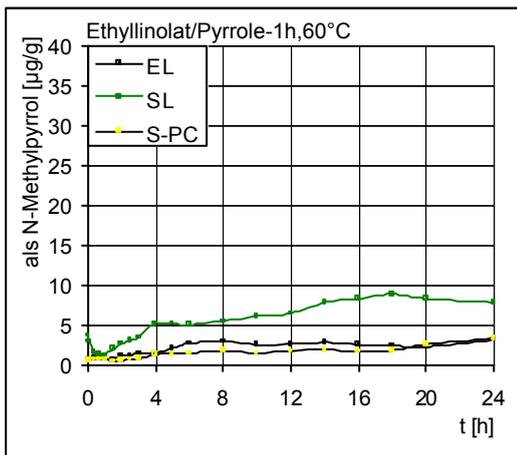


Abbildung 3.42d p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz (Pyrrrole) in Ethyllinolat bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

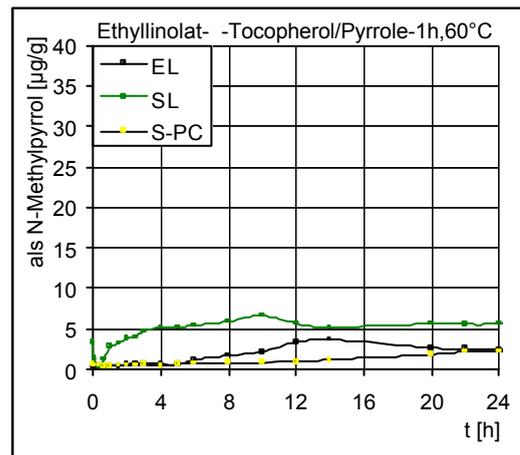


Abbildung 3.43d p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz (Pyrrrole) in Ethyllinolat/Tocopherol bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

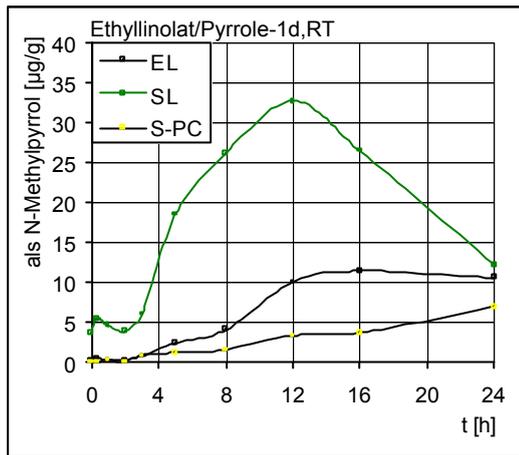


Abbildung 3.42e p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz (Pyrrole) in Ethyllinolat bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

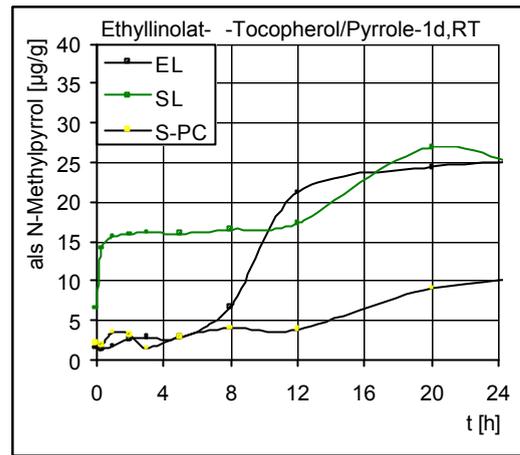


Abbildung 3.43e p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz (Pyrrole) in Ethyllinolat/Tocopherol bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

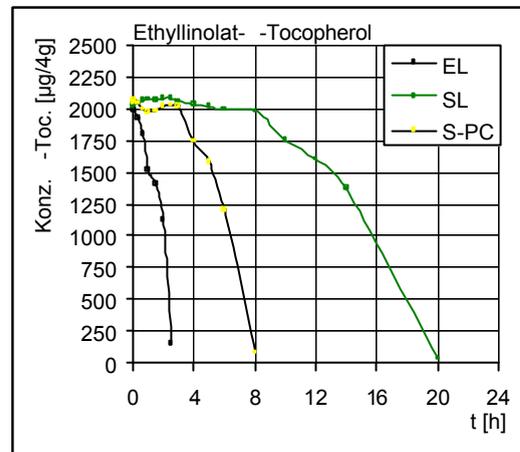


Abbildung 3.43f Tocopherol-Abbau in Ethyllinolat/Tocopherol bei Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin) bzw. hochangereichertem Soja-PC (Epikuron^{gef.}), bei 110°C

Die oxidative Stabilität der Lecithinproben ist wie im Rapsversuch erhöht. Die Induktionsperiode liegt zwischen 16h und 20h, im Falle der -Toc.-Proben liegt sie noch höher. Die Bräunung, die mit SL1 auftritt, ist nach 12h abgeschlossen und wird von -Tocopherol nur wenig verstärkt. Auch die mit SL1 entstandenen „Pyrrol-Strukturen“ erreichen bei Abwesenheit von -Tocopherol an der Stelle 12h ihr Maximum. Wenn zusätzlich -Tocopherol enthalten ist, wird bereits in den ersten 5 Erhitzungsminuten eine größere Menge an Pyrrol-Strukturen gebildet. Die Konzentration ist zwar nur halb so groß wie am 12h-Maximum der tocopherolfreien Probe, bleibt dafür aber über mehrere Stunden praktisch konstant. Der Linolsäure-Verderb täuscht Pyrrole vor, wie an der Blindprobe ab einer Zeit > 8h zu sehen ist. Der Abbau des -Tocopherols wurde über HPLC (7.2.1.) bestimmt. Er ist in der

Blindprobe bereits nach ca. 2h halbiert. Mit 1% Soja-PC wird das α -Tocopherol erst nach ca. 6,5h auf die Hälfte reduziert. Unter dem Einfluss von 1% SL1 erfolgt die Halbierung erst nach ca. 16h. Der Abbau setzt hier bereits ein noch bevor die Bräunung abgeschlossen ist. Obwohl sich ein Zusammenhang zwischen Bräunung und verzögertem α -Tocopherol-Abbau andeutet, scheinen aber eher die Produkte der frühen Bräunungsreaktion eine Wirkung zu haben und nicht die Bräunungsprodukte selbst.

4. Wechselwirkung mit primären Antioxidantien – Synergismus mit Tocopherolen

4.1. phenolische und polyenische Antioxidantien

Antioxidantien sind als Substanzen definiert, die in nur geringen Konzentrationen (100–500ppm) eine signifikante Verzögerung der Oxidation leicht oxidierbarer Substrate bewirken [7]. Allgemein werden Antioxidantien je nach Reaktionsweise in primäre und sekundäre Antioxidantien eingeteilt [104]. Primäre Antioxidantien unterbrechen die Radikalkettenreaktion indem sie reaktive Radikale Wasserstoff (e^- und H^+) donieren und dabei selbst in reaktionsträge Radikale übergehen, die die Kettenreaktion durch H-Abstraktion nicht fortsetzen. Sekundäre Antioxidantien sind solche, die den Fettverderb über verschiedene andere Mechanismen verzögern, z.B.

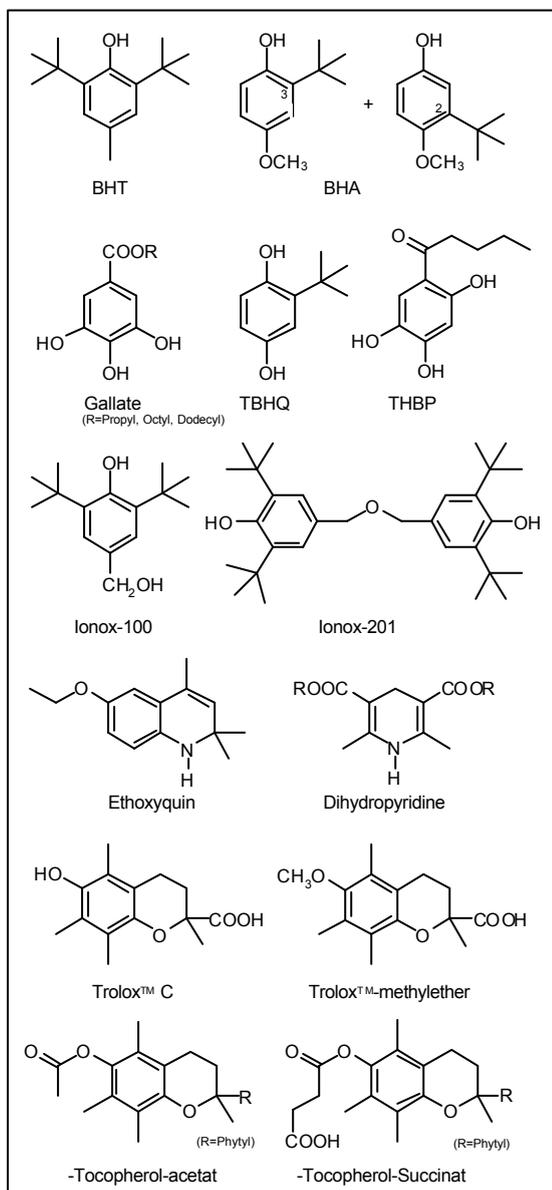


Abb. 4.1 synthetische Antioxidantien

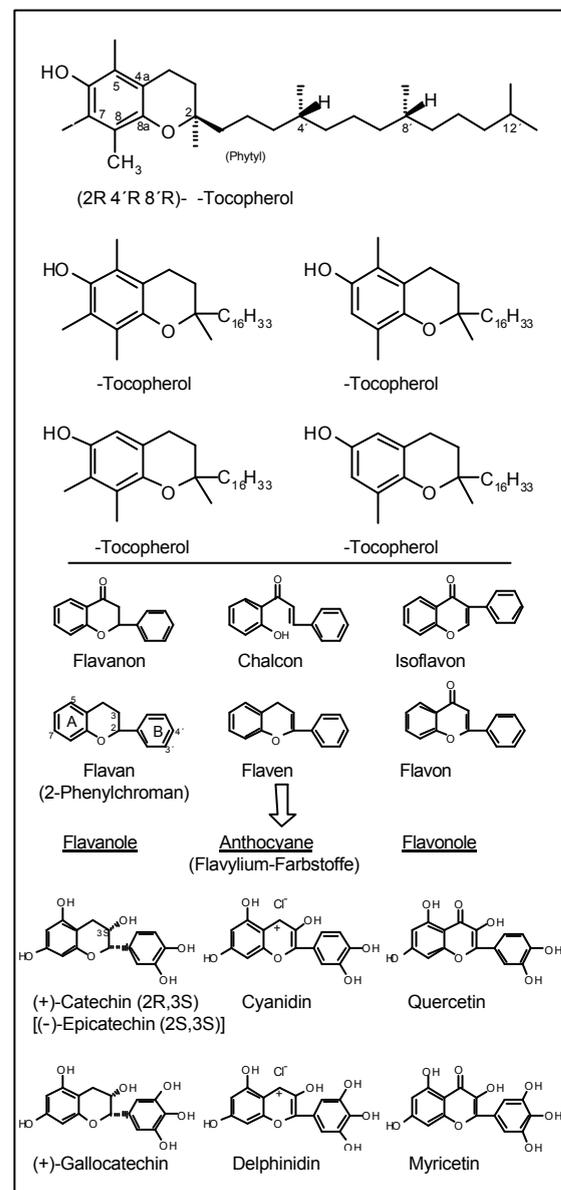


Abb. 4.2 Tocopherole und Flavonoide

über das Quenchen von Singulett-Sauerstoff oder synergistische Wechselwirkungen. Die meisten primären Antioxidantien sind phenolische Verbindungen mit OH-Gruppen. Ihre Wirkung beruht auf der Mesomerie-Stabilisierung der gebildeten Phenoxy-Radikale. Da die Radikalstelle am Sauerstoff auch auf die ortho- und para-Kohlenstoffatome verteilt ist, ergibt sich eine geringere Reaktivität. Alkoxy- und Hydroxy-Radikale abstrahieren H-Atome aus der Linolsäure mit $k = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Hydroperoxy-Radikale noch mit ca. $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; Tocopherolsemichinon-Radikale aber nur noch mit $k < 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [124].

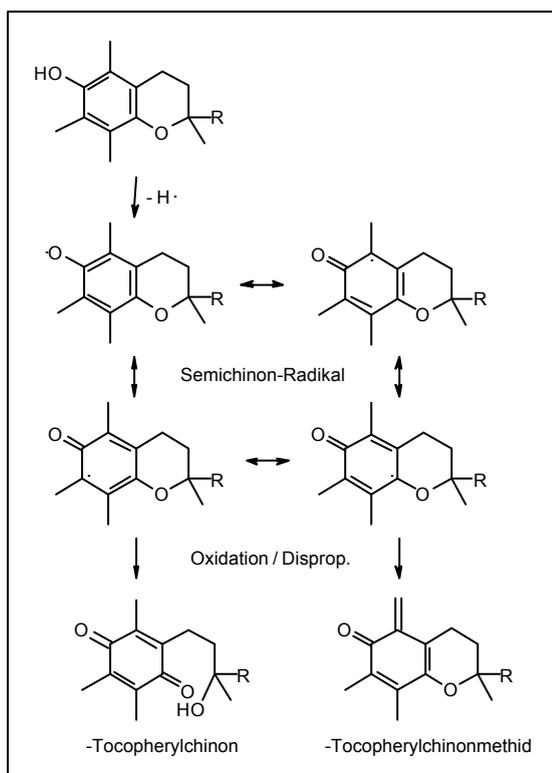


Abb. 4.3 Mesomerie des -Tocopherol-Semichinonradikals

Substituent	p-subst. Benzoesäuren		p-subst. Phenole	
	pK _s	pK _s (Hammett)	(Brown)	E ⁷ [V]
-NO ₂	3,42	0,78	0,79	1,23
-COOH	3,75	(0,45)	(0,24)	1,04
-H	4,20	0	0	0,97
-CH ₃	4,37	-0,17	-0,31	0,87
-OCH ₃	4,47	-0,27	-0,78	0,73
-OH	4,57	-0,37	-0,92	0,46
-NH ₂	4,86	-0,66	-1,30	0,41
-N(CH ₃) ₂	5,03	-0,83	-1,70	0,36

Tab. 4.1 Substituentenkonstanten nach Hammett bzw. Brown und Redoxpotentiale para-substituierter Phenole [63,214,224]

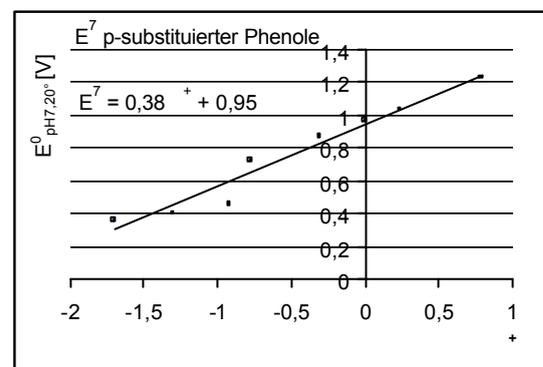


Abb. 4.4 Brown's Substituentenkonstanten und Redoxpotentiale para-substituierter Phenole (vgl. Tab. 4.1)

Phenol selbst wirkt nicht als Antioxidans, da es bei pH 7 mit 0,97V eine zu großes Redoxpotential besitzt, aber Alkylgruppen in ortho- und para-Position erhöhen die Elektronendichte der Hydroxylgruppe und die Reaktivität mit Lipid-Radikalen [69]. Der elektronenschiebende oder induktive Effekt der Substituenten kann über die Hammett-Gleichung quantifiziert werden. Hierbei vergleicht man die Dissoziationskonstanten von Benzoesäure (K_s^0) mit denen der entsprechend para-substituierten Verbindungen (K_s) [214]. Über den Logarithmus des Verhältnisses werden die

Substituentenkonstanten σ definiert. Je kleiner σ desto größer der induktive Effekt.

$$\lg \frac{K_s}{K_s^0} = \rho K_s$$

Aus der Beobachtung, dass gleichartige Variationen der Reaktanden in zwei Reaktionen gleichartige Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten bewirken, dass also die Auftragung von $\lg(k/k^0)$ gegen σ eine Gerade ergibt, hat Hammett eine Reaktionskonstante ρ eingeführt. Sie ist der Anstieg der Gerade und für die Bezugsreaktion der Benzoesäure gleich 1.

$$\lg \frac{k}{k^0}$$

Substituenten nehmen ρ -Werte zwischen -1 und 1 an. Positive Werte bedeuten, der Substituent entzieht Elektronendichte. Diese Substituenten haben meist Doppelbindungen (vgl. Tab. 4.1). Substituenten mit negativen Werten erhöhen die Elektronendichte über ihre freien Elektronenpaare. Vergleicht man die Dissoziationskonstanten para-substituierter Benzoesäuren mit denen der para-substituierten Phenylethansäuren bzw. Phenylpropansäuren, so betragen die ρ -Werte: 1 , $0,489$ und $0,212$ [214]. Der Parameter ρ ist ein Maß für die Empfindlichkeit einer Reaktion auf die Änderung der Substituenten. Der Wert kann auch über 1 liegen. Für die Dissoziation para-substituierter Pyridine ist $\rho = 5,2$ [214]. Da Pyridin eine Base ist, wird zur Formulierung der Reaktion oft die Rückreaktion angegeben, hier ist $\rho = -5,2$. Mit den Hammett-Substituentenkonstanten lassen sich Dissoziationsreaktionen gut beschreiben aber für Oxidationen beobachtet man stärkere Substituenteneinflüsse als vorhergesagt. Brown hat hierfür die Substituentenkonstanten ρ^+ eingeführt [21]. Bezugsreaktion ist die Hydrolyse von Cumylchlorid.

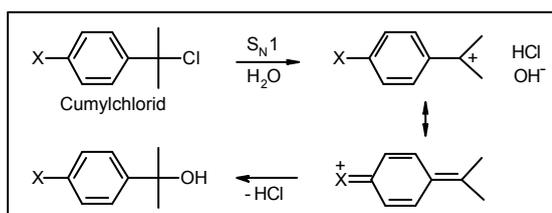


Abb. 4.5 Hydrolyse von Cumylchlorid

Das gebildete Carbokation (daher $^+$) wird über ein freies Elektronenpaar von X mesomer über eine chinoide Struktur stabilisiert. Die Korrelation der Brown-Substituentenkonstanten mit dem Redoxpotential para-substituierter Phenole ist in Abb. 4.4 dargestellt. Von links nach rechts entsprechen die Punkte im Diagramm den Substituenten der darüberstehenden Tabelle. Alkyl-Gruppen, Alkoxy-Gruppen und Hydroxyl-Gruppen erniedrigen das Redoxpotential. Sie sind in Antioxidantien verbreitet (Abb. 4.1, Abb. 4.2). Im Falle der p-OH-Gruppe –also dem p-Hydrochinon– ergibt sich mit $E^7 = 0,46V$, etwa der gleiche Wert wie für α -Tocopherol ($E^7 = 0,48V$; zum Vergleich Ascorbat $0,28V$ [11,35]). Die Regression ist nicht optimal, da nicht alle auftretenden Effekte berücksichtigt werden. Yukawa und Tsuno [257] erhalten bsw. für die Hydrolyse von para-substituierten Ethinylbenzolen zu Methyl-Phenyl-Ketonen eine auffallend gute Regression, indem sie statt der ρ - und σ -Werte eine Pareto-Wichtung beider Größen verwenden ($r = 0,81$).

$$\lg \frac{k}{k^0} = (0,81 \rho + 0,19 \sigma) \quad (r = 0,81)$$

Es ist zu beachten, dass meta-Substituenten andere ρ und σ -Werte haben, als der entsprechende Substituent in para-Stellung. Die Konstanten für die meta-Substituenten resultieren aus deren induktiven Effekten, während für para-Substituenten die Summe aus induktiven und Resonanzeffekten ausschlaggebend ist. Nach [110] kann das Ein-Elektronen-Redoxpotential eines phenolischen Antioxidants über die Summen der einzelnen Brown-Substituentenkonstanten berechnet werden.

$$E^7 = 0,95 \rho + 0,31 \sigma$$

Bei ortho-Substituenten tritt das Problem auf, dass die elektronischen Effekte durch sterische Effekte überlagert werden. In Analogie zu Hammett wurde von Taft ein sterischer Parameter abgeleitet. Betrachtet wird die Geschwindigkeit der säurekatalytischen Hydrolyse von α -substituierten Essigsäuremethylestern; Bezugswert ist die Methylgruppe ($X = H$) [39].

Das bekannteste synthetische Antioxidants ist das butylierte Hydroxytoluol BHT (Abb. 4.1.). Die Verbindung ist fettlöslich und in Wasser praktisch unlöslich. Nach Abstraktion des phenolischen Wasserstoffatoms kann sich das freie Elektron durch Mesomeriestabilisierung im aromatischen Ring verteilen. Durch die sterische Hinderung der zwei tert.-Butylgruppen wird die Abstraktionstendenz des entstandenen

Radikals stark unterdrückt. Andererseits behindert die tert.-Butylgruppen aber auch die H-Donor-Reaktion der HO-Gruppe. BHT zeigt in Kombination mit BHA einen synergistische Effekt [11]. BHA ist üblicherweise ein 9:1 Mischung aus 3- und 2-tert.-Butylhydroxyanisol [202]. Das sterisch blockierte 3-Isomer ist die aktivere Form, sein Phenoxyradikal soll durch BHT regeneriert werden [11]. Zwei BHA-Radikale stabilisieren sich durch Dimerisierung über die nicht tert.-butylierte ortho-Position [121]. BHT kann derartige Dimere nicht bilden. Hier erfolgt die Oxidation an der Methylgruppe. Neben BHT-Alkohol und BHT-Aldehyd findet man insbesondere das Methid-Dimer, das zum Chinonmethid-Dimer weiteroxidiert. In der Mischung von BHT und BHA rekombiniert zusätzlich das Methid-Radikal des BHT mit der freien ortho-Position des BHA [121]. Dieses Abbauprodukt ist ebenfalls noch antioxidativ. BHT-Alkohol ist der Grundkörper der Antioxidantien der Ionox-Gruppe. Das tert.-Butylhydrochinon (TBHQ) wird in den USA verwendet und ist in pflanzlichen Ölen aktiver als BHA und BHT [202]. Das Semichinonradikal kann zum para-Hydrochinon und para-Chinon disproportionieren [69]. TBHQ wird durch Citronensäure synergistisch verstärkt.

Ein weiterer bedeutender ortho-Effekt tritt durch eine zusätzliche OH-Gruppen in 2- oder 6-Position auf. Das Semichinon-Radikal wird hier durch eine intramolekulare Wasserstoff-Brückenbindung stabilisiert, es kann sich ferner zum ortho-Chinon und ortho-Hydrochinon disproportionieren und so weitere Radikale abfangen [69].

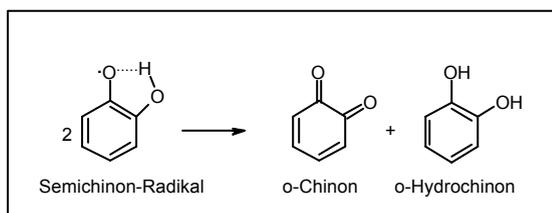


Abb. 4.6 Disproportionierung von o-Semichinon-Radikalen

Unter den Estern der Gallussäure wird das Propylgallat (PG) am häufigsten eingesetzt. PG ist polarer als die bisher diskutierten Verbindungen und wird dort verwendet wo die fettlöslichen Verbindungen BHA, BHT und TBHQ nicht eingesetzt werden können [202]. Es zersetzt sich bei Temperaturen über 148°C. Octyl- und Dodecylgallat sind besser fettlöslich und weniger hitzeempfindlich. PG wird synergistisch durch BHA verstärkt, da es ähnlich wie BHT das BHA-Radikal in ein stabileres Radikal über-

führen kann. Kurechi et al. [121] fanden auch hier Crossdimere. Das BHA-Radikal rekombiniert über die nichtalkylierte ortho-Position mit einem Oxyradikal (Semichinonradikal) des PG's. Die beiden möglichen Strukturen sind selbst antioxidativ, so dass der synergistische Effekt auch über die Verlängerung der effektiven Halbwertszeit der antioxidativen Verbindungen möglich ist. Mit BHT tritt kein Synergismus auf [11].

Die hohe antioxidative Wirksamkeit einiger Flavonoide [Abb. 4.2] wird ebenfalls der ortho-Dihydroxy-Struktur des B-Rings zugeschrieben [199]. Alle Flavonoide, die die 3',4'-OH Struktur enthalten sind antioxidativ. Die Flavonoide umfassen tausende von Verbindungen, die bekannteste ist das Quercetin. Es kommt in Pflanzen überwiegend am C3-OH glycosidiert vor. Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid) besitzt eine dem Aglycon vergleichbare antioxidative Wirkung [199]. Rutin (Quercetin-3-rhamnogalucosid, Vitamin P) zeigt eine geringere Wirkung. Es setzt physiologisch die Permeabilität von Kapillaren herab und wird daher als Permeabilitätsvitamin bezeichnet [13]. Quercetin wird gebildet aus Phloroglucin und Caffeoesäure, die zu einem Chalcon – dem Butein – kondensieren. Durch den intramolekularen Ringschluss resultiert ein Flavanon, das Eriodictyol; der Einbau der Doppelbindung am C3 führt zum entsprechenden Flavon (Luteolin), welches zum Flavonol Quercetin hydroxyliert wird [199]. Eine weitere OH-Gruppe, im B-Ring am C5' führt zum Myricetin und erhöht die antioxidative Wirkung weiter. Robinetin, das im Vergleich zum Myricetin die „obere“ OH-Gruppe in A-Ring am C5 nicht enthält, ist noch stärker antioxidativ [199]. Der alkalische Abbau von Myricetin läuft bis zur Gallussäure, der des Quercetins zur Protocatechursäure [13]. Gleiches gilt für die entsprechenden Flavanole (Catechin und Epicatechin bzw. Gallocatechin und Epigallocatechin) und die Anthocyane (Cyanidin und Delphinidin). Catechine findet man in Früchten. Anthocyane verursachen die Blau- und Rotfärbungen vieler Blüten und tragen auch zur Laubfärbung im Herbst bei. Cyanine (Cyanidin-glucoside) verursachen sowohl das Blau der Kornblume, als auch das Rot der Rosen [229]. Bei der Reduktion von Cyanidinchlorid mit Lithiumaluminiumhydrid wird der Heteroring hydriert und es bilden sich zwei asymmetrische C-Atome. Die daraus resultierenden zwei diastereomeren Antipodenpaare werden als Catechin und Epicatechin bezeichnet. In der Natur kommt Catechin als (+)-Form vor und Epicatechin als (-)-Form [13]. Die bekannte antioxidative Wirkung von grünem

Tee wird durch Epicatechin und Epigallocatechin, sowie deren C3-Gallaten hervorgerufen [11,202]. Auch die in einigen Gewürzen, insbesondere in Salbei und Rosmarin, vorkommenden Antioxidantien: Carnosolsäure, Carnosol, Rosmarinsäure und Rosmarindiphenol gehören zu den ortho-Dihydroxy-Verbindungen [202]. Sowohl Gallate als auch Flavanoide besitzen eine Schwermetallaffinität. Morin (5,7,2',4'-Tetrahydroxyflavonol) ist ein empfindliches Reagens auf Aluminium-Ionen; in alkoholischer Lösung tritt eine charakteristische grüne Fluoreszenz auf [13]. Anthocyane bilden mit Al^{3+} und Fe^{3+} über die Sauerstoffe an 3' und 4' dunkelblaue zweizählige Komplexe [11]. Propylgallat bildet mit Eisen-Ionen dunkel gefärbte Präzipitate; ein Effekt den man auch bei Trihydroxybutyrophenon (THBP) beobachtet, nicht aber beim para-dihydroxylierten 2-tert.-Butylhydrochinon (TBHQ) [192].

Polyphenoloxidasen, die für die enzymatische Bräunung von angeschnittenen Äpfeln, Avocados, Kartoffeln oder Pilzen verantwortlich sind, arbeiten mit dem Redoxsystem Cu^{+2+} und katalysieren bei einem weiten Spektrum von Mono- und Diphenolen zwei Reaktionen: die Hydroxylierung eines Monophenols zum o-Diphenol und die weitere Oxidation zum o-Chinon [11]. Das aktive Zentrum der Polyphenoloxidase besitzt zwei Cu-Atome. Durch Polymerisation der o-Chinone tritt dann spontan Braunfärbung ein. Polyphenoloxidase wird durch Hitze, $pH < 4$ oder Chlorid-Ionen inaktiviert; Ascorbinsäure und SO_2 können o-Chinone wieder reduzieren bevor sie Bräunen [212].

In der Technik sind auch stickstoffhaltige Antioxidantien verbreitet, wie z.B. N,N-Diphenylamin. Sie wirken wie die Phenole, donieren H-Radikale und bilden mesomeriestabilisierte Radikale [207]. In Lebensmitteln ist Ethoxyquin (auch Santoquin) von Bedeutung. Phenothiazin- oder Phenoxazin-Derivate, die sich vom Diphenylamin durch eine zusätzliche S- bzw. O-Brücke (Planarisierung) zwischen den beiden Benzolringen unterscheiden, können wie Ethoxyquin oder Dihydropyridin-Derivate die Lipidperoxidation hemmen. Mit Singulett-Sauerstoff werden stabile $>N-O\cdot$ -Radikale gebildet [123,192]. Lin et al. [147] haben auch freie Aminoxide von Prolin, Histidin und Tryptophan erfolgreich als Antioxidantien in Lipiden eingesetzt. Aminoxide wie z.B. Trimethylaminoxid verstärken die Wirkung von Tocopherolen synergistisch. Diskutiert wird eine Oxidation von Linolsäure-Alkoxyradikalen zur Ketosäure + Aminoxid-H. Das H soll dann u.A. auf Tocopherylradikale übertragen werden [192].

Die bedeutendsten natürlichen Antioxidantien sind die Tocopherole. Sie enthalten wie die Flavonoide das Chroman-Grundgerüst, das hier aber in der para-Position zum Ether-Sauerstoff (C6) hydroxyliert ist (Abb 4.2). Die vier natürlich vorkommenden Tocopherol-Homologen – α – und β – unterscheiden sich ausschließlich in Methylierungsgrad am Benzolkern. Während α -Tocopherol permethyliert ist, fehlt bei β die „obere“ Methylgruppe (am C5) und bei γ die andere zur OH-Gruppe ortho-ständige Methylgruppe; beim δ -Tocopherol fehlen beide ortho-Methylgruppen (Abb. 4.2). Der Einfluss der ortho-Methylgruppen auf das Redoxpotential und die Reaktionsgeschwindigkeit mit Hydroperoxy-Radikalen wird in Tab. 4.2 deutlich.

o-CH ₃	Pos. 5			?	?
	Pos. 7		?		?
$k_{\text{ROO}\cdot}$ [$\times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$][11]		23,5	16,6	15,9	6,5
Diss.-Energie [kcalmol^{-1}][124]		75,8	77,8	78,2	79,8
Redoxpotential E^0 [V][63]		0,270	0,345	0,350	0,405
Wirkungsbereich c [ppm][124]		ca. 100	250-500	250-500	500-1000
biol. Aktivität [%][41]	RRR 100 SRR 30		50	10	3
E-Nummer	E307	-	E308	E309	

Tab. 4.2 Tocopherol-Homologe, physikochemische Daten

				[ppm]
Baumwollsaat	40-560	-	270-410	-
Erdnussöl	80-330	-	130-590	10-20
Maiskeimöl	300-430	1-20	450-790	5-60
Olivenöl	168-226	-	-	-
Palmöl	180-260	0-5	180-320	10-70
Rapsöl	180-280	-	380-590	10-20
Sojaöl	30-120	0-20	250-930	50-450
Sonnenblumenöl	350-700	20-40	10-50	1-10
Wallnussöl	560	-	590	450
Weizenkeimöl	560-1200	660-810	260	270
Rindertalg	ca. 30	-	ca. 5	-
Schweineschmalz	ca. 20	-	-	-

Tab. 4.3 Tocopherole, Vorkommen [31,212]

Damit eine Verbindung als Antioxidans wirkt, muss sie ein kleineres Redoxpotential als Lipid-Radikale – also $< \text{ca. } 0,6\text{V}$ – besitzen [124]. Das der induktive Effekt von para-Alkoxygruppen zur Senkung des Redoxpotentials einer phenolischen Verbindung führt, wurde bereits ausführlich beschrieben. Er bewirkt eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inaktivierung von Hydroperoxy-Radikalen im Vergleich zum BHT ($0,1 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Das die Reaktion auch schneller ist als die des BHA (ca. $1 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) wird mit der sterischen Fixierung (Planarisierung) des Ethersauerstoffs im Chroman und der besseren Überlagerung der p-Orbitale im Semichinon-Radikal begründet [11]. Die natürlichen Tocopherole enthalten am C2 neben einer Methyl-Gruppe den langkettigen Phitylrest. Die Synthese von (\pm)- α -Tocopherol gelang Karrer aus 2,5,6-Trimethyl-1,4-hydrochinon und Phitylbromid mit Zinkchlorid als Katalysator [13]. Da die Tocopherole drei asymmetrische C-Atome enthalten gibt es für jedes Homologe $2^3 = 8$ Stereoisomere. Die natürlich vorkommenden Tocopherole sind RRR kon-

figuriert; eine Änderung der Konfiguration am C2 reduziert die biologische Aktivität [41]. In Samenölen kommt neben α -Tocopherol vor allem auch γ -Tocopherol, das die biochemische Vorstufe des α -Tocopherols darstellt, in größeren Mengen vor. Der Aufbau erfolgt aus Homogentisinsäure (2,5-Dihydroxy-phenylelessigsäure) und Phytyl-Diphosphat unter Decarboxylierung. Durch die Tocopherolcyclase wird das Chroman-System gebildet, welches durch Methyltransferasen schließlich mehrfach methyliert wird [41]. Der Einbau von Geranylgeranyl-Diphosphat (anstelle des Phytyl-Diphosphats) durch die Geranylgeranyl-Transferase führt zu den entsprechenden Tocotrienolen, bei denen die Phytylkette dreifach ungesättigt ist – und zwar an den Methylverzweigungsstellen in Richtung zum Chromanring. Hier gibt es zwar nur die C2-Enantiomere, davon aber je vier cis-trans-Isomere (4' und 7') und damit wie bei den Tocopherolen auch jeweils acht Isomere für jedes Homologe. Das natürliche R,E,E- γ -Tocotrienol hat im Vergleich zum α -Tocopherol etwa die halbe biologische Aktivität, das β -Homologe nur ca. 5% [41]. Tocotrienole sind in der Natur weniger verbreitet als Tocopherole; lediglich Palmöl enthält alle vier Homologen in vergleichbaren Mengen wie auch die Tocopherole. Im Mais findet sich γ -Tocotrienol (0-240ppm), beim Weizen kommen β - und γ -Tocotrienol vor – wobei β überwiegt (80-190ppm) [212]. Die biologische Wirkung der Tocopherole als „Antisterilitätsvitamin“ ist seit seiner Entdeckung bekannt. Sein Fehlen bewirkt Sterilität bei Ratten, z.B. sind Rattenweibchen, die vitamin-E-frei ernährt werden, nicht in der Lage lebensfähige Junge zu gebären; desweiteren kann die Honigbiene sich nur dann zur Königin entwickeln, wenn sie vitamin-E-haltiges Futter erhält [13]. Dem permethylierten α -Tocopherol scheint dabei eine Schlüsselrolle zuzukommen. Bei Vitamin-E-Mangel werden die Membranen besonders schnell durch reaktive Substanzen zerstört. Einen umfassenden Überblick über die biologischen Funktionen des α -Tocopherols gibt Machlin [151].

Die Oxidation der Tocopherole verläuft insgesamt recht komplex. Das Spektrum der gebildeten Oxidationsprodukte hängt neben der Art des Homologen auch vom Oxidationsmittel und der Polarität des Mediums ab. Letztere wird von den Phospholipiden beeinflusst, wobei den nukleophilen Substanzen (PE, PS) eine besondere Bedeutung zukommt. Zur Oxidation der Tocopherole sind neben

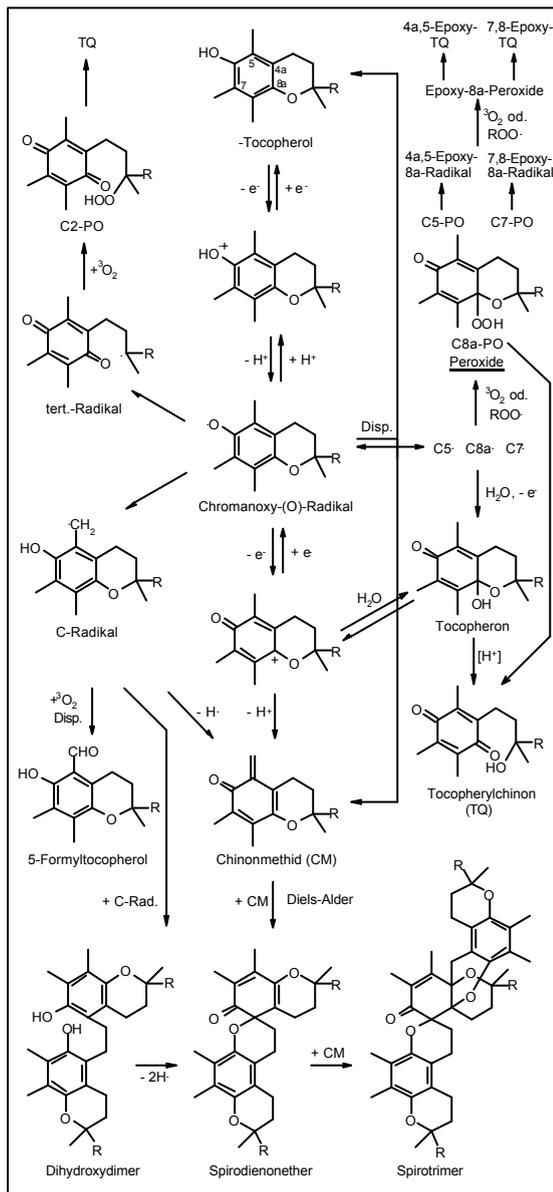


Abb. 4.7 α -Tocopherol-Oxidation [112,124,130]

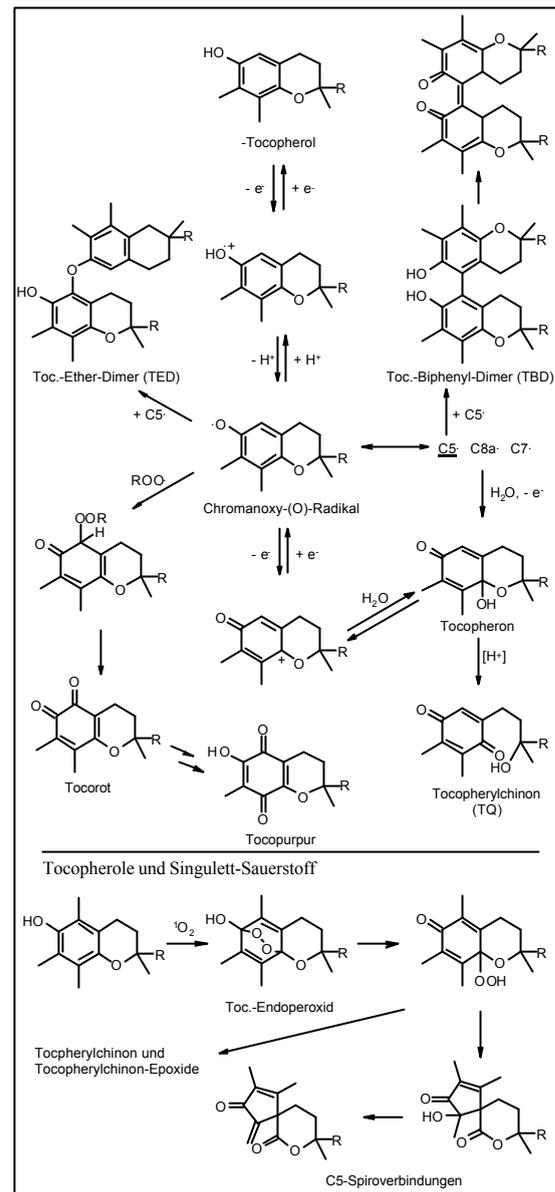


Abb. 4.8 γ -Tocopherol-Oxidation [31,41,112,121,124,130]

anorganische Oxidationsmitteln wie Blei(IV)acetat, Cer(VI)sulfat, Eisen(III)chlorid, Kaliumhexacyanoferrat(III) oder Salpetersäure auch radikalisch wirkende Oxidationsmittel wie z.B. DPPH, ABTS, Benzylperoxid, *t*-Butylhydroperoxid oder Cumolhydroperoxid verwendet wurden [130,207]. Die wichtigsten Oxidationprodukte sind für α - und γ -Tocopherol in Abb. 4.7 und 4.8 dargestellt. Das Hauptprodukt ist in beiden Fällen das Tocopheryl-p-quinon, daneben treten vor allem dimere Strukturen auf; beim α -Tocopherol vor allem der Spirodienonether und bei γ -Tocopherol das Ether-Dimer [121,130]. Ether-Dimere, die sich in analoger Weise auch über die freien ortho-Positionen des α - und γ -Tocopherols bilden, sind selbst sehr gute Antioxidantien und verlängern die „effektive Antioxidantienhalbwertszeit“ [121]. Sie sind der Grund

für die höhere antioxidative Wirksamkeit der α -, β - und γ -Homologen gegenüber dem δ -Tocopherol. Das δ -Tocopherol hat eine besondere Stabilität. Da es keine ortho-Methylgruppen besitzt, kann es keine Chinonmethide bilden und somit nicht über die daraus resultierenden Diels-Alder-Spiroverbindungen abreagieren.

Eingeleitet wird die Tocopherol-Oxidation durch die Entfernung eines Elektrons aus dem Molekül. Svanholm et al. [231] oxidierten eine δ -Tocopherol-Modellverbindung elektrochemisch und erkannten mittels ESR-Spektroskopie ein Kationenradikal als Intermediat. Mukai et al. [171] stellten mittels ENDOR-Messungen fest, dass die Struktur der α -, β -, γ - und δ -Tocopherol-Kationenradikale, die durch Oxidation mit AlCl_3 erhalten wurden, von der Zahl und der Stellung der Methylgruppen am Chromanring beeinflusst wird. Möglicherweise kommt es hier zu einer Art McLafferty-Umlagerung der o-Methylprotonen an den Sauerstoff. Durch den Verlust eines Protons bildet sich das Chromanoxyl-Radikal (Semichinon-Radikal), das durch verschiedenen mesomere Grenzformeln über das Molekül verteilt ist und eine Schlüsselrolle in der Tocopherol-Reaktion spielt. Bedingt durch den heterocyclischen Ring liegt die Spindichte am C5 um 20% höher als am C7 [16]. Entsprechend fällt die Lebenszeit des Chromanoxyl-Radikals bedingt durch den Grad an o-Methylierung in der Reihe $\alpha > \beta > \gamma$. Diskutiert wird auch ein an der C5-Methylgruppe lokalisiertes Benzylradikal, wobei der Mesomeriebegriff hier an seine Grenzen stößt. Ähnliches gilt für das in Abb. 4.7 oben links dargestellt tertiäre Radikal, bei dem der Heteroring geöffnet ist. Für die Entstehung des Tocopherylchinons gibt es nach der Literatur zwei grundsätzlich verschiedene Wege. Zum Einen die Entstehung durch die Peroxidation des ringoffnen tertiären C2-Radikals [11,124], zum Anderen über eine Reaktion am C8a und die Bildung sogenannter Tocopheron-Strukturen [68,112,130,177]. In Lösungsmitteln mit höherer Dielektrizitätskonstante können geladene Teilchen besser stabilisiert werden, so auch ein mesomeriestabilisiertes Tocopherol-Kation an dem ein Nukleophil –im einfachsten Fall Wasser (bzw. reaktive Sauerstoffspezies)– angreift und ein Tocopheron bildet. Das gebildete 8a-Hydroxytocopheron ist das Halbacetal des Tocopheryl-p-chinons in das es durch saure Hydrolyse übergeht. [68,130]. Da über den Tocopheron-Weg die Bindung des Heterosauerstoffs zum C2 nicht gebrochen wird, bleibt C2 (R)-konfiguriert. In polaren

Lösungsmitteln (z.B. Alkoholen) läuft die Reaktion vorzugsweise über die Bildung von 8 α -substituierten Tocopheronen. Goodhue und Risley [68] konnten durch Variation des Alkohols verschiedene 8 α -Alkoxytocopherone herstellen. Im schwach Sauren reagieren diese Stoffe zum Tocopherylchinon; in neutralem bzw. alkalischen Milieu sind sie stabiler. Nishikimi und Machlin [177] fanden bei der Oxidation durch ein Xanthin-Xanthin-Oxidase-System auch Verbindungen mit Tocopheronstruktur, die durch Ascorbinsäure regenerierbar sind. Tocopherone lassen sich anhand ihrer typischen UV-Absorption bei 240nm gut von Tocopherol (290nm), Tocopherylchinon (270nm), dem Dihydroxydimer (300nm) und dem Spirodienonether (300nm) unterscheiden [130]. Bei der Oxidation mit tert.-Butylhydroperoxid in Chloroform fanden Sumarno et al. [230] auch das 5-Ethoxymethyltocopherol (UV-Abs.: 300nm [130]), dessen Bildung über das in Chloroform enthaltene Ethanol (2% zur Stabilisierung zugesetzt) erklärt wird. Bei Variation des Alkohols (z.B. Cholesterin) bzw. Wasser fanden sie weitere Derivate mit 5-methyl-substituierter -Tocopherolstruktur. Bei der Oxidation mit Benzylperoxid findet sich auch 5-Benzoylmethyltocopherol [68]. Die Oxidation des Benzylradikals führt zum entsprechenden Peroxyradikal, das zum Formyltocopherol disproportioniert [58]. Der Angriff des Sauerstoffs am C8 α -Radikal ergibt das Hydroperoxytocopheron das zum Tocopherylchinon zerfällt. Die Hydroperoxyradikale, die bei der Sauerstoffanlagerung an das C5- bzw. C7-Radikal gebildet werden, lagern sich –ähnlich wie bereits für Linolsäurehydroperoxy-Radikale beschrieben– in Epoxy-8 α -Radikale um, deren weitere Oxidation über Epoxy-8 α -Peroxide schließlich zu Epoxytocopheryl-p-chinonen führt. Diese unterscheiden sich von Tocopherylchinon dadurch, dass eine der Chinondoppelbindungen nur einfach und epoxyüberbrückt ist. Es sind zwei Epoxytocopheryl-p-chinone möglich (Abb. 4.7), und zwar aus dem C5-Peroxid das 4 α ,5-Epoxytocopheryl-p-chinon und aus dem C7-Peroxid das 7,8-Epoxytocopheryl-p-chinon [112,124]. Durch Dimerisierung von Peroxy-Radikalen kommt es zu Bildung von Singulett-Sauerstoff, der seinerseits direkt an Tocopherol unter Bildung eines Endoperoxids addieren kann (Abb. 4.8) [124]. Von großer Bedeutung ist in der Tocopherol-Oxidation die Entstehung von Dimeren-Produkten. So werden bei der -strahleninduzierten Reaktion des -Tocopherols in inertem Hexan fast ausschließlich

dimere Produkte gebildet [130]. Neben dem Spirodienonether als Hauptprodukt wird auch das Spirotrimer und das Dihydroxydimer gebildet; das Tocopherylchinon entsteht nur in geringen Mengen. Die Bildung des Spirodienonethers erfolgt aus der Diels-Alder-Dimerisierung des Chinonmethids, das bei der Disproportionierung des Semichinonradikals entsteht. Bei Reaktionen, die über Protonen- bzw. Elektronentransfer ablaufen, sind zusätzliche Redoxreaktionen mit Tocopherol, Tocopherylchinon und Tocopherolhydrochinon möglich. So kann z.B. der Spirodienonether mit Tocopherol zum Dihydroxydimer reagieren [176]. Koswig [130] beobachtete umgekehrt den Abbau der verschiedenen α -Tocopherylchinone und die Bildung von α -Tocopherol bei der Lagerung der Proben nach γ -Bestrahlung. Parallel beobachtete sie auch die Abnahme von Ethoxymethyltocopherol und eine Zunahme von Formyltocopherol. Erklärt wird diese Umwandlung mit der Oxidation des Ethoxymethyltocopherols zum entsprechenden OH-Chinonmethid, dessen Umprotonierungsprodukt das Formyltocopherol ist. Werden Tocopherone mit Salzsäure behandelt zerfallen sie in Tocopherylchinon, daneben wird auch Tocopherol gebildet, da zwischen Tocopherol und Tocopherylchinon ein Redoxgleichgewicht besteht [108].

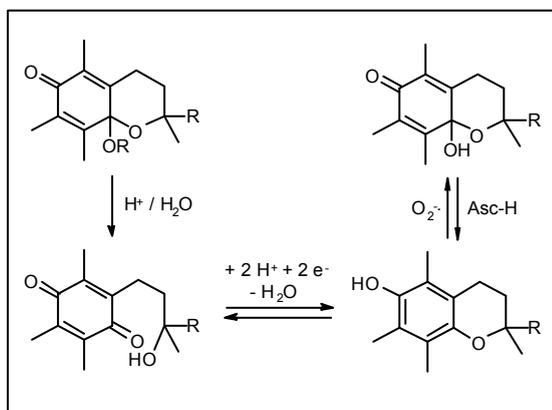
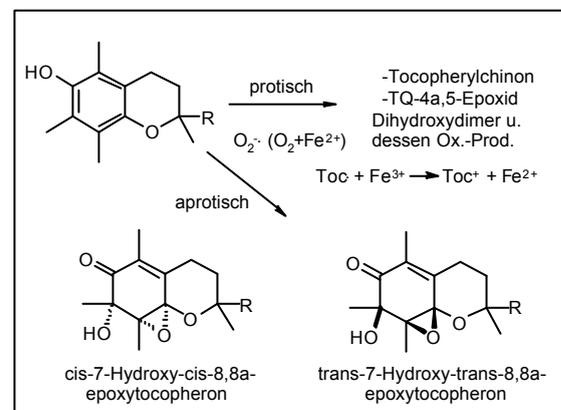
Abb. 4.9 α -Tocopherone und α -Tocopherol [108,177]

Abb. 4.10 Reaktion mit dem Superoxid-Radikalanion [112]

Hydroxytocopheron wird mit Ascorbinsäure vollständig und direkt zu Tocopherol umgesetzt [111,170,177]. Auch Tocopherylchinon wird eine antioxidative Wirkung zugeschrieben. Nach Jore et al. [108] erfolgt eine Oxidation zum Tocopherylchinon-Radikal und eine anschließende Disproportionierung zum Tocopherolhydrochinon. Ozawa und Hanaki [130] konnten durch ESR-Untersuchungen zeigen, dass aus α -Tocopherolchinon durch Reaktion mit $O_2^{\cdot -}$ das Semichinonradikal gebildet wird. Die

Reaktion von α -Tocopherol mit dem Superoxid-Radikalanion liefert in protischen und aprotischen Lösungsmitteln verschiedene Produkte (Abb. 4.10).

Bei β - und γ -Tocopherol tritt im Gegensatz zum α -Tocopherol die Oxidation über den Chinonmethid-Weg in den Hintergrund, beim δ -Homologen ist dieser Pfad wegen der fehlenden o-Methylierung gar nicht möglich. Dagegen kommen hier dimere Produkte über die freien ortho-Positionen vor. Man unterscheidet zwei Arten von Dimeren: Ether-Dimere und Biphenyl-Dimere (Abb. 4.8). Die Biphenyldimere treten in deutlich kleineren Mengen auf – in Triglyceriden findet man sie praktisch gar nicht; da die Drehbarkeit der Bindung zwischen den Benzolringen sterisch blockiert ist, gibt es je zwei Stereoisomere [121]. Zwischen dem Abbau von α -Tocopherol und dem Gehalt an α -Tocopherol-Etherdimer besteht ein direkter Zusammenhang. In ungesättigten Systemen erfolgt der thermisch induzierte oxidative Abbau des α -Tocopherols und der damit einhergehende Aufbau des Ether-Dimers schneller und mit höherer Ausbeute als in gesättigten Systemen. Ähnliches gilt für die β - und γ -Homologen. Die Ether-Dimere sind nicht nur antioxidativ; aufgrund ihrer größeren Stabilität sind sie im Öl auch bessere Antioxidantien, als das jeweilige Ausgangstocopherol [121]. Aggressive Oxidationsmittel, wie z.B. Salpetersäure oder ROO^\cdot , können das α -Tocopherol-Chromanoxyl-Radikal am C5 angreifen [112]. Diese Reaktion führt zum ortho-Chinon, dem Tocorot, das zum Tocopurpur weiter oxidieren kann [41,112,206].

Tocopherole bilden bei der Oxidation innerhalb einer Öl-Matrix auch stabile Rekombinationsprodukte mit ungesättigten Fettsäuren. Linolsäure bildet mit α -Tocopherol bei 80°C ein Diels-Alder-Addukt. Auf die gleiche Weise reagiert Methylolinolat auch im Verlauf der Peroxidation über das C7-Methyl des α -Tocopherylchinons [121].

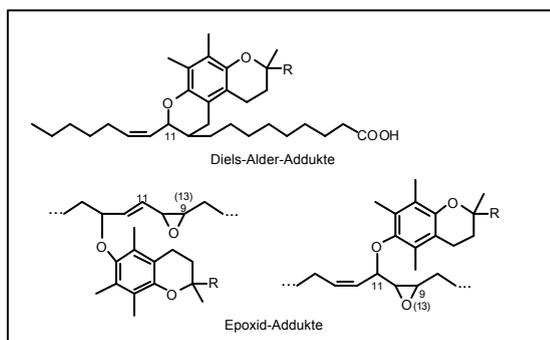


Abb. 4.11 Tocopherol-Linolsäure-Addukte [59,121]

Als zweite Gruppe treten Epoxy-Addukte auf. Diese entstehen beim radikalischen Zerfall der Hydroperoxide (Abb. 3.1 S. 36), den man insbesondere in monomolekularen Schichten oder an Kieselgel [159] beobachtet. Sie stellen die Rekombinationsprodukte von Epoxy-Allyl-Radikalen und dem Chromanoxy-(O)-Radikal dar. Es bilden sich die cis-11- und trans-9- bzw. trans-13-Produkte [59].

Bei den synthetischen α -Tocopherolabkömmlingen kann man in polarere Verbindungen unterscheiden bei denen der Phytylrest durch eine Carboxylgruppe (TroloxTM C) bzw. eine derivatisierte Carboxylgruppe ersetzt ist und solche, bei denen die Hydroxylgruppe verethert oder verestert ist (Abb. 4.1). Trolox C ist als Antioxidans den meisten synthetischen Phenolen nur wenig überlegen [192]. Trolox-aminosäuren dagegen, die durch Anbinden von Aminosäuren über eine Peptidbindung an Trolox C entstehen, zeigen eine bessere Wirkung [121]. Beim Trolox-methylether ist zur Stabilisierung die OH-Gruppe verethert. RRR- α -Tocopherol-acetat und RRR- α -Tocopherolsuccinat, die beide am OH-verestert sind, zeigen eine dem α -Tocopherol vergleichbare biologische Aktivität (91% und 81%) [41].

Tocopherole wirken in höheren Konzentrationen prooxidativ [11,112,124]. Der optimale Konzentrationsbereich der vier natürlichen Homologen für die Stabilisierung von Pflanzenfetten ist in Tab. 4.2 dargestellt. Beim α -Tocopherol setzt die prooxidative Wirkung ab Konzentrationen von ca. 100ppm ein, die anderen Homologen –insbesondere γ -Tocopherol– neigen weniger zur Prooxidativität. Da die kritische Tocopherolkonzentration parallel zum Redoxpotential in der Reihe $\alpha < \beta < \gamma < \delta$ steigt, wird das Semichinonradikal, seine Stabilität und sein weiterer Verbleib als Schlüssel für den prooxidativen Effekt angesehen.

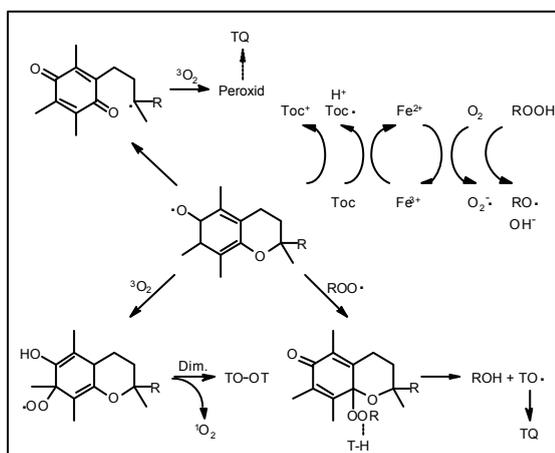


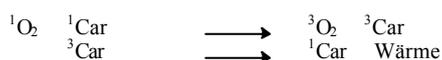
Abb. 4.12 prooxidativer Effekt der Tocopherole [112]

Nach Gottstein und Grosch [70] ist die Peroxidation des tertiären-C2-Radikals die Ursache für den prooxidativen Effekt. Burton et al. [24] berichten andererseits, dass die Reaktion des Chromanoxyl-Radikals mit Sauerstoff nur langsam ist ($6,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 25°C). Der schwermetallinduzierte Fettverderb –z.B. durch Fe^{2+} – wird aber durch Tocopherol verstärkt, da es Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert und dieses Sauerstoff zum reaktiven Superoxid-Radikalanion aktiviert, bzw. den Zerfall von Peroxiden über die Fenton-Reaktion bewirkt [25]. Nach Kamal-Eldin & Appelqvist ist Tocopherol danach kein direktes Prooxidans, sondern ein Cooxidans oder synergistisches Prooxidans [112]. Die Fe^{3+} -katalysierte Reaktion von Tocopherol mit Methylolol-Hydroperoxiden führt zum Tocopherylchinon [74]. Der prooxidative Effekt tritt bei den anderen Homologen in den Hintergrund, da hier durch den Angriff des Sauerstoffs (O_2^\cdot) an den freien ortho-Positionen, eine Stabilisierung über ortho-Chinone (Tocorot) möglich ist. Dass eine hohe Konzentration an Hydroperoxiden den prooxidativen Effekt verstärkt wird von Hicks et al. [88] beschrieben. In höheren Konzentrationen kommt es zunehmend zur Reaktion von Tocopherol-Molekülen, vergleichbar der Reaktion von Hydroperoxiden untereinander (Reaktion (5) Abb. 2.1), die zur Peroxid-Zersetzung und damit zum Start der Lipidperoxidation führt. Tocopherole treten zunächst über Wasserstoffbrücken mit Hydroperoxiden in Kontakt. Durch den Übergang des Tocopherol-H-Atoms kann das Hydroperoxid Wasser abspalten und in ein Alkoxyradikal übergehen [112,124].



Die Reaktion ist bei α -Tocopherol energetisch am günstigsten, da sein Chromanoxyl-Radikal am stabilsten ist. Neben ROOH oder ROOR unterliegen auch Tocopherolperoxide (TOOH, TOOR, TOOT) dieser Reaktion (vgl. Abb. 4.12). Ferner führt die Dimerisierung von Tocopherol-Hydroperoxid-Radikalen zur Generierung von Singulett-Sauerstoff, der durch direkte Reaktionen die Lipid-Peroxidation initiiert. Die Reaktion von Singulett-Sauerstoff mit α -Tocopherol ist in Abb. 4.8 dargestellt. Sie führt über ein Endoperoxid zum 8 α -Hydroperoxytocopheron und weiter zum Tocopherylchinon. Ferner findet man 4 α ,5-Epoxytocopherylchinon und C5-Spiroverbindungen [112].

Abschließend sollen hier noch die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide diskutiert werden, da sie die Wirkung von Tocopherolen synergistisch verstärken [46]. Carotinoide gehören zu den Isoprenoiden. Man klassifiziert zwei Hauptgruppen, die Carotine und die Xanthophylle. Im Unterschied zu den Carotinen bei denen es sich um reine Kohlenwasserstoffe handelt, kommen in den Xanthophyllen auch Sauerstoff-Atome vor (Abb. 4.13). Stark gefärbte native Pflanzenöle enthalten bis zu 700 ppm an Carotinoiden [20]. Natürliches Olivenöl enthält nur etwa 1-3 ppm β -Carotin und 1-2 ppm Lutein [200]. Lutein, das vor allem im Eidotter vorkommt, gehört wie das Zeaxanthin, welches die gelbe Maisfärbung verursacht, zu den Xanthophyllen [11]. Im Unterschied zum Zeaxanthin, ist beim Lutein nur eine Doppelbindung verschoben. Statt zwischen 5' und 6' liegt sie zwischen 4' und 5', was das konjugierte System um eine Doppelbindung kürzer macht. Den gleichen Strukturunterschied weisen β - und γ -Carotin auf. Carotinoide besitzen nicht die für die meisten Antioxidantien typischen phenolischen Strukturen. Es sind polyenische Antioxidantien, deren antioxidative Eigenschaften auf einem langen, konjugierten Polyensystem beruhen, welchem verschiedene Reaktionspfade offen stehen. Carotinoide inaktivieren Singulett-Sauerstoff und hemmen damit die Photooxygenierung [31,242]. Das entstandene angeregte Carotinoid kann die dabei aufgenommene zusätzliche Schwingungsenergie durch intramolekulare Stöße in Form von Wärme an die Umgebung abgeben [23,207].



Die Energie des Singulett-Sauerstoffs ($94 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$) wird z.B. auf β -Carotin ($88 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$) übertragen. Die Reaktion ist exotherm [53] und läuft mit einer Geschwindigkeit von $1,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [124]. Von den aus 8 Isopreneinheiten aufgebauten C40-Carotinoiden sind die mit 11 konjugierte Doppelbindungen (β -Carotin, Lycopin) effektivere Singulett-Sauerstoff-Quencer, als solche mit nur 10 konjugierten Doppelbindungen (γ -Carotin, Lutein). Wird die Länge des konjugierten Systems durch Keto-Gruppen auf 13 konjugierte Doppelbindungen erhöht (Astaxanthin, Canthaxanthin), steigt die Quencin-Aktivität weiter und ist nur noch diffusionskontrolliert, während der Einbau von Hydroxy, Epoxy- oder Methoxy-Gruppen die Wirksamkeit herabsetzt [123,242]. Carotinoide mit weniger als 9 konjugierten

Doppelbindungen können weniger gut Singulett-Sauerstoff inaktivieren, übernehmen aber die Energie anderer photosensitiver Moleküle – wie z.B. von Chlorophyll [31].

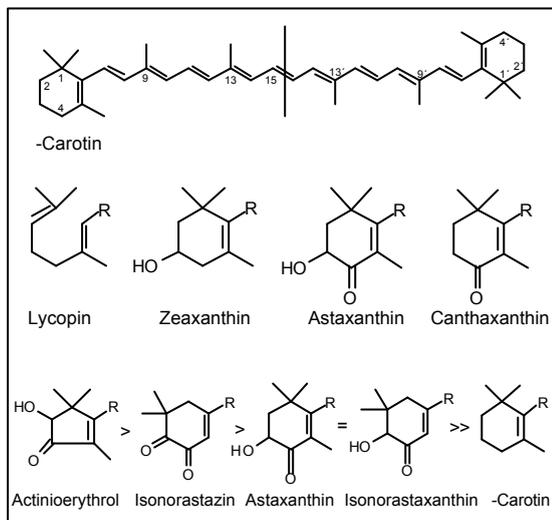


Abb. 4.13 Carotinoide und Xanthophylle [11,207]

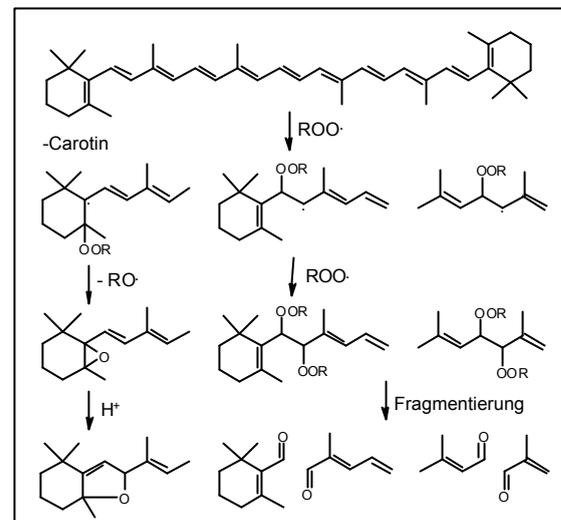


Abb. 4.14 Carotinoide als Radikalfänger [11,25,35]

Vom β -Carotin gibt es 4 isomere Strukturen. Das dargestellte all-trans-Isomer ist thermodynamisch am stabilsten. Daneben kommen auch das 9-cis-, 13-cis-, und 15-cis-Derivat vor [145]. Mit einem Redoxpotential von 1,06V ist β -Carotin ein schlechter Wasserstoff-Atom-Donator [31]. Das Redoxpotential entspricht aber etwa dem des Hydroperoxid-Radikals [112], so dass Wechselwirkungen möglich sind. Nach Burton und Ingold [25] kann sich ein reaktives ROO-Radikal an das Polyensystem von β -Carotin addieren. Die gebildeten Additionsprodukte sind resonanzstabilisiert und vergleichsweise reaktionsträge. Burton [23] und Krinsky [133] erklären die ungewöhnliche antioxidative Wirkung damit, dass sich direkt an die Bildung des ROO-Car-Radikals ein weiteres ROO-Radikal anlagert und ein relativ stabiles ROO-Car-OOR entsteht und so die Kettenreaktion zum Erliegen kommt. Bei höheren Carotenoid-Konzentrationen und unter höheren Sauerstoff-Partialdrücken kommt es aber vermehrt zur weiteren Oxidation und zu einem prooxidativen Verhalten [31]. Nach Heinonen et al. [83] wirkt β -Caroten in Öl-in-Wasser-Emulsionen bereits in Konzentrationen um 0,5ppm prooxidativ; in Kombination mit α -Tocopherol (1,5ppm) erhielten sie aber eine bessere Stabilisierung als mit α -Tocopherol allein. Diese synergistische Wirkung der Carotinoide wird versucht über die Regeneration von Chromanoxylradikalen zu Tocopherolen zu erklären [18,23], was nach Lage der

Redoxpotentiale aber in Frage steht. Vielmehr scheint es umgekehrt, dass die Carotine den Redoxpotentialsprung zwischen Hydroperoxiden und Tocopherolen überbrücken [41,211]. Je höher die Konzentration an β -Carotin in raffiniertem Olivenöl ist, desto besser ist es lagerfähig [46]. Die Wasserstoff-Donierung bei β -Carotin ist über die allylischen Positionen 4 bzw. 4' möglich. Ketoxanthophylle unterdrücken die thermisch induzierten Lipidperoxidation weit stärker, als die reinen Carotin-Kohlenwasserstoffe. Die Reihenfolge der antioxidativen Wirksamkeiten, der sich nur in den Kopfgruppen unterscheidenden Verbindungen, ist in Abb. 3.13 dargestellt [207]. Durch induktive Effekte der O-Substituenten kommt es zur Absenkung der Redoxpotentiale und damit zur Aktivierung der in allen Verbindungen vorkommenden Allylpositionen. Die sehr gute antioxidative Wirkung von Astaxanthin und Actinioerythrol liegt in ihrer Acyloinstruktur begründet, die leicht zum Diketon oxidiert werden kann. Es fällt jedoch auf, dass Isonorastazin besser wirksam ist, als sein korrespondierendes Acyloin; Isonorastaxanthin. Begründet wird dieses Verhalten über ein höheres Redoxpotential, die daraus resultierende bessere Stabilität und höhere „antioxidative Halbwertszeit“ [207]. Von besonderer Bedeutung ist bei den Xanthophyllen die Blockierung der C4-Position durch Keto-Gruppen. Es besteht daher nicht wie beim β -Carotin die Möglichkeit zur Mesomerie mit der Polyenkette; die Radikale verteilen sich nur innerhalb der jeweiligen Kopfgruppe. So läuft auch der oxidative Abbau geordneter als bei den Carotenoiden. Sell [218] fand bei der thermischen Zersetzung des Astaxanthins nicht die für Carotinoide typischen oxidativen Fragmentierungsprodukte (Abb. 4.14). Actinioerythrol hat eine noch höhere „antioxidative Halbwertszeit“ als Astaxanthin und ist daher besser wirksam. Als Ursache wird die planarere Struktur des Moleküls angesehen [207]. Möglicherweise spielt auch die sterische Blockierung der HO-Gruppe und des C2-H-Atoms eine Rolle.

4.2. Phospholipide als Synergisten – Grundlagen

Synergisten sind Stoffe die die Wirkung von primären Antioxidantien verstärken. Im Gegensatz zum rein additiven Effekt ist beim synergistischen Effekt die Verlängerung der Induktionsperiode größer, als die Summe der Induktionsperioden der Einzelkomponenten erwarten lässt. Der synergistische Effekt wird nach Bishov & Henick [14] in Prozent des Gesamteffekts angegeben.

$$\text{Synergismus} = \frac{I_{\text{Mix}}}{I_0} \frac{I_A}{I_0} \frac{I_S}{I_0} \frac{I_0}{I_{\text{Mix}}} 100 \%$$

I_0 ist dabei die Induktionsperiode des Substrats, I_A und I_S die von Substrat plus Antioxidants bzw. Synergist allein, und I_{Mix} die Induktionsperiode bei Einsatz der Mischung beider Stoffe.

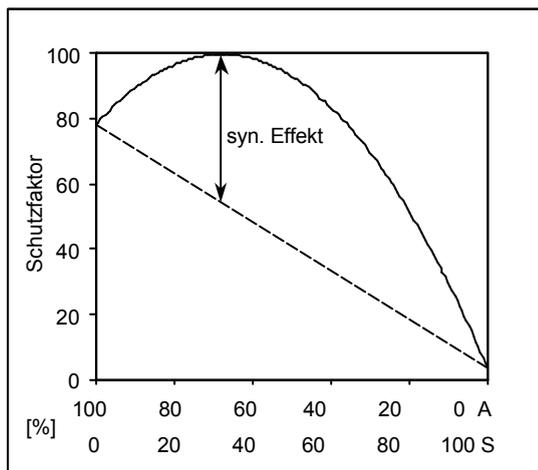


Abbildung 4.15 synergistischer Effekt [192]

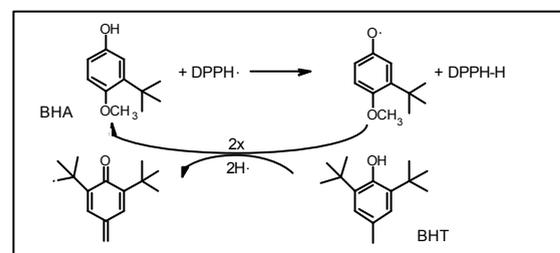


Abbildung 4.16 synergistischer Effekt zwischen BHA und BHT

Primäre Antioxidantien zeigen aufgrund unterschiedlicher Reaktionsmechanismen und regenerative Wechselwirkungen in Mischung oft synergistische Effekte. Der einfachste Fall ist das Verhalten von BHA und BHT gegenüber dem stabilen Diphenyl-pikryl-hydrazyl-Radikal [121]. BHA gibt 0,75-1,2 H-Atome ab, während BHT viel weniger H doniert. In Kombination werden aber 2,78 H-Atome abgegeben. Nach Kurechi et al. [121] reagiert BHA nur mit einem DPPH-Radikal; das entstehende BHA-Radikal reagiert nicht weiter sondern liegt als Intermediat – z.B. an DPPH gebunden – vor. Die Reaktion von BHT mit DPPH ist sterisch behindert. In der

Mischung reduziert BHT aber die BHA-Radikal-Intermediate wieder zu BHA und liefert durch die Oxidation zum Chinonmethid zwei H-Atome, so dass insgesamt drei DPPH-Radikale abgebaut werden. Boguth et al. [17] beschreiben den synergistischen Effekt zwischen Tocopherolen und BHT gegenüber dem DPPH-Radikal ebenfalls durch die katalytischen Aktivierung von inaktivem BHT durch Tocopherole. Auch bei der Reduktion von Fe^{3+} zeigen BHA und BHT einen Synergismus. Der Umsatz entspricht 3 : 0,6 : 5,5 für BHA : BHT : BHA+BHT und ist in der Mischung 1,5 mal größer als erwartet [121]. Der synergistische Effekt innerhalb der Lipidperoxidation ist ebenfalls geringer als beim DPPH, da die Reaktion mit Hydroperoxy-Radikalen sterisch weniger blockiert ist. BHA baut sich gegenüber tert.-Butylhydroperoxid/ Co^+ bei Anwesenheit von BHT praktisch nicht ab. Allerdings baut sich BHT in der Mischung mit BHA schneller ab, als wenn es allein vorhanden ist; jedoch ist dieser Abbau immer noch langsamer verglichen mit dem des BHA allein (gleiche Anfangskonzentrationen – 2mM) [136]. Aufgrund der höheren Effizienz des BHT durch die „glattere“ Reaktion (zum Chinonmethid) erhöht sich die effektive antioxidative Halbwertszeit. Auch die unterschiedlichen Tocopherol-Homologen zeigen wechselseitige Stabilisierungen. Parkhurst et al. [188] erhielten in Schweineschmalz einen bessere Schutz für Tocopherol-Mischungen (, ,) als für die Einzelsubstanzen.

Generell lassen sich die synergistischen Wirkungen auf primäre Antioxidantien in der Lipidperoxidation in zwei Gruppen unterteilen:

1. indirekte Schutzwirkung („Sparen“ primärer Antioxidantien)

- a.) $^1\text{O}_2$ -Quencher (Carotenoide, Lichtfilter)
- b.) Komplexierung von Schwermetallen (Citronensäure, Phosphorsäure, Aminosäuren, Ascorbinsäure)
- c.) Peroxidzersetzung (S-haltige Aminosäuren, Aminoxide)

2. direkte Schutzwirkung

- a.) Regeneration primärer Antioxidantien (Ascorbinsäure, Glutathion)
- b.) Löslichkeitseffekte (Phospholipide)

Ascorbat wirkt sowohl über indirekte Mechanismen – insbesondere über die Bindung von Sauerstoff – als auch über die direkte regenerative Wechselwirkung [121,183]. Packer et al. berichtete 1979 in Nature [183], dass der synergistische Effekt zwischen Ascorbinsäure und α -Tocopherol auf die Regeneration des α -Tocopherols durch die Reduktion seines Semichinonradikals durch Ascorbinsäure zurückgeht.

Die indirekten Effekte der Phospholipide; die Schwermetallkomplexierung und die Wechselwirkung mit Lipidperoxydationsprodukten ist bereits ausführlich diskutiert worden. Nun sollen die direkten Interaktionen mit phenolischen Antioxidantien und dabei insbesondere die Fähigkeit zur Regeneration im Mittelpunkt stehen.

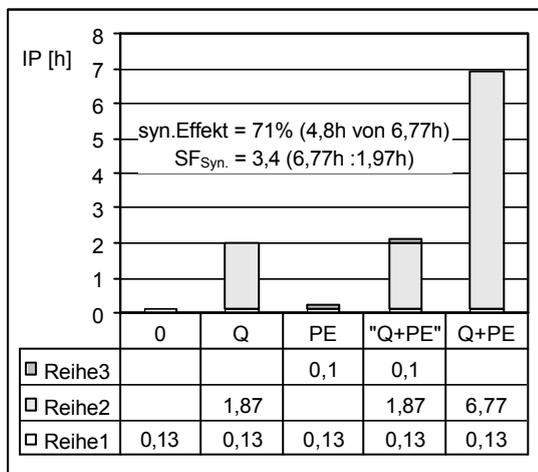


Abbildung 4.17 synergistischer Effekt von 0,16% Dipalmitoyl-PE und 0,07% Quercetin (Q) (molares Verhältnis) in Schweineschmalz bei 140°C [101]

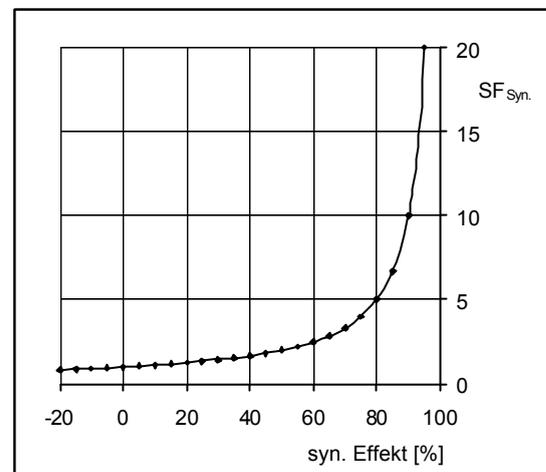


Abbildung 4.18 relativer synergistischer Effekt [%] und synergistischer Schutzfaktor (ohne Synergist $SF_{Syn} = 1$)

Hudson et al. untersuchten in den 80er Jahren den synergistischen Effekt von Phospholipiden und phenolischen Antioxidantien, darunter Tocopherole, Flavonoide, BHA, BHT, TBHQ und Gallate. Der Effekt von 0,16% Dipalmitoyl-PE auf 0,07% Quercetin (molares Verhältnis) in Schweineschmalz bei 140°C ist in Abb. 4.17 dargestellt. Über die Messung der Induktionsperiode mit der Rancimat-Methode und die Formel von Bishov & Henick bestimmten sie einen synergistischen Effekt von 71% [101]. Anschaulicher ist aber die Interpretation über den Faktor, den sich die Induktionsperiode von der rein additiv zu erwartenden unterscheidet, da der prozentuale Effekt und dieser „synergistische Schutzfaktor“ sich nicht linear zueinander verhalten.

$$SF_{\text{Syn.}} = \frac{100 \%}{100 \% \text{ syn.Effekt } [\%]}$$

Ein synergistischer Effekt von 50% bedeutet einen Schutzfaktor von 2, 75% einen von 4, 80% einen von 5 (vgl. Abb. 4.18), 90% einen von 10 und 99% einen Schutzfaktor von 100. Werte unter 40% – wie sie z.B. für PC/Quercetin erhalten werden [101] – können praktisch nicht als synergistische Wirkung bezeichnet werden. Der für PE/Quercetin bestimmte synergistische Effekt von 71% entspricht einer um Faktor 3,4 längere Induktionsperiode als theoretisch erwartet. Für andere Flavonoide erhielten Hudson et al. vergleichbare Werte, wobei jedoch die eingesetzten Flavonoide, die keine OH-Gruppe am C3 enthalten kleinere Werte lieferten (insbesondere bei kleineren PE-Konzentrationen) [101]. Mit der PE-Konzentration steigt der synergistische Effekt linear an. Gleiches beobachtet man bei Einsatz von 0,025% -Tocopherol, BHA oder PG in Schweineschmalz bei 120°C [37].

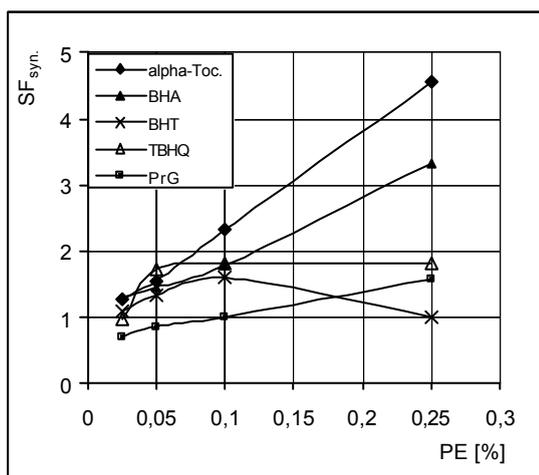


Abbildung 4.19 synergistischer Effekt von 0,025% Antioxidants mit Dipalmitoyl-PE in Schweineschmalz bei 120°C [37]

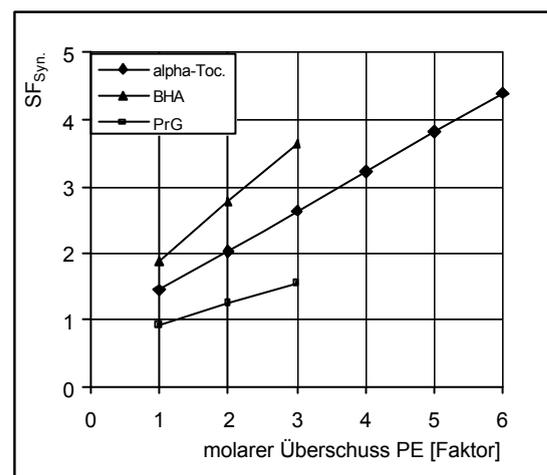


Abbildung 4.19a synergistischer Effekt bei molarer Zugabe von PE (Faktor =1) bzw. Überschuss – ber. aus Versuch Abb. 4.19

BHT und TBHQ erreichten bei etwa molarer PE-Zugabe (ca. 0,1%) einen Sättigungspunkt. Die größten Effekte zeigt PE in Verbindung mit -Tocopherol und BHA. Propylgallat (PrG) wechselt bei molarer PE-Menge von prooxidativer zu synergistischer Wirkung. Ob -Tocopherol oder BHA den stärkeren Synergismus zeigen, lässt sich hier nicht sagen, da die BHA-Proben aufgrund des Molmassenunterschieds ca. 2,4 mal mehr Moleküle enthalten als die -Tocopherol-Proben (MG; BHA: 180, -Toc: 431, Dipal.-PE: 691), andererseits aber die -Tocopherol-Proben relativ mehr PE enthalten; und zwar am letzten Messpunkt ca. 6

mal mehr, während es beim BHA nur ca. 3 mal mehr ist. Unter der Annahme, dass ein Regenerationsmechanismus vorliegt – und damit die Anfangsmenge an Antioxidants die geringere Rolle spielt – kommt BHA der größere synergistische Effekt zu. Beim Vergleich der phenolischen Antioxidantien in Abb. 4.19 deutet sich an, dass die Stabilität der primär gebildeten Semichinon-Radikale von Bedeutung ist. BHT, TBHQ und PrG reagieren leicht weiter zu Chinonen. Das α -Tocopherol-Semichinonradikal ist sehr viel stabiler und das BHA-Radikal reagiert –wie vorhin beschrieben– nicht mal mehr mit DPPH. BHA und α -Tocopherol als auch Flavonoide haben etwas gemeinsam; es handelt sich um Ether. Tatsächlich zeigt das Flavonoid Butein, das als Chalkon kein Ether ist, bei 140°C zu 0,07% in Schweineschmalz mit molarer Menge Dipal.-PE im Gegensatz zum Quercetin keinen Synergismus [101]. Ein Effekt tritt hier erst bei höherem PE-Zusatz auf. Im Fall von BHA und α -Tocopherol ist durch die Etherbrücke die Reaktivität der para-OH-Gruppe blockiert. Da keine H-Abstraktion möglich ist, ist die Bildung des para-Chinons behindert, was auch der Grund dafür ist warum p-OH-Gruppen das Redoxpotential weit stärker senken als p-Methoxy-Gruppen (vgl. Brown-Substituentenkonstanten Tab. 4.1 S.70).

Der Einfluss von Dipal.-PE auf den Abbau von Propylgallat in Schweineschmalz und die damit verbundene Lagerfähigkeit bei 120°C wurde in der Arbeitsgruppe Hudson von Dziedzic und Robinson untersucht [38].

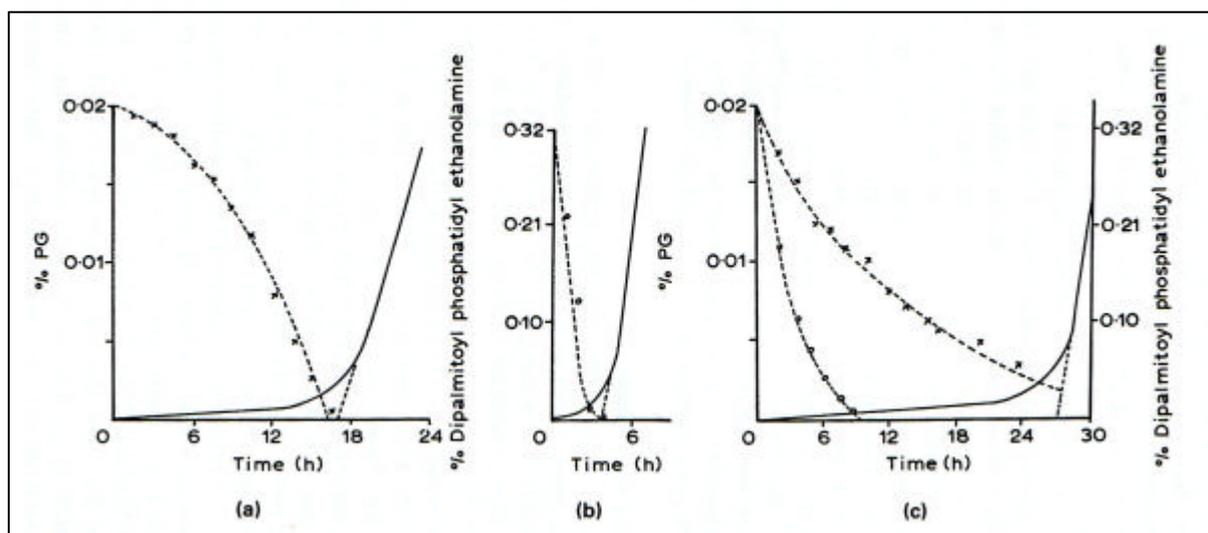


Abbildung 4.20 Abbau von 0,02% Propylgallat (a), von 0,32% Dipal.-PE (b) und Abbau beider Komponenten in Mischung (c); in Schweineschmalz bei 120°C, Induktionsperiode in Stunden [38,121]

Während sich Propylgallat im Laufe der Induktionsperiode anfangs langsam, dann aber mit zunehmender Geschwindigkeit abbaute, erhöhte der Zusatz von 0,32% PE die Anfangsgeschwindigkeit des Abbaus zwar, aber im Verlauf der Induktionsperiode wurde die Abbaugeschwindigkeit immer kleiner. Der Abbau erfolgte nun in erster Näherung exponentiell, wobei die Autoren eine Halbwertszeit von 9h angeben. Der schnellere PrG-Abbau zu Beginn lässt vermuten, dass es zu einer Reaktion mit PE kommt. PrG selbst bildet beim oxidativen Abbau durch Dimerisierung über C2 bzw. C6 ein Biphenyldimer, das zu einem Dilacton – der Ellagsäure – umestert [121].

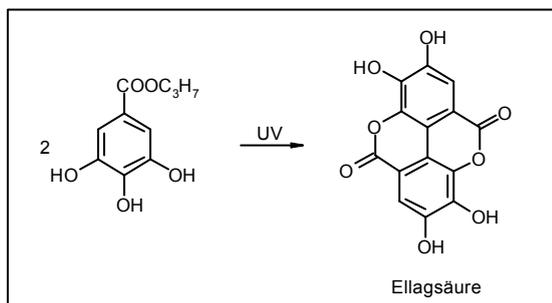


Abbildung 4.21 Abbau von PrG zu Ellagsäure [121]

Die Oxidation der Ellagsäure sollte zu chinoiden Strukturen führen, welche möglicherweise die Targets des PE's darstellen. Zwar sind diese kein Ether, aber auch sie enthalten –diesmal über Esterbindungen– blockierte OH-Gruppen.

Der Vergleich der Effekte von PE, PC und PI auf die einzelnen Tocopherol-Homologen in Schweineschmalz bei 100°C [100] ergibt für PE/ -Tocopherol die größte Induktionsperiode.

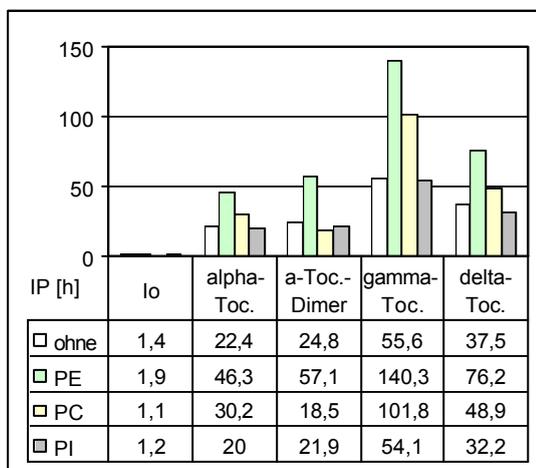


Abbildung 4.22 Induktionsperioden von je 0,02% Tocopherol-Verbindung mit 0,3% Dipalmitoyl-PE, -PC und PI in Schweineschmalz bei 100°C [100]

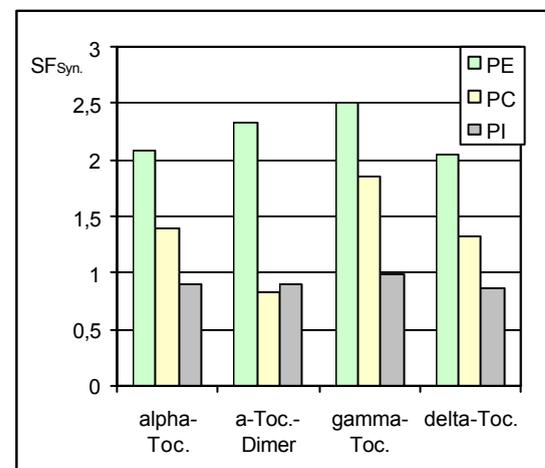


Abbildung 4.22a synergistischer Effekt von je 0,02% Tocopherol-Verbindung mit 0,3% Dipalmitoyl-PE, -PC und PI in Schweineschmalz bei 100°C [100]

Der reine synergistische Effekt des PE's ist aber bei allen untersuchten Tocopherol-Verbindungen etwa gleich und liegt zwischen 2 und 2,5. Man kann daher annehmen, dass der gleiche Mechanismus dahintersteckt und dem Abbau der α - und γ -Homologen über Etherdimere keine besondere Bedeutung zukommt. PC zeigt eine geringere, aber nicht unerhebliche, synergistische Wirkung. PI ist inaktiv. Der Effekt von PA wurde hier nur für α -Tocopherol bestimmt und liegt mit 1,89 zwischen der von PE und PC. Das α -Tocopheroldihydroxydimer steht in seiner Wirkung mit PE dem α -Tocopherol nicht nach; anders sieht das gegenüber PC aus. Dadurch das 0,02% des Dimers nur die halbe Zahl an Molekülen enthält, deutet dieser Unterschied auf eine intensivere chemische Wechselwirkung mit PE hin.

Hidalgo & Zamora et al. [89] haben in neueren Untersuchungen versucht, die synergistischen Effekte von PE und Lysin auf α -Tocopherol über die mit Lipidautoxidationsprodukten gebildeten Pyrrol-Artefakte zu erklären. In tocopherolfreiem Olivenöl als auch nach Zugabe von 250 ppm α -Tocopherol fanden sie mit 400 ppm PC keinen Effekt, mit je 400 ppm PE bzw. Lysin nur geringe synergistische Wirkungen und mit PC/PE (1:3; 1:1, 3:1 400 ppm) keinen Effekt. Die größte synergistische Wirkung von ca. 20% ($SF_{Syn} \sim 1,25$; I (zum additiv erwarteten Wert der Einzelkomponenten) = 1,04 – 3,3h) erhielten sie durch Zugabe von PC/Lysin und PE/Lysin (je 1:3; 1:1, 3:1 400 ppm). Je größer die Menge an PL, desto größer der Effekt. Während bei PC/Lysin der Anstieg der Induktionsperiode (I) im tocopherolfreien Olivenöl nur etwa halb so groß war, wie im Olivenöl + α -Tocopherol, war mit PE/Lysin der Anstieg in beiden Ölen auf etwa dem gleichen, hohen Niveau ($I^{3:1}$ ca. 3h). Das lässt den Schluss zu, dass mit PE/Lysin antioxidative Stoffe entstehen, die die Rolle des α -Tocopherols übernehmen. „Pyrrol-Lysin“ und „Pyrrol-PE“ wurden bislang auf ihre antioxidative Wirkung untersucht [89].

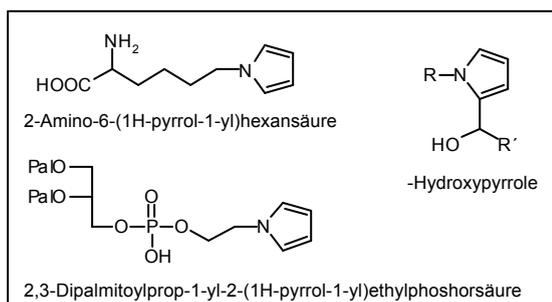


Abbildung 4.23 Pyrrol-Lysin und PyrrolPE [89]

In tocopherolfreiem Olivenöl waren beide aber inaktiv; wohingegen Pyrrol-Lysin in Olivenöl + α -Tocopherol –allerdings erst in Konzentrationen über 200ppm– einen stabilisierenden Effekt zeigte. Dieser lässt sich möglicherweise allein auf die synergistische Wirkung als schwermetallbindende Aminosäure [192] zurückführen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob die beobachtete antioxidative Eigenschaft auf die ebenfalls entstehenden α -hydroxylierten Pyrrole und im Verbindung mit Kohlenhydraten auch auf HMF-analoge Pyrrole zurückgeführt werden kann.

Die Regeneration der α -Tocopherol-Semichinon-Radikale durch Ascorbinsäure ist seit längerem bekannt [183]; Skibsted et al. [189] zeigten, dass auch phenolische Verbindungen mehr oder weniger gut dazu in der Lage sind und setzen den synergistischen Effekt von Flavonoiden einem tocopherolregenerierten Effekt gleich [190]. Bei ihren ESR-Messungen erzeugten sie das α -Tocopheryl-Radikal in N_2 -gesättigter Hexanlösung durch Reaktion mit DPPH. Sowohl p-Hydroxybenzoesäure, als auch ihre beiden in meta-Position Methoxy-substituierten Abkömmlinge; Vanillinsäure und Syringasäure zeigten in einer Konzentration von 400 μ M keine Regeneration. Protocatechursäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) und Gallussäure reduzierten bei gleicher Konzentration die Menge an α -Tocopheryl-Radikal um 16% bzw. 64%. Epicatechin reagierte ähnlich gut wie Gallussäure und reduzierte das Radikal um 57%. Mit Epigallacatechingallat und Ascorbylpalmitat (je 400 μ M) wurde das Tocopheryl-Radikal vollständig abgebaut und somit regeneriert. Hier beobachteten sie auch bei geringeren Konzentrationen schon einen deutlichen Umsatz.

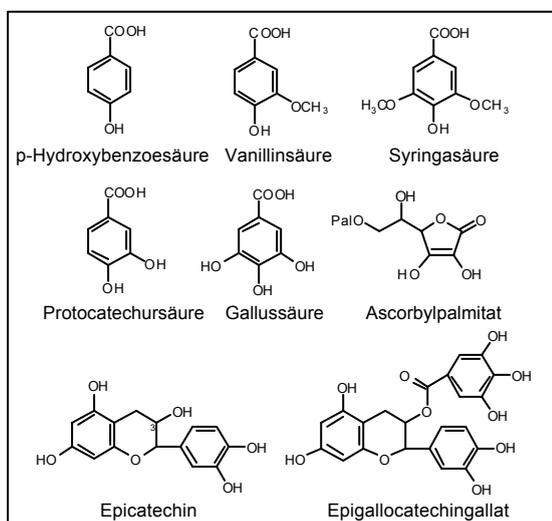
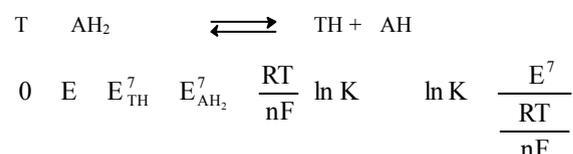


Abb. 4.24

	$\frac{\text{mol T}}{\text{mol AH}_2}$	$E^7[\text{V}]$	BE: O-H [kcalmol ⁻¹]	$\frac{\text{mol T}}{\text{mol AH}_2}$ kcal
Epicatechin	0,00045	0,57	81,2	0,0029
Gallussäure	0,00043	0,56	82,2	0,0035
Epigallo- catechingallat	0,066	0,43	77,8	0,043
Ascorbyl- palmitat	0,93	0,28	73,2	0,45
α -Tocopherol	-	0,27	75,8	-

Tab. 4.4 α -Tocopherol-Regeneration durch phenolische Verbindungen und Ascorbylpalmitat, Redoxpotentiale, Bindungsenergie [124,189] und errechneter Umsatz (kcal) nach K über Nernst-Gleichung [8]:



Der Logarithmus des Verhältnisses an umgesetzten mol α -Tocopheryl-Radikal je mol phenolischer Verbindung korreliert mit der OH-Bindungsenergie und dem Einelektronen-Redoxpotential der eingesetzten Verbindung [189]. Die von Skibsted et al. erhaltenen Umsätze stimmen gut mit denen überein, die man über die Gleichgewichtskonstanten (K) der Redoxgleichgewichte erhält. Die K-Werte lassen sich rein theoretisch aus den E° -Werten über die Nernstgleichung berechnen, weil im Gleichgewicht $E = 0$ ist. Da die genauen Bedingungen nicht beschrieben wurden, habe ich für den Term RT/nF mit $0,02569V$ die Standardbedingungen [8] angesetzt. Die gemessene Regeneration ist für Epigallocatechingallat größer als erwartet, Ursache ist wahrscheinlich, dass die Verbindung zwei reduzierbare Elemente enthält. Ähnliches gilt für Ascorbat. Da Ascorbylpalmitat praktisch das gleiche Redoxpotential wie α -Tocopherol besitzt, ergibt sich eine Gleichgewichtskonstante nahe 1 ($0,678$). Als Triebkraft der Reaktion wird die Weiterreaktion von $\cdot AH$ zu A angesehen [190]. Diese Reaktion wurde bei α -Tocopherol in Verbindung mit phenolischen Antioxidantien zuerst beim Ubichinon-Radikal beschrieben und hier als exergonisch (ca. -60 kJ mol^{-1}) identifiziert [138]. Für die α -Tocopherolregenerierung durch phenolische Substanzen ist danach die Lage des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Semichinon-Radikalen (Bindungsenergie) von Bedeutung. Auf welcher Seite es liegt ist wesentlich davon abhängig, ob sich das betreffende Antioxidants durch Disproportionierung über eine chinonide Struktur stabilisieren kann. Quantitativ äußert sich das in der Senkung des Einelektronen-Redoxpotentials (vgl. p-Hydroxyanisol und p-Hydrochinon Tab. 4.1). Das α -Tocopherylradikal wird gerade deswegen regeneriert, weil es selbst nicht über sein Chinon abreagiert, dieses entsteht erst durch Reaktion mit ROO-Radikalen oder andere Moleküle ($\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, H_2O , Nukleophile [112]). Auch die Reaktion über Chinonmethide ist energetisch ungünstig (Tab. 4.1). Da Phospholipide mit Tocopherolen und BHA gerade die etherblockierten Antioxidantien synergistisch verstärken, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier ein Semichinon-Radikal-Regenerationsmechanismus zugrunde liegt. Die Frage ist aber; was wird oxidiert? Spielt eine dritte Komponente –wie z.B. Lipidperoxidationsprodukte oder Maillard-Carbonyle– eine Rolle oder reagiert PE bzw. seine Abbauprodukte direkt mit Tocopherolen –etwa unter Bildung von Tocopheron-Strukturen– die mit Ascorbat

regenerierbar sind? Warum zeigt auch PC mit Tocopherolen einen kleinen synergistischen Effekt aber keinen mit Flavonoiden [101] ?

Die Wirkung von Phospholipiden auf den synergistischen Effekt zwischen Ascorbylpalmitat und α -Tocopherol wurde von Pongracz et al. [212] an einer kommerziell erhältlichen antioxidativen Mischung von 70% Sojalecithin, 25% Ascorbylpalmitat und 5% DL- α -Tocopherol an Schweineschmalz bei 120°C untersucht.

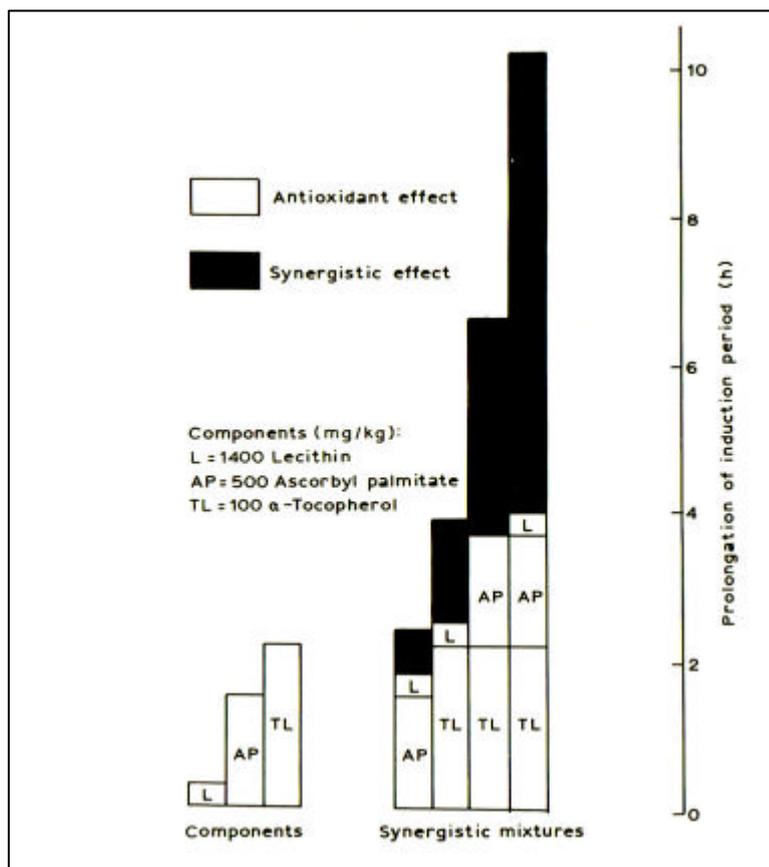


Abb. 4.25 Synergismus von Ascorbat/ α -Tocopherol und Sojalecithin [aus 212]

In diesem Mischungsverhältnis zeigte die Ascorbat/ α -Tocopherol-Regeneration der größten synergistischen Effekt. Alle drei Komponenten zeigten eine um etwa 1,3h größere Wirkung als die Summe der drei einzelnen synergistischen Effekte erwarten ließ. Da Ascorbinsäure selbst nur in Verbindung mit einem Emulgator α -Tocopherol synergistisch verstärkt [11], spielt auch die unterschiedliche Polariät der antioxidativen Stoffe und deren Überbrückung eine Rolle. Tatsächlich konnten Koga & Terao [126] 1995 an einem dem Schweineschmalz nachempfundenen Modellsystem aus Methylaurat und Methylinolat (85:15) mit 10 nmol ml⁻¹ α -Tocopherol und 100

nmol·ml⁻¹ PC zeigen, dass Dibutyryl-PC keinen synergistischen Effekt besitzt (? SF_{Syn.}=1,03).

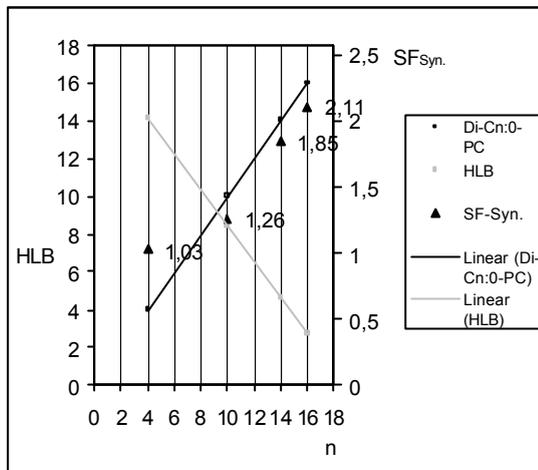


Abbildung 4.26 synergistischer Effekt von Dibutyryl-, Dicaproyl-, Dimyristoyl- bzw. Dipalmitoyl-PC (100nmolml⁻¹) mit α -Tocopherol (10nmolml⁻¹) in Methyllaurat/ Methylolinolat (85:15) bei 50°C [126]

Unter Einbeziehung der HLB-Werte [11,158] sieht man, dass erst bei Wechsel der hydrophil-hydrophoben Balance des PC in den unpolaren Bereich (HLB < 7, Kettenlänge C10–C12) die synergistische Wechselwirkung deutlich mit der Kettenlänge ansteigt.

Mit dem System Tocopherol/Ascorbat/Lecithin lassen sich selbst Fischöle gut stabilisieren (Patente). Diese sind wegen des hohen PUFA-Anteils sehr oxidationsempfindlich aber gerade durch den hohen Gehalt an 3-Fettsäuren – insbesondere Eicosapentaensäure (C20:5n3) und Docosahexaensäure (C22:6n3) – ernährungsphysiologisch wertvoll.

Tocopherole [ppm]	Homologe	Ascorbin-säure [ppm]	Lecithin [ppm]	Methode	Temp.	IP _{inh.} [h]	IP _o [h]	SF	Ref.
1000		500 (AP)	750	Rancimat	100°C	10,1	1,5	6,7	[129]
2000		400	1000	Rancimat	80°C	40,0	4,0	10,0	[255]
1000	12:58:30%	200	2000	Rancimat	90°C	24,1	0,9	26,8	[29]
4000		200	3000	1,8mm Film	30°C	1114	50,5	22,1	[77]
500	Mix (n.g.)	1000	10000	Fira-Astel	80°C	23,2	0,5	46,4	[150]

Tab. 4.5 Stabilisierung von Fischölen mit Tocopherolen/Ascorbat/Lecithin

Trotz der unterschiedlichen Messbedingungen lässt sich als allgemeine Tendenz erkennen; je mehr Lecithin desto größer der Stabilisierungseffekt. Das Sojalecithin kann daher nicht allein als Emulgator wirken, sondern ihm müssen zusätzlich auch funktionelle Eigenschaften zukommen.

Der größte synergistische Effekt in raffiniertem Sardinenöl bei 40°C wurde mit einer Mischung von α -Tocopherol und PE erhalten (0,04%/0,5%, 40°C), während PC aber ebenfalls noch eine deutliche Wirkung zeigte [9]. Ohshima et al. [182] arbeiteten mit vergleichsweise wenig α -Tocopherol (30ppm = 0,003%) und erhielten erst bei Zugabe von 10% PL deutliche Effekte. In Sardinenöl-Neutrallipiden zeigte Dipalmitoyl-PE mit α -Tocopherol bei 37°C eine SF_{syn} von 1,7 aber gegenüber Trilinolein nur einen von 1,4. Auch bei Zusatz der Basen-Komponenten als solches ergab sich im Sardinenöl etwa der doppelte Effekt. Für o-PE, o-PS und o-PC erhielten sie im Sandinenöl: 2,06, 1,52 und 1,14; und im Trilinolein: 1,45, 1,26 und 1,09. Man kann daher vermuten, dass weitere Inhaltsstoffe im Sardinenöl den Effekt verstärken. Segawa et al. [215] erklären den beobachteten höheren synergistischen Effekt von PE gegenüber PC mit einem H-Transfer aus der Aminogruppe zum Tocopheryl-Radikal und damit über eine Tocopherol-Regenerierung. So steigt der synergistische Effekt proportional zur Anzahl der Amino-Wasserstoffe im Phospholipid-Molekül [216]. Sheldon et al. [178] beobachteten in raffiniertem Lachsöl bei 100°C vergleichbare Effekte für PE und PC. Bei 180°C zeigten sie, dass auch der synergistische Effekt von PC mit seiner Konzentration ansteigt [125]. Darüberhinaus ergab sich bei 1% PL-Zusatz für die Größe des synergistischen Effekts die Abstufung [125]:

Sphingomyelin = PC = LPC = PE > PS > PI > PA.

Die Regeneration von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon bei Reaktion mit PE unter Rückflußerhitzung in Toluol wurde 1993 von Wenig und Gordon entdeckt [254]. Im Rancimat-Test an Schweineschmalz fanden Sie weder für 0,1% α -Tocopherylchinon noch für 0,26% L- α -Dilauryl-PE einen antioxidativen Effekt (IP: 4-5h). Werden beide aber vorher für 12h in Toluol am Rückfluß erhitzt, so erhöht sich die Induktionsperiode auf 22,6h. Als Produkt konnten Sie u.a. α -Tocopherol nachweisen, welches auch den Stabilisierungseffekt erklärt. Interessant ist weiter die Beobachtung, dass 0,019% α -Tocopherylchinon, das äquimolar mit 0,025% Dilauryl-PE in Toluol für 37,5h erhitzt wurde, in Schweinefett mit 24,6h eine größere Induktionsperiode verursacht als 0,1% α -Tocopherol (21,8h).

4.3. Ergebnisse und Diskussion

4.3.1. Einfluß von Lecithinen auf den Abbau von Tocopherolen

a.) Langzeitlagerversuch – Raps- und Sojaöl

Handelsübliches raffiniertes Raps- bzw. Sojaöl wurde mit 1% Sojalecithin1 versetzt und in braunen Glasgefäßen im Kühlschrank bei 4°C bzw. bei Raumtemperatur für 1½ Jahre gelagert. Das Lecithin wurde durch „rotieren“ in den Ölen gelöst. Der Abbau der Tocopherole wurde wöchentlich über HPLC-Fluoreszenz-Messung verfolgt (7.2.1). Nach Abschluss der Lagerung wurden die Proben zusätzlich über POZ, ANZ, SZ und ihr Fettsäurespektrum charakterisiert (7.3.1., 7.3.2., 7.3.3., 7.2.8.).

Im Sojaöl, das neben α - und γ -Tocopherol auch das δ -Homologe enthält, ist der Tocopherolabbau langsamer. In beiden Ölen wird der Abbau aber durch 1% SL1 deutlich verzögert. Auch im Sojaöl sind nach 18 Monaten bei 25°C die Tocopherole

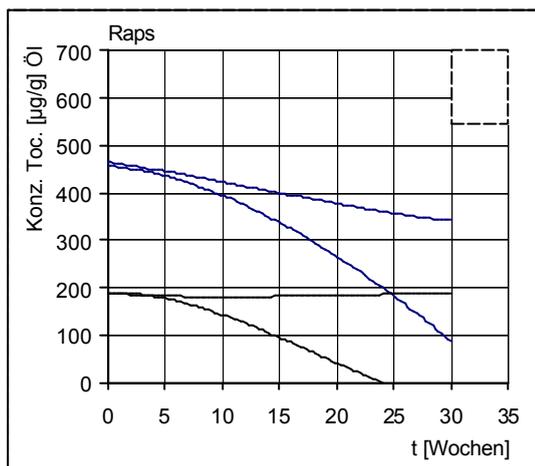


Abbildung 4.27 Toc.-Abbau in raff. Rapsöl (1) bei RT, ohne (dünne Linie) und mit Zusatz (dicke Linie) von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin), RT (schwarz, blau)

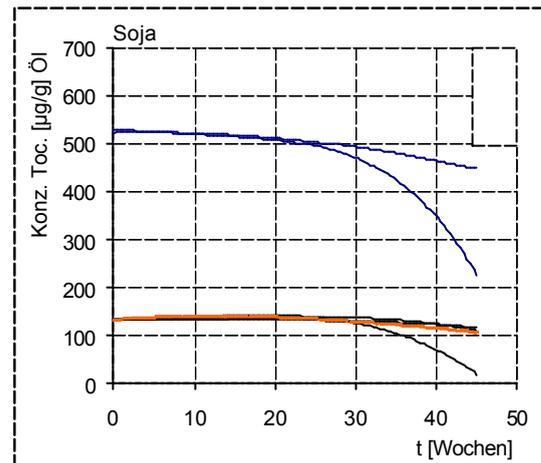


Abbildung 4.28 Toc.-Abbau in raff. Sojaöl (1) bei RT, ohne (dünne Linie) und mit Zusatz (dicke Linie) von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin), RT (schwarz, blau, orange)

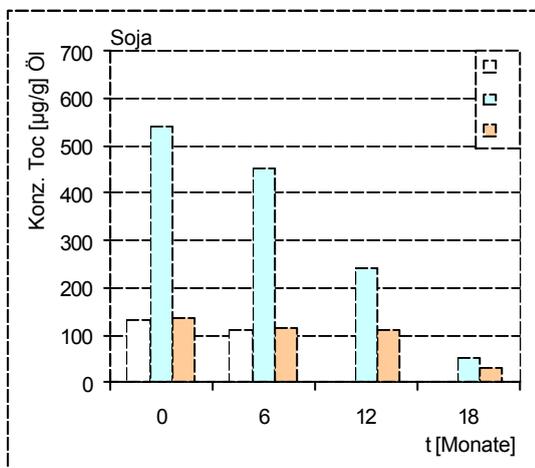


Abbildung 4.29 Toc.-Abbau in raff. Sojaöl (1) bei RT, ohne Sojalecithin, RT

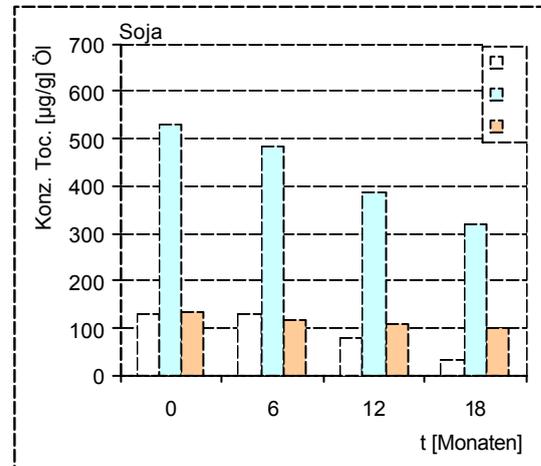


Abbildung 4.30 Toc.-Abbau in raff. Sojaöl (1) bei RT, mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin), RT

	POZ	AZ	SZ
R4°C	3,3	3,0	0,2
R25°C	9,8	31	0,5
R25°C+1%SL	3,0	4,9	0,5
S4°C	0,5	3,1	0,2
S25°C	14,2	17,2	0,5
S25°C+1%SL	9,8	8,0	0,7

Tabelle 4.6 Fettkennzahlen von raff. Rapsöl (1) bzw. Sojaöl nach 18 monatiger Lagerung, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin)

	[%]	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
R4°C	4,45	1,65	60,65	17,45	7,45	
R4°C+1%SL	4,45	1,65	60,65	17,55	7,25	
R25°C	4,6	1,65	59,15	15,8	5,8	
R25°C+1%SL	4,55	1,7	59,15	16,9	6,8	
S4°C	10,0	2,75	23,7	50,75	5,56	
S4°C+1%SL	10,1	2,8	24,8	51,1	5,7	
S25°C	11,1	3,2	23,2	49,25	4,6	
S25°C+1%SL	10,95	3,2	22,2	48,65	4,55	

Tabelle 4.7 Fettsäurespektren von raff. Rapsöl (1) bzw. Sojaöl nach 18 monatiger Lagerung, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin)

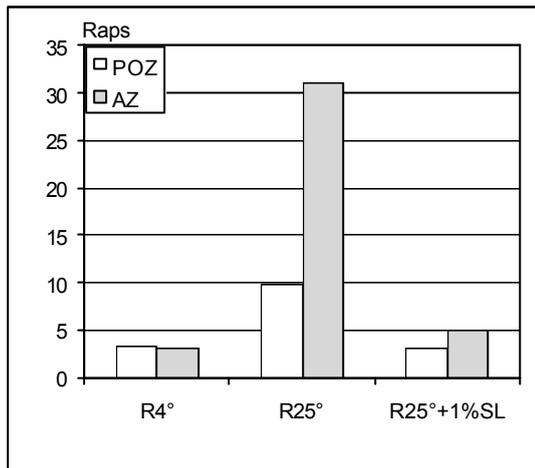


Abbildung 4.31 Fettkennzahlen von raff. Rapsöl (1) nach 18 monatiger Lagerung, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin)

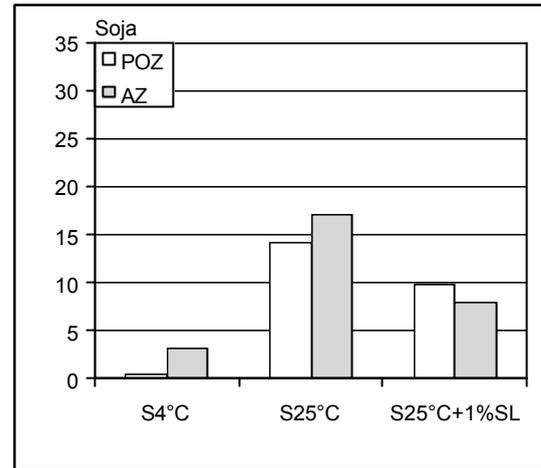


Abbildung 4.32 Fettkennzahlen von raff. Sojaöl (1) nach 18 monatiger Lagerung, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin)

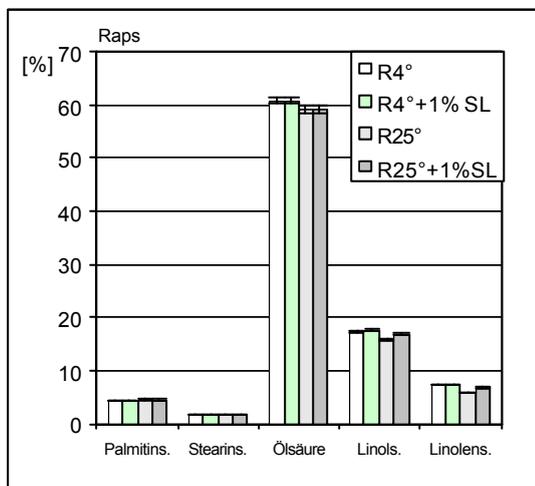


Abbildung 4.31a Fettsäurespektren von raff. Rapsöl (1) nach 18 monatiger Lagerung, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin)

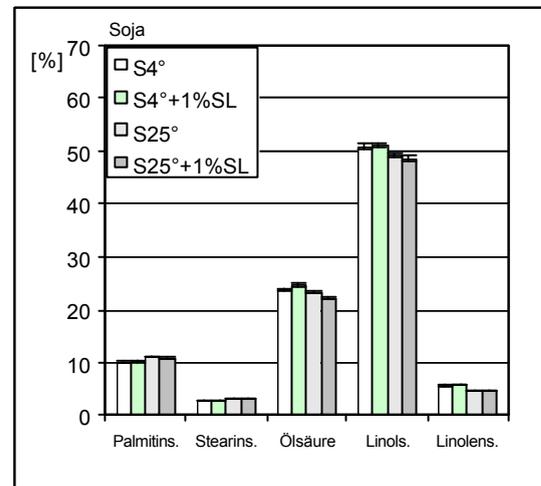


Abbildung 4.32a Fettsäurespektren von raff. Sojaöl (1) nach 18 monatiger Lagerung, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin)

nahezu vollständig abgebaut. Das -Tocopherol baut sich im Vergleich zu und –sowohl in der Vergleichsprobe, als auch mit 1% SL1– signifikant langsamer ab. Auch die Fettkennzahlen nach 1½ zeigen eine verminderte Oxidation der SL1-Proben. Anhand der Fettsäurespektren lässt sich kaum ein Unterschied erkennen. Das Rapsöl, das mit SL1 versetzt wurde, zeigt nach 18-monatiger Lagerung bei Raumtemperatur einen geringeren Linol- und Linolensäureabbau.

b.) Abbau bei 110°C – Raps- und Sojaöl

Um die Messzeit zu verkürzen wurde der Tocopherolabbau in Raps- und Sojaöl nach 1%iger Sojalecithinzugabe auch bei 110°C untersucht. Hierzu wurden 2,5g Öl –bzw. Öl + 25mg SL1– auf 10ml Chloroform aufgefüllt und jeweils 100µl in 1,5-ml-Vials pipettiert. Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels wurden die Proben im Trockenschrank auf 110°C erhitzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden einzelne Probenvials entnommen mit 1000ml Isooctan versetzt und zur HPLC eingesetzt (Autosampler).

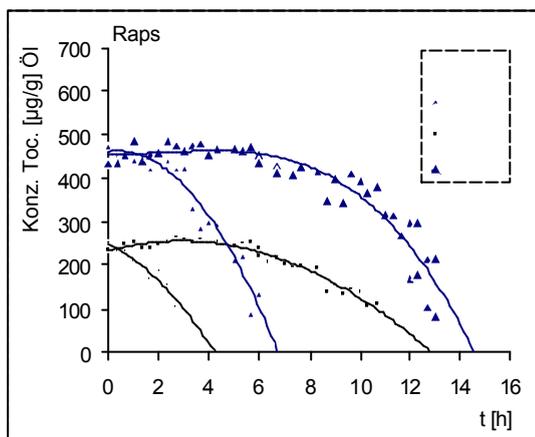


Abbildung 4.33 Toc.-Abbau in raff. Rapsöl (1) bei 110°C, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin)

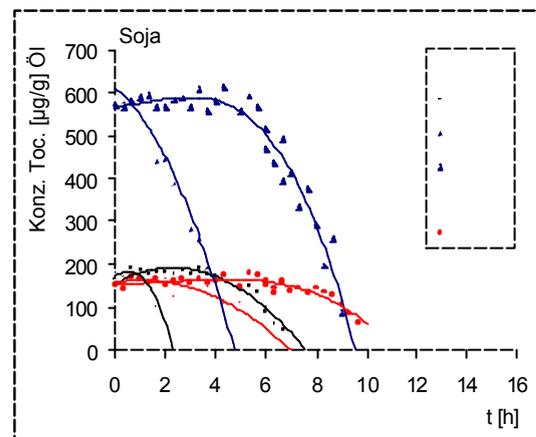


Abbildung 4.34 Toc.-Abbau in raff. Sojaöl (1) bei 110°C, ohne und mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin)

Auch hier wird der Tocopherol-Abbau bei SL1-Anwesenheit deutlich verzögert. Wie man an den Diagrammen erkennen kann, ergibt sich für α-Tocopherol in beiden Ölen ein leichter Anstieg nach 2 stündiger Erhitzung. Der Effekt tritt im Sojaöl auch beim γ-Tocopherol auf und wird nicht –wie anfänglich angenommen– durch einen Messfehler verursacht. Bemerkenswert ist am Sojaöl wieder die Beobachtung, dass das δ-Homologe sich erst abzubauen beginnt, wenn bereits die beiden anderen Tocopherole deutlich dezimiert sind. Der Grund liegt im höheren Redoxpotential und dem damit verbundenen synergistischen Effekt über die Regenerierung des α-Tocopherylradikals durch γ- und δ-Tocopherol [188]. Tatsächlich ist es so, dass sich α-Tocopherol insbesondere in linolsäurereichen Samenölen findet. Hier ist es mit dem γ- und δ-Homologen vergesellschaftet. In Weizenkeimöl kommt noch zusätzlich das β-Tocopherol in größeren Mengen vor. Nachdem nun gezeigt ist, dass Sojalecithin einen Stabilisierungseffekt in raffinierten Samenölen besitzt, ist zur weiteren Untersuchung der Zusammenhänge ein Modellsystem definierter Zusammensetzung nötig.

c.) Ethyllinolat– -Tocopherol–Modell, Einfluss von SL1 auf $t_{\text{Ind.}}$ bei 110°C

Als Modellsubstanz wurde ein Ester der Linolsäure ausgewählt, da Linolsäure häufig in Samenölen vorkommt und auch die Hauptfettsäure der Phospholipide ist. Zudem ist sie durch ihre doppelt aktivierte Allylposition besonders oxidationsempfindlich. Aus Kostengründen wurde nicht Methyllinolat sondern der Ethylester verwendet. Eine andere häufig verwendete Modellverbindung ist das Cumol. Diese Verbindung zeigt ebenfalls autokatalytische Peroxidation. Sie wurde hier nicht verwendet.

Um die Wirkung der Phospholipide auf die Tocopherole zu untersuchen, wurde dem Ethyllinolat 0,05% –in einigen Fällen auch 0,1%– -Tocopherol zugesetzt. Die Menge von 500ppm entspricht etwa dem Gehalt in Sonnenblumenöl (Abb. 4.3 S.76).

Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, in welchen Konzentrationen Sojalecithin einen Effekt besitzt und ob sich die Lecithine von Soja-, Raps und Sonnenblume in ihrer Wirkung unterscheiden. Zusätzlich wurde hochangereichertes Soja-PC (gefällt, Toc.-frei) eingesetzt. Gearbeitet wurde bei 110°C. Die Induktionsperiode wurde photometrisch über die Absorption bei 233nm bestimmt (7.3.5.).

Das Ethyllinolat wurde in Chloroform/Methanol (3+1) zu 1g/10ml gelöst. Jeweils 1ml (0,1g) wurde mit bis zu 10% (10.000ppm) SL1 –gelöst im gleichen Lösungsmittel– versetzt. Die Lösung wurde auf 2ml ergänzt. Je 100µl wurden dann in 1,5-ml-Vials pipettiert und nach vertreiben des Lösungsmittels am Stickstoffstrom im Trockenschrank für auf 110°C erhitzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Vials entnommen. Der Rückstand wurde mit 1ml Hexan gelöst und davon 200µl/2ml in Quarzküvetten am UV-Photometer bei 233nm vermessen. Über den Anstieg der Absorption, der von Oxydieren verursacht wird, wurde die Induktionsperiode bestimmt. Für den Vergleich der verschiedenen Lecithine wurde diese jeweils in einer Menge von 1% zugesetzt.

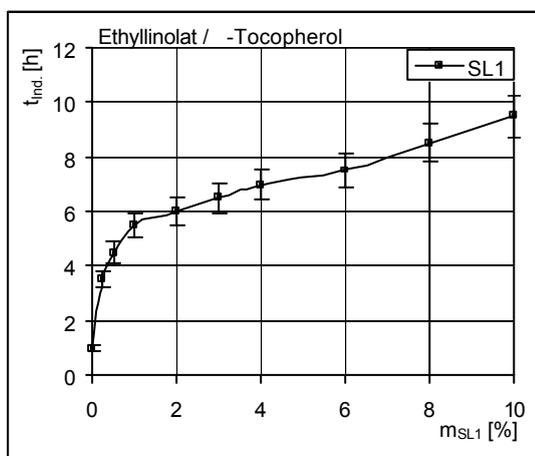


Abbildung 4.35 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C mit Zusatz von 0,05% -Tocopherol und verschiedenen Mengen Sojalecithin (SL1)

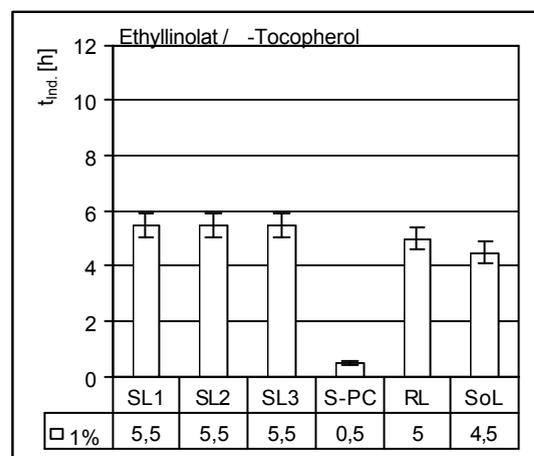


Abbildung 4.36 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C mit 1%igem Zusatz verschiedener Lecithine (Soja, Raps, Sonnenblume, Soja-PC^{gef.}) und 0,05% -Tocopherol

Die Induktionsperiode des mit 0,05% α -Tocopherol versetzten Ethyllinolats, die bei 110°C unter 2h liegt, steigt schon bei Zugabe geringer Mengen SL1 deutlich an. Ab einer Menge von ca. 1% im Ethyllinolat steigt der Effekt mit zunehmender Menge nur noch gering an. Wie die Grafik zeigt, ist eine Zusatz von 1% SL1 sinnvoll. In Abbildung 4.36 sind die Wirkungen der verschiedenen Pflanzenlecithine bei 1%iger Zugabe dargestellt. Aufgrund der relativ großen Schwankungsbreite der Messwerte sind die Ergebnisse auf halbe Stunden gerundet. Für Raps- und Sonnenblumenlecithin ergeben sich etwas kleinere Induktionsperioden. Auffällig ist der kleine Wert für Soja-PC. Es wirkt prooxidativ. Die kleineren Induktionsperioden für Raps und Sonnenblumenlecithin lassen sich nicht in einfacher Weise über die Zusammensetzung der Phospholipide, die Braunfärbung und den Schwermetallgehalt erklären (S.16-17). Beide sind dunkler gefärbt als die Sojalecithine und enthalten auch geringere Mengen an PE. Der größere Effekt von Raps- gegenüber Sonnenblumenlecithin könnte mit dem höheren Gehalt an Glycolipiden zusammenhängen. Allgemein lässt sich aber für die drei untersuchten Pflanzenlecithine eine synergistische Verstärkung des α -Tocopherols feststellen. Der „synergistische Schutzfaktor“ beträgt unter den verwendeten Bedingungen $3 \pm 0,5$.

Da die Induktionsperiode von Ethyllinolat $^{-Toc}$ durch 1%ige Lecithin-Zugabe von ca. 1,5h nur auf maximal 5,5h erhöht wird, stellt sich die Frage, ob der Effekt nicht durch weitere Stoffe bzw. Inhaltsstoffe noch verstärkt werden kann. Zuerst wurde der Einfluss von D-Galactose untersucht, da diese bei der Hydrolyse der enthaltenen Glycolipide zu erwarten ist. Der Zucker wurde bei 60°C in Methanol gelöst und in Verbindung mit dem jeweiligen Pflanzenlecithin (1%) in einer Menge von 0,5% des Ethyllinolats zur Chloroform/Methanol-Lösung zugesetzt. Wie Abb. 4.37 auf der nächsten Seite zeigt, erniedrigt der D-Galactose-Zusatz aber die Induktionsperiode wieder. Der Zucker wirkt unter den gewählten Bedingungen demnach prooxidativ. Als nächstes wurde der zusätzliche Effekt von 1% Dipalmitoyl-PE bzw. 0,5% D-Glucose in Verbindung mit 1% SL1 bzw. Rapslecithin im Ethyllinolat $^{-Toc}$ -System untersucht. Erstaunlicherweise erhöht das zusätzliche Dipal.-PE den Effekt beider Lecithine nicht weiter. D-Glucose selbst ist in Verbindung mit SL1 prooxidativ, in Verbindung mit Rapslecithin aber leicht antioxidativ. Interessant ist die hohe Induktionsperiode, die

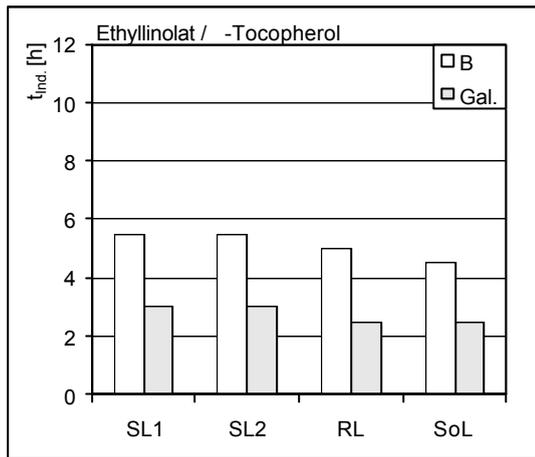


Abbildung 4.37 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C mit 0,05% -Tocopherol mit Zusatz von Sojalecithin bzw. Rapslecithin oder Sonnenblumenlecithin sowie nach Zugabe von Galactose (0,5%)

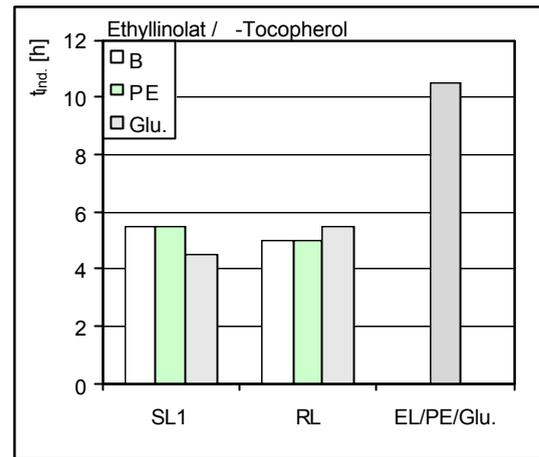


Abbildung 4.38 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C mit 0,05% -Tocopherol mit Zusatz von Sojalecithin (SL1) bzw. Rapslecithin sowie nach Zugabe von PE (1%) bzw. Glucose (0,5%)

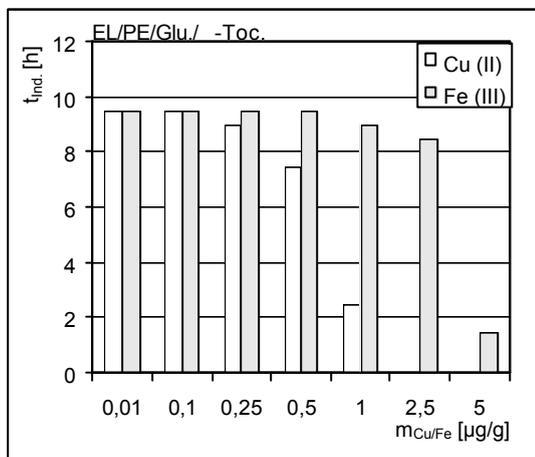


Abbildung 4.39 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C mit Zusatz von 1% PE, 0,5% Glucose und 0,05% -Tocopherol in Abhängigkeit vom Gehalt an Cu (II) und Fe (III)

nach Zusatz von Glucose und PE ohne Pflanzenlecithin erhalten wurde. Der Wert wurde eigentlich nur als Vergleichsblindwert angesetzt. Für den beobachteten hohen Effekt sind eine ganze Reihe von Gründen denkbar. Einerseits enthält die Probe im Gegensatz zu den Lecithinansätzen keine zusätzlichen Schwermetalle. In der Tat inaktiviert der Zusatz von Cu^{2+} oder auch Fe^{3+} den PE/Glucose-Effekt, wie die Grafik 4.39 des entsprechenden Versuchs zeigt. Die Schwermetalle wurden in Form von Kupfersulfat bzw. Eisen(III)-chlorid, ebenfalls in Methanol gelöst, zugegeben. Auf der anderen Seite führt die Erhitzung von PE und Glucose zu einer Bräunung, die ebenfalls für den Effekt verantwortlich sein kann. In diesem Fall lässt sich sagen, dass der Effekt vermutlich nicht über eine Schwermetall-Inaktivierung durch die Bräunungsprodukte zustande kommt.

4.3.2. Regeneration primärer Antioxidantien

a.) Propylgallat in Rapsöl

Im theoretischen Teil zum synergistischen Effekt der Phospholipide (S.94-98) wurde die Möglichkeit der Regeneration von Semichinonradikalen, insbesondere von solchen, denen über eine derivatisierte ortho- oder para-OH-Gruppe keine Stabilisierung zu Chinonstrukturen offen steht, durch PE diskutiert. In Anlehnung an die Untersuchungen von Dziedzic et al. [38] wurde der Effekt von 0,03% Propylgallat und 0,3% Dipalmitoly-PC bzw. -PE auf die Tocopherole an Rapsöl näher untersucht. Gearbeitet wurde bei 110°C. Gemessen wurde hier nicht der Verderb, sondern der Abbau der im Rapsöl enthaltenen Tocopherole (7.2.1). Der Gehalt von Propylgallat wurde mit HPLC-UV verfolgt (7.2.4.). Die Säulendiagramme zeigen die Zeit bis zum Abbau der beiden Tocopherole. Im unteren Diagramm sind die Blindwerte in Abzug

Phosphatidzusatz	t [h] bis zum Toc.-Abbau	
R1 (Vergleich)	4,1	6,8
PC (0,3%)	6,6	10,3
PE (0,05%)	4,9	7,8
PE (0,3%)	8,5	10,8
R1+PrG (0,03%, Vergleich)	8,7	14,8
PrG/PC	14,0	18,7
PrG/PE	16,2	18,5

Tabelle 4.8 Abbauzeit der Tocopherole in raff. Rapsöl (1) bei 110°C, ohne und mit Zusatz von PC bzw. PE; sowie weiterem Zusatz von Propylgallat

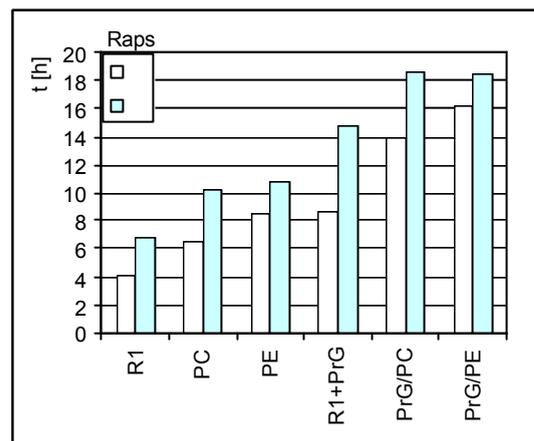


Abbildung 4.40 Abbauzeit der Tocopherole in raff. Rapsöl (1) bei 110°C, ohne und mit Zusatz von 0,3% PC bzw. PE; sowie weiterem Zusatz von 0,03% Propylgallat

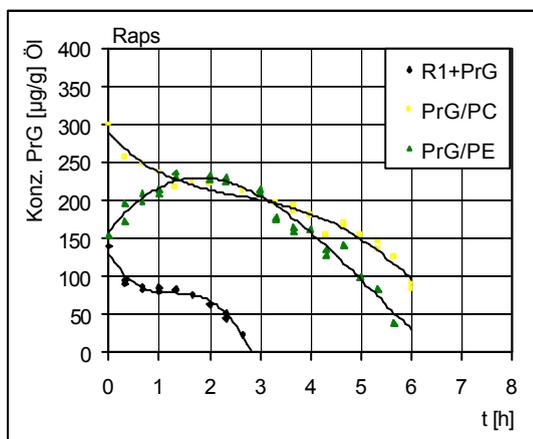


Abbildung 4.41 Abbau von von Propylgallat in raff. Rapsöl (1) bei 110°C, ohne und mit Zusatz von 0,3% PC bzw. PE

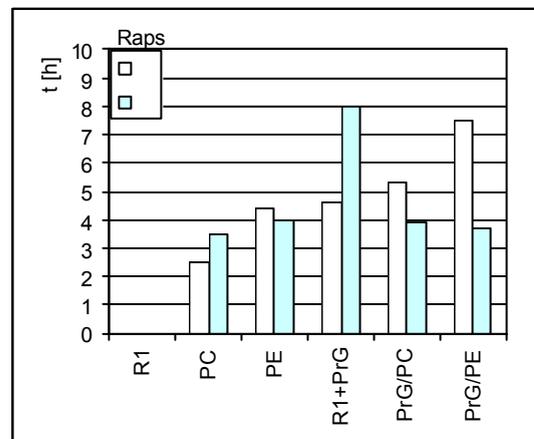


Abbildung 4.40a Abbauzeit der Tocopherole in raff. Rapsöl (1) bei 110°C mit Zusatz von 0,3% PC bzw. PE; sowie weiterem Zusatz von 0,03% Propylgallat; dargestellt jeweils unter Abzug der entsprechenden Vergleichswerte (R1 bzw. R1+PrG)

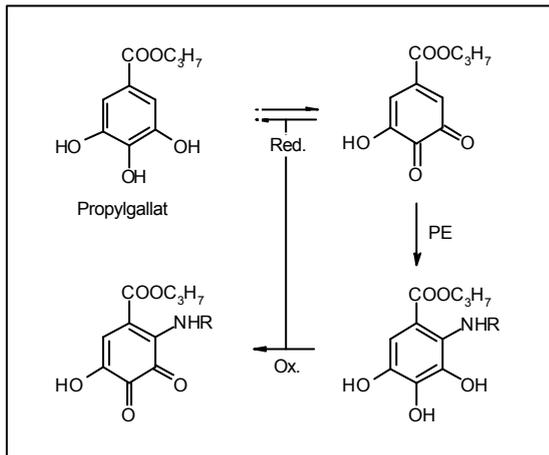


Abbildung 4.42 hypothetische Regeneration von Propylgallat mit PE

gebracht. Das Propylgallat selbst verzögert den Abbau des α -Tocopherols stärker, als den des γ -Homologen. Gleiches gilt für PC, nicht aber für PE und auch nicht für die Mischungen beider Phospholipide mit Propylgallat. Hier ist die Verzögerung des α -Tocopherol-Abbaus stärker. Der größte synergistische Effekt beim α -Tocopherol wird mit PE/PrG erreicht. Betrachtet man den Abbau des Propylgallats in Abb. 4.41, so erkennt man bei Zusatz von PE/PrG einen Anstieg der Konzentration nach 2 Erhitzungsstunden. Ein ähnlicher Regenerationseffekt –allerdings weit weniger stark ausgeprägt– wurde auch schon beim α -Tocopherol selbst in Verbindung mit SL1 gefunden (4.3.1.b.). Durch PC/PrG wird der Propylgallat-Abbau zwar auch verzögert, eine explizite Regeneration wird aber nicht gemessen. Das Regenerationsphänomen lässt sich einerseits über eine Reduktion von PrG-Semichinon-Radikalen deuten. Andererseits ist auch eine Reduktion der o-chinoiden Abbauprodukte denkbar. Einen Erklärungsansatz über eine Recyclierung aus der Ellagsäure, dem Hauptabbauprodukt des Propylgallats, sehe ich nicht. Eine weitere hypothetische Möglichkeit der Regeneration ist in Abb. 4.42 dargestellt. Nach Pokorný et al. reagiert PE mit 1,4-Benzochinon zum roten 2-Alkylamino-Derivat, welches zu braunen Produkten weiterreagiert [194]. Anilin bildet mit 1,4-Benzochinon das 2-Anilinohydrochinon, das durch ein weiteres 1,4-Benzochinon schnell zum Hydrochinon reduziert wird [229]. Für das PrG-o-Chinon ist daher eine analoge Reaktion vorstellbar, die neben PrG das 2-PE-Chinon (ortho oder para) ergeben sollte. Die Regeneration des Propylgallats ist möglich, da das Redoxpotential durch Alkylamino-Substituenten in ortho oder para-Position zur OH-Gruppe abgesenkt wird (vgl. Tab. 4.1. S. 70).

b.) Effekt der Dipalmitoyl-PL-Standards auf α -Tocopherylchinon

Jeweils 400 μ M Dipalmitoyl-PL-Standard von PA, PC, PE, PI oder PS wurden mit 200 μ M α -Tocopherylchinon (Fluka) in Toluol bei 100°C über mehrere Tage inkubiert. Die Menge an α -Tocopherol wurde in Abhängigkeit von der Erhitzungszeit über HPLC (7.2.1.) bestimmt.

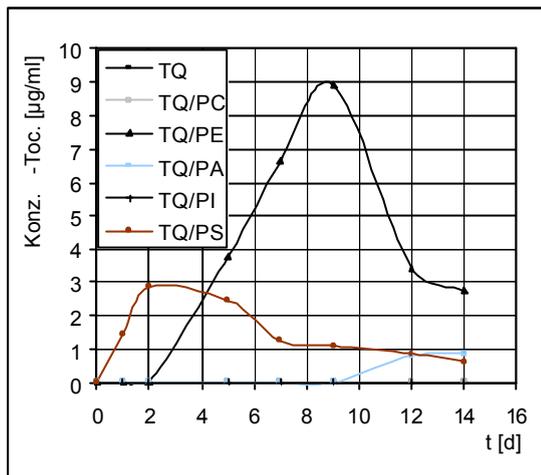


Abbildung 4.43 Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (TQ) bei Reaktion mit verschiedenen Phosphatiden, in Toluol bei 100°C

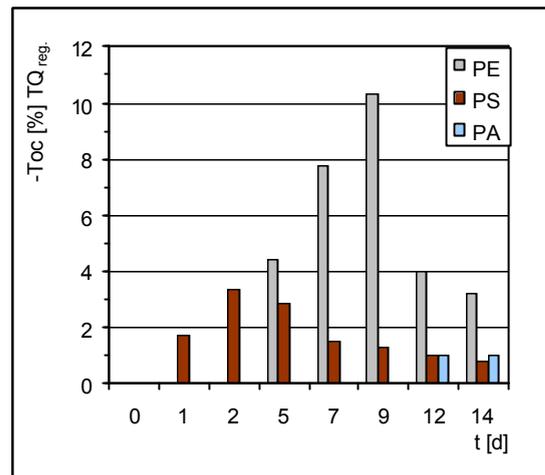


Abbildung 4.43a Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (TQ) bei Reaktion mit verschiedenen Phosphatiden, in Toluol bei 100°C

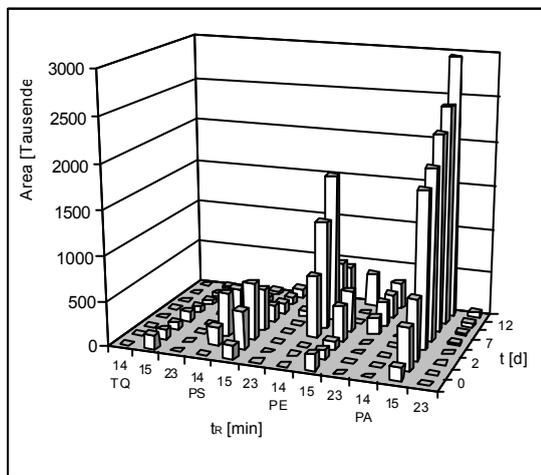


Abbildung 4.44 Bildung von α -Tocopherol (14min) aus α -Tocopherylchinon bei Reaktion mit verschiedenen Phosphatiden, in Toluol bei 100°C; zusätzliche Peaks bei 15min und 23min

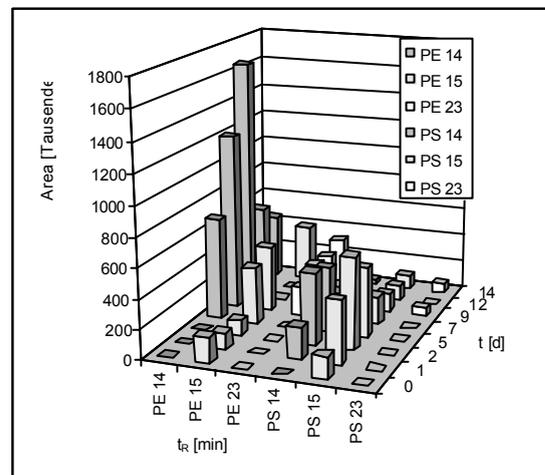


Abbildung 4.44a Bildung von α -Tocopherol (14min) aus α -Tocopherylchinon bei Reaktion mit PE bzw. PS, in Toluol bei 100°C; zusätzliche Peaks bei 15min und 23min

Beim PS entwickelt sich schon zu Beginn der Erhitzung α -Tocopherol. Im Falle des PE entwickelt es sich erst nach einer Induktionsperiode von über 2 Tagen, dann aber in einer größeren Menge. PC und PI regenerieren kein α -Tocopherol. PA zeigt nur einen leichten Effekt, und den auch erst nach langem Erhitzen. Wie im Säulendiagramm rechts zu sehen ist, liegt der regenerierte Anteil an α -Toc. nur bei maximal ca. 10%. Im HPLC-Fluoreszenz-Diagramm der α -Tocopherol-Bestimmung tauchen während

der Erhitzung weitere Peaks auf. Das α -Tocopherol eluiert nach ca. 14 min. Schon der TQ-Blindwert zeigt einen kleinen Peak bei 15 min. Dieser Peak steigt insbesondere bei der sauren PA stark an. Auch mit PS ist er erhöht. Da sich PS von PE nur durch die zusätzliche Carboxylgruppe unterscheidet, verstärkt sich der Verdacht auf einen sauren Bildungsweg der Verbindung. Es handelt sich eventuell um das „Halbacetal“ des α -Tocopherylchinons. PA kann die Struktur nicht zum α -Tocopherol reduzieren. Ein weiterer Peak tritt bei 23 min. auf. Der zeitliche Verlauf deutet an, dass es sich hier um ein α -Tocopherol-Abbauprodukt handeln könnte. Anhand der Verhältnisse beim PS läßt sich vermuten, dass der Peak bei 15 min. –also wahrscheinlich das „Halbacetal“– eine Vorstufe für die Tocopherol-Regenerierung ist. In dem Fall stellt sich die Frage, ob die PE-induzierte Recyclierung nicht durch PA beschleunigt bzw. in ihrer Ausbeute erhöht wird. Der Versuch wurde daher mit binären Mischungen diverser PL-Standards wiederholt. Eingesetzt wurden jeweils Konzentrationen von 200 μ M. Darüberhinaus wurde der katalytische Einfluß von 5% Essigsäure (im Toluol) bzw. 200 μ M Palmitinsäure auf den PE-Effekt untersucht. Die Regenerationsblindwerte für PE und PS sind wegen der halben Konzentration erniedrigt. Die besten Wechselwirkungen zeigen PA und PS. Die Regeneration beginnt unmittelbar bei Erhitzung. Die regenerierte Menge an α -Tocopherol ist im Vergleich zum PS-Blindwert mehr als verdoppelt. Die Ausbeute an regeneriertem TQ wird aber insgesamt nicht bedeutend erhöht. Sie liegt bei maximal ca. 11%. Interessant ist der Verlauf der PE/PS-Mischung. In Mischung ergibt sich hier eine stärkere Regeneration. Sie ist im Vergleich zum PS

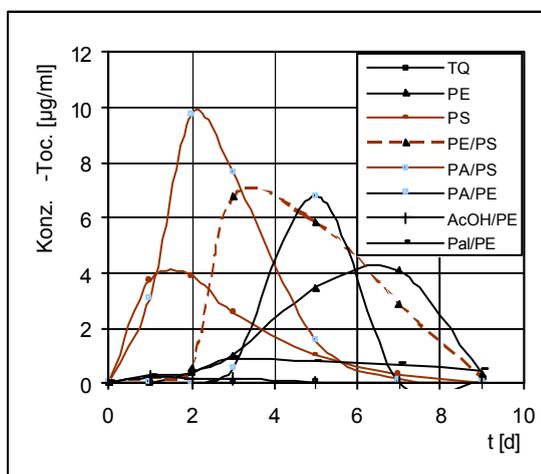


Abbildung 4.45 Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon bei Reaktion mit Phosphatiden in Mischung, in Toluol bei 100°C

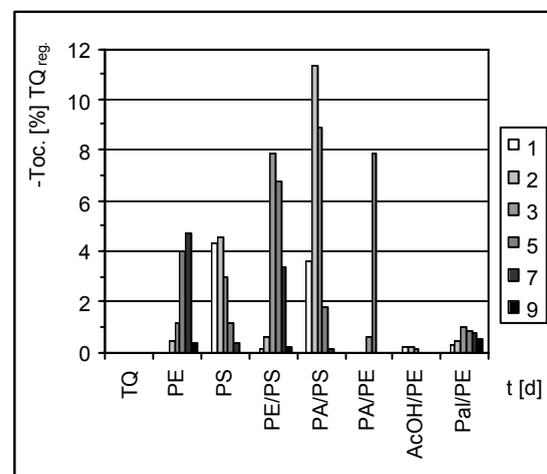


Abbildung 4.45a Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon bei Reaktion mit Phosphatiden in Mischung, in Toluol bei 100°C während 9 Tagen

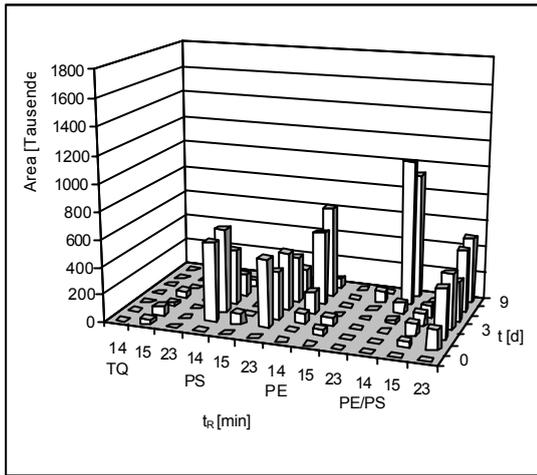


Abbildung 4.46 Bildung von α -Tocopherol (14min) aus α -Tocopherylchinon bei Reaktion mit verschiedenen Phosphatiden, in Toluol bei 100°C; zusätzliche Peaks bei 15min und 23min

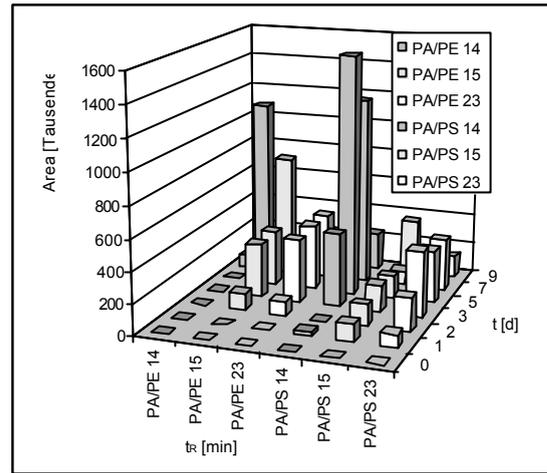


Abbildung 4.46a Bildung von α -Tocopherol (14min) aus α -Tocopherylchinon bei Reaktion mit Phosphatiden in Mischung, in Toluol bei 100°C; zusätzliche Peaks bei 15min und 23min

verzögert – im Vergleich zum PE aber beschleunigt. Der Kurvenverlauf deutet eine Art Konkurrenzsituation an. Auch ist die unbekannte Verbindung, die bei 23 min eluiert, schon relativ kurz nach Beginn der Erhitzung zu messen. Sie kommt hier aber auch bereits vor, wenn nur PS anwesend ist. Warum das im vorstehenden Versuch mit doppelter PS-Menge nicht so war, lässt sich nicht unmittelbar einsehen. Die Verbindung bei 23 min ist nach der neuen Messung als ein weiterer Precursor des α -Tocopherols anzusehen. Ich denke, dass der 23er-Peak eine labile Vorstufe des α -Tocopherols ist, die mit diesem direkt in einem pH-abhängigen Gleichgewicht steht.

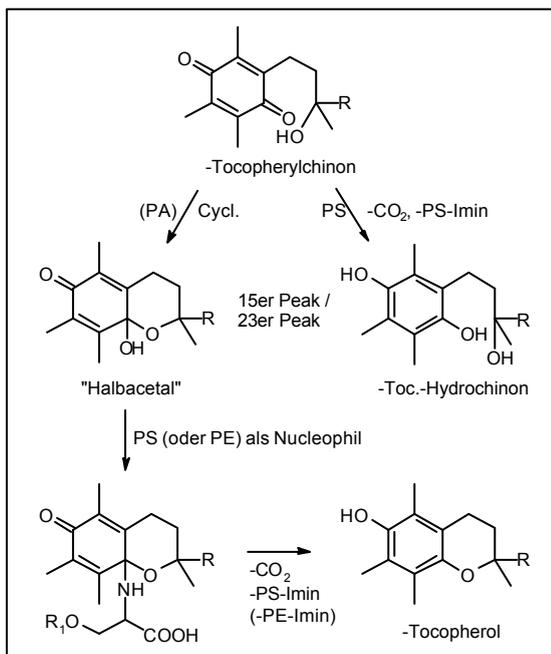


Abbildung 4.47 hypothetische Regenerationswege von α -TQ mit PA/PS/PE

Nach der Retentionszeit sollte es sich um eine polarere Verbindung handeln, als etwa um das cyclische Halbacetal oder das α -Tocopherylhydrochinon. Durch schnelles Abreagieren zum α -Tocopherol könnte sich die Verbindung im 1. Teil des Versuchs der Bestimmung entzogen haben. Zu beachten ist, dass die Versuche über mehrere Tage liefen in denen das Laufmittel aus Kostengründen im Kreis gefahren wurde. Es ist davon auszugehen, dass sich dabei insbesondere der pH-Wert des Isooctan/Ethylacetats-Laufmittels verschoben hat. Der säurekatalytische Effekt des PA ist auch in Verbindung mit PE messbar, verkürzt aber dessen Induktionsperiode nicht. Essigsäure und Palmitinsäure haben in den verwendeten Konzentrationen keine positiven Einflüsse auf die Reaktion des PE's.

Eine Konkurrenz von PS und PE um das primär gebildete „Halbacetal“ (α -Tocopheron) in Form einer nukleophilen Substitution zu entsprechenden Alkylamino-Tocopheronen könnte das Wiederauftreten der Induktionsperiode bei PE-Zusatz erklären. Aufgrund der Acidität der Carboxylgruppe würde das PS-Tocopheron leichter wieder zum Zerfall neigen als das PE-Tocopheron. Dieses würde sich anreichern, kann aber wegen der fehlenden Decarboxylierungsmöglichkeit nur langsam zu α -Tocopherol und dem entsprechenden Imin abreagieren. Das in Abb. 4.47 zusammengefasste Reaktionsschema ist rein hypothetisch. Mit der Information, welche Stoffe sich genau hinter den Peaks bei 15 und 23 min verbergen, ließe sich schon eine deutlich klarere Aussage machen. Prinzipiell muss bei der Reaktion von α -TQ zum α -Tocopherol eine Cyclisierung und eine Reduktion stattfinden. Nach meiner Meinung findet zuerst eine Cyclisierung statt und dann erst die Reduktion. Eine direkte Reduktion von α -TQ durch Aminosäurestrukturen unter Decarboxylierung ist in der Literatur nicht zu finden. Es ist zu untersuchen, ob sich Alkylamino-Tocopherone als Schlüsselintermediate der Reduktion nachweisen lassen. Da PS in den Lecithinen von Soja, Raps und Sonnenblume praktisch nicht enthalten ist, muss das PE- α -TQ-Kondensat nachgewiesen werden (S.122ff). Zuvor muss aber erstmal geklärt werden, ob bsw. Sojalecithin überhaupt in der Lage ist α -Tocopherylchinon zu α -Tocopherol zu reduzieren und ob man die Ausbeute und die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen kann, denn die momentan beobachtete Induktionsphase der Regenerierung verzögert den antioxidativen Schutzeffekt des PE's.

c.) Effekt von Sojalecithin auf α -Tocopherylchinon

Das α -Tocopherylchinon (200 μ M; ca. 89,2 μ g/ml) wurde mit verschiedenen Mengen an SL1 (a: 100 μ g/ml, b: 200 μ g/ml bzw. c: 1000 μ g/ml) in Toluol bei 100°C über 16d inkubiert. Als Vergleich wurde auch 200 μ M Dipal.-PE, sowie 200 μ M Dipal.-PE und 200 μ M Hexanal (A6) eingesetzt. Es sollte geklärt werden, ob das Hexanal den Effekt beeinflusst. Die α -Tocopherol-Regenerierung wurde über HPLC bestimmt (7.2.1.).

t [d]	Konz. α -Toc. [μ g/ml] Toluol					
	TQ	TQ/PE	TQ/PE/A6	TQ/SL1	TQ/SL2	TQ/SL3
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0,13
2	0	0,10	0	0,04	0,44	0,57
3	0	0,11	0,10	0,05	0,41	0,56
7	0	2,90	2,98	0,05	0,39	0,46
10	0	7,12	7,38	0,05	0,46	0,61
14	0	4,99	4,75	0,10	0,39	0,70
16	0	4,33	3,73	0	0	0,54

Tabelle 4.9 Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherolchinon (TQ) bei Reaktion mit PE, PE/Hexanal (A6) bzw. techn. Sojalecithin (SL1-a-c, steigende Konz.), in Toluol bei 100°C

t [d]	Färbung (Ext. _{rel} bei 350nm)					
	TQ	TQ/PE	TQ/PE/A6	TQ/SL1	TQ/SL2	TQ/SL3
14	1,0	1,9	2,0	1,0	2,6	12,6

Tabelle 4.10 Bräunung der Ansätze nach 2 Wochen

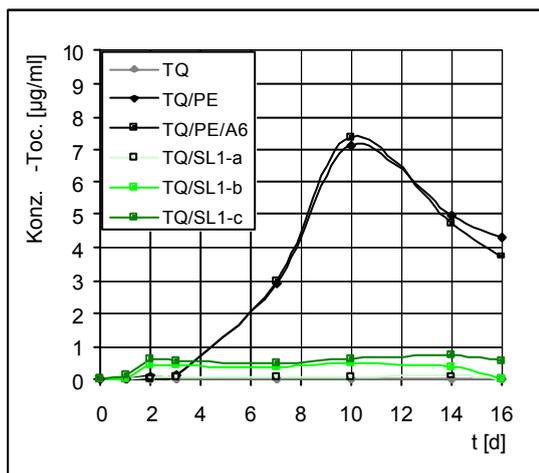


Abbildung 4.48 Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherolchinon (TQ) bei Reaktion mit PE, PE/Hexanal (A6) bzw. techn. Sojalecithin (SL1-a-c, steigende Konz.), in Toluol bei 100°C

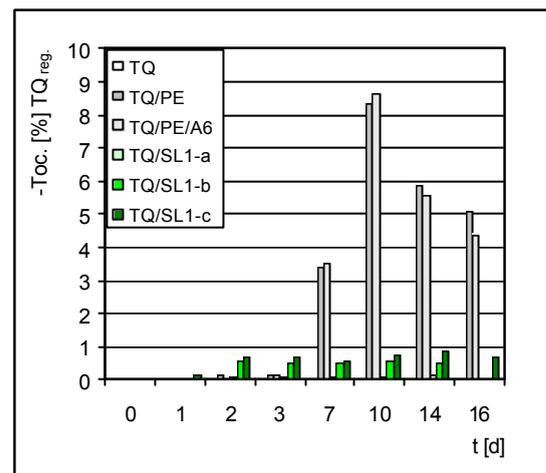


Abbildung 4.48a Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherolchinon (TQ) bei Reaktion mit PE, PE/Hexanal (A6) bzw. techn. Sojalecithin (SL1-a-c, steigende Konz.), in Toluol bei 100°C

Nach einer Induktionsperiode von 2-3 Tagen wird ca. 8-9% des α -Tocopherylchinons durch PE zu α -Tocopherol umgesetzt. Das zusätzliche Hexanal beeinflusst die Regenerationswirkung des PE's nicht. Bei Sojalecithin-Zusatz wird nur eine kleine Regeneration beobachtet. Sie steigt mit der Menge an SL1 an. Allerdings zeigt auch die 1000 μ g/ml-Probe (SL1-c) trotz einer starken Bräunung nach längerem Erhitzen auch nur einen schwachen Effekt (unter 1%). Die IP ist im Vergleich zum PE kürzer. Das α -Toc. könnte durch PUFA's abgebaut worden sein. Möglicherweise reagiert PE auch eher über die Bräunung ab, statt über die Regenerationsreaktion.

d.) Tocopherole im Linolatsystem

Die Regeneration der Tocopherole konnte auch in Ethyllinolat bei 110°C, sowohl mit Dipal.-PE, als auch mit SL1, beobachtet werden. Die Tocopherol-Homologe wurden jeweils einzeln in einer Menge von 0,05% zugesetzt. Der Effekt zwischen PE auf α -Tocopherol ist im linken Diagramm dargestellt.

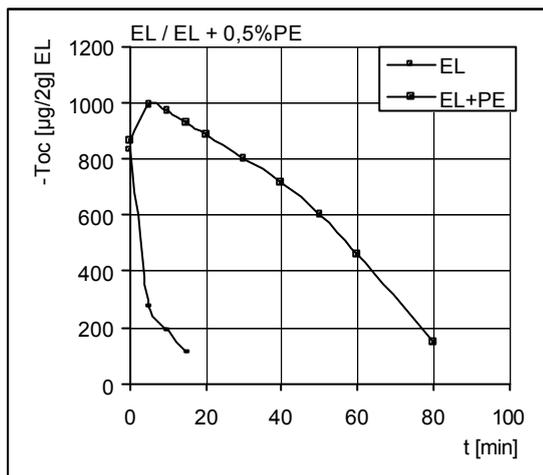


Abbildung 4.49 α -Toc.-Abbau im Linolatsystem mit Zusatz von 0,5% PE bei 110°C

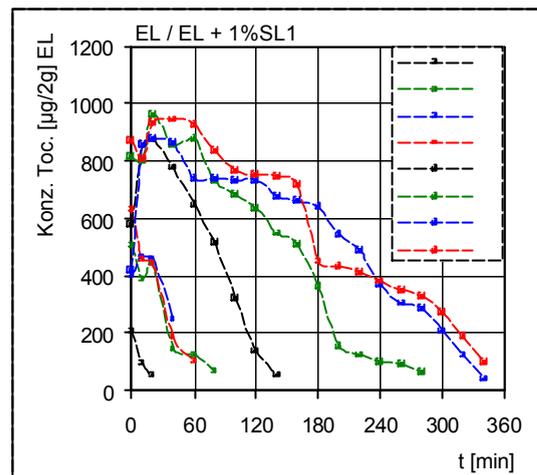


Abbildung 4.50 Toc.-Abbau in Ethyllinolat bei 110°C; ohne und mit 1% techn. Sojalecithin (SL1, Asolectin)

Hier kommt es bereits am ersten Messpunkt nach der Erhitzung zur vollständigen Regeneration, des nach der Zugabe teilweise abgebauten α -Tocopherols. Mit Dipal.-PC und auch mit Soja-PC^{gef.} findet diese Regeneration nicht statt. In diesem Fall verläuft der α -Tocopherol-Abbau ähnlich schnell wie ohne PL-Zugabe (nicht dargestellt). Beim Sojalecithin beobachtet man ebenfalls schon nach kurzer Erhitzung eine Regeneration aller Tocopherole bis fast zur Ursprungskonzentration von 1000 µg/2g. Die Konzentrationen von β - und γ -Tocopherol fallen nach Zugabe zu Ethyllinolat/SL1 (in Chloroform/ Methanol 3+1) etwa auf die Hälfte; β - und γ - bauen sich nur etwa um 10-20% ab. Nach der Regeneration zeigen alle Tocopherole mit zunehmender Erhitzungszeit einen nahezu linearen Abbau. Dieser ist für α -Tocopherol mit ca. $8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ etwa doppelt so schnell wie für β , γ und δ (ca. 4; 3; 3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Insgesamt liefert der Versuch folgende Ergebnisse: Die Regenerationsreaktion geht von der Aminogruppe aus; sie ist schnell und vollständig, bedarf aber einer hohen Temperatur. In Verbindung zu den Ergebnissen der vorstehenden Versuche ist es unwahrscheinlich, dass das α -TQ allein das Target ist. Der Kurenverlauf sieht ganz so aus, als ob T mit PE ein T-PE bildet, das thermisch in TH und PE zerfällt.

e.) Reaktion von o-PE mit oxidiertem α -Tocopherol

Die Klärung des Reaktionsmechanismus der α -Tocopherol-Recyclierung ist nur über den Nachweis der beteiligten Zwischenprodukte und der letztlich entstehenden Produkte möglich. Wird PE oxidiert und wenn ja zu was? Eine schwierige Frage, ist doch die Oxidation primärer Amine wegen der entstehenden Mischung verschiedener Produkte in der organisch-chemischen-Synthese nicht brauchbar [229]. Oder wirkt PE vorrangig als Katalysator, ähnlich wie die Aminosäuren in der Kohlenhydrat-Bräunung? Da aus den Vorversuchen Zweifel daran bestehen, dass α -Tocopherylchinon allein für den beobachteten Regenerationseffekt verantwortlich ist, wird die Isolierung von Produkten mit Synthesegemischen von oxidiertem α -Tocopherol durchgeführt. Um die Trennung von PE- und Tocopherol-Derivaten zu erleichtern, wurde zunächst mit dem polaren ortho-Phosphoethanolamin (ortho-PE) gearbeitet.

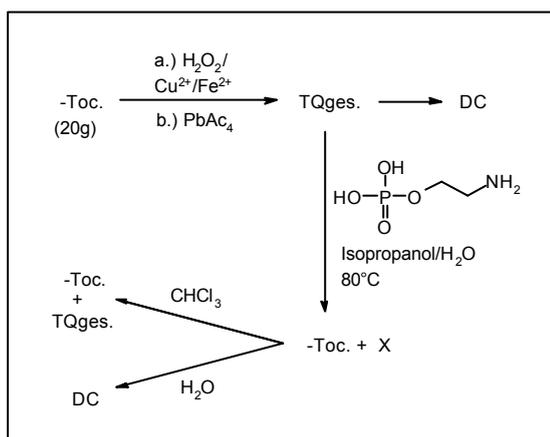


Abbildung 4.51 Herstellung und Isolierung von Produkten aus der Reaktion von oxidiertem α -Tocopherol (TQges.) mit o-PE

Das α -Tocopherol (20g) wurde zum einen direkt mit Wasserstoffperoxid oxidiert, wobei aber erst nach Zugabe von katalytischen Mengen an $\text{FeCl}_3(\text{H}_2\text{O})_6$ und CuSO_4 ein exothermer Abbau beobachtet wurde (HPLC). Zum anderen wurde eine Oxidation mit Blei(IV)-acetat in Essigsäure, analog wie bei Isodorides [105] beschrieben, versucht. Wie eine Übersichts-DC [analog 254] des Produkts der H_2O_2 -Oxidation ergab, handelt es sich um eine Mischung von 3 Hauptprodukten und über 10 Nebenprodukten. Um Schwermetallreste abzutrennen wurde die erhaltene Mischung (TQges.) mit Chloroform über einen Kieselgelsäule eluiert. Da o-PE (1g) in den gängigen organischen Lösungsmitteln nicht löslich ist, wurde in Isopropanol/ H_2O (200+50) auf 80°C erhitzt. Die Entstehung von α -Tocopherol wurde mit HPLC (7.2.1.) über Wochen bis zur Ausbildung der maximalen Konzentration verfolgt.

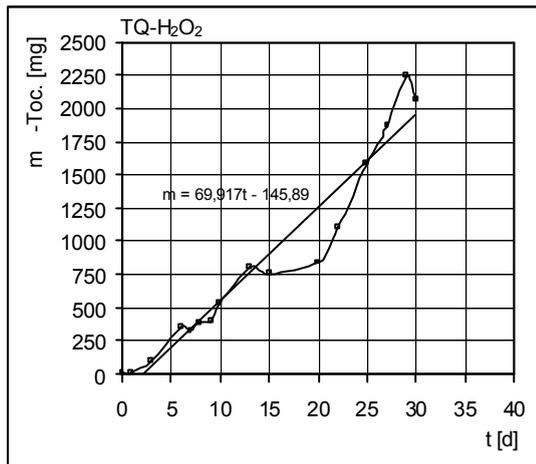


Abbildung 4.52 Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (Synthesegemisch von H_2O_2) bei Reaktion mit o-PE, in Isopropanol/ H_2O bei $80^\circ C$

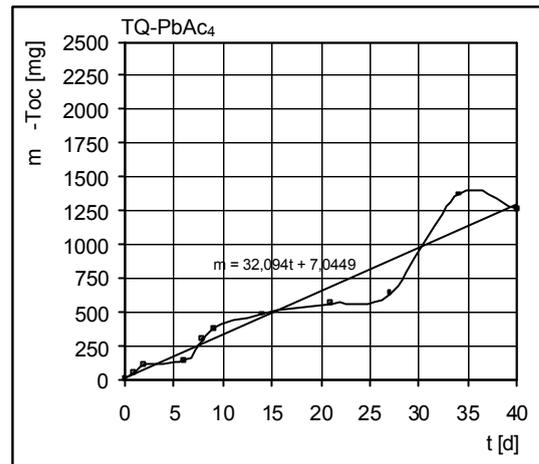


Abbildung 4.53 Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (Synthesegemisch von $PbAc_4$) bei Reaktion mit o-PE, in Isopropanol/ H_2O bei $80^\circ C$

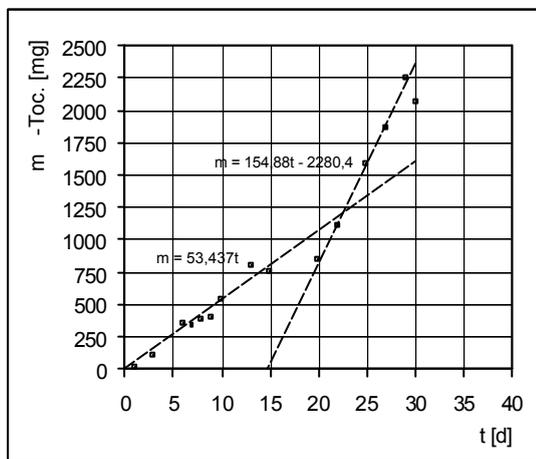


Abbildung 4.52a Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (Synthesegemisch von H_2O_2) bei Reaktion mit o-PE, in Isopropanol/ H_2O bei $80^\circ C$

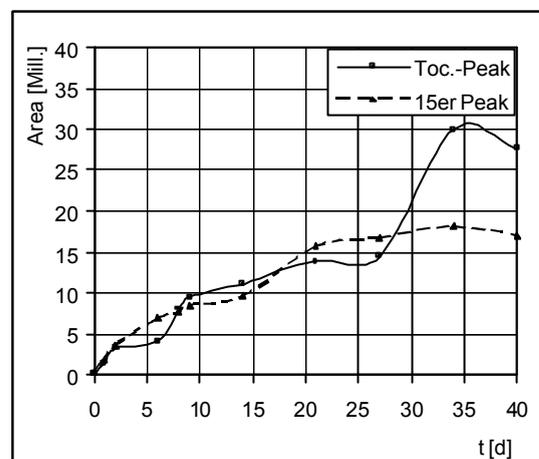


Abbildung 4.53a Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (Synthesegemisch von $PbAc_4$) bei Reaktion mit o-PE, in Isopropanol/ H_2O bei $80^\circ C$, zusätzlicher Peak bei 15 min

Während einer Dauer von ca. 4 Wochen entstand im Falle des TQ- H_2O_2 etwa 70 mg d^{-1} α -Tocopherol. Beim TQ- $PbAc_4$ waren es nur etwa 30 mg d^{-1} . Auch wird die parallele Bildung eines Peaks, der kurz nach α -Tocopherol bei 15 min eluiert, beobachtet. In Versuch b.) wurde dieser bereits gefunden und als α -Tocopheron oder α -Tocopherol-Hydrochinon interpretiert. Die eingesetzten α -TQ-Synthesegemische bilden insgesamt ca. 7-11% α -Tocopherol. Nach Durchschreitung des Konzentrationsmaximums wurde die Erhitzung abgebrochen, das Lösungsmittel abrotiert und mit Hilfe von Chloroform/ Wasser in eine polare und eine unpolare Phase aufgetrennt. Da in der Chloroformphase praktisch kein Phosphat nachweisbar war (0,002%, 7.3.8.) und damit keine interessanten Verbindungen zu vermuten sind, wurde nur die wässrige

Phase mittels DC weiter untersucht. Als Vergleich wurde auf den Platten -TQ, -Toc. und o-PE aufgetragen.

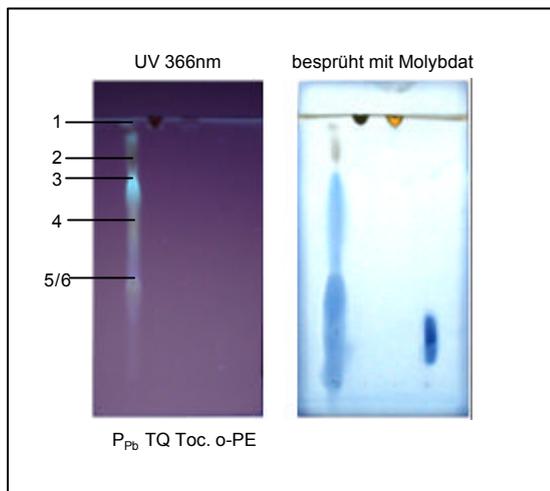


Abbildung 4.54 DC-Trennung der wässrigen Phase des PbAc₄-o-PE-Ansatzes; Kieselgel zweimal entwickelt mit: CH₂Cl₂: AcOH : MeOH : H₂O 14:6:4:3 v+v

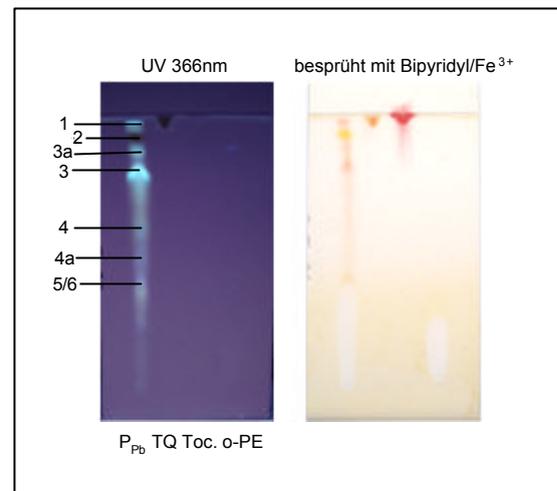


Abbildung 4.54a DC-Trennung der wässrigen Phase des PbAc₄-o-PE-Ansatzes, Kieselgel zweimal entwickelt mit: CH₂Cl₂: AcOH : MeOH : H₂O 14:6:4:3 v+v

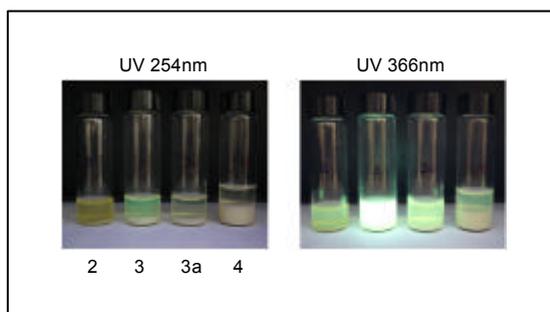


Abbildung 4.55 Fluoreszenz der gesammelten Fraktionen aus der wässrigen Phase des PbAc₄-o-PE-Ansatzes (DC abgekratzt)

Im Vergleich mit den Standards lassen sich in der Probe mehrere bei 366nm fluoreszierende Stoffe erkennen. Spot 3 tritt dabei besonders auffällig hervor; zudem enthält er Phosphor, wie ein besprühen mit Molybdat, aber auch eine externe Phosphat-Bestimmung des abgekratzen Spots zeigten (7.3.8). In Abb. 4.54a wird deutlich, dass sich aus dem Spot Nr. 3 noch eine weitere Verbindung (3a) abtrennen lässt. Spots 5/6 enthalten ebenfalls Phosphor. Punkt 2 ist mit bloßem Auge als gelber Spot zu erkennen; er fluoresziert nicht und reagiert auch nicht mit Bipyridyl/Fe³⁺. Das -Tocopherol generiert mit diesem Reagenz Fe²⁺, welches mit Bipyridyl zu einem roten Komplex reagiert. Auch Spot 1 und 3 zeigen eine leichte Färbung. Die Zonen der DC-Platte, die das o-PE enthalten bleiben hierbei farblos, was an einem Benetzungseffekt oder aber auch an den Komplexbildungseigenschaften der Verbindungen liegen kann. Die Spots 1 und 4 zeigen ebenfalls noch jeweils einen schwächeren Sateliten (1a, 4a).

Auf 20x20cm-Platten wurde die wäßrige Phase des α -Toc.-PbAc₄-o-PE-Ansatzes nun vollständig aufgetragen, die Zonen 1-6 abgekratzt, in Wasser aufgelöst und damit die einzelnen Verbindungen für eine spätere NMR-Untersuchung isoliert. Die Fluoreszenz bei 366nm von Fraktion 3 (Spot 3) ist im Abb. 4.55 deutlich zu erkennen. Die Stoffe wurden zur Trockene eingeeengt und unter Stickstoff im Tiefkühler gelagert. Zum Zeitpunkt der NMR-Messung zeigte Fraktion 3 aber keine Fluoreszenz mehr.

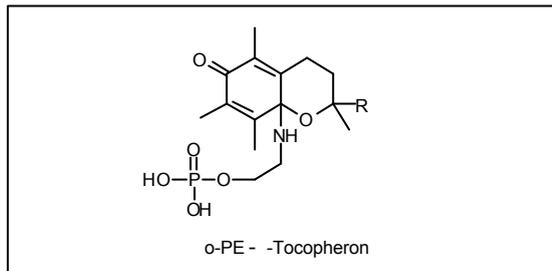


Abbildung 4.56 hypothetisches o-PE- Tocopheron

Aufgrund der ähnlichen Fluoreszenz wie die 2,4-Decadienal-PE-Schiffbase (S. 54) und aufgrund der Polarität sowie der nukleophilen Eigenschaften des o-PE wird eine o-PE-Tocopheron Struktur vermutet. Diese „Halbacetal“ ist allerdings wegen der enthaltenen sauren Phosphatgruppe nicht sehr stabil.

f.) Essigsäure-Katalyse der Reaktion von Sojalecithin 1 mit oxidiertem α -Tocopherol
Die Regeneration von α -Tocopherol aus einem PbAc₄-Synthesegemisch (20g α -Toc.) bei Reaktion mit 20g Sojalecithin 1 wurde in Isooctan bei 80°C untersucht. Das eingesetzte Sojalecithin wurde zuvor mit Aceton aus etherischer Lösung gefällt (7.3.7). In einem weiteren Ansatz wurde zudem versucht die Reaktion durch Essigsäure (10% in Isooctan) zu beschleunigen.

Die Produktkonzentration und damit die Reaktionsgeschwindigkeit (v_R) steigt in der Regel exponentiell mit der Temperatur. Mathematisch zeigen viele Reaktionen Arrhenius-Verhalten, d.h. folgende Proportionalität:

$$v_R \propto e^{-\frac{T_a}{T}}$$

Dabei ist T_a die Aktivierungstemperatur; sie liegt für viele organische Reaktionen im Bereich von 5000K (Abb. 4.57). Dieser Wert ist zwar groß im Vergleich zur Raumtemperatur, die unter 300K liegt, aber er entspricht der üblichen Langsamkeit vieler Reaktionen unter Normalbedingungen (weil $e^{-5000/300} \sim 5 \times 10^{-8}$). Erhöht man die Temperatur auf etwa 500K, wie es beim Backen im Herd der Fall ist, vertausendfacht sich v_R ($e^{-5000/500} \sim 5 \times 10^{-5}$). Sobald die Reaktion mit merklicher Geschwindigkeit abläuft, gilt dann auch in guter Näherung die Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel (RGT-Regel) von Van't Hoff: Eine Temperaturerhöhung um 10°C bewirkt eine Verdopplung bis Vervielfachung der Reaktionsgeschwindigkeit. Um die α -Tocopherol-Regeneration zu beschleunigen ohne eine unnötige thermische Belastung des Untersuchungsmaterials, liegt es daher nahe, durch Einsatz eines Katalysators die Aktivierungstemperatur abzusenken. Je kleiner die Aktivierungstemperatur ist, desto weniger wird die Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur beeinflusst:

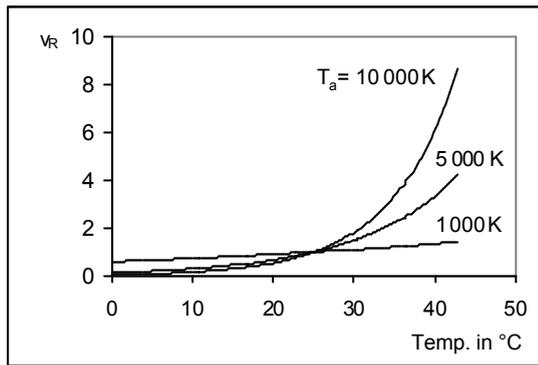


Abbildung 4.57 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Aktivierungstemperatur nach der Arrhenius-Gleichung

Die Isolierung von Produkten gestaltet sich hier deutlich schwieriger. Dazu wurde die erhaltene nahezu schwarze Lösung eingengt und über eine Kieselgelsäule in Neutrallipide, Glycolipide und Phospholipide fraktioniert (7.2.10.). Die Phospholipid-Fraktion wurde dann gegen entsprechend mitgeführte Blindwerte über DC untersucht.

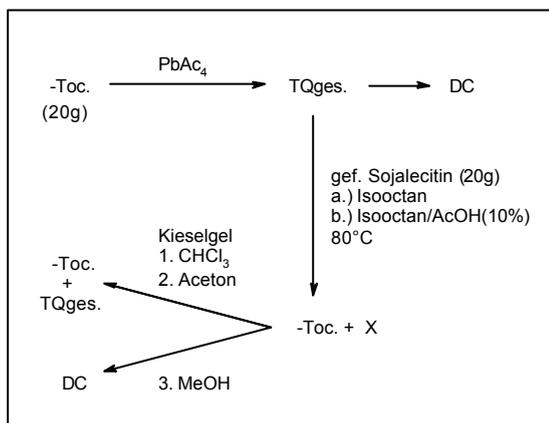


Abbildung 4.58 Herstellung und Isolierung von Produkten aus der Reaktion von -Tocopherylchinon (TQ) mit gefällttem Sojalecithin (SL)

Trotz der im Sojalecithin enthaltenen ungesättigten Fettsäuren, welche bei 80°C schneller oxidiert werden und dadurch etwaig recycliertes -Tocopherol wieder zerstören sollten, sind in beiden Ansätzen große Mengen -Tocopherol entstanden (Abb. 4.59 und 4.59a). Essigsäure wirkt sich als Katalysator beschleunigend auf die Reaktion aus. Vermutlich ist hier eine Erhitzung auch nicht zwingend notwendig. Das Tocopherylchinon-Synthesegemisch setzt sich zu ca. 35% in -Tocopherol um. Da dies für beide Ansätze gleichermaßen gilt, ergibt sich, dass Essigsäure tatsächlich nur katalytisch wirkt. Interessant ist die große Menge an entstandenem -Tocopherol im Vergleich zu den bisherigen Untersuchungen mit Dipal.-PE oder o-PE (S.108, S.112 und S.114f).

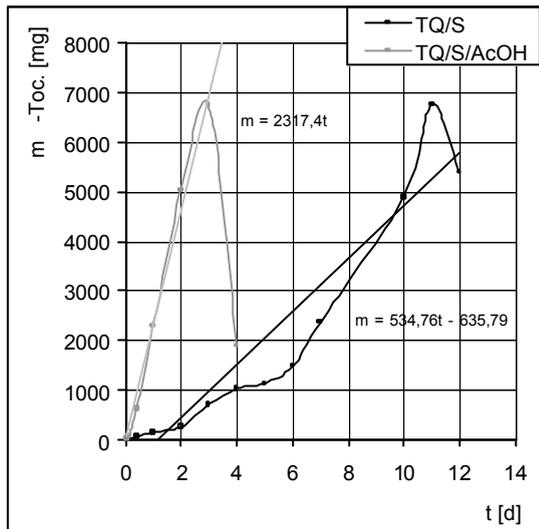


Abbildung 4.59 Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (Synthesegemisch) bei Reaktion mit gefälltem Sojalecithin, in Isooctan bei 80°C, mit und ohne 10% Essigsäure

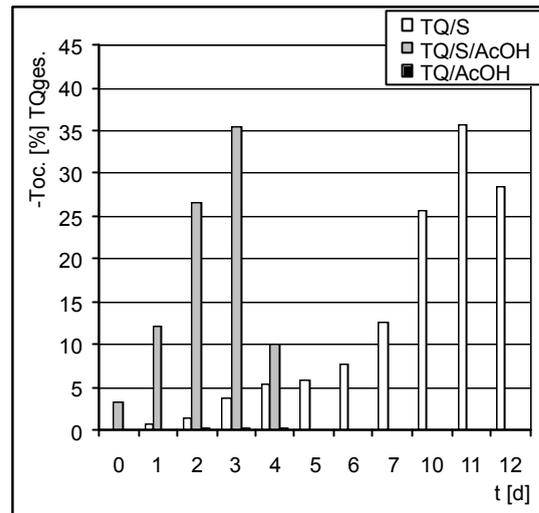


Abbildung 4.59a Bildung von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon (Synthesegemisch) bei Reaktion mit gefälltem Sojalecithin, in Isooctan bei 80°C, mit und ohne 10% Essigsäure

Es wurden auch Blindwerte mit TQges. bzw. gefälltem Sojalecithin 1 (hier: S) mitgeführt. Im Falle des TQ_{AcOH} -Blindwerts ergab sich ebenfalls ein leichte α -Tocopherol-Bildung; Abb. 4.59a zeigt jedoch, dass sie gegenüber dem Haupteffekt vernachlässigt werden kann. Alle Ansätze die Sojalecithin enthalten, färbten sich während der Erhitzung schwarz. Die Erhitzung des Essigsäure-Ansatzes wurde nach 4, die des essigsäurefreien Ansatzes nach 12 Tagen eingestellt. Die Proben wurden einrotiert, in Chloroform gelöst und im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Gleiches gilt für die Blindwerte. Um das α -Tocopherol und das nicht umgesetzte TQ abzutrennen, wurde ein Aliquot jedes Ansatzes nun über eine Kieselgel-Säule aufgereinigt. Dazu wurde zunächst die Neutrallipid- und Glycolipidfraktion mit Chloroform und Aceton eluiert. Das anschließende Methanol-Eluat enthält die Phospholipid-Fraktion und ggf. auch strukturell interessante Produkte. Die DC-Läufe sind mit S für SL1-Blindwerte, T für α -TQ-Blindwerte und mit P für Probe (S+T), bezeichnet. Besonders interessant ist die Phospholipid-Fraktion des Essigsäure-Probenansatzes (P_{AcOH}), deren DC in den beiden oberen Abbildungen der nächsten Seite dargestellt sind. Da die erste Fraktionierung (P^1_{AcOH}) aus ungeklärten Gründen noch α -Tocopherol enthielt, wurde die Auftrennung wiederholt (P^2_{AcOH}). P^2_{AcOH} enthält nun praktisch kein α -Tocopherol mehr, dafür sind aber 4 weitere Peaks im HPLC-Chromatogramm der Tocopherol-Bestimmung messbar; darunter möglicherweise auch die auf der DC sichtbaren Verbindungen 1, 2 und 3:

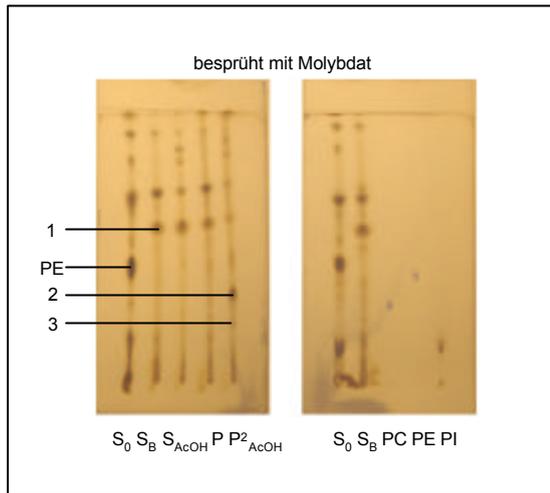


Abbildung 4.60 DC-Trennung der Phosphatid-Fractionen (MeOH-Eluate) und Vergleich mit Standards, Kieselgel zweimal entwickelt mit: $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{NH}_3$ 8,1:3,1:0,5 v+v

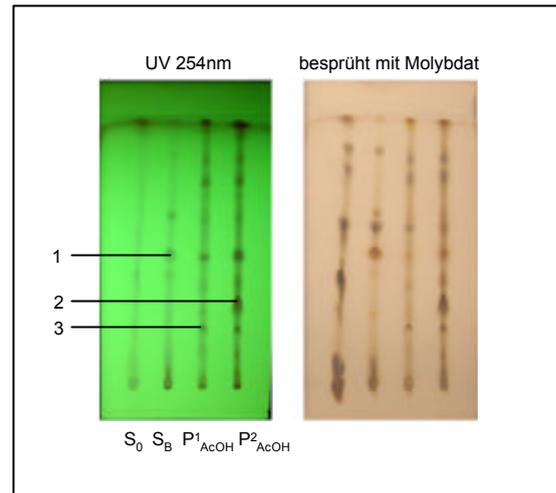


Abbildung 4.60a DC-Trennung der Phosphatid-Fractionen (MeOH-Eluate, P_{AcOH} zweimal aufgearbeitet), Kieselgel zweimal entwickelt mit: $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{NH}_3$ 8,1:3,1:0,5 v+v

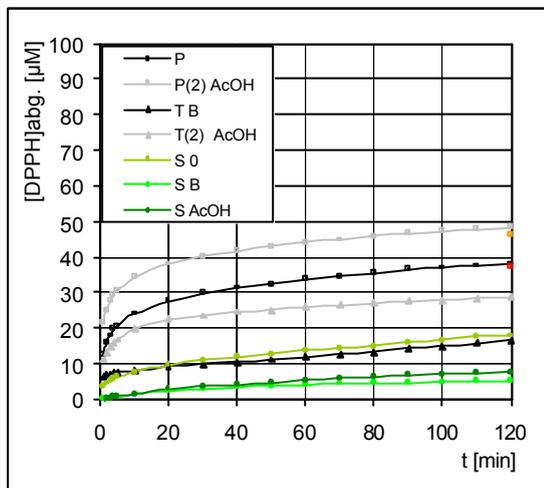


Abbildung 4.61 DPPH-Abbau durch die Phosphatid-Fractionen (CHCl_3 -Eluat) je $375\mu\text{g/ml}$; die Probenansätze enthalten auch etwas -Toc., welches für die Stelle 120min herausgerechnet wurde (die jeweils nahen roten Punkte)

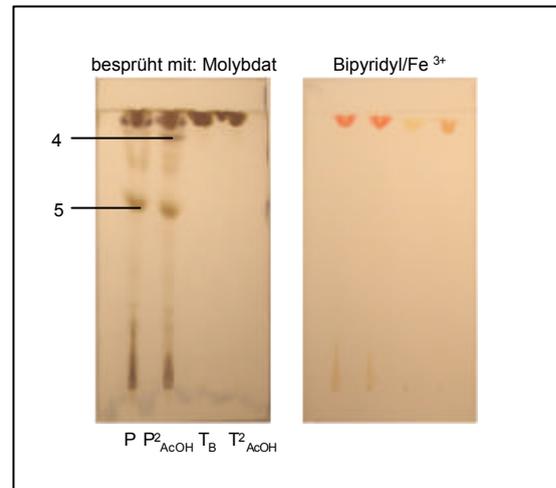


Abbildung 4.60b DC-Trennung der Neutrallipid-Fractionen (CHCl_3 -Eluate), Kieselgel zweimal entwickelt mit: $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{NH}_3$ 8,1:3,1:0,5 v+v

Spot 1 ist eine Erhitzungsverbindung aus Sojalecithin. S_0 ist ein SL1-Vergleich nach Fällung. S_B und S_{AcOH} sind die SL1-Blindwerte nach alleiniger Erhitzung in Isooctan bzw. Isooctan/AcOH. Auf der rechten DC-Platte Abb. 4.60 sind zusätzlich die Dipal.-Standard-Phospholipide aufgetragen. Das PE ist in den erhitzten Proben praktisch vollständig abgebaut. An seiner Stelle tritt deutlich Spot 2 auf, der in den Blindwerten nicht vorkommt. Auch ist die DPPH-Aktivität (7.3.4.) der Phospholipidfraktionen der Probenansätze größer als die der Blindwerte, so dass reduzierende Verbindungen (Spot 2?) entstanden sein müssen. Auch in den Neutrallipid-Fractionen (Abb. 4.60b) treten Verbindungen (4 und 5) auf, die in den -TQ-Blindwerten (T) nicht enthalten sind. Durch den Einsatz der Standardverbindung von -Tocopherylchinon (TQpur) anstelle eines Synthesegemisches wurde in einem sehr viel kleineren Ansatz, die optimale

Essigsäuremenge für die Umsetzung mit SL1 zu α -Tocopherol bei RT in Isooctan bestimmt. Sie beträgt 30 Vol.%, bedarf aber 9 Tage Reaktionszeit. Anhand der Übersichts-DC (nach 11d) ist zu sehen, dass auch die Standardsubstanz wenigstens 3 weitere Stoffe enthält. Durch die Umsetzung verschwindet Spot 2 und Spot 1 entsteht.

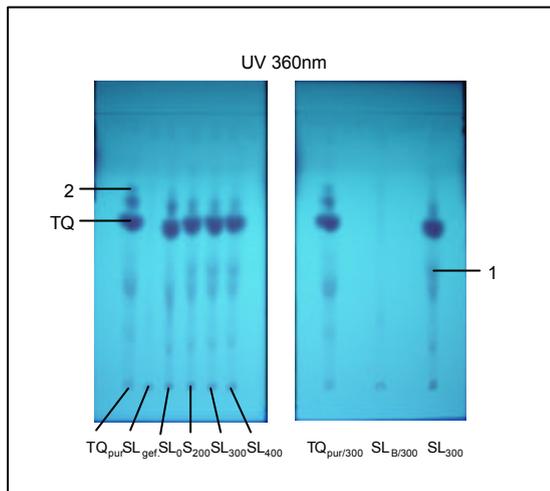


Abbildung 4.62 Umsetzung von Tocopherylchinon mit gefälltem Sojalecithin (gef. Asolectin) unter Zusatz von Essigsäure (0, 200, 300 und 400 μ l/ml Isooctan, 11d RT) Kieselgel zweimal entwickelt mit CHCl_3 : MeOH : Aceton : Wasser, 10:4:4:2:1 v+v

Da die α -Tocopherol-Bildung aus α -TQ bei Raumtemperatur trotz Essigsäure als Katalysator nur langsam abläuft, wurden die Verhältnisse bei Verwendung des PbAc₄-Synthesegemisches nocheinmal bei 80°C und 25°C verglichen. Tatsächlich wird bei 25°C trotz Essigsäure kein α -Tocopherol gebildet. Das bedeutet, dass neben einem Katalysator eine zusätzliche Erhitzung notwendig ist. Es läuft demnach eine weitere

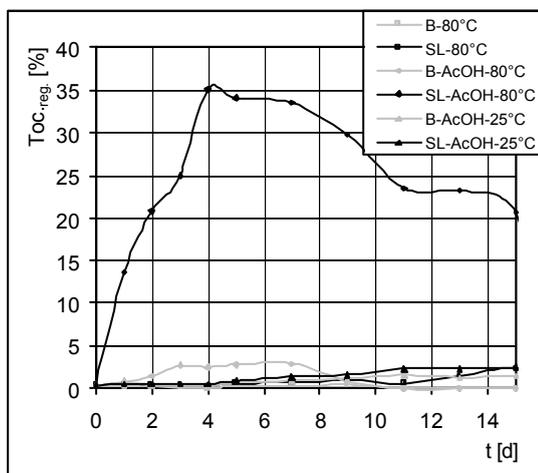


Abbildung 4.63 Regeneration von oxidiertem α -Tocopherol durch Sojalecithin (SL1) in Isooctan bei 25°C und 80°C mit und ohne 10% Essigsäure

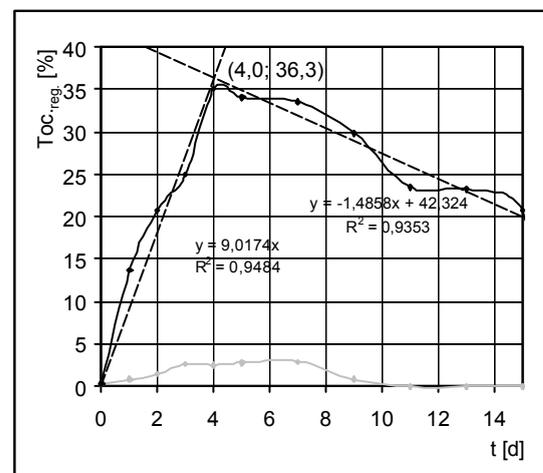


Abbildung 4.63a Regeneration von oxidiertem α -Tocopherol durch Sojalecithin (SL1) in Isooctan bei 25°C und 80°C mit und ohne 10% Essigsäure

wichtige Reaktion ab, die durch Säure nicht katalysiert wird. Es liegt der Verdacht nahe, dass diese mit der Bräunung zu tun hat.

g.) MS-Untersuchung: PE- -TQ

Das bei der Regeneration von -Tocopherylchinon mit Dipal.-PE analog zum α -PE erwartete fluoreszierende Zwischenprodukt PE- -Tocopheron sollte hergestellt und mit NMR charakterisiert werden. Die Isolierung einer ausreichenden Menge gelang jedoch nicht.

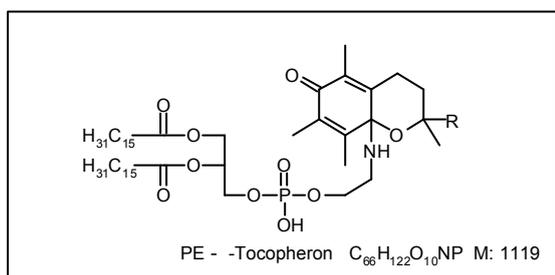


Abbildung 4.64 hypothetisches PE- -Tocopheron

Zunächst wurden 2g -Tocopherol mit 5g PbAc₄ in Eisessig oxidiert [105]. Das säulenchromatographisch von Schwermetallspuren befreite Produkt wurde mit 0,03g Dipal.-PE in Isooctan/ Eisessig (90ml+10ml) für 36h im Trockenschrank bei 80°C zu -Tocopherol regeneriert. Nach Einengen zur Trockene wurden mit Chloroform über eine Kieselgelsäule (Durchmesser 2cm, Füllhöhe ca. 10cm) das -Tocopherol, nicht umgesetzte -TQ sowie weitere unpolare Produkte abgetrennt. Die an den oberen 2cm Kieselgel adsorbierten gelblichen PE-Produkte wurden mit einem Spatel abgenommen und mit Methanol desorbiert. Die weitere Aufreinigung kann nun mit DC erfolgen. Um die gesamte Produktmenge aufzutrennen wurde aber wie folgt vorgegangen: Eine 1cm x 10cm-Säule wurde mit aktiviertem Kieselgel ca. 8cm hoch befüllt. Die desorbierte Probe wurde –gelöst in wenig Chloroform– auf die Säule aufgebracht, mit 1cm Kieselgel überschichtet und die Säule mit Glaswatte verschlossen. Die Säule wurde herumgedreht und in einer DC-Kammer mit Chloroform/ Methanol/ konz. NH₃ (49ml+18,5ml+3ml) entwickelt. Mit Druckluft wurde das noch feuchte Säulenmaterial aus der Säule gedrückt und die unter UV bei 366nm sichtbare gelb-grünlich fluoreszierende Bande mit einem Messer und einem Spatel selektiert und mit Methanol desorbiert. Es konnten knapp 1,5mg Produkt isoliert werden, von dem aber

kein aussagekräftiges NMR-Spektrum erhalten werden konnte. Es wurden MS-Scans mit positivem bzw. negativem Potential im erwarteten Massenbereich aufgenommen (7.4.2.). Mit negativem Potential konnte m/z 1119 gemessen werden, was der Molmasse der erwarteten PE^- -TQ-Struktur entspricht. Es existiert auch eine Verbindung, die ein Wassermolekül weniger besitzt (m/z 1101).

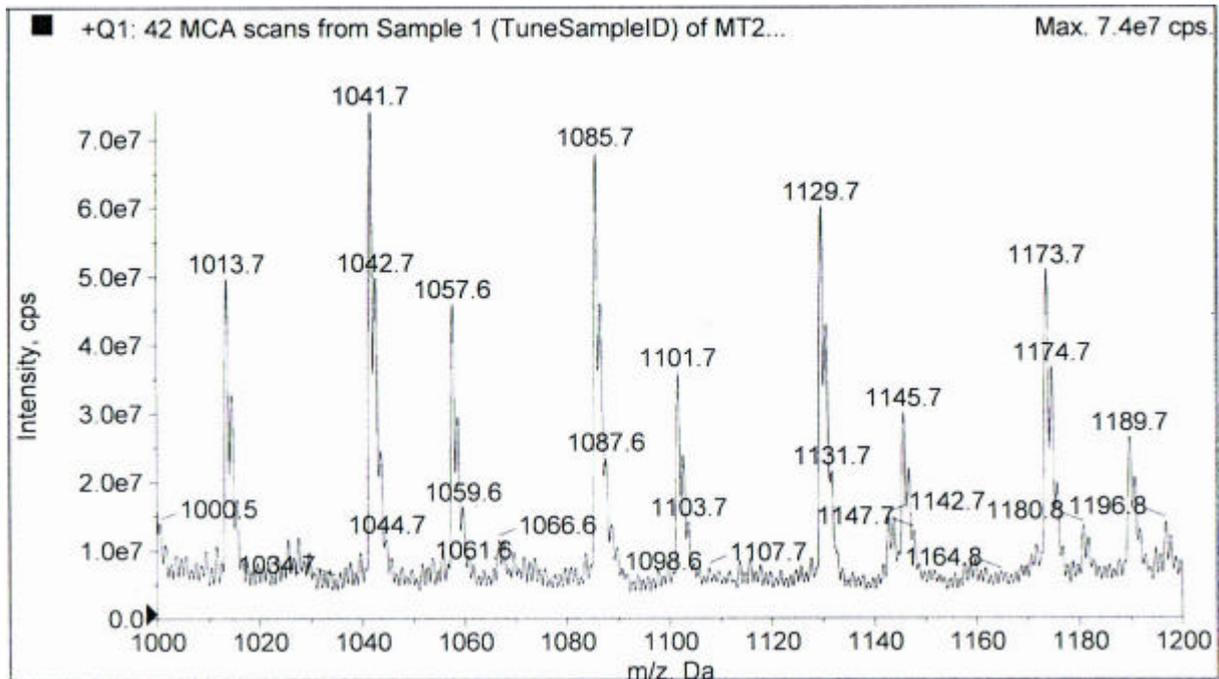


Abb. 4.65 MS-Scan, pos. Potential (DP: 50, EP: 10; GS1: 12, GS2: 0)

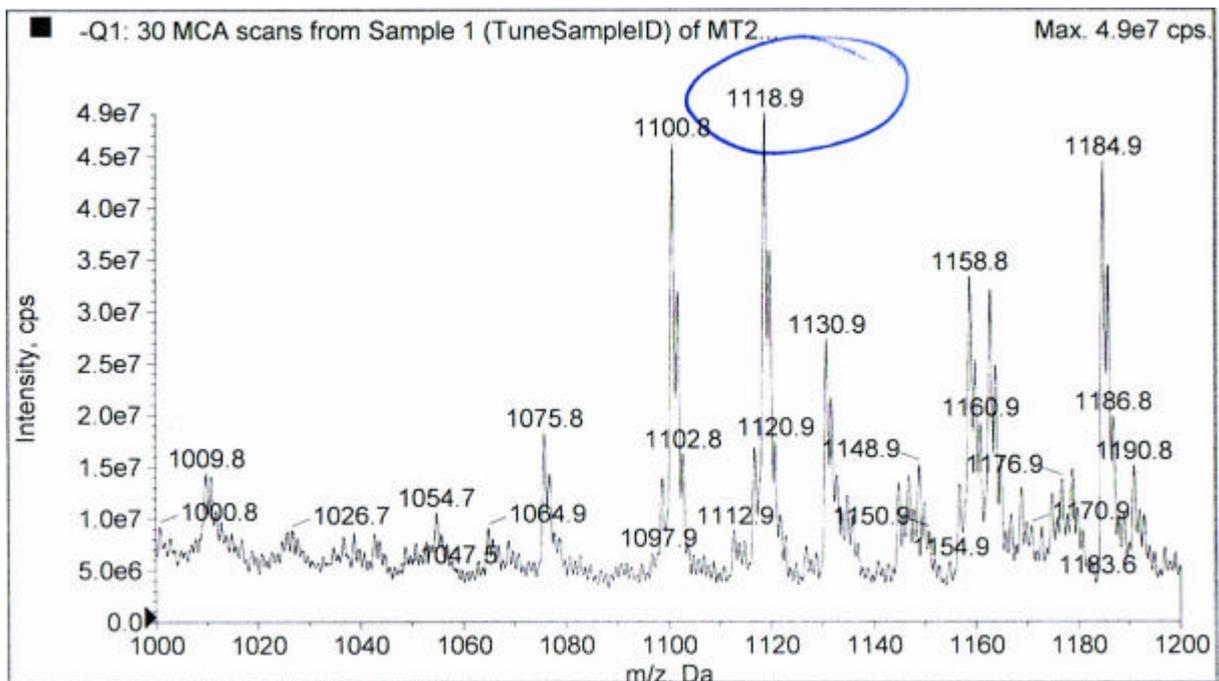


Abb. 4.66 MS-Scan, neg. Potential (DP: -50, EP: -10; GS1: 25, GS2: 25; 450°C)

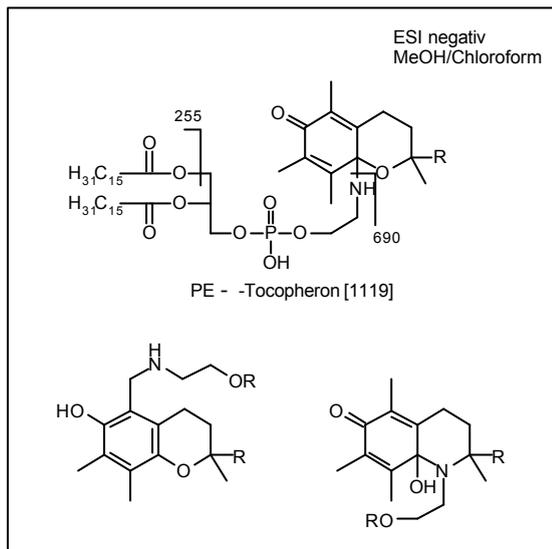


Abb. 4.67 Fragmente von PE- TQ

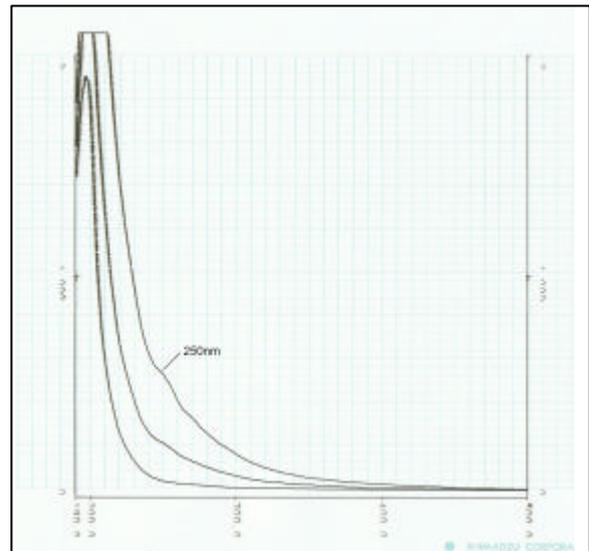


Abb. 4.68 UV-vis-Spektrum der fluoreszierenden Fraktion, in Methanol/ Chloroform, steigende Konzentrationen

neg. Fragmentierung 1119 Da	
Tochter-Ion	Intensität
255,2	251824
690,5	208552
452,2	90605
140,0	56470
153,2	50448

Tab. 4.11 Fragmentierung m/z 1119

Das Fragmentierungsmuster der Massenspur 1119 zeigt, dass es sich um ein PE-Derivat handelt (Dipal-PE: 691). In der Grafik 4.67 sind 2 weitere Strukturvorschläge für PE/TQ-Kondensate ($M_{PE} + M_{TQ} - M_{Wasser} = 1119$) angegeben. Die rechte Verbindung könnte auch direkt Wasser abspalten und dadurch ein Chinonmethid bzw. ein Ammoniumsalz bilden. Das UV-Spektrum der isolierten Bande zeigt eine Absorption bei 250nm. Dies spricht für eine Tocopheron-Struktur [130].

h.) Effekte bei BHA und BHT mit SL1

In Versuch f.) wurde -Tocopherol durch BHA bzw. BHT ersetzt. Die Bestimmung der Verbindungen erfolgte mit HPLC-UV (7.2.4.). Zunächst einmal wurden beide Stoffe durch $PbAc_4$ nur teilweise abbaut. Auch ist mit SL1/AcOH bei 80°C keine Regeneration messbar. Nach [37] zeigt BHA aber einen starken synergistischen Effekt mit PE. Was hier lediglich gemessen werden konnte, war eine stärkere Bräunung von SL1, die mit BHT nicht zu beobachten ist (nicht dargestellt).

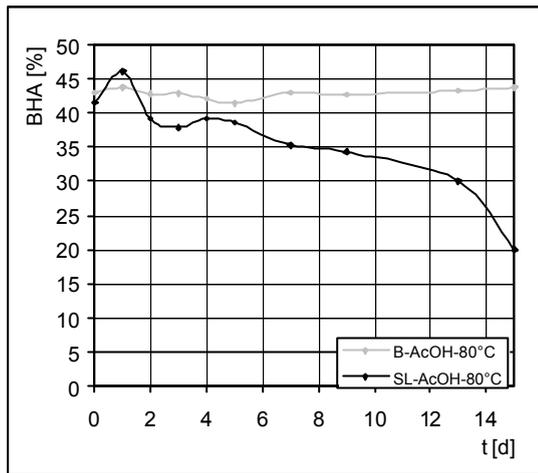


Abbildung 4.69 Verhalten von oxidiertem BHA unter den Bedingungen der Tocopherol-Regeneration (SL1 in Isooctan/10% Essigsäure, 80°C)

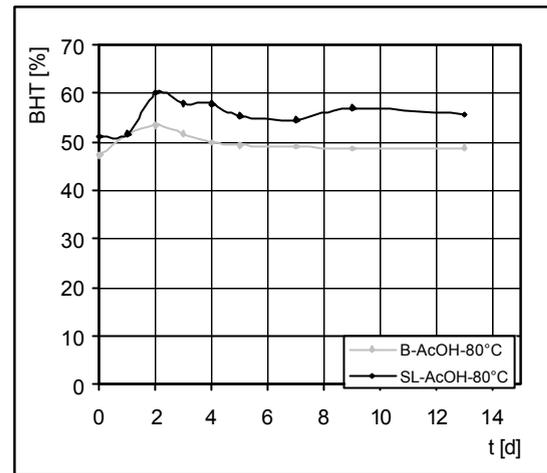


Abbildung 4.70 Verhalten von oxidiertem BHT unter den Bedingungen der Tocopherol-Regeneration (SL1 in Isooctan/10% Essigsäure, 80°C)

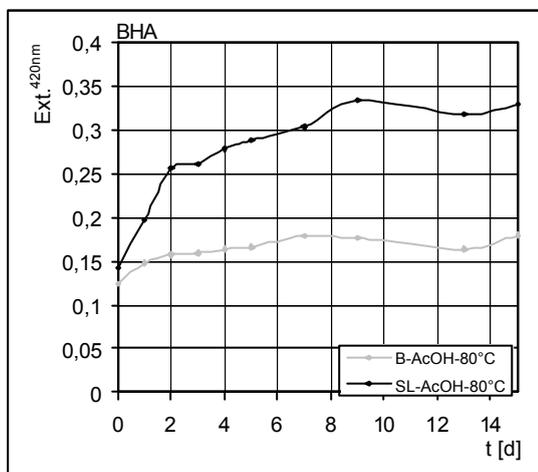


Abbildung 4.69a Verhalten von oxidiertem BHA unter den Bedingungen der Tocopherol-Regeneration (SL1 in Isooctan/10% Essigsäure, 80°C) – Bräunung

4.3.3. Ethyllinolat–Modelluntersuchungen an Drei–Komponenten–Systemen

a.) EL α -Toc./PL/Glucose und EL α -Toc./PL/Ascorbat bei 110°C

In den bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Sojalecithin in Pflanzenölen den Abbau der Tocopherole verlangsamt. Der Effekt tritt auch bei der thermisch beschleunigten Oxidation auf und konnte hier mit der Regeneration von α -Tocopherylchinon durch PE oder Sojalecithin in Verbindung gebracht werden. Die Reaktion wird zwar durch Säuren beschleunigt, bedarf aber dennoch einer hohen Temperatur. In Ethyllinolat bei 110°C erreicht der Stabilisierungseffekt (IP) bei 1%iger Sojalecithinzugabe einen gewissen Sättigungspunkt. Im Ethyllinolat konnte bei Erhitzung auf 110°C eine rasche Regeneration des abgebauten α -Tocopherols durch PE bzw. Sojalecithin beobachtet werden. Allerdings kommt es hier bei erhöhter Temperatur aber infolge eines zügigen Tocopherol-Abbaus zu einem schnellen Verderb. Da Phospholipide bzw. Pflanzenlecithine allein keine ausreichende Stabilisierung erreichen, stellt sich die Frage, wie ihr Effekt weiter verstärkt werden kann? Es bietet sich der Zusatz einer 3. Komponente mit potentiellen antioxidativen Eigenschaften an. Diese Komponente sollte natürlichen Ursprungs sein und optimalerweise in den Pflanzenlecithinen selbst vorkommen, bzw. aus ihnen generiert werden können. Unter 4.3.1.c. konnte bereits gezeigt werden, dass D-Glucose den PE- α -Tocopherol-Effekt verstärkt. Nach der Literatur ist der Einsatz von Ascorbinsäure [183, 212] sinnvoll. Diese ermöglicht in Verbindung mit Phospholipiden auch die Stabilisierung von Fischölen (vgl. S. 98). Die Modelluntersuchungen wurden an Ethyllinolat bei 110°C durchgeführt. Es wurden jeweils 3 Komponenten zugesetzt und zwar: Phospholipide in einer Menge 1%, der 2. Synergist (z.B. D-Glucose oder L-Ascorbinsäure) mit 0,5% und das primäre Antioxidants (z.B. α -Toc. bzw. α -TQ) mit 0,05%. Die IP wurde über die UV-Absorption bei 233nm bestimmt (7.3.5.).

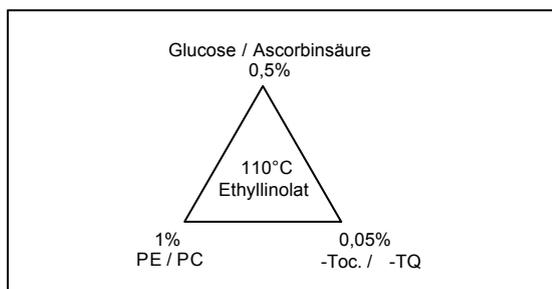


Abbildung 4.71 Versuch mit Ethyllinolat bei 110°C, unter Zusatz von 1% PE bzw. PC, 0,5% Glucose bzw. Ascorbinsäure sowie 0,05% α -Tocopherol bzw. α -Tocopherylchinon

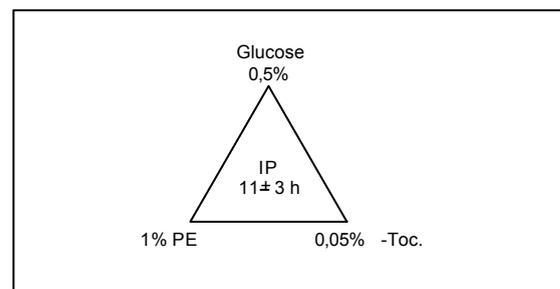


Abbildung 4.71a Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C bei Zusatz von 1% PE und 0,5% Glucose und 0,05% α -Tocopherol

Als Phospholipide wurden zunächst Dipal.-PE und Dipal.-PC miteinander verglichen. PS wurde nicht eingesetzt, da es in den untersuchten Pflanzenlecithinen praktisch nicht vorkommt. Dipal.-PA und Dipal.-PI wurden ebenfalls nicht eingesetzt, da sie als saure Phosphatide stärkere Schwermetall-Wechselwirkungen zeigen, die hier nicht im Mittelpunkt der Untersuchung stehen. Die drei Komponenten wurden jeweils einzeln, paarweise bzw. alle zusammen zugesetzt. Die Verbindungen wurden dazu in Methanol (Glu. und Asc.) bzw. Chloroform/Methanol (3+1) gelöst und zu einer Lösung von Ethyllinolot (Chl./MeOH) zugegeben. Eine entsprechende Menge von je 5mg Ethyllinolot wurde in 1,5-ml-Vials pipettiert und nach Vertreiben des Lösungsmittels mit N₂ im Trockenschrank auf 110°C erhitzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Vials entnommen, der Rückstand mit 1ml Hexan gelöst und 200µl ad 2ml in 1cm-Quarzküvetten bei 233nm vermessen. Ethyllinolot ^{-Toc.} hat ein IP^{110°C} von 2 0,5 h. Für das System PE/D-Glu./ -Toc. ergibt sich eine Induktionsperiode von 11 3 h.

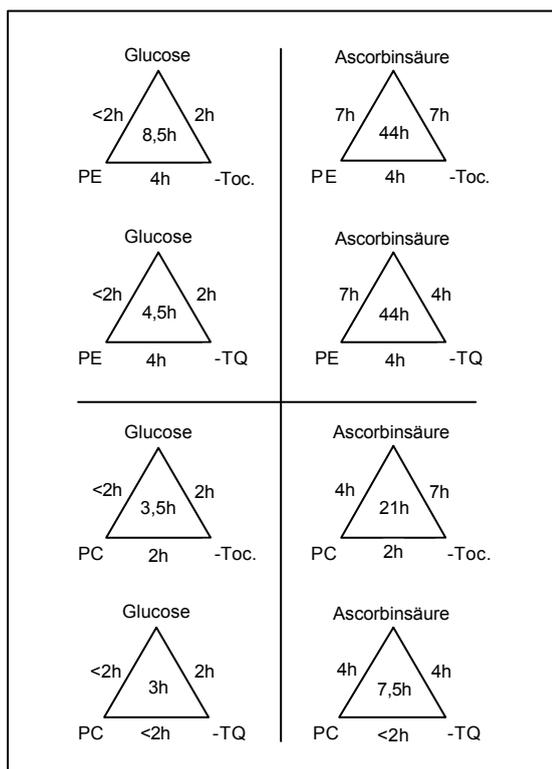


Abbildung 4.72 Induktionsperiode von Ethyllinolot bei 110°C, unter Zusatz von 1% PE bzw. PC, 0,5% Glucose bzw. Ascorbinsäure sowie 0,05% -Tocopherol bzw. -Tocopherylchinon (-TQ)

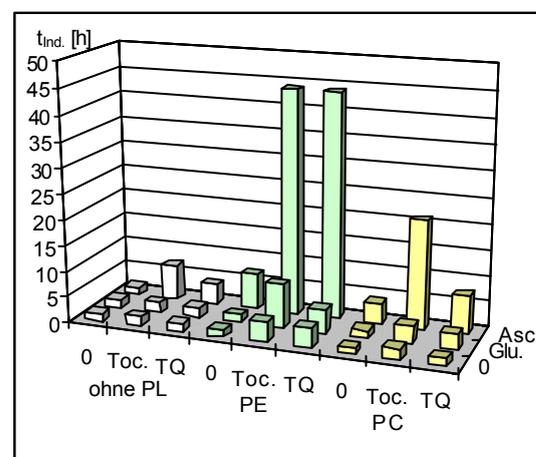
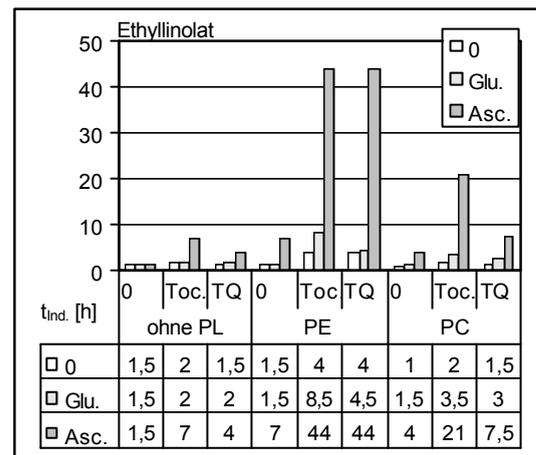


Abbildung 4.72a Induktionsperiode von Ethyllinolot bei 110°C, unter Zusatz von 1% PE bzw. PC, 0,5% Glucose bzw. Ascorbinsäure sowie 0,05% -Tocopherol (Toc.) bzw. -Tocopherylchinon (TQ)

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten wurden die Versuche, die in Abb. 4.72 dargestellt sind gleichzeitig durchgeführt, d.h. mit der gleichen Ethyllinolat-Charge unter gleichen atmosphärischen Bedingungen. Der synergistische Effekt von PE und α -Tocopherol wird durch die zusätzlich anwesende D-Glucose mehr als verdoppelt. Bei Verwendung von α -TQ tritt kein zusätzlicher Effekt auf. Auch mit PC tritt keine deutliche Stabilisierung auf. Interessant sind die Induktionsperioden, die im PE/Ascorbinsäure-System erhalten wurden. Sie sind mit 44h deutlich größer, als die Effekte der Einzelsubstanzen bzw. der Substanzpaare (IP = 7h). Die positive Wechselwirkung zwischen Ascorbinsäure und PE ist aber immernoch größer (IP: 7h) als die zwischen PE und α -Tocopherol (4h). Die Wechselwirkung zwischen Ascorbinsäure und α -Tocopherol (7h) beruht auf die Regeneration von α -Tocopherol aus α -Tocopherylradikalen [37] und kommt zwischen Ascorbinsäure und α -TQ nicht vor (4h). Ist aber zusätzlich PE vorhanden steigt die Induktionsperiode auch auf 44h. Nach meiner Meinung lässt sich diese Beobachtung nur über die Regeneration vom α -Tocopherylchinon zu α -Tocopherol erklären. Da der Effekt mit PC nicht eintritt (7,5h), spielt bei der Recyclierung die Aminogruppe des PE eine entscheidende Rolle. Ein deutlicher Stabilisierungseffekt wird aber auch mit PC/Asc./ α -Toc. erreicht (21h). Die Beobachtung könnte mit den Phasentransfer-Eigenschaften des PC in Verbindung stehen und über die Ausbildung eines Asc.–PC Säure-Base-Komplexes erklärt werden. Ein vergleichbarer Komplex ist für PC und Quercetin beschrieben worden [175]. Eine andere Erklärung wäre die Ausbildung von inversen Mizellen bzw. Vesikeln. Ein reiner Löslichkeitseffekt scheidet aus, da Ascorbylpalmitat auch in Verbindung mit PE nur eine IP von ca. 4,5h hervorruft. Es ist noch eine dritte Erklärung denkbar, die hier aber nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden soll: Ascorbinsäure wird leicht durch Sauerstoff oxidiert, wodurch im Ethyllinolat der Gehalt an O₂ abnimmt. Durch Verhinderung der Nachdiffusion –etwa durch Ausbildung „seifenblasenähnlicher“ Aggregationszustände, freilich im Form inverser Vesikel– könnte der PC-Schutzeffekt entstehen. Obwohl PC im Ascorbinsäure– α -Tocopherolsystem nur knapp den halben Effekt (21h) wie PE (44h) verursacht, ist die ausbleibende Bräunung hier ein Vorteil. Auf der anderen Seite kann gerade diese eine Ursache für den zusätzliche chemischen PE-Effekt sein. In den Glucose-Ansätzen tritt mit PC/ α -TQ sogar wie keine

zusätzliche Stabilisierung auf. Eine synergistische Wirkung kommt aber zwischen PE und -Toc., sowie zwischen PE und -TQ vor. Sie ist gleich groß (4h), wird aber nur im Falle von -Tocopherol durch Glucose weiter verstärkt (8,5h). Grund könnte die verzögerte Bildung von D-Glucoson, dem Hauptoxidaionsprodukt der D-Glucose sein, das wie Ascorbinsäure eine Reductonstruktur besitzt. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen kommt es insbesondere zum Abbau von PE, der unter Glucose noch schneller verläuft als unter Ascorbinsäure, wie ein Versuch mit 5% SL1 zeigt:

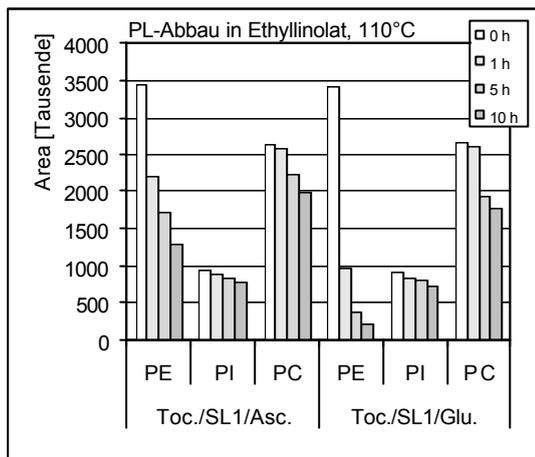


Abbildung 4.73 Phospholipid-Abbau im Ethyllinolatsystem bei 110°C (0,05% Toc., 5% SL1, 0,5% Ascorbinsäure bzw. Glucose)

Die Messung der Phospholipide erfolgte hier über HPLC-UV bei 205nm (7.2.3.).

b.) Einfluß des phenolischen Antioxidants – Tocopherolhomologe

Welche Effekte zeigen die anderen Tocopherol-Homologen in einer Konzentration von 0,05%? Auch andere phenolische Verbindungen wurden im Ascorbinsäure- bzw. Glucose-Modellansatz untersucht, darunter BHA, BHT, Propylgallat und Quercetin:

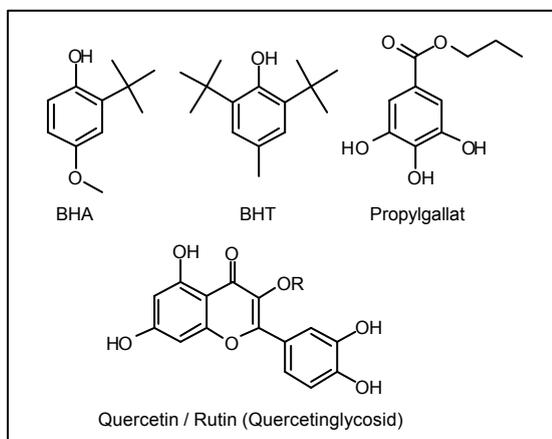


Abbildung 4.74 eingesetzte phenolische Verbindungen

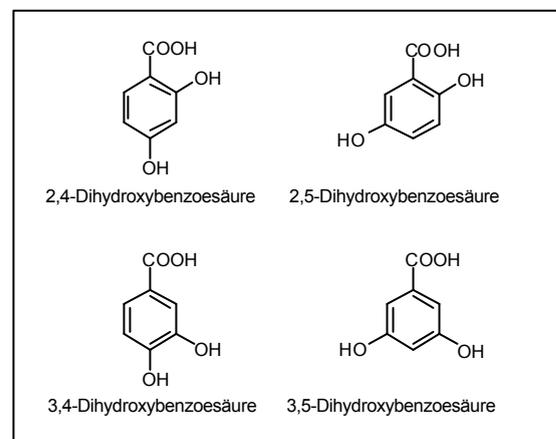


Abbildung 4.75 eingesetzte Dihydroxybenzoessäuren

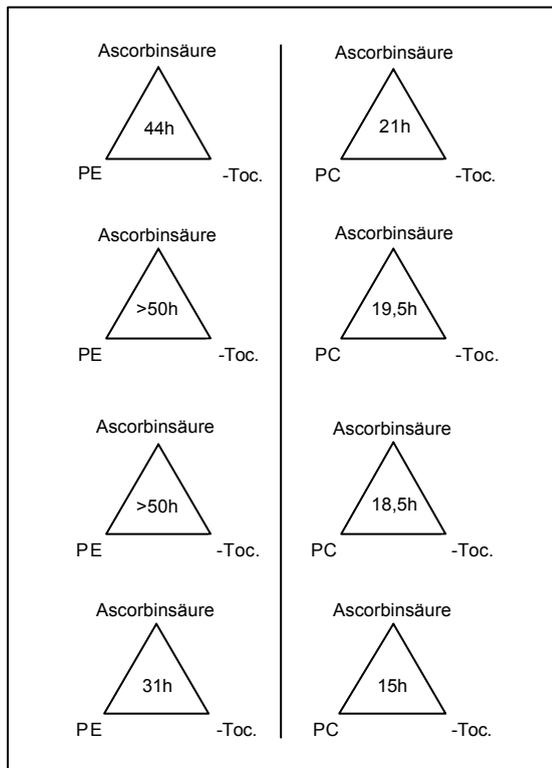


Abbildung 4.76 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C, bei Zusatz der verschiedenen Tocopherol-Homologen sowie von 1% PE bzw. PC und 0,5% Ascorbinsäure

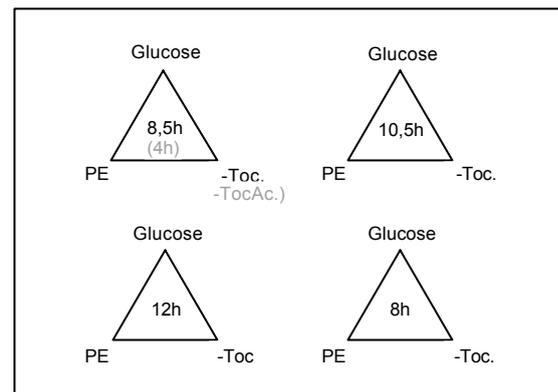


Abbildung 4.76a Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C, bei Zusatz der verschiedenen Tocopherol-Homologen (0,05%) sowie von 1% PE und 0,5% Glucose

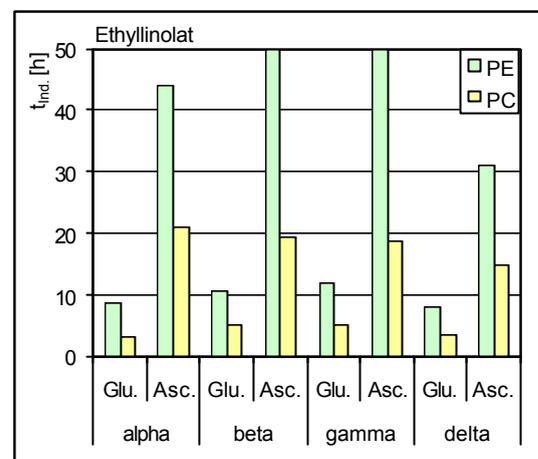


Abbildung 4.76b Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C, bei Zusatz der verschiedenen Tocopherol-Homologen sowie von 1% PE bzw. PC u. 0,5% Glucose bzw. Ascorbinsäure

Mit PE/Ascorbinsäure zeigen α - und β -Tocopherol eine IP > 50h. Die Wirkung des γ -Tocopherols (31h) ist hingegen kleiner als die des δ -Homologen. Es wurden auch Mischungen der verschiedenen Tocopherole (zu gleichen Teilen, die α und β enthielten) eingesetzt, wobei die Gesamtmenge 0,05% betrug. Die Induktionsperioden sind: α = 44h und β > 60h. Im PE/Glucose-System gilt folgende Abstufung: β > α > γ ~ δ > -Acetat. Sie entspricht etwa den Verhältnissen der Vitamin C – Messreihe. Der erhöhte synergistische Effekt der mono-ortho-methylierten Homologen könnte auf die Bildung der Etherdimere zurückgehen, die die „antioxidative Halbwertszeit“ verlängern, da sie selbst Antioxidantien sind. Der geringere Effekt beim δ -Tocopherol rührt wahrscheinlich von dessen hohem Redoxpotential her. In Verbindung mit PC/Ascorbinsäure zeigen alle Tocopherole vergleichbare synergistische Effekte, was den physikalischen Charakter des Schutz-

effekts untermauert. Mit PC/Glucose treten bei allen Homologen nur marginale Effekte auf.

Bei den anderen untersuchten phenolischen Verbindungen (0,05%) sind die beobachteten Effekte z.T. deutlich kleiner als bei den Tocopherolen:

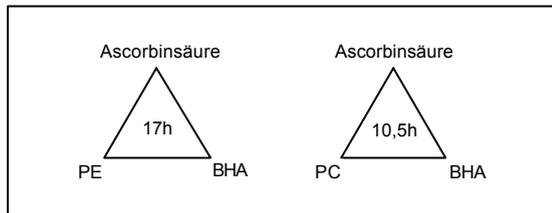


Abbildung 4.77 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C mit 0,05% BHA bei Zusatz von 1% PE bzw. PC und 0,5% Ascorbinsäure

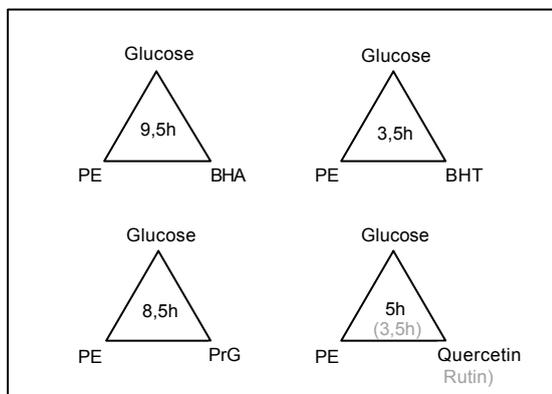


Abbildung 4.77a Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C, Vergleich verschiedener phenolischer Antioxidantien (0,05%) bei Zusatz von 1% PE und 0,5% Glucose (PE/Glu./ -Toc.: 12,5h)

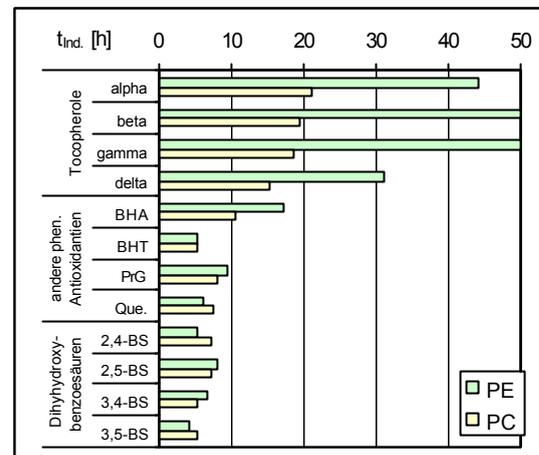


Abbildung 4.77b Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C, Vergleich verschiedener antioxidativer phenolischer Verbindungen in Verbindung mit 0,5% Ascorbinsäure

Den größten Effekt zeigt noch BHA mit 17h in Verbindung mit PE/Ascorbinsäure und 9,5h mit PE/Glucose. Die IP für PE/Glu./ -Toc. wurde zum Vergleich hier auch noch einmal ermittelt und betrug 12,5h. Im PE/Glucose-System gilt die Abstufung:

Tocopherole > BHA ~ PrG > Que. > BHT

c.) Einfluss des Kohlenhydrats bzw. großer Mengen phenolischer Verbindungen (0,5%)
 Alle eingesetzten Zucker zeigen mit PE/ -Tocopherol einen synergistischen Wirkung. Der Effekt fällt bei Fructose im Vergleich zu Glucose, Galactose und Mannose etwas ab. Bei den Disacchariden sind die Effekte wegen der geringeren Molekülzahl entsprechend kleiner. Lactose zeigt als reduzierenden Kohlenhydrat aber keine größere Wirkung als Saccharose. Der Einsatz von Dipal.-PS liefert für alle Monosaccharide kleine Induktionsperioden als bei Dipal.-PE. Auch phenolische Verbindungen können in Mengen von 0,5% die Rolle der Zucker übernehmen. Einen besonders großen

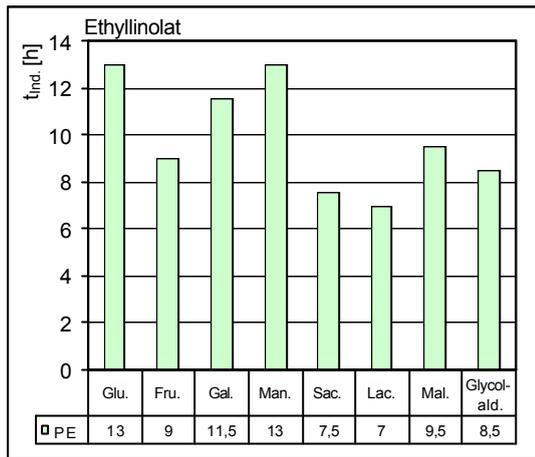


Abbildung 4.78 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C bei Zusatz verschiedene Zucker (0,5%) sowie 1% PE und 0,05% -Tocopherol

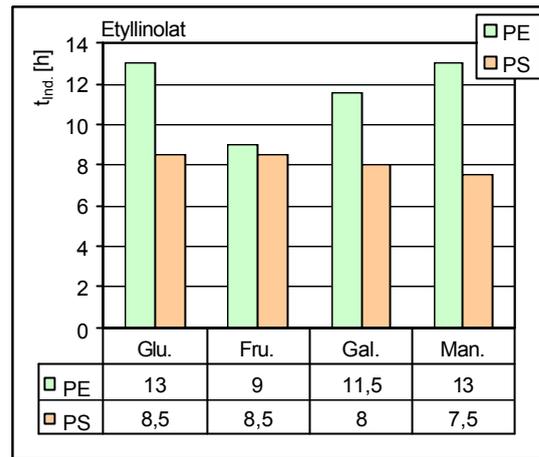


Abbildung 4.78a Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C bei Zusatz verschiedene Zucker (0,5%) sowie 1% PE bzw. PS und 0,05% -Tocopherol

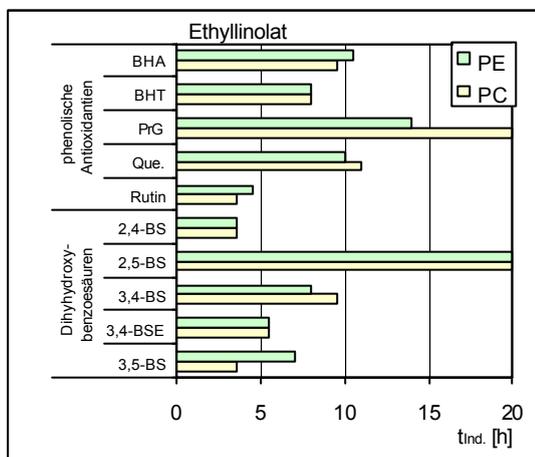


Abbildung 4.79 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C bei Zusatz verschiedener phenolischer Verbindungen (0,5%) sowie 1% PE bzw. PC und 0,05% -Tocopherol

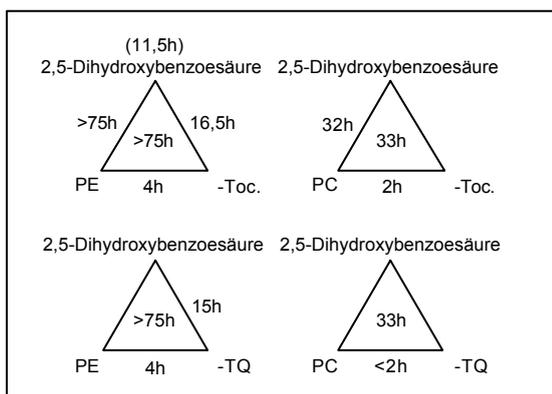


Abbildung 4.80 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C bei Zusatz von 0,5% 2,5-Dihydroxybenzoessäure sowie 1% PE bzw. PC und 0,05% -Tocopherol bzw. -Tocopherylchinon (TQ)

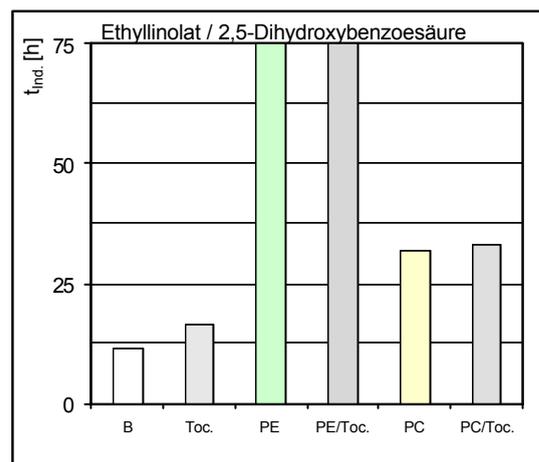


Abbildung 4.80a Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C mit Zusatz von 0,5% 2,5-Dihydroxybenzoessäure (B) und 0,05% -Tocopherol sowie 1% PE bzw. PC und 0,05% -Tocopherol

Effekt haben Propylgallat/PC und 2,5-Dihydroxybenzoesäure – sowohl mit PC als auch mit PE. Von den verwendeten Dihydroxybenzoesäuren ist die 2,5-Dihydroxybenzoesäure die einzige Verbindung mit zwei zueinander para-ständigen OH-Gruppen. Wie die Ergebnisse zeigen, ist hier kein α -Tocopherol notwendig. Die Verbindung zeigt mit PE allein einen Synergismus mit einer $IP^{110^\circ C}$ von über 75h. Der PC-Effekt ist ebenfalls beträchtlich (32h) und wird durch 0,05% α -Tocopherol praktisch nicht weiter erhöht (33h). Ähnlich wie schon bei Ascorbinsäure/ α -Tocopherol und Ascorbinsäure/BHA ist auch hier die PC-Wirkung etwa halb so groß wie die PE-Wirkung. Das lässt vermuten, dass der Gesamteffekt des PE's etwa zu gleichen Teilen auf einem physikalischen Dispersionseffekt und einen chemischen Regenerationseffekt zurückgeht. Was den Regenerationseffekt mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure betrifft, dürfte dieser ähnlich wie schon für Propylgallat postuliert –also über Alkylaminobenzole– ablaufen (vgl. Abb. 4.42 S.107).

Die bei höheren Konzentrationen beobachtete Stabilisierungsreihenfolge:

PrG > BHA > BHT korreliert mit der Abbau-Geschwindigkeit dieser Substanzen (7.2.4.). In Verbindung mit Glucose oder PE/Glucose lassen sich auch bei niedrigen Konzentrationen für alle drei Verbindungen Regenerationseffekte messen. Aufgrund des zusätzlichen langsamen Abbaus, ergibt sich für Propylgallat hier der größte Schutzeffekt.

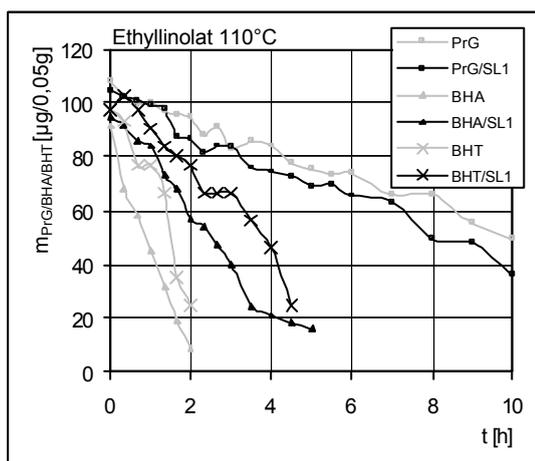


Abbildung 4.81 Abbau von Propylgallat, BHA und BHT (2%) in Ethyllinolat mit und ohne Sojalecithin (SL1 1%)

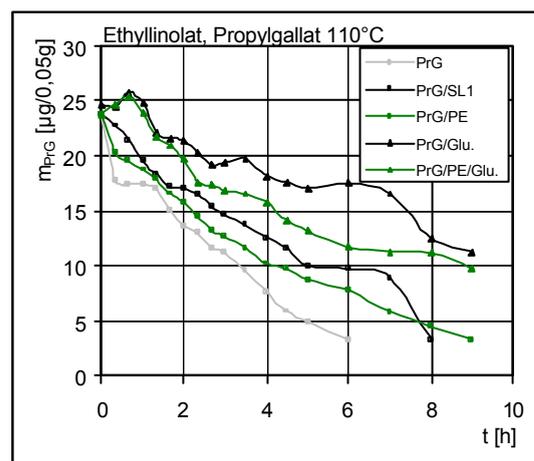


Abbildung 4.81a Abbau von Propylgallat (0,4%) in Ethyllinolat mit und ohne Sojalecithin (SL1 1%), PE (1%) und Glucose (0,5%)

e.) Regeneration von α -Tocopherol mit PE/Glucose

Da eine Regeneration von oxidiertem α -Tocopherol (PbAc₄-TQges.) bereits nur mit PE gelingt, soll hier nur die Geschwindigkeit der Recylierung und das Vorhandensein einer Induktionshemmung überprüft werden. Parallel wurde auch die Reaktion mit der α -Tocopherylchinon-Standardverbindung untersucht. Die Umsetzung wurde bei 80°C mit verschiedenen PE-Mengen in Isooctan/Isopropanol (1+1; 20ml) durchgeführt um ein Ausfallen der Glucose zu verhindern. Eingesetzt wurden: 0,025g α -TQ bzw. α -TQges., 0,05g D-Glucose, sowie 0,0125g, 0,025g bzw. 0,05g Dipal.-PE. In den Diagrammen ist die PE-Menge als Prozent der α -TQ-Menge angegeben. Der PE-Blindwert enthält 0,05g PE („200%“). Die Bräunungen der Ansätze wurde bei 420nm verfolgt um ggf. eine Zusammenhang mit der Regeneration herstellen zu können.

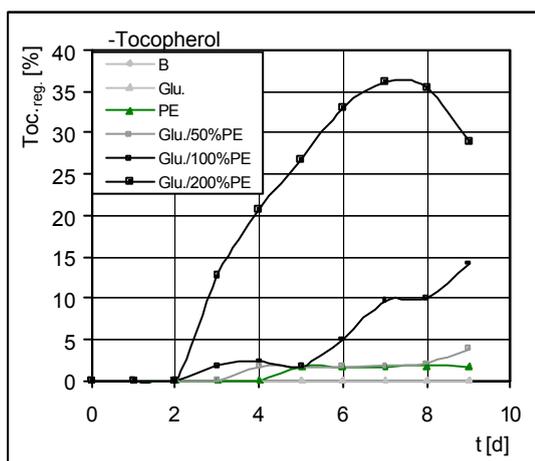


Abbildung 4.82 Regeneration von oxidiertem α -Tocopherol mit PE/Glucose in Isoctan/Isopropanol (1:1) bei 80°C

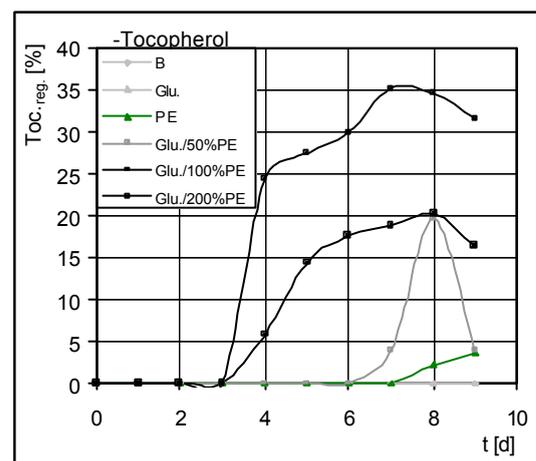


Abbildung 4.83 Regeneration von α -Tocopherylchinon mit PE/Glucose in Isoctan/Isopropanol (1:1) bei 80°C

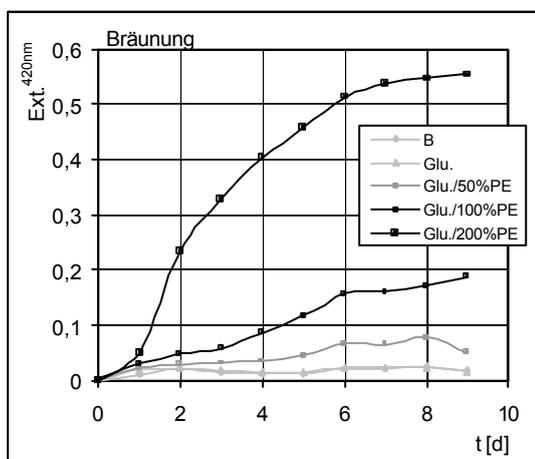


Abbildung 4.82a Regeneration von oxidiertem α -Tocopherol mit PE/Glucose in Isoctan/Isopropanol (1:1) bei 80°C

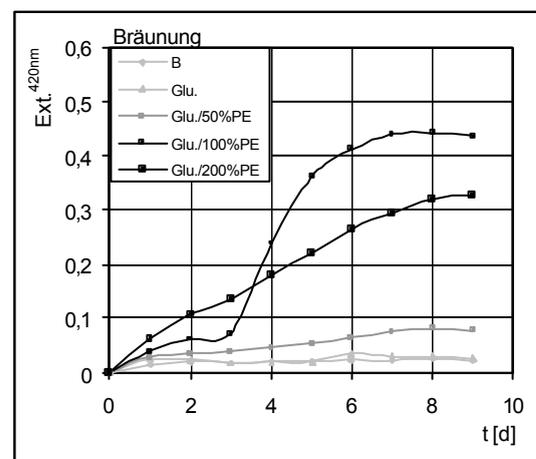


Abbildung 4.83a Regeneration von α -Tocopherylchinon mit PE/Glucose in Isoctan/Isopropanol (1:1) bei 80°C

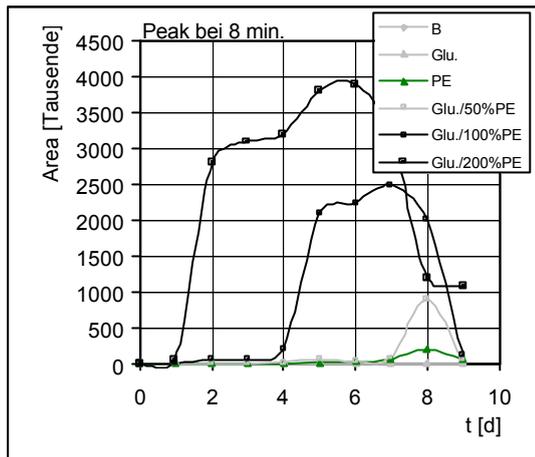


Abbildung 4.82b Regeneration von oxidiertem α -Tocopherol mit PE/Glucose in Isoctan/Isopropanol (1:1) bei 80°C

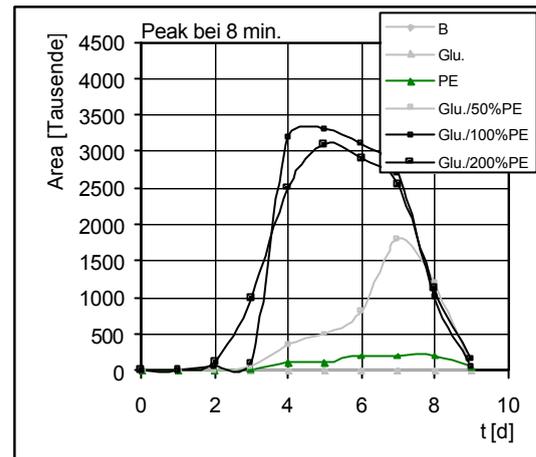


Abbildung 4.83b Regeneration von α -Tocopherylchinon mit PE/Glucose in Isoctan/Isopropanol (1:1) bei 80°C

Es ist zu sehen, dass bei 80°C PE allein nur geringe Mengen α -Tocopherol erzeugt, dass die Regeneration aber bei zusätzlicher Anwesenheit von Glucose möglich ist. Die Menge an PE (m) muß etwa doppelt so hoch sein wie die Menge an α -TQ um eine deutliche Umsetzung zu erreichen. Die Reaktion zeigt sowohl beim α -TQ-Synthesegemisch, als auch beim α -TQ-Standard eine deutliche Induktionsperiode. Die Regeneration läuft der Bräunung hinterher. Interessant ist das Auftreten eines weiteren Peaks im HPLC-Fluoreszenz-Chromatogramm der Tocopherole vor α -Tocopherol (~12min). Die Verbindung eluiert bei ca. 8 min und tritt nur in Verbindung mit PE auf. Bei Anwesenheit von Glucose entsteht deutlich mehr, zudem bildet sich der Stoff vor dem α -Tocopherol. Ein Zusammenhang mit dem Regenerationseffekt ist auch deshalb wahrscheinlich, weil bei beginnendem Abbau des 8er-Peaks auch die α -Tocopherol-Entstehung zum Erliegen kommt. Der Peak bei 8 min korreliert zudem ebenfalls mit der Bräunung. Der starke Anstieg des 8er-Peaks in der α -TQ/Glu./100%PE-Probe zwischen dem 4. und 5. Erhitzungstag hat eine einfache Ursache: Das 25ml-Vial war nicht dicht verschlossen, so dass das Lösungsmittel verdunstete. Durch die Trocknung wird die Bildung der unbekanntes Verbindung erhöht. Der Stoff wurde in den bisherigen Untersuchungen nicht gefunden. Formal könnte aus dem α -TQ durch Cyclisierung zum α -Tocopheron und anschließender thermischer Wassereliminierung eines der beiden Chinonmethide entstanden sein. Die Verbindungen sind unpolarer als α -Tocopherol, was die kleinere Retentionszeit erklären würde. Der Stoff sollte dann auch in Verbindung mit Ascorbinsäure auftreten.

d.) Vergleich der Regeneration von α -Tocopherol mit PE/Asc. und PE/Glu.

Zum Vergleich der α -Tocopherol-Regeneration durch PE/Asc. und PE/Glu. wurde der Effekt direkt im Ethyllinolat bei 110°C untersucht. Zunächst wurde mit Dipal-PE/Ascorbinsäure gearbeitet.

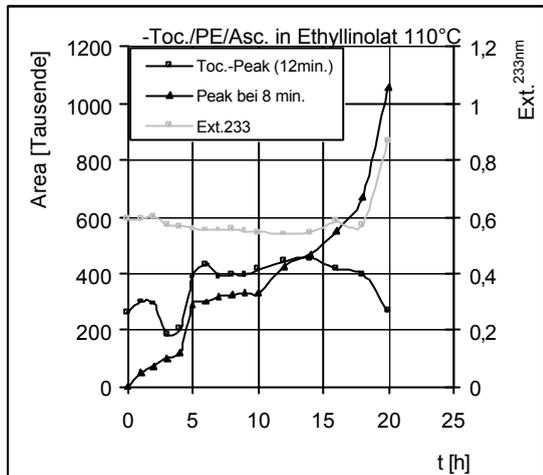


Abbildung 4.84 Peak bei 8 min. im Tocopherol-Ethyllinolatsystem (0,05% Toc., 1% PE, 0,5% Ascorbinsäure)

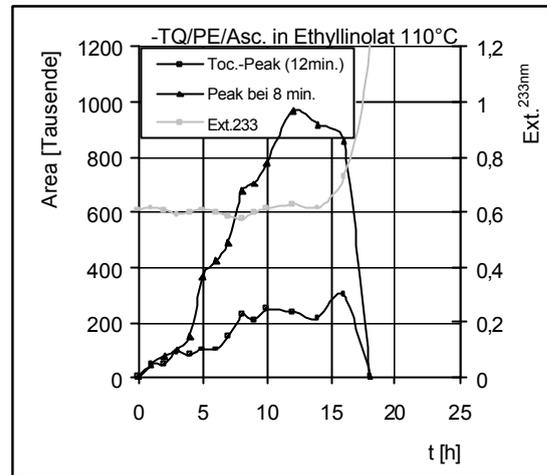


Abbildung 4.85 Peak bei 8 min. im Tocopherylchinon-Ethyllinolatsystem (0,05% TQ, 1% PE, 0,5% Ascorbinsäure)

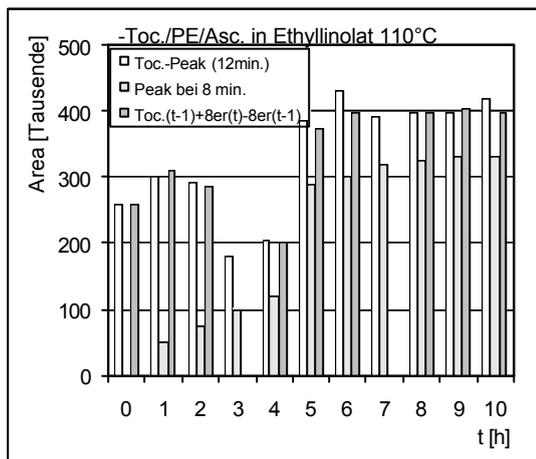


Abbildung 4.84a parallele Entstehung vom 8er-Peak und Tocopherol im Tocopherol-Ethyllinolatsystem (0,05% Toc., 1% PE, 0,5% Ascorbinsäure)

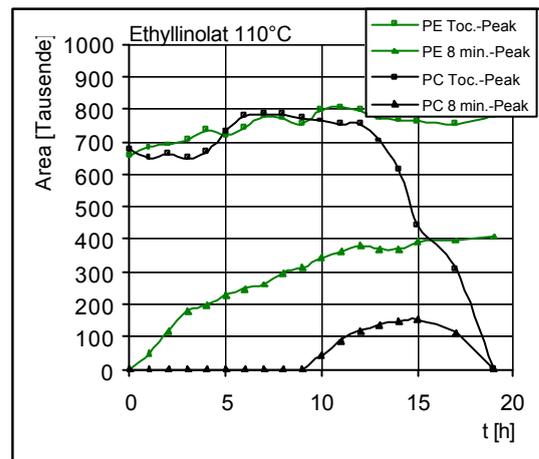


Abbildung 4.86 Peak bei 8 min. mit PE bzw. PC im Tocopherol-Ethyllinolatsystem (0,1% Toc., 1% PE bzw. PC, 0,5% Ascorbinsäure)

Auch mit Ascorbinsäure tritt tatsächlich der 8-min-Peak im Tocopherol-Chromatogramm auf. Bei Einsatz von α -Tocopherylchinon ist die gebildete Menge nach 10h höher, als bei Zugabe von α -Tocopherol. Die Regeneration des α -Tocopherols aus α -TQ ließ sich im Ethyllinolat-System bestätigen. Der 8er-Peak scheint die Schlüsselkomponente der Regeneration zu sein. Da die Verbindung sowohl mit PE/Glucose, PE/Ascorbinsäure als auch mit PC/Ascorbinsäure gebildet wird (Abb. 4.86), handelt es sich offensichtlich um ein α -Tocopherol-Abkömmling (C5-Chinonmethid?). Der Verlauf der α -Tocopherol-Konzentration in Abb. 4.84 – also unter PE/Ascorbinsäure –

sieht auf den ersten Blick nach einem Messfehler aus. Ein solcher liegt aber nicht vor. Das α -Tocopherol baut sich im Ethyllinolat (Blindversuch) bei 110°C innerhalb von ca. 2h ab. Was man in der Grafik sieht, ist eine Überlagerung von diesem Abbau und der Regeneration durch PE/Ascorbinsäure. Geht man davon aus, dass die Verbindung bei 8min als Vorläufer relativ leicht in α -Tocopherol übergehen kann; und nimmt man weiter an, dass sie ein ähnliches Fluoreszenzverhalten wie α -Tocopherol zeigt, ergibt sich für die Area von α -Tocopherol an der Stelle t:

$$A(\text{Toc.})_t = A(\text{Toc.})_{t-1} + A(8\text{min.})_t - A(8\text{min.})_{t-1}$$

In Abb. 4.84a sind die entsprechenden Werte für die ersten 10h dargestellt. Damit erklärt sich der Tiefpunkt der α -Tocopherolkonzentration bei ca. 3h.

Zum Vergleich der α -Tocopherol-Regeneration durch PE/Asc. und PE/Glu. wurde die zugegebene Menge an α -TQ auf 0,1% verdoppelt. Dies ist notwendig, da sonst für PE/Glucose keine Werte erhalten werden. Das entstehende α -Tocopherol und der Peak bei 8 min wurden hier nur über die ersten 5 Erhitzungsstunden verfolgt. Der Verderb wurde über die Extinktion bei 233nm erfasst (7.3.5.).

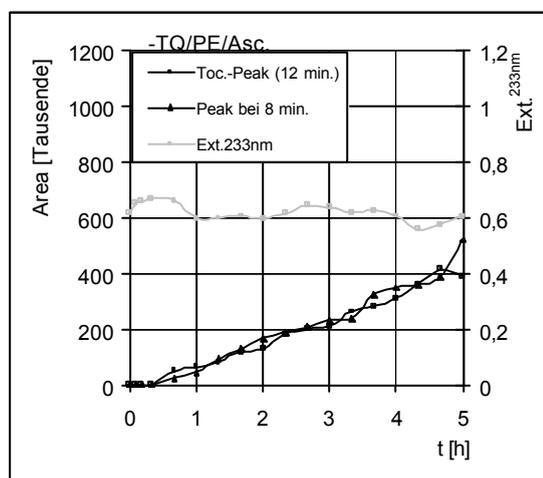


Abbildung 4.87 Peak bei 8 min. im Tocopherylchinon-Ethyllinolatsystem (0,1% TQ, 1% PE, 0,5% Ascorbinsäure)

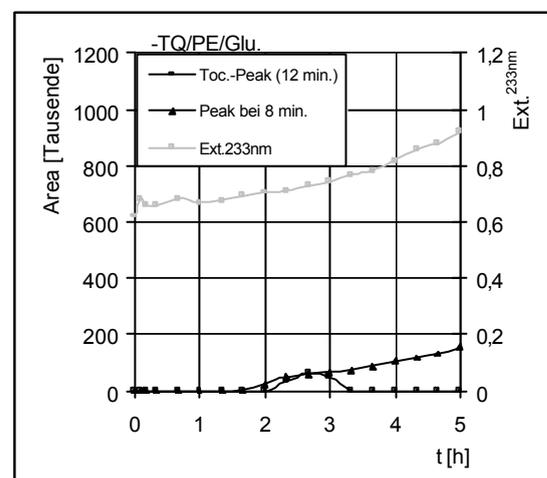


Abbildung 4.88 Peak bei 8 min. im Tocopherylchinon-Ethyllinolatsystem (0,1% TQ, 1% PE, 0,5% Glucose)

Bei PE/Ascorbinsäure beginnt die α -Tocopherolbildung bereits nach ca. 30min. Im Falle von PE/Glucose ist sie verzögert. Aber auch hier ist eine Regenerierung zu beobachten. Die entstehenden Mengen sind nur gering, da bereits der Verderb einsetzt, wie am Anstieg der Extinktion bei 233nm zu erkennen ist. In beiden Fällen kommt als Zwischenprodukt die Verbindung bei 8 min. vor. Die fortwährende Bildung innerhalb

der Glucose-Messreihe deutet an, dass die Substanz weniger oxidationsempfindlich ist als -Tocopherol.

Im Modellsystem mit 0,1% -Tocopherol wurde zusätzlich die Bräunung der Ansätze über die Extinktion bei 420nm während der Erhitzungszeit bestimmt. Auch auf die Bildung von o-Phenylendiamin-aktiven Verbindungen wurde nach Umsetzung eines wässrigen Extrakts mit OPD und anschließender 2-Butanol-Extraktion und UV-Messung bei 320nm vorgetestet.

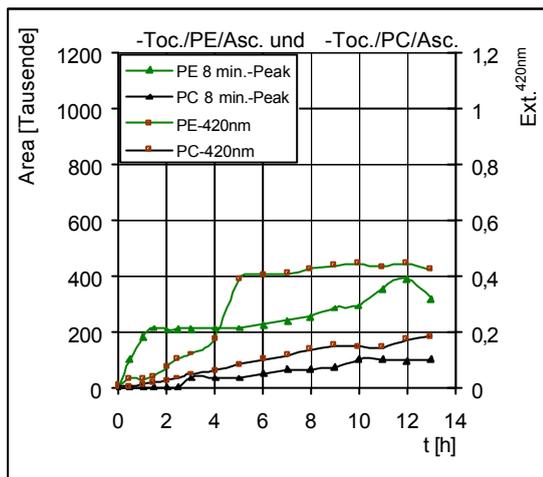


Abbildung 4.89 Bräunung und Peak bei 8 min. im Tocopherol-Ethyllinolatsystem (0,1% Toc., 1% PE bzw. PC, 0,5% Ascorbinsäure)

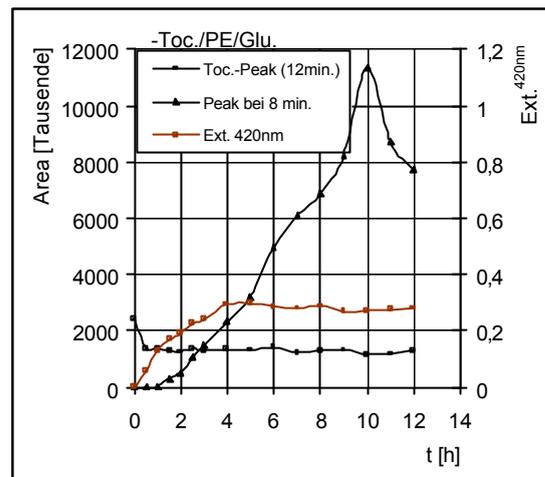


Abbildung 4.90 Peak bei 8 min. (270nm/400nm) im Tocopherol-Ethyllinolatsystem (0,1% Toc., 1% PE, 0,5% Glucose) im Vergleich zur Bräunung

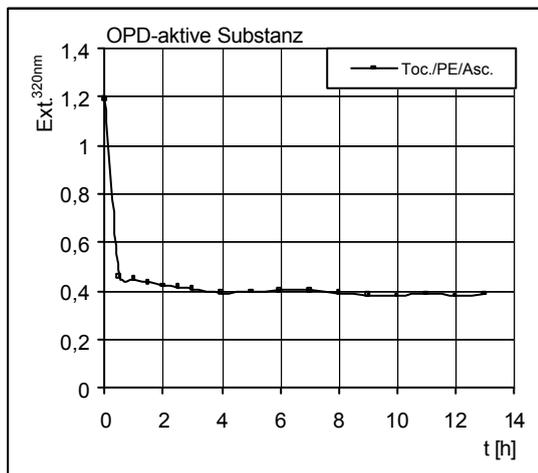


Abbildung 4.89a OPD-aktive Substanz im Tocopherol-Ethyllinolatsystem (0,1% Toc., 1% PE, 0,5% Ascorbinsäure)

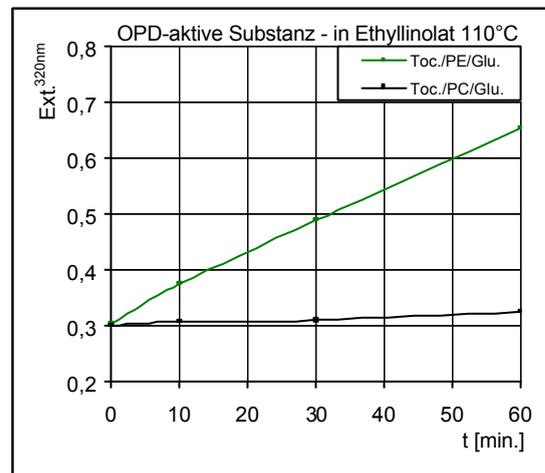


Abbildung 4.90a OPD-aktive Substanz im Tocopherol-Ethyllinolatsystem (0,1% Toc., 1% PE, 0,5% Glucose)

Mit PE/Asc. entsteht der 8er-Peak noch vor der Bräunung. Die PC/Asc.-Ansätze bräunen nur leicht und zeigen nach einer Induktionsperiode auch nur einen kleinen Peak bei 8 min. Im PE/Glu.-System entsteht der 8er-Peak erst nach/mit der Bräunung. Über die Optimierung der Fluoreszenzwellenlängen (270nm/400nm) gelang es darüberhinaus die unbekannte Verbindung hier ca. Faktor 10 empfindlicher zu

detektieren. Die Verbindung selbst wurde über HPLC isoliert, die NMR-Untersuchung verlief aber ergebnislos. Bei Umsetzung mit DPPH zeigte die Substanz keine antioxidativen Eigenschaften. Die Bestimmung der gesamt-OPD-reaktiven Substanz erbrachte für PE/Asc. eine schnelle Abnahme mit der Erhitzung, was vermutlich mit dem Abbau der Ascorbinsäure zusammenhängt. Mit PE/Glu. steigt die Post-OPD-Aktivität in den ersten 60 Erhitzungsminuten dagegen an. Ein Effekt, der mit PC/Glu. nicht beobachtet werden konnte. Hier deutet sich ein interessanter Zusammenhang an, der über HPLC noch genauer untersucht wurde. (5.2.1. S. 160ff).

e.) Oxidation von (RRR)- α -Tocopherol und Regeneration mit PE/Ascorbinsäure

(RRR)- α -Tocopherol wurde mit $PbAc_4$ in Essigsäure bis zum vollständigen Abbau oxidiert und über Säulenchromatographie mit Chloroform an Kieselgel von Schwermetallspuren befreit [105]. Von dem erhaltenen Synthesegemisch wurden ca. 1000 μ g mit 1000 μ g Dipal.-PE und 1000 μ g Ascorbinsäure (angefeuchtet mit Chloroform) für 3h bei 110°C inkubiert. Das erhaltene α -Tocopherol wurde mittels chiraler HPLC auf seine Konfiguration untersucht (7.2.2.). Entgegen den Erwartungen wurde keine Racemisierung am C2 beobachtet. Es entstand nur (2R)- α -Tocopherol. Die biologische Wirksamkeit nimmt daher bei der Regeneration mit PE/Asc. nicht ab.

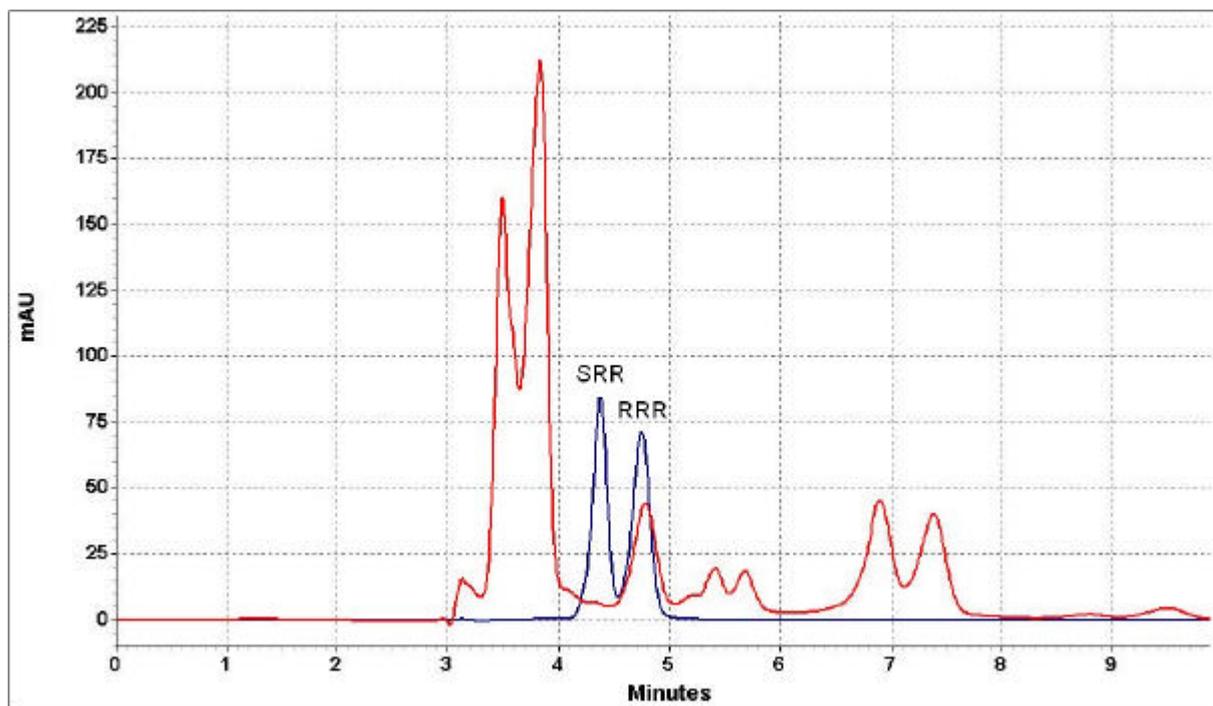


Abbildung 4.91 chirale HPLC-UV-Trennung von (2S)- und (2R)- α -Tocopherol; blau racemischer Standard, rot Probe: mit PE/Asc. regeneriertes oxidiertes (RRR)- α -Tocopherol

f.) Lagerung bei Raumtemperatur, Einfluss der Vorerhitzung von PE / Glucose

Der Zusatz der verschiedenen Pflanzenlecithine (1%) zu Ethyllinolat in Verbindung mit 0,05% α -Tocopherol bringt auch bei Lagerung unter Raumtemperatur eine bessere Oxidationsstabilität. Im PE/Glu.-System beobachtet man bei 25°C aber keinen Effekt:

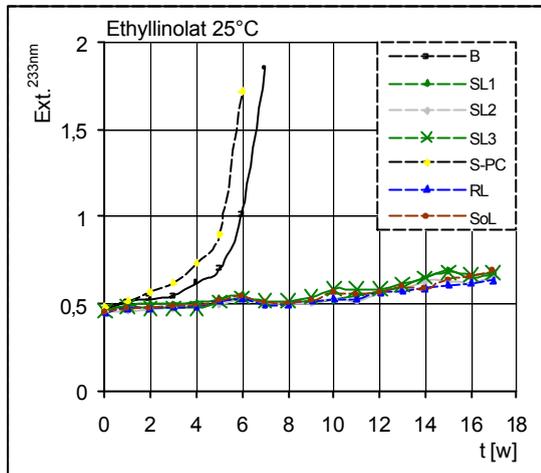


Abbildung 4.92 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei Raumtemperatur mit Zusatz von 0,05% α -Tocopherol sowie 1% verschiedener Lecithine (Soja, Raps, Sonnenblume)

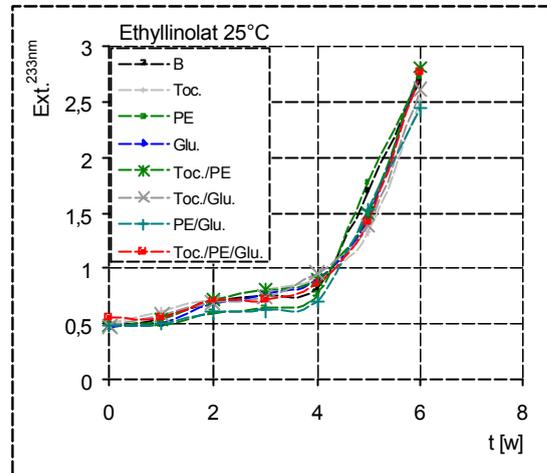


Abbildung 4.93 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei Raumtemperatur mit Zusatz von 0,05% α -Tocopherol sowie 1% Dipal.-PE bzw. 0,5% D-Glucose, sowie Mischungen

Da Pflanzenlecithine während der Herstellung erhitzt werden, stellt sich die Frage; welchen Effekt eine Vorerhitzung von PE und Glucose auf die Stabilisierung von Ethyllinolat α -Toc. bei Lagerung unter 25°C hat? Bisher wurde gezeigt, dass im System PE/Glucose die Regeneration der Bräunung hinterherläuft. Ferner deuten sich im OPD-Vorversuch Reductonstrukturen an, welche die Rolle der Ascorbinsäure im System PE/Ascorbinsäure einnehmen könnten. Auf der anderen Seite ergaben die Regenerationsuntersuchungen in organischen Lösungsmitteln, aber auch in Ethyllinolat, eine α -Tocopherol-Regeneration erst nach Erhitzung. Die Untersuchungen zur Vorerhitzung von Dipal.-PE und D-Glucose wurden prinzipiell analog den bisherigen Modelluntersuchungen durchgeführt. Beide Substanzen wurden lediglich vor der Zugabe zum Ethyllinolat für 0-3h zusammen (mit Chloroform angefeuchtet) bei 110°C im Trockenschrank vorerhitzt. Der Rückstand wurde in Chloroform/ Methanol (3+1) durch 1-minütige Erhitzung auf 60°C gelöst. Die Bräunung der Lösungen wurde bei 420nm gemessen. Nach Zusatz zum Ethyllinolat wurden Mengen von je 5mg Ethyllinolat in 1,5-ml-Vials pipettiert, mit N₂ zur Trockene eingeeengt und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Der Verderb wurde über 17 Wochen [w] photometrisch bei 233nm verfolgt (7.3.5.).

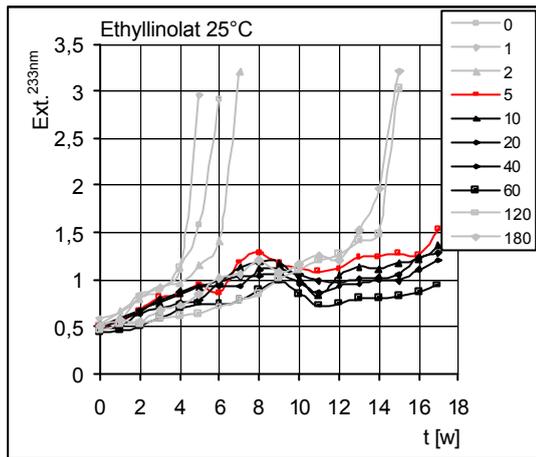


Abbildung 4.94 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei Raumtemperatur mit Zusatz von 0,05% -Tocopherol sowie 1% PE und 0,5% Glucose, wobei PE und Glucose für verschiedene Zeiten [min] zusammen bei 110°C vorehitzt wurden

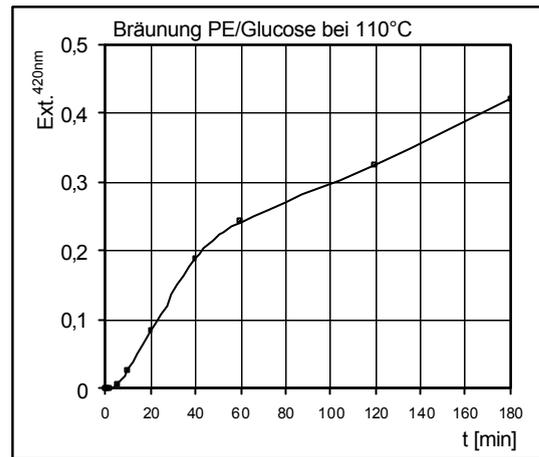


Abbildung 4.94a Bräunung von PE und Glucose bei 110°C

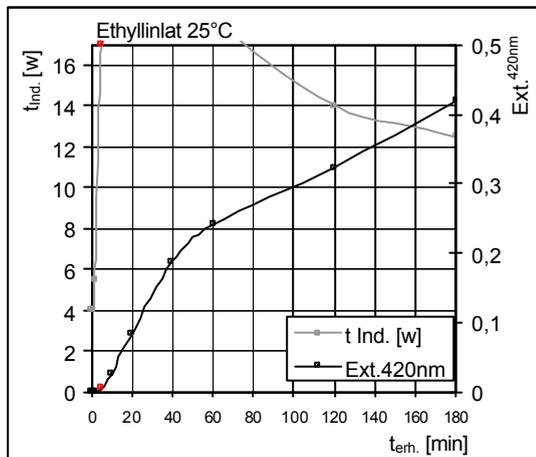


Abbildung 4.94b Induktionsperiode von Ethyllinolat bei Raumtemperatur mit Zusatz von 0,05% -Tocopherol sowie 1% PE und 0,5% Glucose in Abhängigkeit von der PE/Glucose-Bräunung

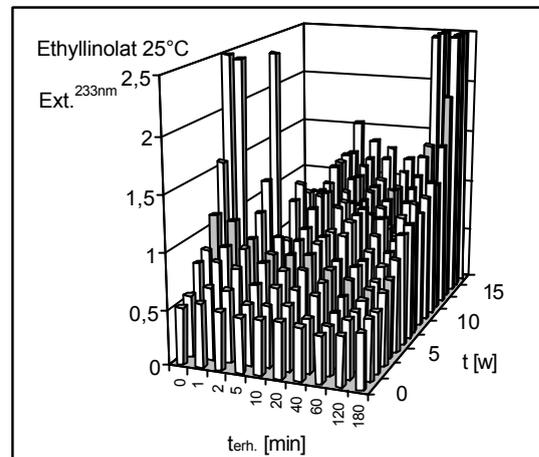


Abbildung 4.94c Induktionsperiode von Ethyllinolat bei Raumtemperatur mit Zusatz von 0,05% -Tocopherol sowie 1% PE und 0,5% Glucose, wobei PE und Glucose für verschiedene Zeiten zusammen bei 110°C vorehitzt wurden

Die Proben, die für 0, 1 und 2min bei 110°C vorehitzt wurden zeigen praktisch keine Stabilitätserhöhung. Ab einer Vorehitzung von 5min entwickeln Dipal.-PE und D-Glucose in Verbindung mit -Tocopherol aber einen starken Schutzeffekt. Vergleicht man den einsetzenden Effekt ($t_{ind.}$) mit der Bräunung, so sieht man, dass bei 5min (rot) zwar noch kaum eine Färbung auftritt, aber dennoch schon ein deutlicher Schutzeffekt vorhanden ist (Abb. 4.94b). Bei über 1-stündiger Vorehitzung nimmt der antioxidative Effekt –trotz weiterer Bräunung– wieder ab. Beide Beobachtungen zeigen, dass die Bräunungsprodukte selbst den Effekt nicht verursachen. Der bei 233nm gemessene Anstieg der bei der Oxidation des Linolats entstehenden konjugierten Oxidene –darunter insbesondere die Hydroperoxide– lässt sich für den gesamten Versuch in einem 3D-Säulendiagramm darstellen. Besonders anschaulich ist

aber die Darstellung als 3D-Fläche. Beachten Sie, dass in der Darstellung die Achse der Vorerhitzungszeit gestaucht ist:

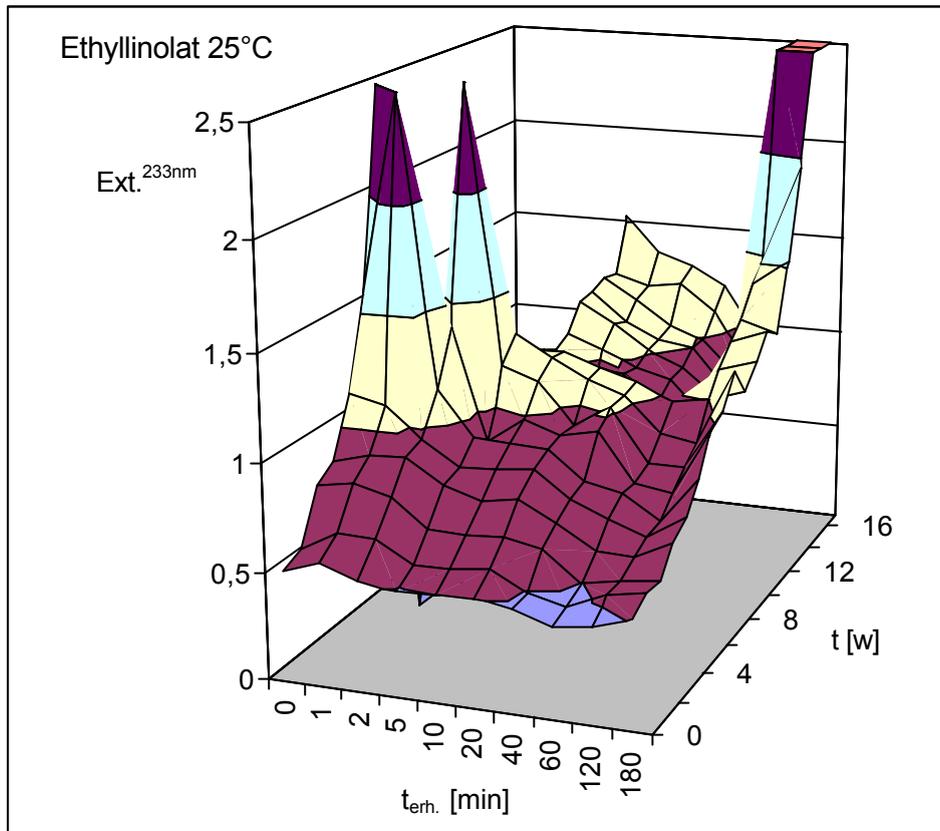


Abbildung 4.95 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei Raumtemperatur mit Zusatz von 0,05% α -Tocopherol sowie 1% PE und 0,5% Glucose, wobei PE und Glucose für verschiedene Zeiten zusammen bei 110°C vorerhitzt wurden

Die Konzentration der konjugierten Oxidene läuft auch bei der 5-minütigen Vorerhitzung über die Lagerzeit nur entlang eines schmalen Grats dicht am gefährvollen autokatalytischen Anstieg. Die kritische Konzentration entspricht etwa dem gelb dargestellten Bereich. Günstiger ist es, die Hydroperoxide im roten Bereich zu halten. Dieser Bereich durchläuft einen Sattelpunkt bei einer Vorerhitzung von 30 ± 10 min. Da an dieser Stelle schon eine deutlich Bräunung eingetreten ist, ist die beginnende Bräunung auch gleichzeitig ein guter Indikator für den antioxidativen Effekt von PE/Glucose. Gleiches sollte für Pflanzenlecithine gelten, unter der Voraussetzung, dass die Hydrolyse der Glycolipide hier ausreichende Mengen an reduzierenden Kohlenhydraten zur Verfügung stellt. Ein Indiz dafür liefert die starke Bräunungs-tendenz des glycolipidreichen Rapslecithins. Maislecithin, das mir nicht zur Verfügung stand, scheint aufgrund seines nur ca. 3%igen PE-Gehalts [260] zur Regeneration von α -TQ über den „Kohlenhydrat-Synergismus“ eher ungeeignet.

5. Wechselwirkungen mit Zuckern – Maillard-Bräunung

5.1. Maillard-Reaktion

Im Jahre 1912 berichtete Louis C. Maillard von einem braunen Niederschlag, den er beim Erhitzen einer Lösung von Glucose und Glycin erhalten hatte [152,153]. Die in der Folgezeit als Maillard-Reaktion bezeichnete Bräunung von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren wurde von Hodge (1953) [94] in drei Phasen unterteilt. In der Anfangsphase reagiert die Aminogruppe der Aminosäure mit der Carbonylgruppe des Zuckers unter Wasserabspaltung zu einer Schiff'schen Base. Der Zucker wird dadurch für weitere Reaktionen aktiviert (Enolisierung). M. Amadori berichtete 1931 über zwei Produkte, die er als stabiles und labiles Isomer bezeichnete [4]. Die Glucose-Schiff-Base lagert sich in das säurestabilere Fructoseamin (Amadori-Produkt) um. Amadori-produkte reagieren in der fortgeschrittenen Phase u.a. über Wasserabspaltungen und Rückbildung der Aminokomponente zu reaktiven α -Dicarbonylen, die als Schlüsselverbindungen für die Bräunungsreaktion angesehen werden [143]. Vergleichbare Reaktionen treten auch bei der Karamellisierung der Zucker unter drastischeren Bedingungen (ab 120°C, pH <3/>8) unter Abwesenheit von Aminen auf [135]. Bei der Maillard-Reaktion katalysieren Amine die intramolekulare Disproportionierung der Zucker zu Desoxydicarbonyl-Verbindungen. In der Endphase der Maillard-Reaktion kommt es – insbesondere durch Aldolkondensationen – zur Bildung von polymeren Strukturen, die man unter dem Begriff Melanoidine zusammenfasst [181,241,50]. Während der Maillard-Bräunung werden darüberhinaus zahlreiche niedermolekulare Stoffe gebildet, die Geruch, Geschmack und Haltbarkeit von Lebensmitteln beeinflussen [143]. Maillardreaktionsprodukte kommen auch als freie oder protein-gebundene Derivate in physiologischen Medien wie Geweben, Plasma oder Urin vor. Überwiegend findet die Reaktion hier unter der Beteiligung der ϵ -Aminogruppe des protein-gebundene Lysins statt. Nach [143] sind in Geweben zwischen 1-3% der Lysinreste glyciert. Hämoglobin liegt im Körper am N-terminalen Valin der α -Kette zu ca. 5-8% modifiziert vor, bei Diabetikern steigt dieser Wert aufgrund des hohen Blutzuckers auf ca. 12% an [54]. Der Übersichtsartikel der Stuttgarter F. Ledl und E. Schleicher von 1990 [143] kann als Meilenstein der Maillard-Forschung angesehen werden. Obwohl es zahlreiche Untersuchungen zur Maillard-Reaktion von redu-

zierenden Zuckern mit Aminosäuren gibt [143,54,156] ist die Rolle des Phosphatidylethanolamins als Aminokomponente bislang kaum beachtet worden [239]. Die nichtenzymatische Bräunung von Aminophospholipiden in Volleipulver wurden bereits 1957 von Lea beschrieben [139]. Die Bedeutung von glyciertem PE bzw. PS in vivo ist seit 1993 ein Schwerpunkt der Forschung (AGEs) [22, 239]. Die Bezeichnung „advanced glycation endproducts“ (AGEs) für zumeist proteingebundene Produkte der fortgeschrittenen Reaktion in vivo wurde in den 90er Jahren von Cerami eingeführt [243]. Die Glucose-Amadori-Verbindung des PE's wurde 1997 in der Stuttgarter Arbeitsgruppe um M. Lederer synthetisiert [140]. Kurz darauf folgten Pyrrolcarbaldehyd (Pyrrol-PE: HMF-analoges PE-Produkt), Carboxymethyl-PE (CM-PE) und Carboxyethyl-PE (CE-PE) [141,239,240]. Ausgehend von Lederers Untersuchungen hat die japanische Gruppe um T. Miyazawa die Amadori-Produkte: Glucose-PE und Lactose-PE in Lebensmitteln über UV-Markierung der Carbonylgruppe mit MBTH nachgewiesen [179]. Zudem ordnen Sie dem Amadori-PE in Verbindung mit Linolsäure/ Fe^{3+} eine prooxidative Wirkung zu [180]. Lederer et al. beschreiben eine prooxidative Wirkung von Amadori-PE auch unter Abwesenheit von Fe^{3+} bzw. Cu^{2+} und nehmen an, dass die Glycierung der Aminophospholipide mitverantwortlich ist für den oxidativen Stress an Membranen (insbesondere bei Diabetikern). [142].

D-Glucose zeigt, obwohl es sich um ein Aldose handelt, nicht die für Aldehyde typische Reaktion mit fuchsin-schwefliger Säure. Aus diesem abweichenden Verhalten zog Tollens 1863 den Schluss, dass Glucose nicht als Aldehyd vorliegen kann und schlug eine tautomere Halbactal-Ringstruktur vor [13]. Da das C1 in dieser Struktur chiral ist, existieren 2 diastereomere D-Glucopyranosen (- und -Anomer), die sich in ihrer optischen Aktivität unterscheiden. Die (S)- -Form hat eine spezifische Drehung von $+111^\circ$, die (R)- -Form: $+19^\circ$. Die -Form kann aufgrund der axialen Stellung der C1-OH-Gruppe die auf der gleichen Seite der Sesselform liegt, wie die (äquatoriale) C2-OH-Gruppe einen Borsäure-Ester bilden, der aufgrund seiner starken Dissoziation die Leitfähigkeit der Borsäure erhöht. Die -Form kann dies nicht, da

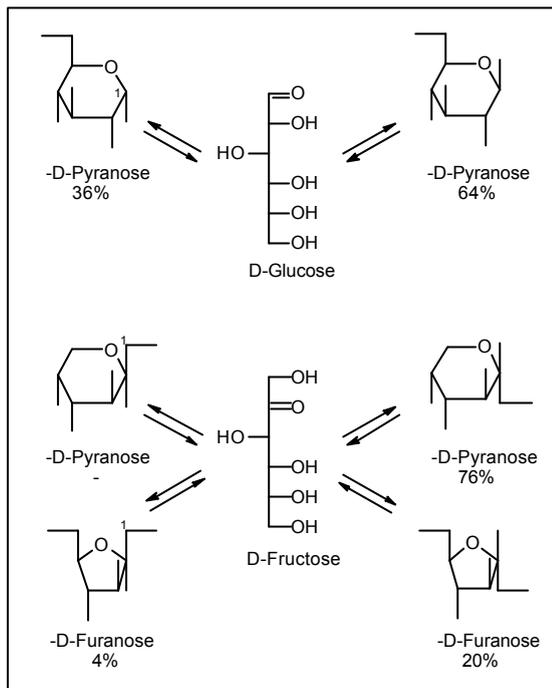


Abbildung 5.1 Oxo-Cyclo-Tautomerie, Halbacetale [11]

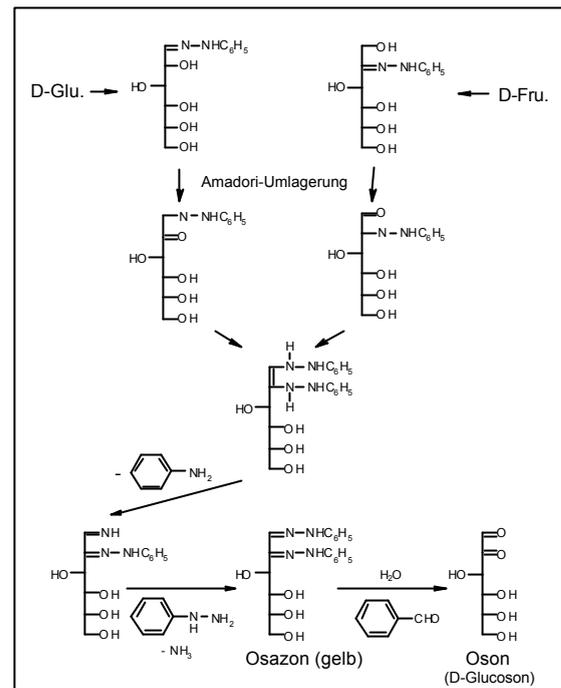


Abbildung 5.2 Bildung von Osazon [13]

beide OH-Gruppen äquatorial sind und damit auf verschiedenen Seiten des Rings (trans) liegen. Löst man eine der beiden D-Glucose-Formen, die sich separat isolieren lassen in Wasser, so stellt sich nach einiger Zeit ein gleicher Drehwert von $+52,5^\circ$ ein. Dieser Effekt der Mutarotation erklärt sich über das Gleichgewicht beider Strukturen über die offenkettige Form. Aus den Drehwerten lässt sich berechnen, dass die α -Form mit 64% im Gleichgewicht überwiegt. Die Einstellung des Mutarotationsgleichgewichts ist von Temperatur und pH-Wert abhängig. Im Basischen stellt es sich sofort ein. Auch D-Fructose bildet über das C2 eine 6-Ringacetalstruktur, die in Lösung ausschließlich in der β -Form vorliegt [11]. Darüberhinaus bildet Fructose im Gegensatz zur Glucose auch 5-Ring-Acetale [(S)- α - und (R)- β -D-Fructofuranose]. Aufgrund der zusätzlichen Strukturen stehen Fructose mehr Reaktionswege offen.

Die Nachweisreaktionen der Monosaccharide beruhen meist auf der leichten Oxidierbarkeit im Alkalischen. So wird bei Erhitzung Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert (Fehling, Trommer), Ag^+ zu Ag (Tollens), Bi^{3+} zu Bi (Nylander); mit Phenylhydrazin fallen hingegen aus essigsaurer Lösung gelbe Osazone aus (E. Fischer). Dabei reagiert Glucose genau wie Fructose mit 3 Äquivalenten Phenylhydrazin zu einem Osazon (Abb. 5.2) Dieses lässt sich mit HCl (besser mit Benzaldehyd) in D-Glucoson –einem Oxidationsprodukt der D-Glucose bzw. D-Fructose– überführen [13]. Ein Äquivalent

Phenylhydrazin wird bei dieser Reaktion reaktiv zu Anilin und Ammoniak gespalten. Die reduzierenden Eigenschaften der Monosaccharide gehen auf die im Alkalischen vorliegende Endiolatstruktur zurück. Endiole sind Verbindungen, die an den beiden C-Atomen einer Doppelbindung je eine OH-Gruppe tragen. Die einfachsten Vertreter sind α -Hydroxy-Carbonyle, die unter bestimmten Bedingungen in die Endiol-Form übergehen können. In Analogie zur Keto-Enol-Tautomerie, handelt es sich hier um eine Ketol-Endiol-Tautomerie. Tatsächlich zeigen α -Hydroxy-Aldehyde und α -Ketone sowie eine Reihe von Zuckern –jedoch meist nur im Alkalischen– ein mehr oder weniger ausgeprägtes Reduktionsvermögen. Derartige Verbindungen, die nur im alkalischen Medium reduzierend wirken, bezeichnet man auch als Reduktonate (Endiolate). D-Glucose wird im Alkalischen als Reduktonat mit Cu^{2+} über das D-Glucoson u.a. zu Ameisensäure und Arabinonsäure oxidiert [11]. Beständiger als die einfachen Endiole sind die Reductone. Diese enthalten die Endiol-Gruppierung α -ständig zu einer Carbonylgruppe und sind auch in saurer Lösung reduzierend (acid-Reductone). Beispiele sind die Ascorbinsäure, D-Glucoson und das Triosereducton, welches durch Einwirkung von verdünnter NaOH in Stickstoff-Atmosphäre auf Glucose entsteht (isolierbar über Pb-Reductonat) [13]. Das Triosereducton besitzt eine Doppelfünfring-Chelat-Struktur. D-Glucose, D-Fructose und D-Mannose besitzen ein gemeinsames Endiol, über welches sie sich ineinander umlagern können (Lobry de Bruyn–Alberda van Ekenstein–Umlagerung; Abb. 5.3). Lobry de Bruyn und Alberda van Ekenstein selbst gingen davon aus, dass die Isomerisierungsreaktion über Epoxid-Acetale verläuft [227]. Endiolat-Monoanionen, die durch Brönstedt-Basen aus Aldosen und Ketosen entstehen, sind mesomerie-stabilisiert und können durch Tautomerie ineinander übergehen. Isotopenuntersuchungen zeigen, dass D-Glucose nicht direkt in D-Mannose übergeht, sondern dies über D-Fructose geschieht [227]. Die Reaktion wird stark durch die Art des Katalysators bestimmt. Mit NaOH entstehen aus D-Glucose; D-Fructose und D-Mannose, mit Pyridin entsteht vor allem D-Fructose und mit NH_3 bildet sich fast ausschließlich D-Psicose –das C3-Epimer der D-Fructose [227]. Als Nebenprodukt entsteht zumeist 3-Desoxyhexoson, Furfural und HMF. Wasser allein ist ein schlechter Katalysator für die Reaktion, aber Phosphatpuffer oder Citronensäure können ebenfalls D-Fructose in D-Glucose isomerisieren.

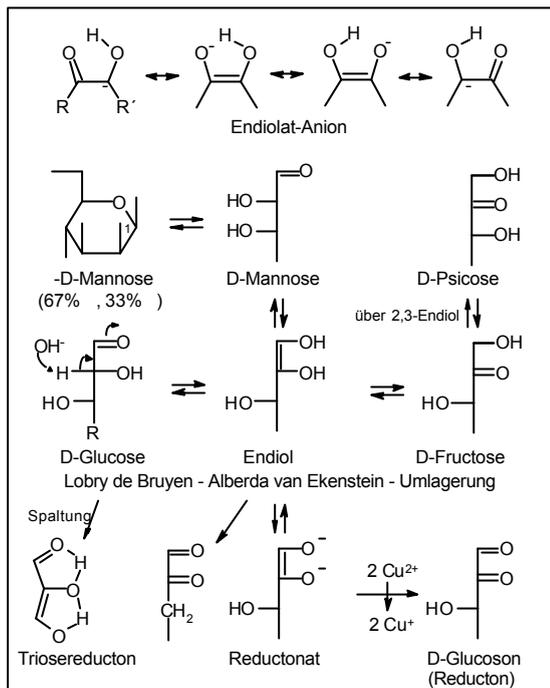


Abbildung 5.3 Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein – Umlagerung, Reduktionsvermögen im Alkalischen

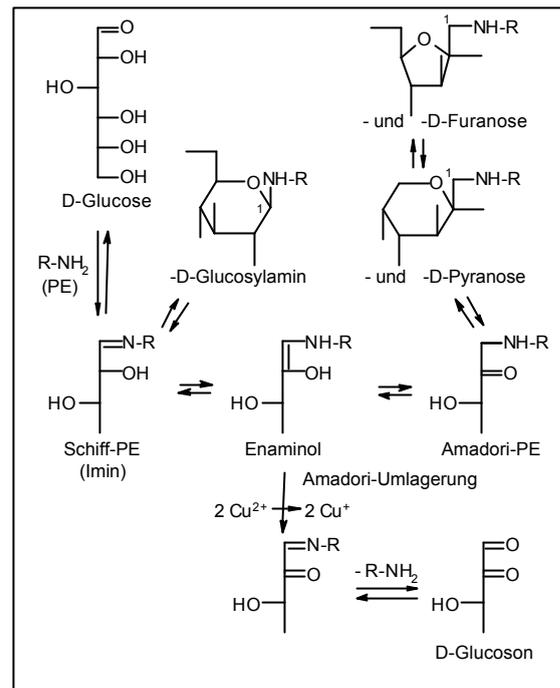


Abbildung 5.4 Amadori-Umlagerung, Oxidation im Neutralen [146]

Die in der Anfangsphase der Maillard-Bräunung stattfindende Amino-Carbonyl-Kondensation führt zu Schiffbasen (Azomethinen). Durch nukleophilen Angriff der PE-Aminogruppe auf die Glucose-Carbonylgruppe entsteht unter Wasserabspaltung das Schiff-PE, das als Imin in 2 isomeren Formen (syn und anti) vorkommt. Über die Oxo-Cyclo-Tautomerie bildet sich aber insbesondere die Halbaminal-Struktur aus, die in der stabileren β -Form vorliegt. In den Erythrocyten von Diabetikern findet man deutlich mehr Schiff-PE (0,18-34,2 mol%) als beim gesunden Menschen (0,012-3,99 mol%) [142]. Glucosylamine können ähnlich der Glucose eine Lobry der Bruyn-Alberda van Ekenstein-Isomerisierung durchlaufen. Diese sogenannte Amadori-Umlagerung ist protonenkatalysiert, findet aber aufgrund des katalytischen Einflusses der Aminokomponenten /Schiffbasen bereits unter neutralen Bedingungen statt [143]. Das Glucose-Amadori-PE ist ein Fructose-Derivat, als solches hydrolysestabil und bildet 6-Ring und 5-Ring-Halbacetale. Erythrocyten von Diabetikern enthalten bis zu 0,375 mol% Amadori-PE im Vergleich zu 0,018-0,055 mol% bei Gesunden [142]. In Lebensmitteln findet sich Amadori-PE (A-PE) insbesondere in Trockenprodukten –z.B. in Eipulver [239] oder Milchpulver für Säuglinge (100 ppm) [179]– aber auch in Sojamilch (250 ppm) [179]. In sprühgetrocknetem Eigelb und den daraus gewonnenen Lecithinprodukten liegt ca. $\frac{1}{4}$ der im Eigelb enthaltenen Glucose als Amadori-PE vor

[239]. Dies entspricht einer PE-Derivatisierung von 11-16 mol%. Schiff-PE und Pyrrol-PE (HMF-N-Derivat – thermisches Abbauprodukt des A-PE) sind nur in geringen Mengen enthalten [239]. Die Oxidation von Amadori-Produkten führt zu Dicarbonyl-Verbindungen. Kawakishi et al. [116] fanden als Hauptprodukt der Oxidation von Amadori-Alanin (pH 7,2 / 40°C) mit Cu^{2+} ($50\mu\text{mol l}^{-1}$) das D-Glucoson. Der Nachweis gelang direkt und als Chinoxalin-Derivat. Die Ergebnisse werden von Liedke bestätigt [146]. Bei pH 7 und 40°C baut sich Fru-Ala unter Cu^{2+} – Zugabe binnen 24h zu ca. 50% zu D-Glucoson ab. Die Oxidation soll über ein mesomerie-stabilisiertes Endiol-Radikal ablaufen (vgl. Abb. 5.7). Nach Miyazawa et al. reduziert das Amadori-PE (als 2,3-Endiol) Fe^{3+} zu Fe^{2+} welches dann prooxidativ wirkt [180]. Dem primär gebildete Schiff-PE (bzw. -Glucosylamin) steht in der frühen Phase der Maillard-Bräunung neben der Amadori-Umlagerung der Reaktionsweg über die Retroaldoladdition (Aldolspaltung) offen. Die Retroaldoladdition ist die Umkehrung der Aldoladdition und wird ebenfalls durch Basen katalysiert. Die Aldoladdition selbst ist die nukleophile Addition eines Enolat-Ions an die Carbonylgruppe einer undissoziierten Carbonylverbindung. Dabei entsteht eine -Hydroxycarbonylverbindung. Der einfachste enolisierbare Aldehyd, der Acetaldehyd, bildet so durch Reaktion mit sich selbst 3-Hydroxybutanal (Aldol). Bei höheren Temperaturen kommt es zur Wassereliminierung und es entsteht trans-2-Butenal (Crotonaldehyd – ungesättigter Aldehyd). Die Gesamtreaktion bezeichnet man als Aldolkondensation. Sie führt zu einer neuen C–C-Bindung. Wird eine Mischung von 2 verschiedenen Aldehyden mit Base behandelt sind 4 Aldolprodukte möglich, so dass die Reaktion zu komplexen Produktgemischen führt. Die intramolekulare Aldolkondensation von Diketonen eignet sich hingegen gut für die Herstellung von 5- und 6-Ringen. 3-, 4- und 7er-Ringe bilden sich aus energetischen Gründen nicht [229]. Das zur Ausfällung von Phospholipiden verwendete Aceton unterliegt ebenfalls der Aldolkondensation. Die einleitende Aldoladdition zweier Acetonmoleküle führt zum „Diacetonalkohol“ (4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone). Die Reaktion ist nur leicht endotherm und daher umkehrbar (Retro-Aldoladdition). Unter basischen Bedingungen bildet sich ein echtes

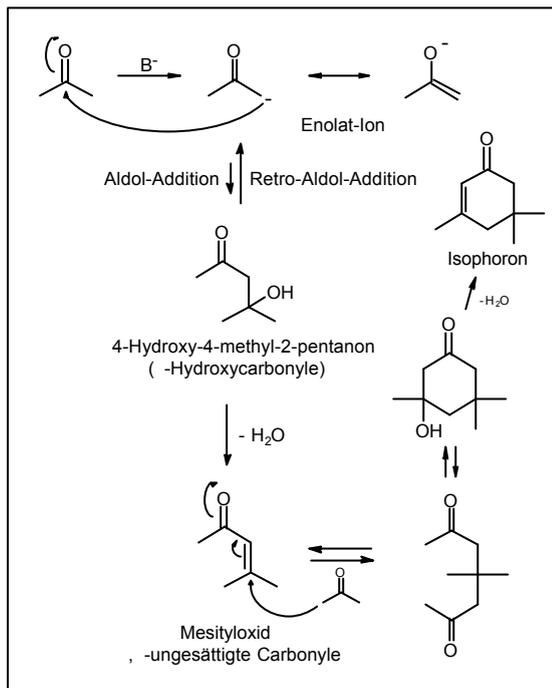


Abbildung 5.5 Aldolkondensation von Restaceton

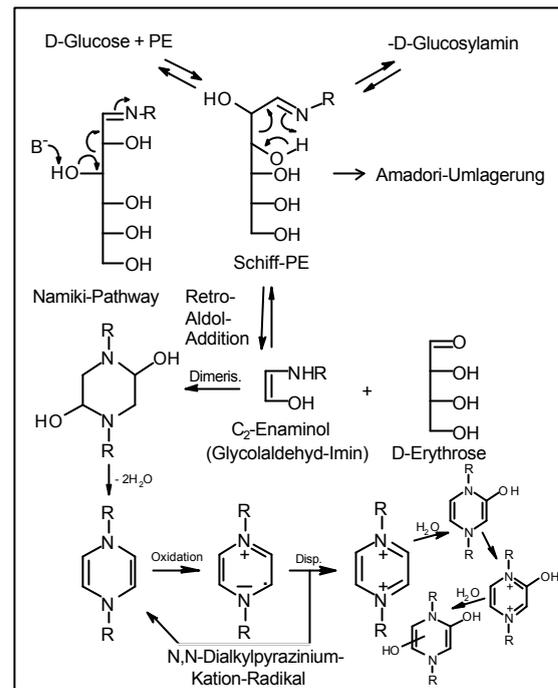


Abbildung 5.6 Retroaldoladdition, Namiki-Weg

Gleichgewicht aus, in dem ca. 95% Aceton und 5% Diacetonalkohol nebeneinander vorliegen [244]. Die thermische Wasser-Eliminierung führt zum α,β -ungesättigten Mesityloxid, welches in Phospholipiden nachgewiesen werden kann (vgl. Tab. 3.2 S. 36) [48]. Die Addition eines weiteren Moleküls Aceton an Mesityloxid führt über das β -Dicarbonyl und dessen intramolekulare Aldolkondensation schließlich zur 6-Ring-Verbindung Isophoron, die ebenfalls in acetongefällten Phospholipiden vorkommt [228].

Das Schiff-PE ist seinerseits ein „quasi“- β -Hydroxycarbonyl und unterliegt so auch der basenkatalysierten Retroaldoladdition. Diese Aldolspaltung wird durch die basische Eigenschaft des Stickstoffs im Molekül initiiert und führt zum Glycolaldehyd-Imin. Namiki et al. konnten 1975 durch die Auswertung der Hyperfeinstruktur von ESR-Spektren von Maillard-Reaktionsgemischen N,N' -Dialkylpyrazinium-Kationen-Radikale nachweisen [172]. In Reaktionsgemischen, die die entsprechenden Amadori-Verbindungen enthalten, fanden sie hingegen keine Pyrazinium-Kationen-Radikale [173]. Namiki und Hayashi gehen deshalb davon aus, dass die Radikale vor der Bildung der Amadori-Produkte aus den Glycosylaminen über die Aldolspaltung und die Kondensation von 2 Molekülen Glycolaldehyd-Imin gebildet werden. Die Radikale bilden sich oxidativ bereits während der ersten Erhitzungsminuten noch vor den Amadori-Produkten und bevor die Bräunung einsetzt [95]. Für PE und PS sind

solche Verbindungen bislang nicht bekannt. Es ist allerdings anzunehmen, dass sie die Lipidperoxidation beeinflussen [174]. Pyrazinium-Kationen-Radikale sind wenig stabil. Da sie sowohl oxidiert als auch reduziert werden können, bauen sie sich primär über Disproportionierung zum Dialkyl-dihydropyrrazin und dem Dialkyl-dikation (Diquat) ab, wobei die Dihydroverbindung durch weitere Oxidation wieder in das Kationen-Radikal übergeht. Diquat kann sowohl Wasser als auch Methanol anlagern. Dabei bilden sich Mono- und Dihydroxy-Dihydroverbindungen, bzw. die entsprechenden Methoxy-Derivate [95]. Untersuchungen von Hofmann et al. mit dem Diethyl-Diquat zeigen, dass sich bei Erhitzung auf 95°C schon binnen der ersten 5 Minuten parallel zum Abbau des Kationradikals (ESR) eine Bräunung entwickelt [95]. Auch in einem Ansatz von Glycolaldehyd mit Ethanolamin erhielten sie bereits in den ersten Erhitzungsminuten Dialkylpyrrazinium-Kationen-Radikale, die bei ca. 5 Minuten ein Maximum durchlaufen und sich dann mit vergleichbarem Bräunungsverlauf abbauen. Die Hydroxy-Hydropyrrazin-Verbindungen werden aufgrund ihrer starken Nucleophilie und der damit einhergehenden Kondensationsreaktion mit Elektrophilen als Schlüsselstrukturen der Bräunung angegeben. Im Übrigen neigen auch Schiff-Basen selbst zur Polymerisierung [13].

Eine weitere Verbindung, die bereits in der frühen Phase der Maillard-Bräunung gebildet wird, ist das Glyoxal. Es ist das Spaltungsprodukt der Retroaldoladdition des D-Glucosons, das sich aus dem Enaminol der Schiff-Base durch Oxidation in Konkurrenz zum Amadori-Umlagerungsprodukt bildet [95]. Letzteres kann ebenfalls durch Oxidation D-Glucoson bilden [251]. Namiki und Hayashi [81] nehmen an, dass Glycolaldehyd unter Anwesenheit von Aminosäuren zu Glyoxal bzw. Glyoxal-Imin oxidiert wird. Desweiteren sollen die Dialkyl-Pyrrazinium-Kationenradikale nach Oxidation Glyoxal und dessen N-Analoga freisetzen [143]. Bei Erhitzung von Glucose/Alanin-Lösung auf 100°C geht die Bildung von Glyoxal der Bildung der Folgeprodukte des Amadori-Produkts (1-DH, 3-DH) voraus [95]. Glyoxal durchläuft bei 15-20 Minuten ein frühes Maximum, wird dann aber schnell abgebaut; Glycolaldehyd wird nur wenig gebildet. Glyoxal entsteht sowohl in Glu./Ala.-Lösung, als auch aus dem entsprechenden Amadori-Produkt vornehmlich unter O₂-An-

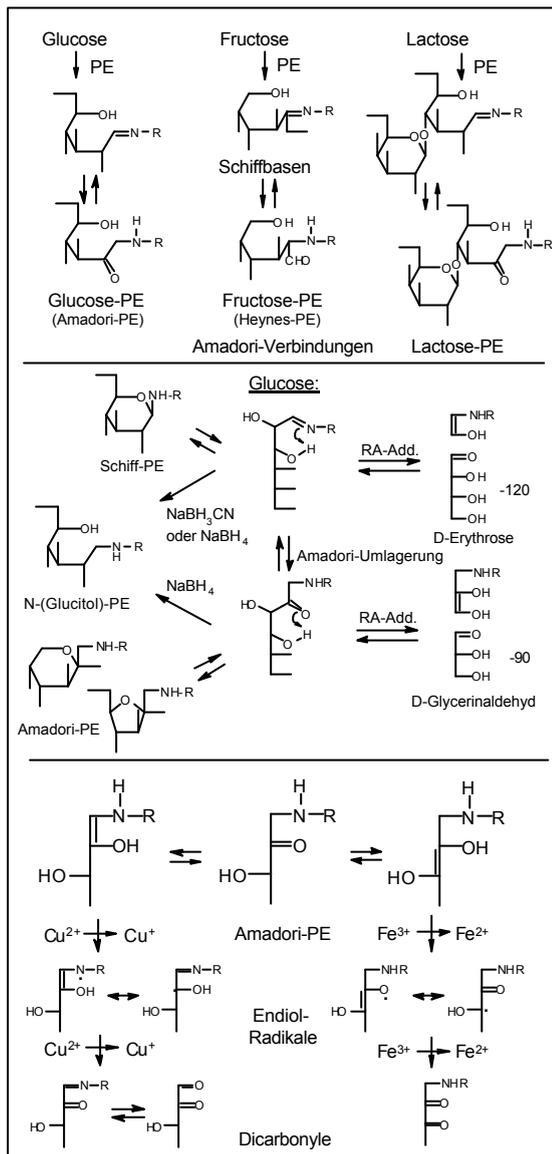


Abbildung 5.7 Amadori-Verbindungen verschiedener Zucker, Aldol-Spaltung, Redoxverhalten [146, 180]

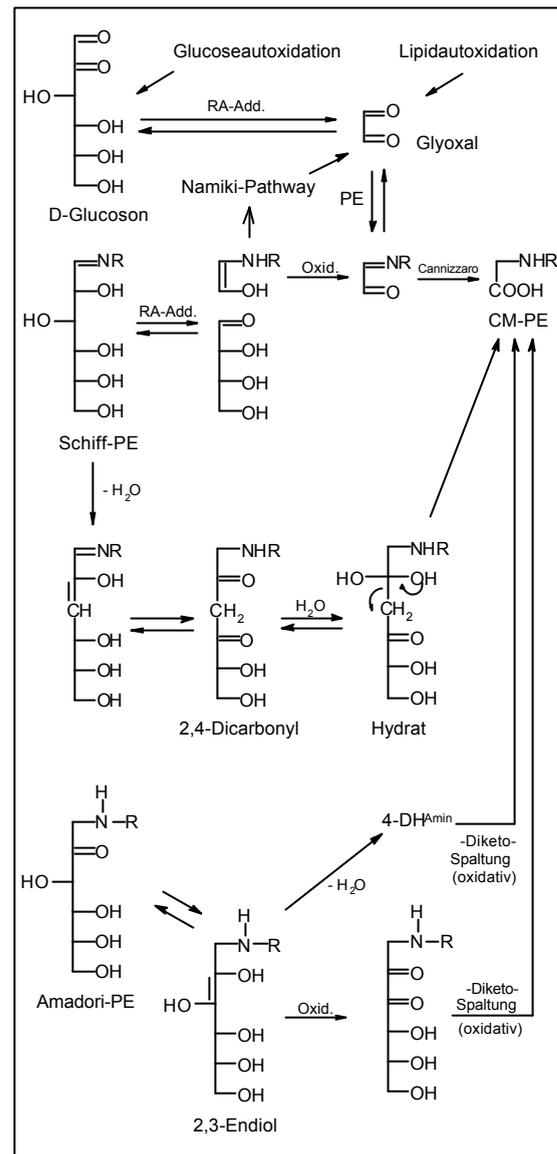


Abbildung 5.8 Carboxymethyl-PE (CM-PE) [54]

wesenheit. Es ist als α -Dicarbonyl wenig stabil und geht z.B. als Imin der α -Aminogruppe von Lysin über eine intramolekulare Cannizzaro-Reaktion in das stabile Carboxymethyl-Lysin über [54,65] (Carboxymethyl-Lysin: CML, Carboxymethyl-PE: CM-PE). CML ist säurestabil und liegt im Körper proteingebunden vor [1]. Der Gehalt in den einzelnen Geweben nimmt mit dem Alter der Proteine zu [143]. Medizinisch erfasst wird es mittels ELISA und dient als Markersubstanz für die Belastung biologischer Systeme mit „advanced glycation endproducts“ [201]. Mögliche Bildungswege für CM-PE sind in Analogie zum CML in Abb. 5.8 zusammengestellt. Aus dem Amadori-PE ist die Bildung über 2,3-Enolisierung und Dehydratisierung über die sogenannte oxidative α -Dicarbonylspaltung möglich. Hierbei werden zwei benachbarte Carbonylgruppen zu Carboxylgruppen oxidiert, so dass neben CM-PE

Erythronsäure entsteht. Über die Wassereliminierung aus dem Schiff-PE bildet sich zunächst ein α -Dicarbonyl, dessen Spaltung (α -Dicarbonylspaltung) über ein Hydrat verläuft [65]. Von CM-Lysin ist bekannt, dass es sich auch aus Ascorbat über Dehydroascorbat und N-Treuloselysin unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4; 37°C) bildet [36]. Fu et al. [57] stellen einen Zusammenhang zur Lipidperoxidation her, indem sie nachwiesen, dass CML auch bei der metallionenkatalysierten Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren unter Proteinanwesenheit gebildet wird. Goldberg et al. [67] haben die CML-Gehalte in 250 verschiedenen Lebensmitteln bestimmt. Die höchsten Gehalte wurden in der „Fettgruppe“ –insbesondere bei Butter, Olivenöl und Mayonnaise– gefunden. Die Verbindung Carboxyethyl-Lysin (CEL) konnten Ahmed et al. 1997 u.A. durch Inkubation von Rattencollagen mit Glucose nachweisen [2]. Die Verbindung entsteht bei der Reaktion der Lysinseitenkette mit Methylglyoxal (aus der Aldolspaltung von 3-DH) über das Imin der Oxogruppe und die entsprechende Cannizzaro-Disproportionierung zum Carboxyaminol. Lederer et al. fanden CM-PE bzw. CE-PE weder in sprühgetrocknetem Eigelb und daraus hergestellten Lecithinprodukten [239] noch in biologischen Proben (Erythrocyten von Diabetikern) [142].

Schiff-PE und sein isomeres Amadori-PE können aufgrund der unterschiedlich verlaufenden Aldolspaltung anhand der MS-Fragmentierungsmuster unterschieden werden. Schiff-PE spaltet das Fragment 120 (Erythrose), Amadori-PE dagegen das Fragment 90 (Glycerinaldehyd) ab [239]. Beide Verbindungen können mit NaBH_4 zum entsprechenden N-(Glucitol)-PE reduziert werden [180]. Das Schiff-PE wird im Gegensatz zum A-PE bereits durch das schwächere Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid (NaBH_3CN) reduziert [180].

Über das aus Fructose mögliche Heynes-PE ist in der Literatur nicht zu finden. Heynes-Verbindungen sind als Aldehyde reaktiver als Amadori-Produkte und neigen dazu über weitere Iminbildung in die Amadori-Verbindungen überzugehen [143]. Lactose-PE fand man in Milch und Milchpulverprodukten in Mengen bis zu 100 ppm [179]. Der HPLC-Nachweis gelang Miyazawa et al. nach UV-Derivatisierung der Carbonylgruppe mit 3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazin (MBTH) [179].

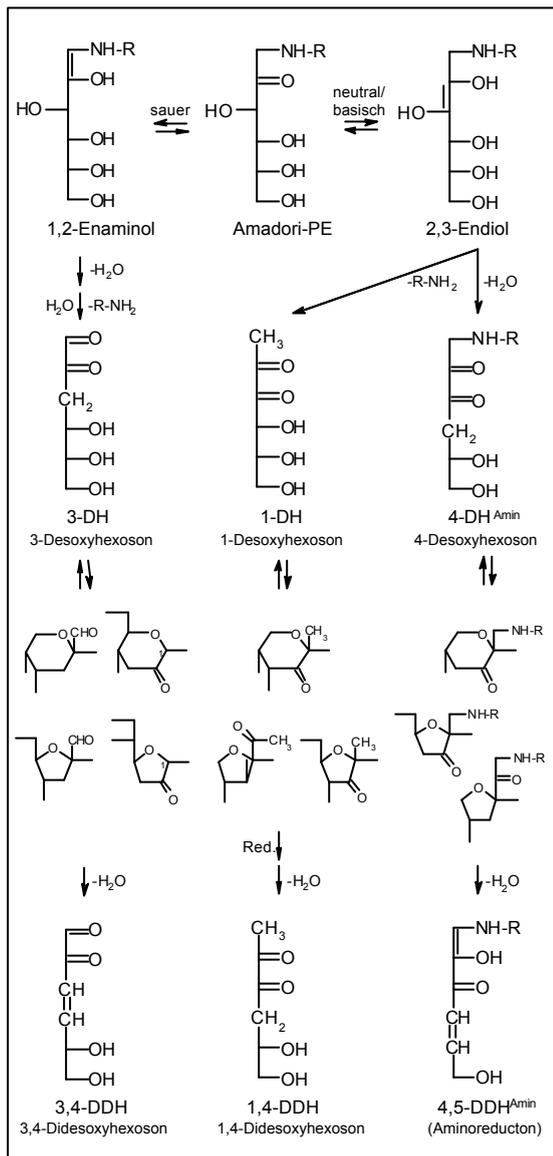


Abbildung 5.9 fortschreitende Dehydratisierung (vinyloge - Eliminierung); Desoxyosone und Didesoxyosone [143]

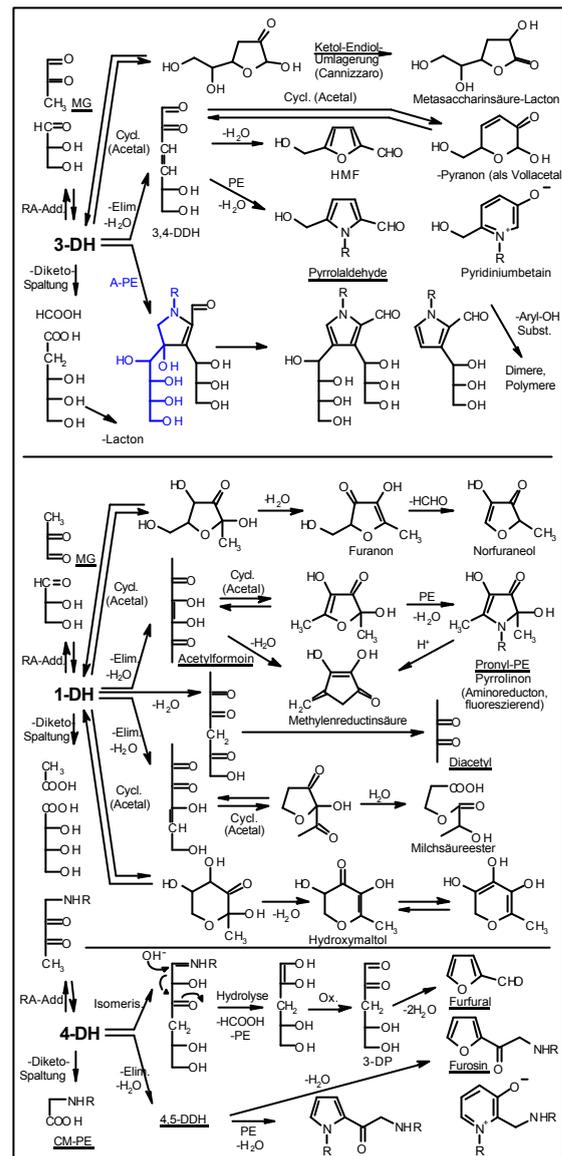


Abbildung 5.10 Folgeprodukte der Desoxyosone [11]

Amadori-Produkte reagieren in der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion unter Wasserabspaltung zu Desoxyosonen und Didesoxyosonen. Das aus Glucose gebildete Amadori-PE bildet 3-Desoxyhexoson (3-DH), 1-Desoxyhexoson (1-DH) und 4-Desoxyhexoson (4-DH) [11,143]. Die Desoxyosone gelten als Schlüsselverbindungen der Maillard-Bräunung. Unter sauren Bedingungen wird bevorzugt 3-DH gebildet; in neutraler bis basischer Umgebung entsteht über das 2,3-Endiol bevorzugt 1-DH [250]. Die Desoxyosone liegen wie die Zucker als cyclische Halbacetale vor. Ihre Aldospaltprodukte, die Produkte der oxidativen -Diketosplaltung und die cyclischen Produkte der weiteren Dehydratisierung sind in Abb. 5.10 zusammengestellt. Das 3-DH bildet durch Wasserabspaltung und Cyclisierung leicht Hydroxymethylfurfural (HMF), welches in Honig dessen Erhitzung anzeigt. Die

ebenfalls gebildete 6-Ring-Verbindung α -Pyranon ist nur als Vollacetal stabil und neigt zur Polymerisation [11]. Bei Anwesenheit primärer Amine wird kein HMF, sondern (neben dem 6-Ring-Pyridinium-Betain) der entsprechende Pyrrolaldehyd gebildet. Mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin bildet sich das Pyrralin, mit PE das Pyrrol-PE. Lederer et al. fanden geringe Mengen Pyrrol-PE in sprühgetrocknetem Eigelb [239]. Die Pyrrolstruktur ist säurelabil [54]. In Modellstudien haben Henle et al. 1993 gezeigt, dass die Pyrralin-Bildung unabhängig von der frühen Phase der Maillard-Reaktion (Bildung und Abbau des Amadori-Produkts) ist [86]. Daher stammt das als Precursor fungierende 3,4-Didesoxyhexoson (3,4-DDH) vorrangig aus dem direkten Zuckerabbau, der Karamellisierung. Die Kondensation von 3-DH mit dem Amadori-Produkt führt zu weiteren Pyrrolaldehyden. Da sämtliche OH-Gruppen in α -Stellung zum Pyrrol-Ring leicht nukleophile Substitutionsreaktionen eingehen, neigen auch diese Strukturen zur Polymerisation [11]. Die Lobry de Bruyn–Alberda van Ekenstein–Umlagerung der C1-furanoiden Form des 3-DH's führt zum Metasaccharinsäurelacton [143].

1-DH ist reaktiver als 3-DH und daher auch schwerer nachzuweisen. Es besitzt wie das 4-DH eine Reductonstruktur. 1-DH reagiert vor allem über seine C2-furanoide Struktur durch Wasserabspaltung zu Furanon, welches zu Norfuranol abgebaut wird. Die über Acetylformoin mögliche Pyrrolinon-Struktur: Pronyl-PE ist bisher nicht nachgewiesen worden. Bekannt sind derartige Strukturen von der Lysinseitenkette. Pronyllysin ist fluoreszierend und wirkt antioxidativ (Aminoreducton, Pyrrolinon-reductonyl-lysin) [148]. Es kommt z.B. in Brotrinde (60 ppm) vor. Das reaktive Acetylformoin ist selbst ein Redukton. In der offenkettigen Form wird seine Endiol-Struktur sogar durch 2 Carbonylgruppen aktiviert (H-Brücken). 1-DH gilt auch der Precursor von Methylenreductinsäure, Diacetyl, α -Hydroxypropionsäure-Lactat und Hydroxymaltol [11]. Die oxidative α -Diketospaltung führt zu den zwei Säuren: Essigsäure und Erythronsäure. Ein 2006 von Blank et al. formulierter Mechanismus der Reaktion geht von einem O_2 -Angriff auf eine der beiden Carbonylgruppen aus, gefolgt von einer Umlagerung entsprechend der Baeyer–Villiger Oxidation (O-Insertierung zwischen die beiden Carbonyl-Gruppen-C's) und der abschließenden Hydrolyse des entstandenen Säureanhydrids [33]. Alternativ wird auch ein Weg durch

Angriff von Hydroperoxiden diskutiert. Das primär gebildete Additions-Produkt (an einer der Carbonylgruppen) soll mit der andere Carbonylgruppe einen Epoxid-Übergangszustand bilden, der ebenfalls zum hydrolysierbaren Säureanhydrid führt. Die Wanderung der Carbonylgruppen innerhalb der C-Kette im 1-DH führt über das 2,4-Dicarbonyl (2,4-Dicarbonyl) zum 3,4-Dicarbonyl. Dieses 3,4-Dicarbonyl unterliegt auch der 3,4-Diketospaltung, die hier zu den C3-Fragmenten: Milchsäure und Glycerinsäure führt. Das 2,4-Dicarbonyl-Isomer seinerseits kann rein hydrolytisch gespalten werden. Je nachdem ob OH^- an C2 oder C4 angreift, bildet sich Essigsäure und Erythrulose (C2) bzw. Acetol (Hydroxyaceton) und Glycerinsäure (C4). Hierbei ist der Weg zur Tetrulose (C4-Fragment) bevorzugt [33]. Nach Glomb et al. [64] kann die Erythrulose über ihr 1,2-Endiol analog zur Glucose zum Threoson oxidiert, oder zum 3-DT –bzw. über das 2,3-Endiol zum 1-DT– dehydratisiert werden.

Das 4-DH^{Amin} bildet über die Isomerisierung (Enolisierung) ein 1,3-Dicarbonyl^{imin}, dessen Hydrolyse (1,3-Dicarbonylsplaltung) zu Ameisensäure und dem C5-Endiol führt und aus dessen Oxidation 3-Desoxypentose (3-DP) hervorgeht. 3-DP entsteht nach [98] insbesondere bei der Maillard-Bräunung oligomerer Zucker. Die Verbindung ist ein 1,3-Dicarbonyl und zeigt auch analog die für 3-DH typischen Reaktionen: die Retradoladdition führt zum Methylglyoxal, die Dehydratisierung/Cyclisierung führt zum Furfural. Das 4-DH^{Amin} bildet weiterhin durch die oxidative 3,4-Diketospaltung CM-Derivate; auf dem Weg der Wassereliminierung entsteht bevorzugt Furosin. Während in roher und pasteurisierter Milch praktisch kein Furosin enthalten ist, enthält das Protein der Sterilmilch bis zu 1,2% Furosin [54]. Vergleichbare Werte findet man in Milchpulver, Nudeln, und Backwaren [54]. Die Pyrralingehalte (aus dem 3-DH-Weg) liegen in der Regel wenigstens um den Faktor 10 darunter. In einigen Backwaren findet man auch höhere Werte. CML-derivatisierte Proteine finden sich in Milchpulver und Backwaren mit bis zu 0,3% [54]. Nach Krause [132] liefert die saure Hydrolyse (6N HCL, 23h, 110°C) des Glucose-Lysin-Amadori-Produkts (Fr-N-Lys) überwiegend Lysin (56%). Daneben bilden sich ca. 30% Furosin, ca. 15% Pyridosin und ca. 2% CML. Pyridosin bildet sich auch aus dem Lactose-Lysin-Amadori-Produkt (N-Lactuloselysin) [217]. Die Verbindung ist dem Maltosin isomer. Maltosin selbst bildet sich wie Maltol aus Disacchariden. Maltol ist am

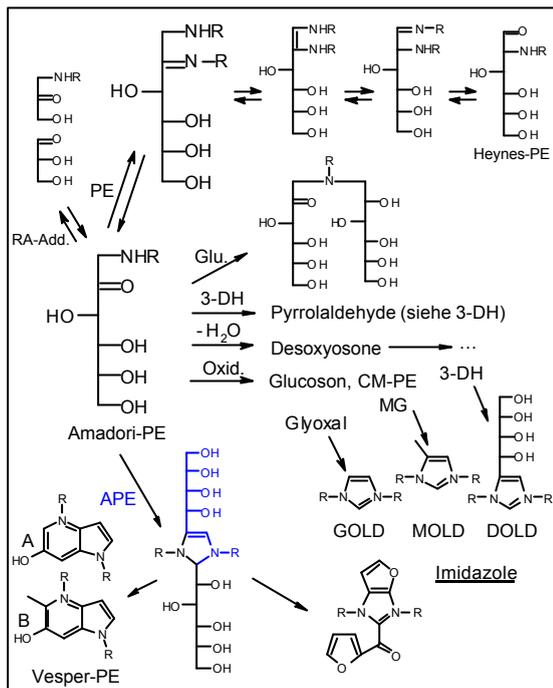


Abbildung 5.11 Reaktionen von Amadori-PE, Imidazole

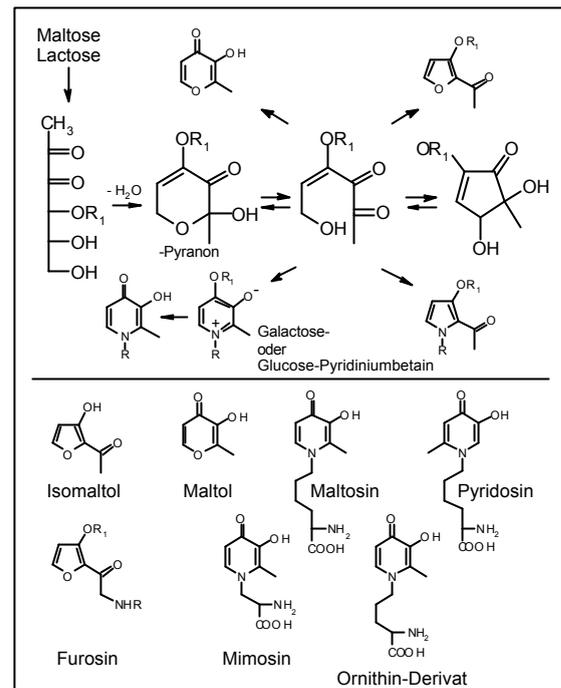


Abbildung 5.12 Isomaltol und Maltol (3-Hydroxy-4-pyranon) sowie N-Derivate (3-Hydroxy-4-pyridinone) [131]

Backaroma von Keksen und Brot maßgeblich beteiligt und ist auch als Aromaverstärker (AromV, 2006) in einer Menge von bis zu 10 ppm zugelassen. Maltol bildet sich über das 1-DH-Derivat bei starker Erhitzung (Karamellisierung) von Maltose und Lactose, oder auch amin-katalysiert über die Maillard-Bräunung [143]. (Das 1-DH der Hexosen selbst bildet kein Maltol, sondern Hydroxymaltol.) Die -Eliminierung von H_2O am C5 nach Enolisierung des Galactosyl- bzw. Glucosyl-1-DH's führt zum 1,5-DDH-Derivat. Dessen C2-pyranoiden Halbactalstruktur bildet das Maltol-Grundgerüst (-Pyranon-Verbindung). Die protonenkatalysierte Acetal-spaltung des Galactose- oder Glucose-Restes führt unter Wasserabspaltung zum Maltol [217]. Eine weitere für Lactose typische Maillard-Verbindung ist das acetalgebundene Isomaltol [143]. Sowohl das aus Maltose gebildete Glucosyl-Isomaltol, als auch das aus Lactose entstehende Galactosyl-Isomaltol wurden in Gebäck zu 4,1 ppm bzw. 7,5 ppm bestimmt [148]. Unter Beteiligung von primären Aminen entstehen in der Maillard-Bräunung anstelle von Maltol auch die entsprechenden 3-Hydroxy-4-pyranon-N-Derivate (3-Hydroxy-4-pyridinone). Ledl et al. [143] formulieren als Zwischenprodukt (Reaktion mit n-Propylamin) das entsprechende Galactose bzw. Glucose-Pyridiniumderivat. Nach Kramhöller et al. [131] liegen schon nach kurzer Erhitzung einer wässrigen Lösung

von Maltose oder Lactose mit primären Aminen das α -Pyranon als Hauptprodukt, und das Cyclopentenon als Nebenprodukt vor. Die Stabilisierung führt zu 3-Hydroxy-4-pyridinonen und Glycosyl-Pyrrolen. Bei Abwesenheit von Aminen bildet sich Galactosyl- bzw. Glucosyl-Isomaltol als Hauptprodukt [131]. Maltol, Maltosin und Pyridosin besitzen aufgrund ihrer 3-Hydroxy-4-pyranon- bzw. α -pyridinon-Struktur gute Komplexbildungseigenschaften (Fe^{3+} : $\lg K_1 = 11,5^{\text{Maltol}}$; $23,6^{\text{Maltosin}}$; $20,7^{\text{Pyridosin}}$) [217]. Fe^{3+} bildet mit ihnen 1:3 Komplexe. Wie man an den Komplexbildungskonstanten sehen kann, ist die Schwermetall-Affinität der Aminosäurederivate größer. Die Aminofunktion in den Komplexen von Maltosin und Pyridosin sind im sauren nicht protonierbar und muss somit direkt an der Koordination beteiligt sein [217]. Entsprechendes kann man auch für die PE- bzw. PS-Derivate erwarten. Das 3-Hydroxy-4-pyridinon-Strukturelement kommt in Form der Aminosäure Mimosin auch natürlich vor ($\lg K_1(\text{Fe}^{3+}) = 18,9^{\text{Mimosin}}$) [217]. In den Blättern und Samen von Mimosengewächsen macht es bis zu 4% der Trockenmasse aus. Nach Ledl et al. [143] erhält man aus Maillard-Produkten mit einer Carbonylgruppe, α -ständig zu einer Enolgruppe in Gegenwart von Metallen oft farbige Komplexe (rot, violett, blau). Die Reaktion von Amadori-Verbindungen untereinander führt zu Imidazol-Strukturen. In Analogie zu den aus Glyoxal-, Methylglyoxal- und 3-DH- gebildeten Lysin-Dimeren: GOLD, MOLD und DOLD (Abb. 5.11), sind auch bei PE bzw. PS entsprechende Imidazol-Strukturen zu erwarten.

Die Maillard-Bräunung wird häufig über die Extinktion der Probelösungen bei 420nm verfolgt, die jedoch für verschiedene Kohlenhydrat- und Aminkomponenten keine Vergleiche zulässt [143]. Generell wird heute davon ausgegangen, dass durch Kondensationsreaktionen von nukleophilen/elektrophilen Intermediaten der Reaktion durchkonjugierte braune Strukturen entstehen [11]. Desoxyhexosen sind durch ihre CH-acide Struktur wichtige nukleophile Intermediate. Furan – bzw. Pyrrol-Aldehyde sind gute Elektrophile. In einem speziellen Modellsystem konnte das primäre Kondensat von 3,4-DDH und HMF als gelbe Verbindung isoliert werden (Abb. 5.13) [143]. Bei Einsatz von Pentosen bildet sich das analoge 3,4-DDP/Furfural-Derivat. Das reaktivere 1-DH reagiert über seine Abbauprodukte –wie z.B. Acetylformoin,

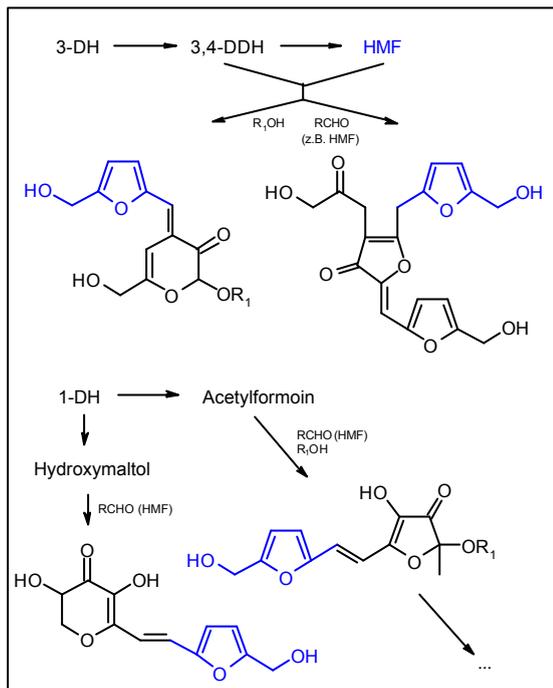


Abbildung 5.13 Bräunungskondensate unter Beteiligung von Furan/Pyrrol-Aldehyden, beispielhaft für HMF [143]

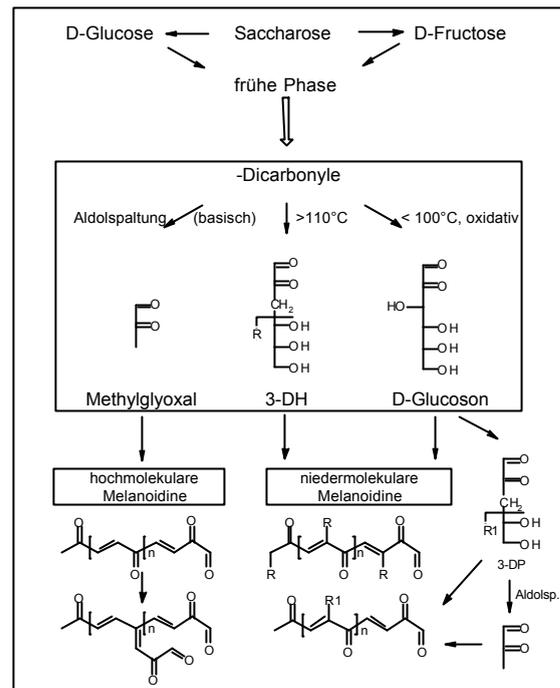


Abbildung 5.14 Bräunung durch Aldolkondensation von -Dicarbylen [50]

Methylenreductinsäure oder Hydroxymaltol- zu gelben HMF-Primärkondensaten [144]. Die beiden in der Abbildung dargestellten Acetal-Kondensate sind als Halbacetale zu reaktiv und bilden Folgeprodukte; sie sind daher nur als Vollacetale (z.B. in Ethanol) auf dieser Stufe isolierbar [143]. Hofmann hat ein Furfuralkondensat aus 4 Furfuralmolekülen an der -Aminogruppe von Lysin als chromophore Gruppe nachgewiesen [96]. Das gleiche rötliche Strukturelement bildet sich auch aus Furfural bei Reaktion mit Alanin aus [11]. In der finalen Phase der Maillard-Reaktion kommt es zur Ausbildung von hochmolekularen stickstoffhaltigen braunen Verbindungen, den Melanoidinen. Neben wasserunlöslichen Pigmenten können Melanoidine in niedermolekulare und höhermolekulare (>12.400D) Fraktionen aufgetrennt werden [245]. In Modelluntersuchungen zur Bräunung von Saccharose konnte Fiedler [50] bei der Bestimmung der Molekülgrößenverteilung 3 diskrete Melanoidindomänen ausmachen, die sich in Abhängigkeit von Temperatur und Erhitzungszeit ausbilden. Durch Dotierungsversuche mit -Dicarbylen konnte er zeigen, dass ausgehend von Methylglyoxal bevorzugt die höhermolekulare Struktur gebildet wird, wohingegen ausgehend von 3-DH und D-Glucoson eine niedermolekulare Domäne gebildet wird. Das Bräunungspotential von Methylglyoxal ist deutlich größer als das von 3-DH, welches aber stärker bräunt als D-Glucoson [50]. Methylglyoxal als solches ist eine gelbe Flüssigkeit vom Siedepunkt 72°C, die leicht polymerisiert. Unter basischen

Bedingungen findet die intramolekulare Disproportionierung zu Milchsäure (Spezialfall der Cannizzaro-Reaktion) statt [13]. Durch intermolekulare Cannizzaro-Reaktion bildet Methylglyoxal neben Brenztraubensäure Acetol, welches mit weiterem MG zur C6-Struktur DMHF (Dimethylhydroxyfuranon) reagiert –das im Unterschied zum Furanon nicht die Seitenketten-OH-Gruppe besitzt [247]. Strukturell wird von Cämmerer u. Fiedler für die Melanoidine ein durchkonjugiertes Aldolkondensat diskutiert, welches im Falle des MG's zunehmend an den Carbonylgruppen Seitenkettenverzweigungsreaktionen eingeht [26,50]. Bei der Kondensation von 3-DH selbst, stabilisieren die Zuckeralkoholreste die Carbonylgruppen durch Acetalbildung. Letzteres gilt auch für D-Glucoson. Dieses generiert über Gluconsäure u.a. Ameisensäure und Arabinose. Letztere reagiert unter Dehydrierung zu 3-DP, welches durch Aldolspaltung MG bildet, das mit 3-DP eine gemischte Kondensat-Struktur ausbilden soll [50].

Melanoidinstrukturen wie sie bei der Röstung von Glucose/Glycin bei 120°C entstehen, besitzen in Fetten im Gegensatz zu wässrigen Systemen praktisch keine antioxidative Wirksamkeit [245]. Die höhermolekulare Fraktion (>12,400D) besitzt die höchste ABTS-Aktivität, gefolgt von der unlöslichen Fraktion und der Niedermolekularen. Von den heterocyclischen Verbindungen der Maillard-Reaktion ist bekannt, dass Pyrrole stärker antioxidativ wirken als Furane [131]. Formyl- oder Acetyl-Seitenketten erhöhen bei den Pyrrolen die antioxidative Aktivität, haben aber bei einfachen Furanen keinen Einfluss. Bei den Furanonen wird der antioxidative Effekt auf die -OH-Gruppe zurückgeführt [245]. Die fluoreszierenden Pyrrolinone (Aminoreductone) reagieren im Sauren zu Methylenreductinsäure [143]. Diese ist schwer nachweisbar, da sie sehr reaktiv ist. Neben Dimeren bilden sich vor allem Kondensate mit anderen Carbonylen [143]. Stark antioxidativ wirken die bereits diskutierten Reductone (1-DH, Acetylformoin, Methylenreductinsäure oder 4,5-DDH). Wie Ascorbinsäure lassen sich derartige Verbindungen über HPLC mit elektrochemischer Detektion bestimmen. Mit Hydrazinen bilden Reductone gaschromatographierbare Hydroxypyrazole. Carbocyclische Reductone –wie z.B. Methylenreductinsäure– bilden keine Pyrazole; man kann sie aber mit Methanol/Toluolsulfonsäure in flüchtige Methoxyderivate überführen [143].

5.2. Untersuchungen und Ergebnisse

Das Phänomen der Wechselwirkungen von Zuckern mit Amino-Phospholipiden und des daraus resultierenden erhöhten synergistischen Effekts mit primären Antioxidantien wurde bereits im Abschnitt 4.3.3. (S. 126ff) im Vergleich zum Effekt der Ascorbinsäure beschrieben. Die Regeneration von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon verläuft über ein Zwischenprodukt (Abschnitt 4.3.3.d., S.136f: Peak bei 8min), das ohne Glucose bzw. Ascorbinsäure nicht beobachtet wurde. Bei Lagerung unter Raumtemperatur verursacht erst eine Vorerhitzung von PE und Glucose für ca. 5min auf 110°C einen stabilisierenden Effekt in Ethyllinolat α -Toc. (Abschnitt 4.3.3.f.). Da nach dieser kurzen Erhitzungszeit nur eine geringe Bräunung zu beobachten ist, kann man annehmen, dass Stoffe aus der frühen Phase der Maillard-Reaktion den Effekt verursachen. Es stellt sich die Frage; ob entsprechende Verbindungen auch bei der Erhitzung der Pflanzenlecithine selbst gebildet werden?

5.2.1. α -Dicarbonyle

Die α -Dicarbonyle, die sich in Ethyllinolat α -stabilisiert mit 0,05% α -Tocopherol– unter Zusatz von 1% Dipal.-PE und 0,5% Glucose bei 110°C bilden, wurden über die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin (OPD) nach Morita et al. [166] bestimmt.

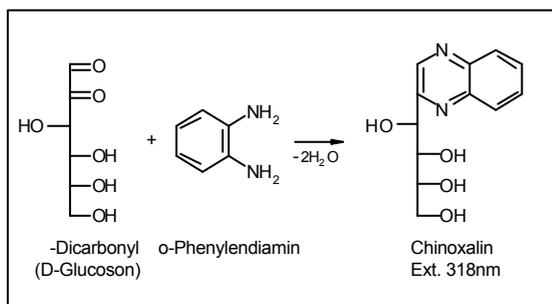


Abb. 5.15 OPD-Reaktion von α -Dicarbonylen

Die Messung erfolgte über HPLC-UV (7.2.7.). Es wurde zum einen präderivatisiert, d.h. es wurde in Anwesenheit des o-Phenylendiamins erhitzt, zum anderen wurde auch ein Nachweis über Postderivatisierung versucht. Bei der Präderivatisierung ergibt sich das Problem, dass das Ethyllinolat vorher abgetrennt werden muss. Dazu wurde es mit Hexan, Chloroform / Methanol, Wasser ausgeschüttelt (7.2.7.). Leider werden hierbei auch die unpolaren Chinoxaline der kurzkettigen α -Dicarbonyle entfernt. Bei der Postderivatisierung wurde die entsprechend erhaltene wässrige Phase mit OPD

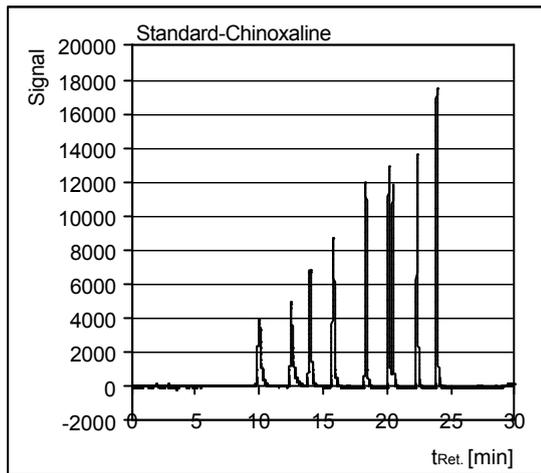


Abb. 5.16 Chinoxaline: D-Glucoson (10min), 1-DH, 3-DH, 3DP, 1,4-DDH, Glyoxal, 1,4-DDP, Methylglyoxal, Diacetyl

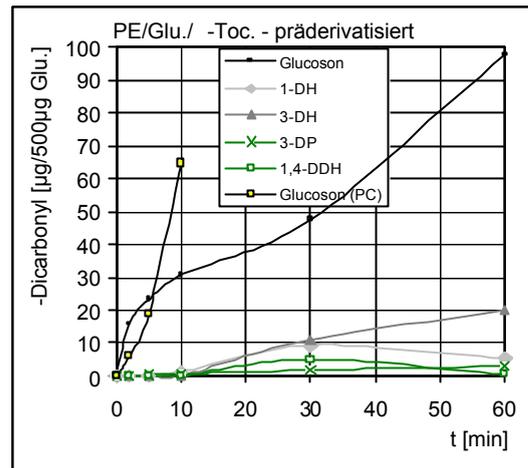


Abb. 5.17 Entstehung von D-Glucoson (Präderivatisierung) bei Erhitzung auf 110°C in Abhängigkeit der Erhitzungszeit

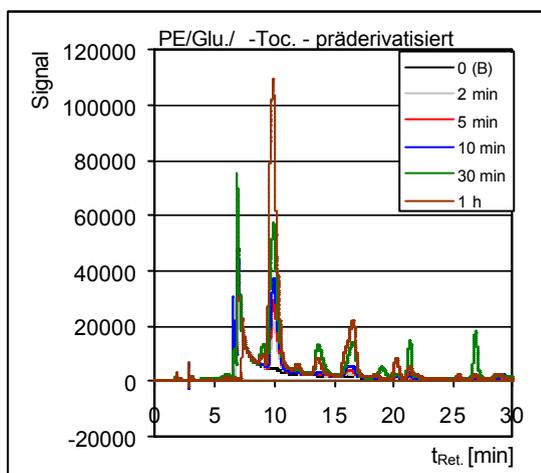


Abb. 5.17a Entstehung von DGlucoson (Präderivatisierung) bei Erhitzung auf 110°C (vgl. Diagramm Abb. 5.16 und 5.17)

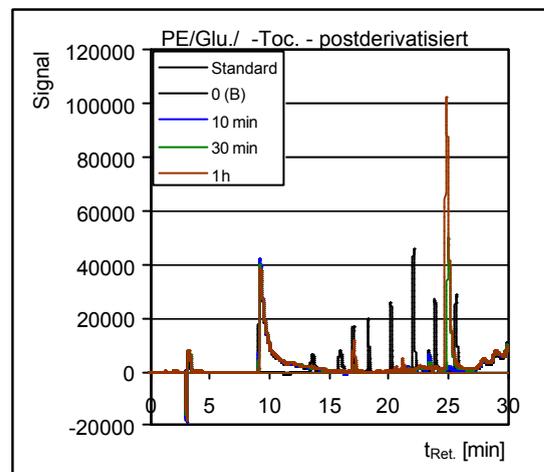


Abb. 5.18 -Dicarbonyle (Postderivatisierung) bei Erhitzung auf 110°C, (anderer Gradient? höhere Retentionszeiten)

umgesetzt. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgte über eine Standard-Mischung der Chinoxaline von je $2,5\mu\text{g ml}^{-1}$. Bei der Präderivatisierung (Abb.5.17/a) entstehen bereits wenige Minuten nach der Erhitzung größere Mengen an D-Glucoson. Nach 2min sind ca. 3% und nach 10min ca. 6% der enthaltenen Glucose zu D-Glucoson oxidiert. Das 3-Desoxyhexoson und das 1-Desoxyhexoson entwickeln sich dagegen nur in kleinen Mengen. In klassischen Maillard-Mischungen von Glucose mit Aminosäuren bildet sich bei diesen Temperaturen eher 3-DH [50,213]. Grund könnten hier die vorliegenden oxidativen Bedingungen sein. Wird das Dipal.-PE durch Dipal.-PC ersetzt, entstehen ebenfalls große Mengen an Glucoson (5.17 gelbe Punkte). Wird statt PE/Glu. nur 1% Sojalecithin (SL1) zugesetzt, entsteht hingegen kein Glucoson. Das zeigt, dass im Sojalecithin keine entsprechenden Precursor-Kohlenhydrate zur Verfügung stehen und der stabilisierende Effekt hier

nicht in einfacher Weise auf die Bildung des Glucosons als Reducton-Struktur erklärt werden kann. Die Stabilisierung, die bei kurzer Erhitzung von PE/Glucose auf 110°C beobachtet wurde (S. 140ff), korreliert andererseits zeitlich gut mit der D-Glucosonbildung. Ein Problem bei der Präderivatisierung ist, dass das OPD die Entstehung des Glucosons beeinflusst und ggf. forciert. Bei der Postderivatisierung (Abb.5.18) lässt sich auch mit PE/Glu. kein Glucoson messen. Es finden sich aber geringe Mengen des relativ stabilen 3-Desoxyhexosons. Interessant ist ein weiterer großer Peak, der aber erst nach längerer Erhitzungszeit mit einer ähnlichen Retention wie Diacetyl im Chromatogramm auftaucht. Der Stoff ist polar genug, um vor der Derivatisierung in die Methanol/Wasser-Phase überzugehen. Es handelt sich um eine Verbindung, die auch bei Abwesenheit von Ethyllinolat entsteht. Es ist ein OPD-Derivat, allerdings kein Chinoxalin. Bei der Präderivatisierung entsteht die Verbindung nicht; möglicherweise wird sie aber auch bei der Entfettung abgetrennt. Wird zusätzlich 2ppm Cu²⁺ zugegeben, entsteht der Stoff in größeren Mengen. Man findet ihn auch unter Zugabe von SL1/Glu./ -Tocopherol; im System PE/Ascorbinsäure/ -Toc. bildet er sich hingegen nicht. Es handelt sich daher wahrscheinlich um ein Glucoseabbauprodukt, das im Verlauf der Bräunung entsteht.

5.2.2. MS-Untersuchung: Amadori-PE

Um einen Überblick über die bei der Bräunung entstehenden Verbindungen zu bekommen wurden MS-Scans der PE/Glu.-Probe durchgeführt (7.4.2.). Hierfür wurden 1000µg Dipal.-PE und 500mg D-Glucose in einem 4-ml-Vial 3h im Trockenschrank bei 110°C erhitzt. Der braune Rückstand wurde durch Zugabe von 1ml Chloroform, 2ml Hexan, 0,25ml Methanol und 0,75ml Wasser in eine polare und eine unpolare Phase aufgetrennt. Die braunen Verbindungen sind in der oberen unpolaren Phase gelöst. Von beiden Phasen wurden MS-Scans im m/z-Bereich 650-1050 und 1300-1600 aufgenommen. Bei der unpolaren Phase wurde auch der Bereich dazwischen abgescannt. Die mit positivem Potential erhaltene Massenspur 855 Da (Abb. 5.19) entspricht den PE-Glu.-Kondensaten, also: Schiff-PE bzw. Amadori-PE (692 + 180 – 18 = 854). Bei negativem Potential erscheint die Struktur bei 853 Da (Abb. 5.19a). Sie findet sich hier auch in der polaren Phase (Abb. 5.20).

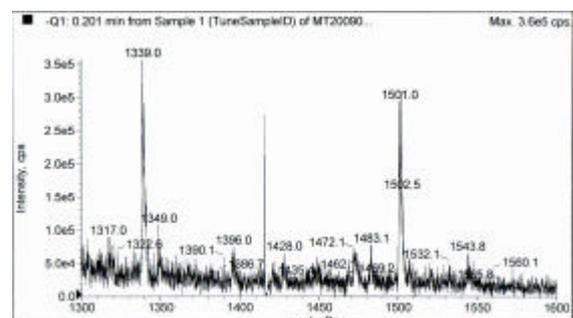
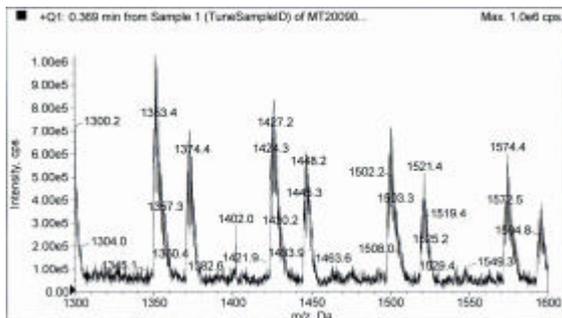
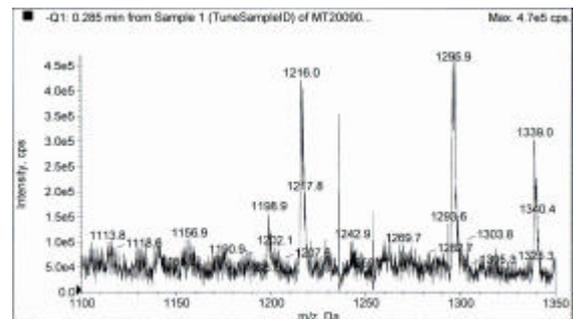
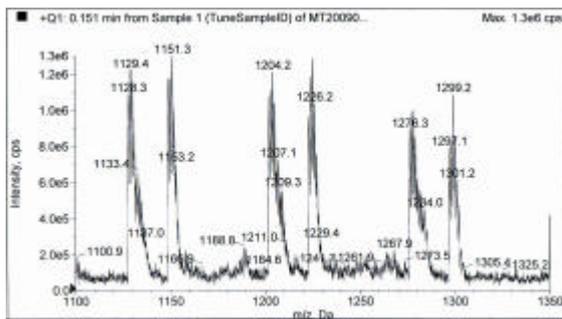
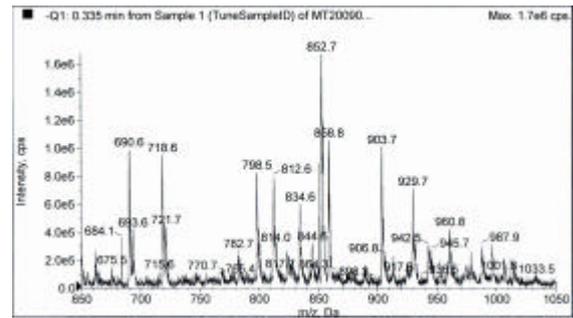
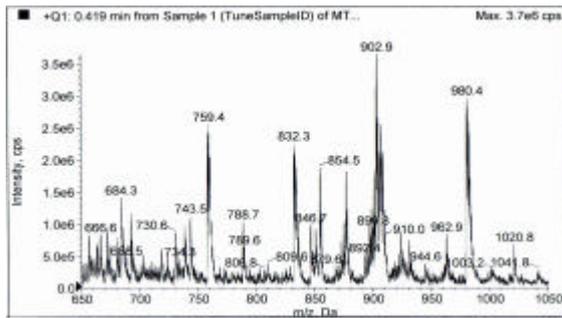


Abb. 5.19 MS-Scan der braunen unpolaren Phase, pos. Potential (DP: 90, EP: 10; GS1: 12, GS2: 0)

Abb. 5.19a MS-Scan der braunen unpolaren Phase, neg. Potential (DP: -90, EP: -10; GS1: 12, GS2: 0)

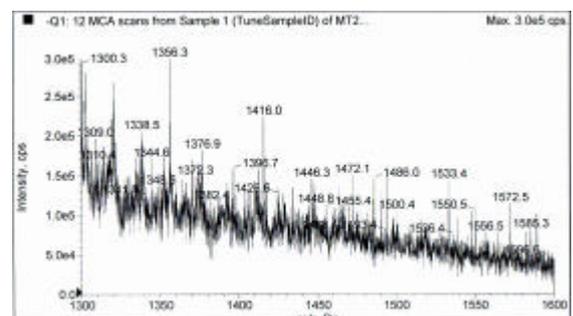
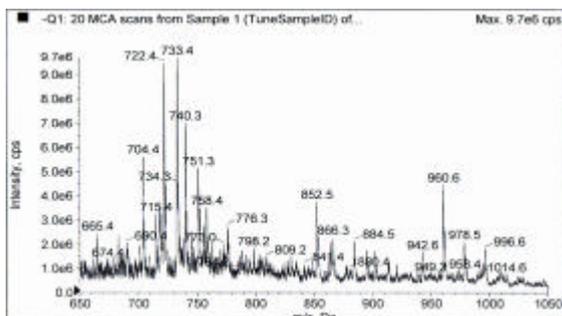


Abb. 5.20 MS-Scan der farblosen polaren Phase, neg. Potential (DP: -50, EP: -10; GS1: 25, GS2: 25)

Abb. 5.20a MS-Scan der farblosen polaren Phase, neg. Potential (DP: -50, EP: -10; GS1: 25, GS2: 25)

Die Verbindung 835 in 5.19 oben ist um H_2O leichter: $4\text{-DH}^{\text{Amin}}$. Die 799 entspricht dem Pyrrol-PE, dem Pyridiniumbetain bzw. dem Furosin. Die positive Fragmentierung von 855 aus der braunen unpolaren Phase liefert neben einer fortschreitenden Wassereliminierung die Abspaltung des gesamten Phosphoethanolamin-Derivat-Teils vom Glycerin (855–303? 552). Das Ion 304 hat neben der Tendenz Wasser abzuspalten mit 855 die Abspaltung von 84 Dalton gemeinsam. Die negative Fragmentierung von 853 liefert das PE-Fragment: 691 und das Palmitat-Ion: 255.

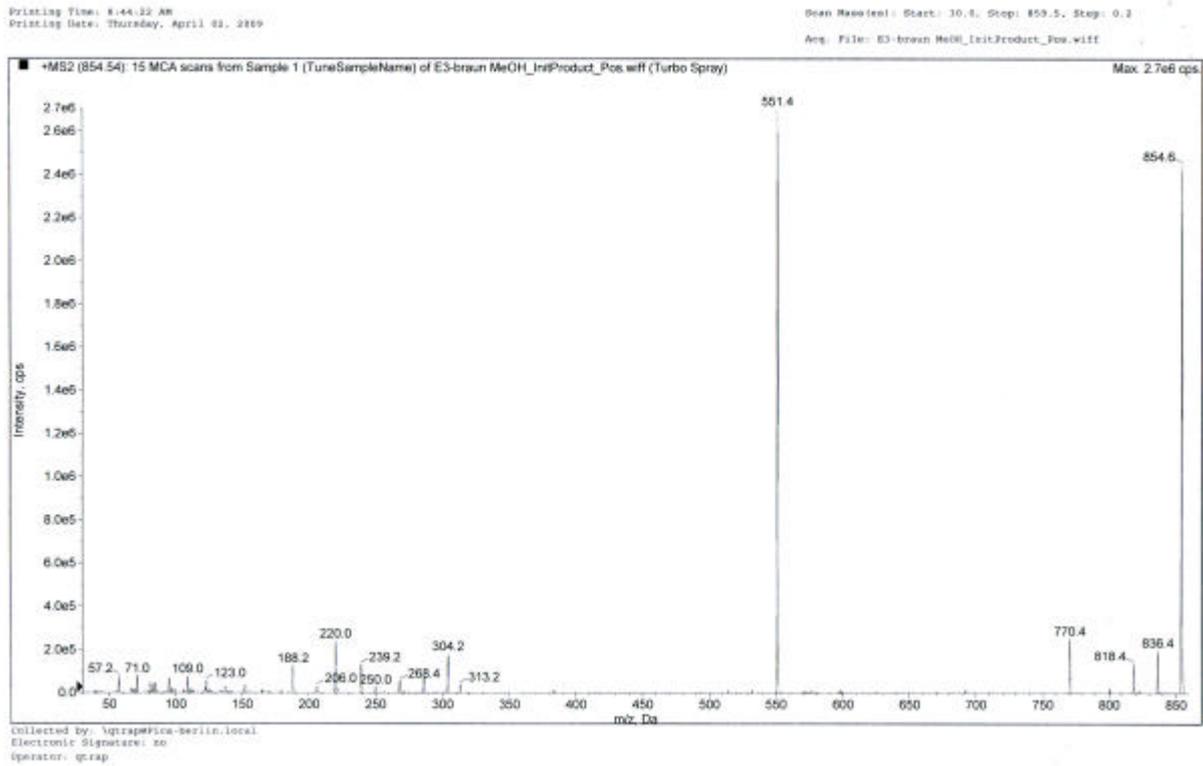


Abb. 5.21 Fragmentierung (pos. Potential) m/z 855

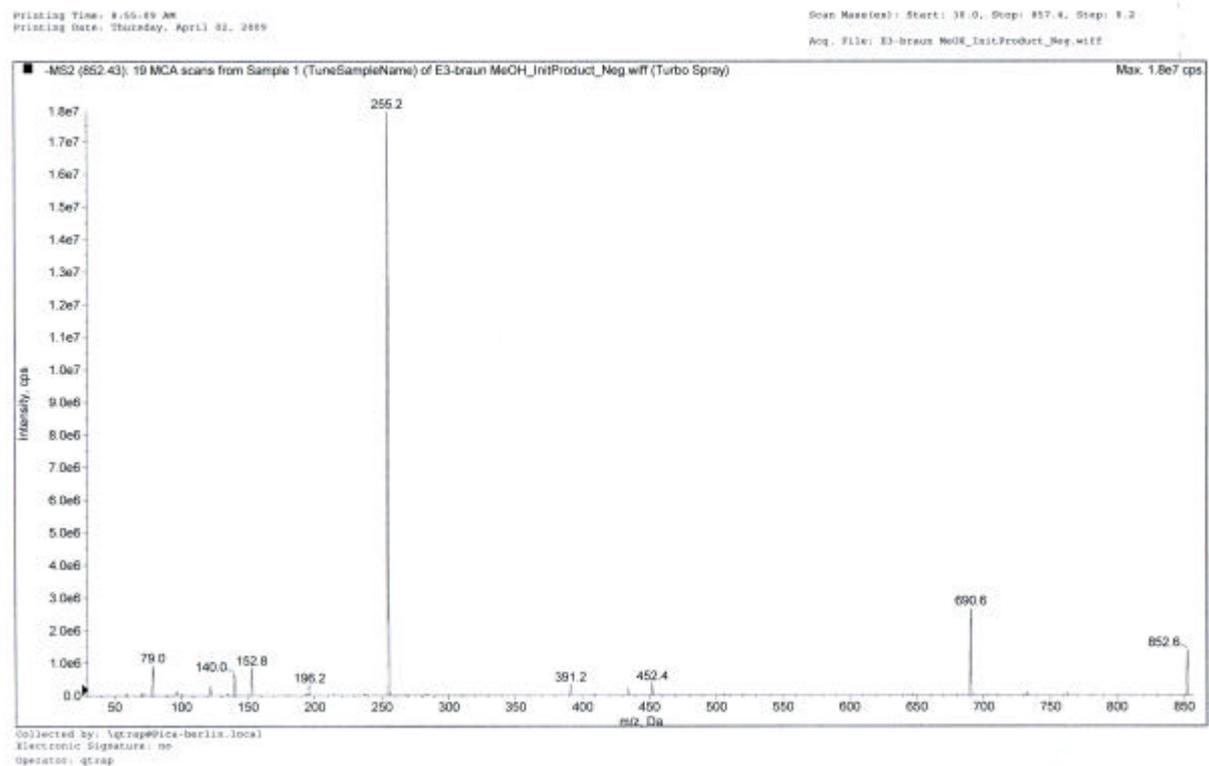


Abb. 5.22 Fragmentierung (neg. Potential) m/z 853

Um den Einfluß der Erhitzung auf die Bildung des PE-Glu.-Kondensats zu untersuchen, wurde bei gleicher Aufarbeitung die mit negativer Ionisierung erhaltene Massenspur 853 sowohl in einer unerhitzten PE/Glu.-Probe, als auch in einer 2 min bei 110°C erhitzten Probe direkt gegeneinander gemessen (7.4.2.):

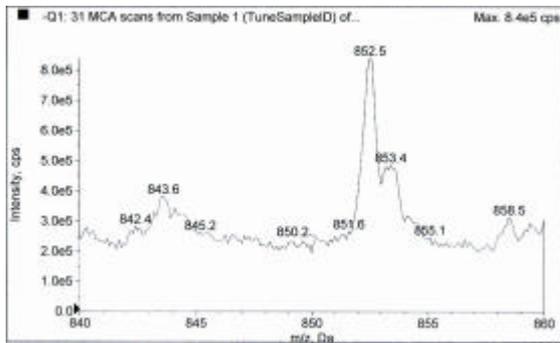


Abb. 5.23 MS-Scan der braunen unpolaren Phase, neg. Potential (DP: -90, EP: -10; GS1: 40, GS2: 30)

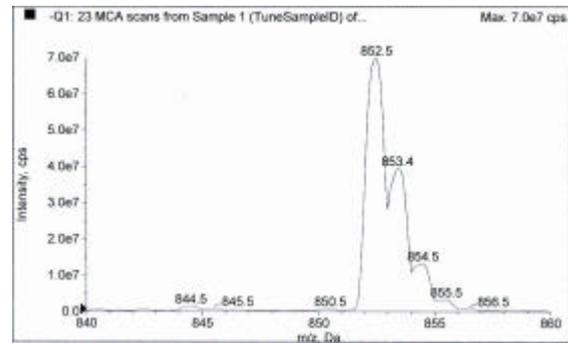


Abb. 5.23a MS-Scan der braunen unpolaren Phase, neg. Potential (DP: -90, EP: -10; GS1: 40, GS2: 30)

Eine Oxidation ist nicht zu erkennen. Die Intensität des Kondensatsignals nimmt deutlich zu. Die Verbindung wird demnach bei thermischer Behandlung leicht gebildet und könnte für den beobachteten antioxidativen Effekt (4.3.3. S.140ff) im System Ethyllinolat^{-Toc} bei Raumtemperatur verantwortlich sein. Und tatsächlich taucht die Massenspur bei Anwesenheit von Ethyllinolat/ -Tocopherol nicht mehr auf (Messung nach 3h bei 110°C); stattdessen findet man das 6 Dalton schwerere Molekül 859:

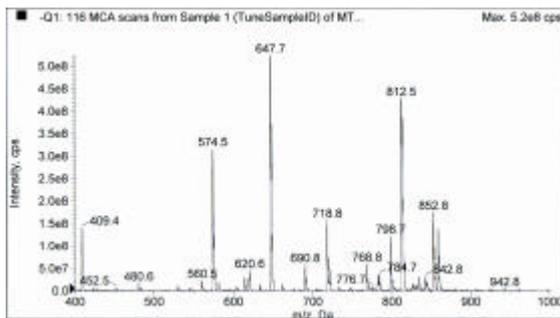


Abb. 5.24 MS-Scan der braunen unpolaren Phase, Vergleich ohne Ethyllinolat, neg. Potential (DP: -90, EP: -10; GS1: 40, GS2: 30)

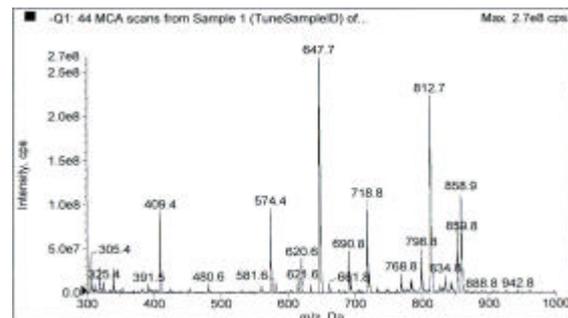


Abb. 5.24a MS-Scan der braunen unpolaren Phase, Ansatzes mit Ethyllinolat (0,01g) und -Toc. (50µg), neg. Potential (DP: -90, EP: -10; GS1: 40, GS2: 30)

	859,8	852,8	812,6	798,7	718,8	690,8	647,7	574,5
Fragment								
255,2	23790.000	14158.000	35052.000	23218.000	26633.000	5095.000	37994.000	16614.000
690,5	-	2071.000	-	-	-	-	-	-
78,9	1860.000	713.000	3693.000	141.400	2114.000	298.000	22399.000	3952.000
152,9	630.000	657.000	1354.000	1159.000	103.700	-	18518.000	1937.000
97,0	432.000	-	1045.000	433.000	-	-	2886.000	476.000
	256,1-12860.	139,9-514.	256,1-13057.	241,1-1295.	167,9-645.	140,0-165.	391,2-6794.	138,0-661.
	308,0-397.	452,2-342.	137,9-1001.	391,1-562.	480,2-543.	452,2-128.	409,2-3201.	318,0-399.
					391,2-443.	195,8-76.		
						227,2-54.		

Tab. 5.1 Fragmentierungen (neg. Potential, 6 intensivste Fragmente) der Massenspuren aus Massenspektrum: Abb. 5.24a

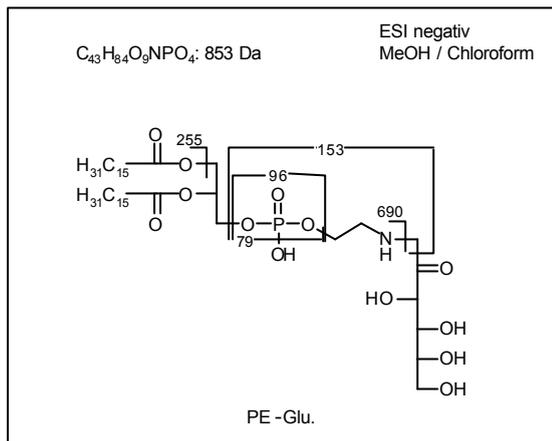


Abb. 5.25 Fragmentierung von Amadori-PE (neg. Potential)

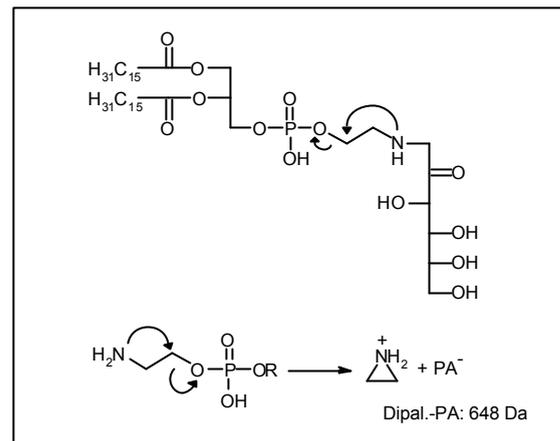


Abb. 5.25a Bildung von PA über cycl. Immonium-Ion [220]

Bleibt die Frage; was entsteht aus PE-Glu.? In der unpolaren braunen Phase liefert das Vergleichsmassenspektrum ohne Ethyllinolat im vermessenen m/z-Bereich hier praktisch keinen Anhaltspunkt. Daher wurde auch die polare Phase untersucht. Diese wurde im System Ethyllinolat ^{-Toc.}/PE/Glu. mit 0,3g Ethyllinolat, 0,05% ^{-Toc.}, 1% Dipal.-PE und 0,5% D-Glucose nach 3h bei 110°C wie oben beschrieben isoliert und sowohl mit, als auch ohne Zugabe von OPD (10mg, postderivatisiert), im m/z-Bereich 60 – 200 vermessen. Dargestellt ist auch eine Vergleichsprobe ohne Ethyllinolat aber mit OPD (100-200, pos. bzw. neg. Potential), die bereits früher aufgenommen wurde (Versuch zu Abb. 5.20 und 5.20a).

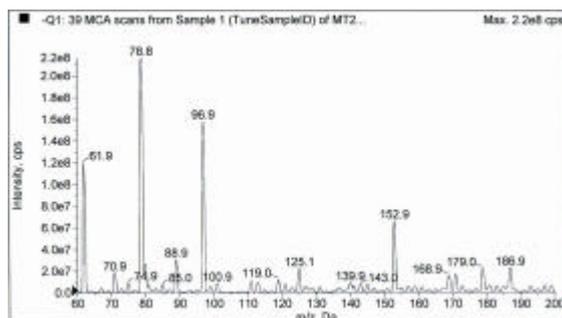


Abb. 5.26 MS-Scan der farblosen polaren Phase, ohne OPD, neg. Potential (DP: -90, EP: -10; GS1: 30, GS2: 40)

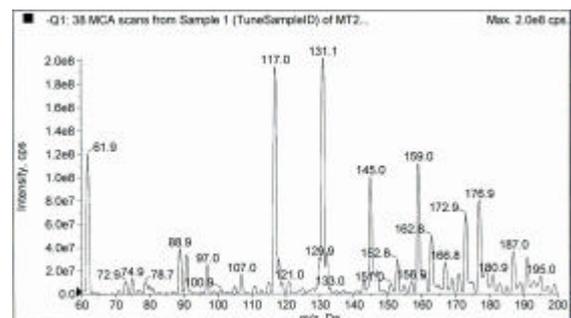


Abb. 5.26a MS-Scan der farblosen polaren Phase, mit OPD, neg. Potential (DP: -90, EP: -10; GS1: 30, GS2: 40)

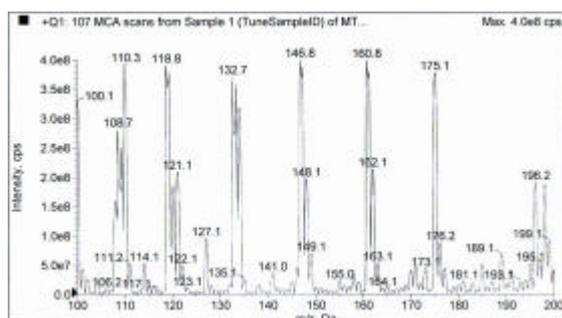


Abb. 5.27 MS-Scan der farblosen polaren Phase, Vergleichsprobe ohne EL ^{-Toc.} mit OPD, pos. Potential (DP: 50, EP: 10; GS1: 25, GS2: 20)

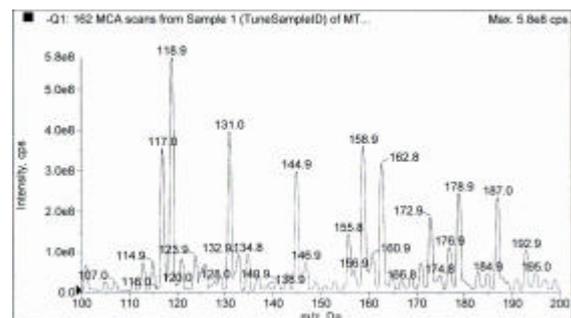


Abb. 5.27a MS-Scan der farblosen polaren Phase, Vergleichsprobe ohne EL ^{-Toc.} mit OPD, neg. Potential (DP: -50, EP: -10; GS1: 25, GS2: 20)

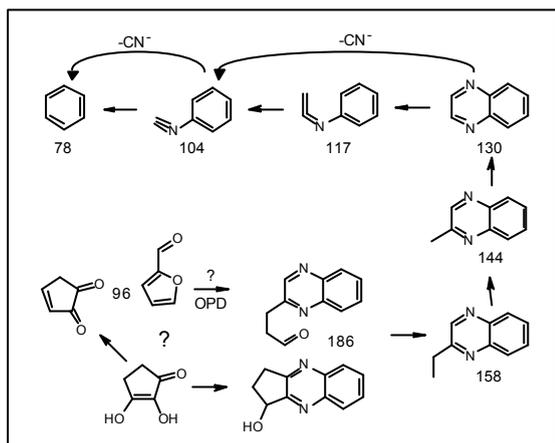


Abb. 5.28 Fragmentierungen von Chinoxalinen

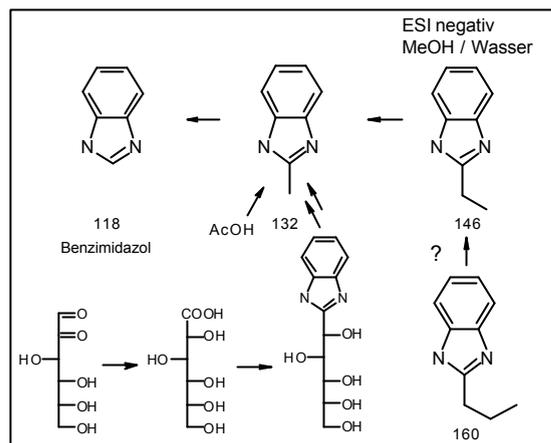


Abb. 5.29 Imidazole aus der Derivatisierung von Carboxylgruppen

Die im Spektrum ohne OPD erhaltenen Massenspuren entsprechen den P-haltigen Tochterionen des PE-Glu.-Kondensats, bei der negativen Fragmentierung. Hier lassen sich keine weiteren Aussagen treffen. Postderivatisiert mit OPD findet man eine ganze Reihe weiterer Massenspuren; darunter 117, 131, 145 und 159, die auf OPD-Derivate zurückgehen. Die Reihe ähnelt zwar dem Fragmentierungsmusters der Chinoxaline, diese sind aber bei Postderivatisierung nicht nachweisbar (5.2.1.). Andererseits entsprechen die Massenspuren nicht den bei negativem Potential erwarteten MG-1-Strukturen. Diese lassen sich eher über Imidazol-Verbindungen aus der Derivatisierung von Carboxylgruppen mit OPD [13] deuten. Hier erklären sich aber die gesättigten Alkylketten nicht. Da die entsprechenden Strukturen auch ohne Ethyllinolat vorkommen, scheiden Produkte aus dessen Oxidation aber aus. Bei Abwesenheit von Ethyllinolat findet sich unter negativem Potential zusätzlich die 119, wobei es sich offensichtlich um die hydrierte Form von 117 handelt. Hier stellt sich die Frage, ob die Verbindung reduziert wurde oder ob etwa Aldehyde mit OPD zu „Hydroimidazolen“ reagieren können? Wenn man davon ausgeht, dass stark reduzierende Stoffe entstehen, muss auch in Betracht gezogen werden, dass die Chinoxaline selbst reduziert werden. Die durch Hydrierung der beiden N-Atome entstehenden „Hydrochinoxaline“ würden den gemessenen Molekülionen der negativen ESI ohne Ethyllinolat (119, 131, 145 und 159, Abb. 5.27a) entsprechen.

	97 (neg.)		119 (pos.)		131 (neg.)
Fragment		Fragment		Fragment	
78,9	5114.000	65,0	1627.000	100,9	509.000
62,9	493.000	92,0	888.000	30,6	413.000
79,8	345.000	39,0	226.000	61,2	404.000
77,6	26.000	63,0	143.000	65,3	402.00
47,3	21.000	51,0	64.000	31,7	400.000
75,4	21.000	62,0	61.000	34,8	400.000

Tab. 5.2 Fragmentierungen (6 intensivste Fragmente) ausgewählter Massenspuren

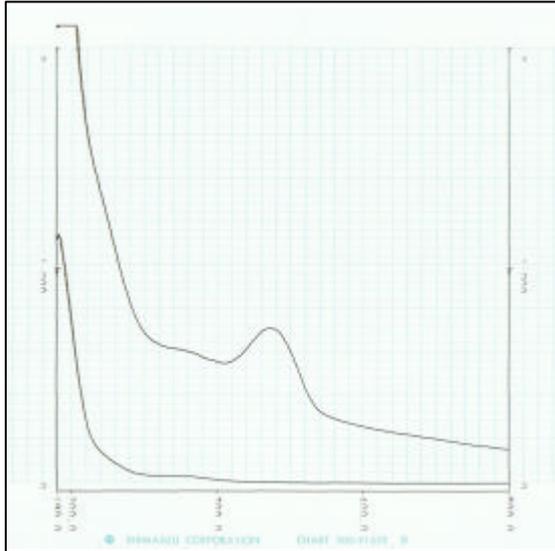


Abb. 5.30 Spektrum von PE/Glu. (unerhitzt, erhitzt 110°C) in Hexan

Das Produkt PE-Glu. fluoresziert nicht, zeigt aber in Hexan eine UV-Absorption bei 337nm.

5.2.3. Ascorbinsäure als Modellreduktion, Wechselwirkung mit PE

Im PE/Ascorbinsäure-System beobachtet man ein weiteres interessantes Phänomen: Die Ascorbinsäure ist hier bereits nach 1h bei 110°C nahezu vollständig abgebaut (7.2.5.). Erhitzt man 1000µg PE und 500µg Ascorbinsäure (angefeuchtet mit Chloroform) in Abwesenheit von Ethyllinolat und α -Tocopherol im Trockenschrank für 1h auf 110°C und löst anschließend in 1ml Isooctan + 1ml Wasser (60°C), so zeigt die organische Phase –und nur diese– eine deutliche DPPH-Aktivität (100µl Isooctanphase + 900ml Isopropanol + 1ml DPPH-Lösung, 7.3.4. ? vollständige Entfärbung). Mit PE und Glucose findet man bei gleichartiger Behandlung derartige unpolare, reduzierende Stoffe nicht. Man kann beim Abbau der Ascorbinsäure in einen oxidativen und einen nichtoxidativen Weg unterscheiden [212]. Der oxidative Abbauweg wird durch alkalischen Bedingungen (Amine) forciert. Die Bildung von α -Dicarbonylen aus L-Ascorbinsäure ist von A. Schulz [213] untersucht worden.

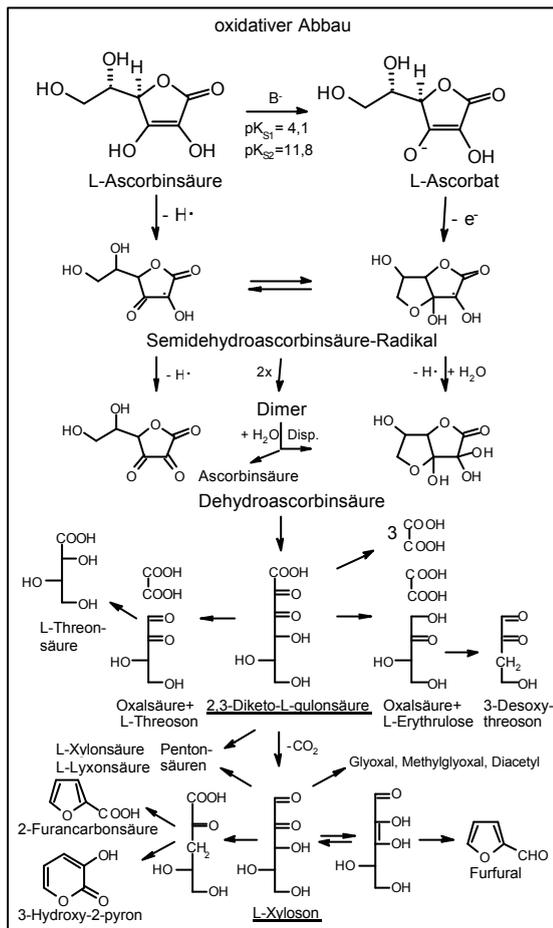


Abbildung 5.31 oxidativer Abbau von Ascorbinsäure [212,213]

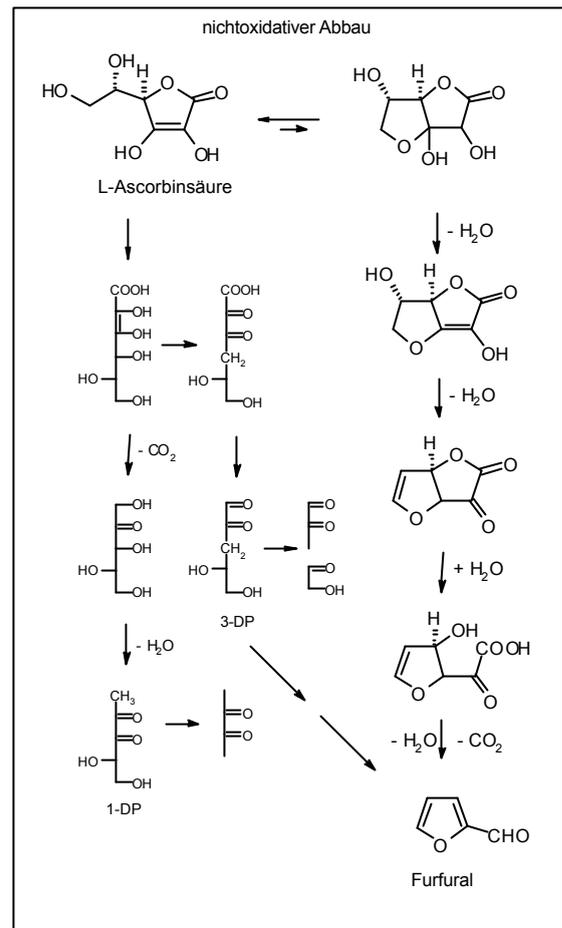


Abbildung 5.32 nichtoxidativer Abbau von Ascorbinsäure [212,213]

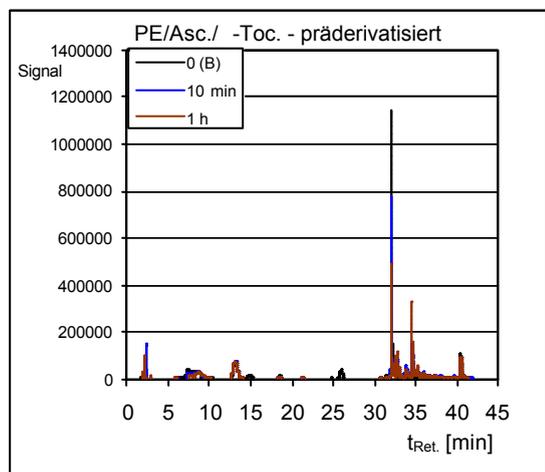


Abbildung 5.33 -Dicarbonyle (Präderivatisierung) bei Erhitzung auf 110°C

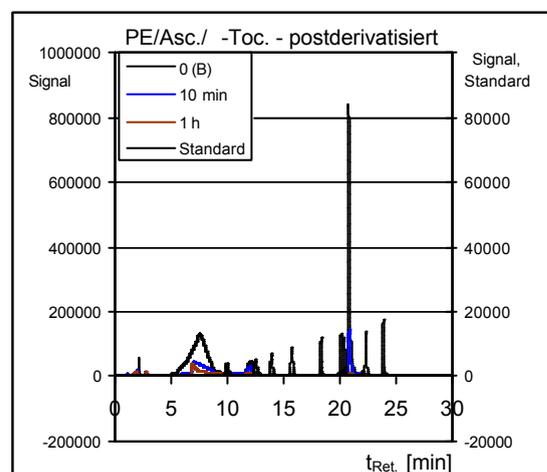


Abbildung 5.33a -Dicarbonyle (Postderivatisierung) bei Erhitzung auf 110°C (Standard vgl. Abb. 5.16)

Wie Abb. 5.31 zeigt bilden sich dabei eine Reihe von Osonen, u.a. das L-Threoson und das L-Xyloson. Über das 3-Desoxypentose (3-DP) bilden sich beim nicht-oxidativen Abbau Furfural und Methylglyoxal. 1-Desoxypentose (1-DP) soll Precursor von Diacetyl sein. Doch weder bei der Prä- noch bei der Postderivatisierung mit OPD finden sich im System PE/Asc./ -Toc. Xyloson oder Threoson (Abb. 5.33/a).

Methylglyoxal, Glyoxal und Diacetyl sind vermutlich Aufgrund ihrer geringen Polarität mit dem Ethyllinolat abgetrennt worden. Bei Prä- und Postderivatisierung findet man zwei verschiedene Verbindungen, die auf die Ascorbinsäure zurückgehen sollten. Die Verbindung, die bei der Präderivatisierung gemessen wird ist unpolarer. Der Stoff aus der Postderivatisierung baut sich mit steigender Erhitzungszeit ab.

Es stellt sich nun die Frage, ob der beobachtete Effekt lediglich von unpolaren Reducton-Verbindungen herrührt oder ob Ascorbinsäure mit PE unpolare Konjugate bildet. Zur Herstellung und Isolierung des erwarteten PE-Derivats wurden 3000µg Dipal.-PE mit einem Überschuß an Ascorbinsäure 1h auf 110°C erhitzt. Durch Zugabe von Isooctan und Wasser wurden die polaren Verbindungen abgetrennt. Der nach Einengen der Isooctanphase erhaltene Rückstand löst sich nur schlecht in Chloroform aber gut in Methanol; er wurde aus Isooctan umkristallisiert und mit MS bzw. NMR charakterisiert. Die MS mit negativer Ionisierung liefert bei 848Da die intensivste Massenspur, ferner treten die Spuren: 608, 846, 860, 864 und 878 deutlich hervor. Die 848(+1) entspricht einem PE-Asc.-Kondensat (691+176-18), die 846 könnte die oxidierte Form des Moleküls darstellen. Mit positiver Ionisierung erhält man 851Da als intensivste Masse. Grafik 5.35 zeigt die positive Fragmentierung dieser Massenspur.

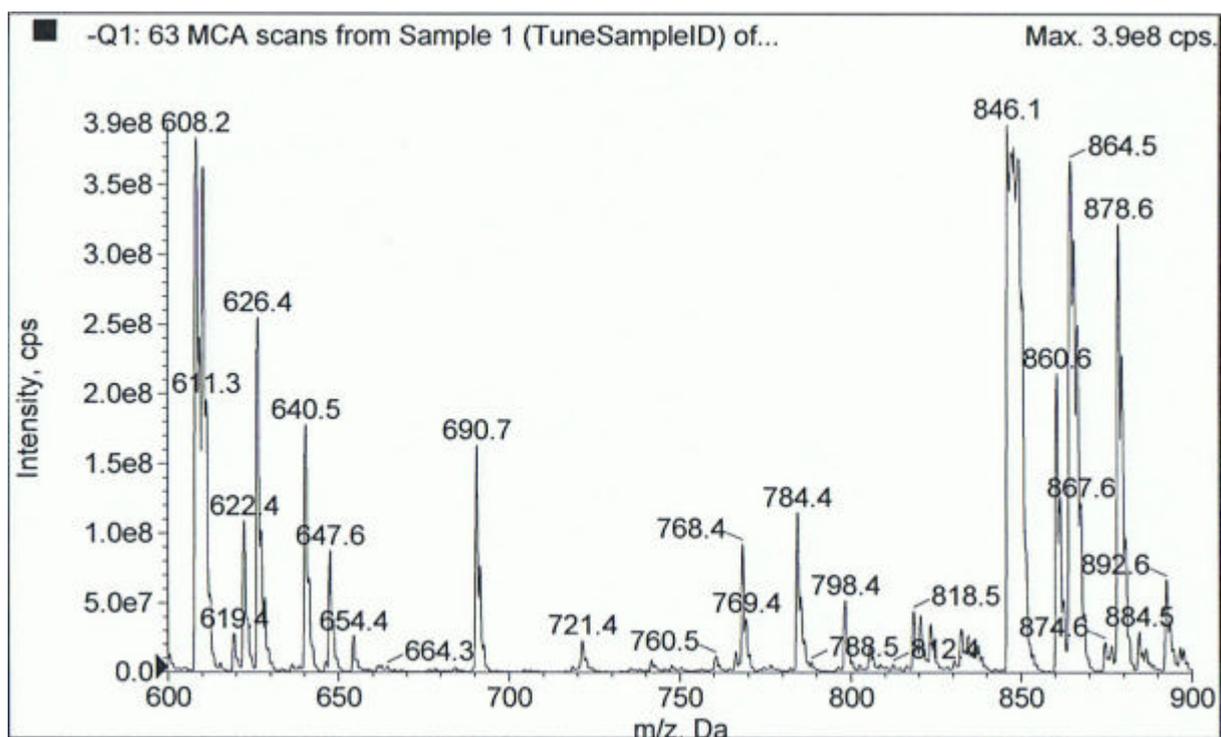


Abb. 5.34 MS-Scan (neg. Potential)

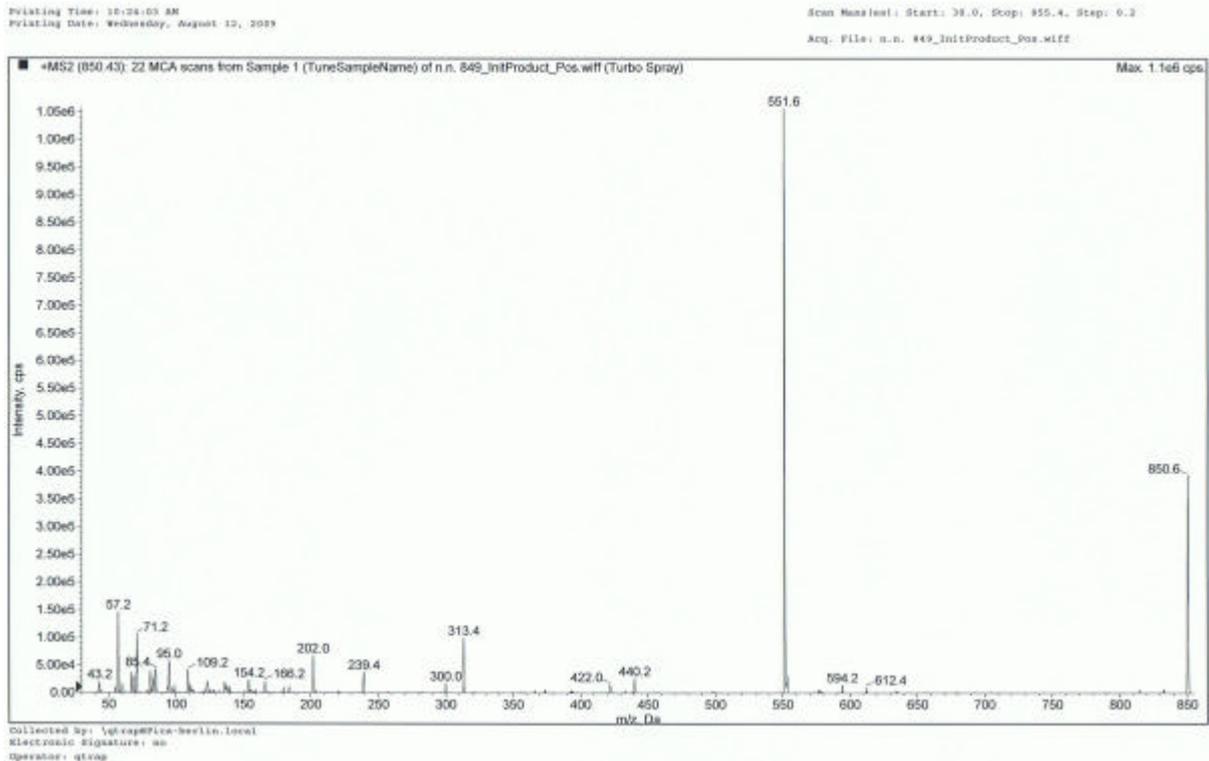


Abb. 5.35 Fragmentierung (pos. Potential) m/z 851

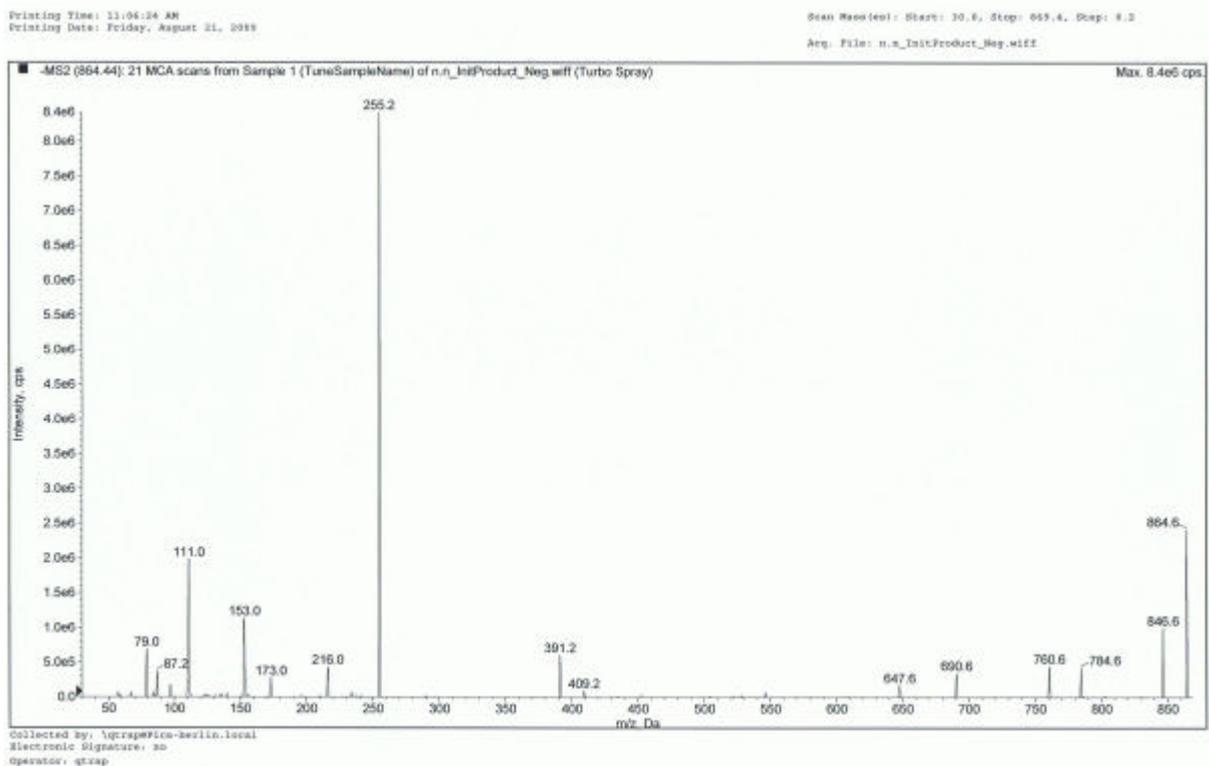


Abb. 5.36 Fragmentierung (neg. Potential) m/z 865

Die positive Fragmentierung von 851 liefert das Fragment 552, was auch schon bei PE-Glu. erhalten wurde. Es entsteht durch die Abspaltung des gesamten Phosphoethanolamin-Derivat-Teils vom Glycerin (851 – 299 = 552). Das Ion 440 hat

neben der Tendenz Wasser abzuspalten mit 851 die Abspaltung von 238 Dalton gemeinsam. Die bei negativer Ionisierung erhaltenen Masse 864,5Da ist um ein Wassermolekül schwerer als 846,5. Ihre Fragmentierung (Abb. 5.36) zeigt neben 846,6 auch das PE-Fragment (691) sowie den Palmitatrest (255). Beide finden sich auch bei der neg. Fragmentierung von 878,5.

846,4		860,4		864,4		878,5	
Fragment		Fragment		Fragment		Fragment	
255,2	34667.000	255,2	3897.000	255,2	8429.000	255,2	5665.000
152,9	3446.000	152,9	680.000	111,0	1987.000	152,9	689.000
784,5	3384.000	391,1	386.000	846,5	1162.000	846,4	641.000
391,2	2969.000	78,9	382.000	152,9	1143.000	391,2	379.000
78,9	1964.000	810,4	134.000	78,9	695.000	78,9	366.000
110,0	1644.000	842,4	97.000	391,2	613.000	690,4	202.000

Tab. 5.3 neg. Fragmentierungen (6 intensivste Fragmente) ausgewählter Massenspektren

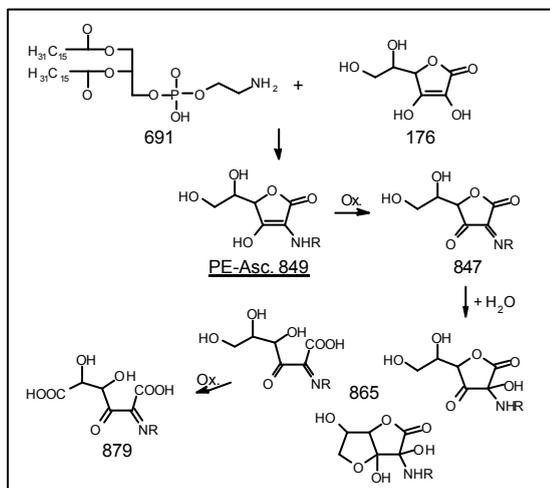


Abbildung 5.37 PE-Asc: hypothetische Struktur und Oxidation

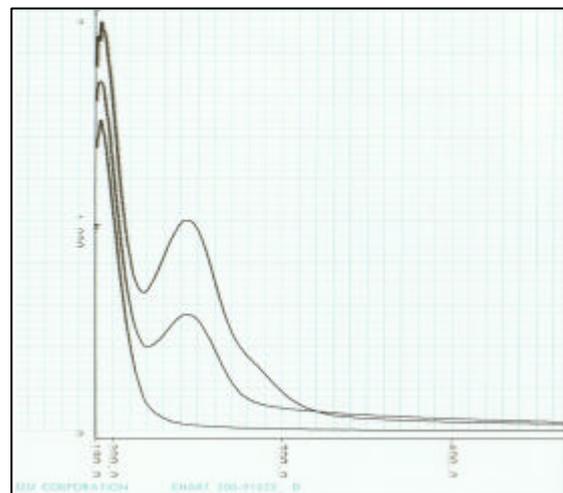


Abb. 5.38 Spektrum von PE/Asc. in Isooctan (Isooctan, unerhitzt, erhitzt 110°C, von unten nach oben)

Die gefundenen Massenspektren lassen sich formal durch die Oxidation des PE-Asc-Kondensats über das Imin der 2,3-Diketogulonsäure erklären. Die erhaltene umkristallisierte Verbindung besitzt eine UV-Absorption bei 244nm; welche auch beim Zusammengeben von PE und Ascorbinsäure schon schwach erscheint (Abb.5.38).

Der sichere NMR-Nachweis des PE-Ascorbinsäure-Kondensats gelang jedoch nicht. Dazu wurden ein 400Hz-¹H-NMR-Spektren in deuteriertem Methanol aufgenommen. Es befindet sich zusammen mit dem Vergleichsspektrum von Dipalmitoyl-PE und den theoretisch zu erwartenden Spektren für: Ascorbinsäure, Dipal-PE und Dipal-PE-Ascorbinsäure (berechnet mit ChemDrawUltra9.0) nocheinmal im Anhang. Das Spektrum lässt keine Aussage zu, ob es sich um Asc.-PE handelt oder nur um eine Mischung beider Ausgangsstoffe.

6. Untersuchungen zur oxidativen Stabilisierung von Lebensmitteln

In Abschnitt 4.3.1.(S.100ff) wurde bereits gezeigt, dass 1% Sojalecithin in raffiniertem Raps- bzw. Sojaöl den Verderb bei Raumtemperatur durch Verlangsamung des Tocopherol-Abbaus verzögert. Auch in Ethylinolat, das mit 0,05% α -Tocopherol stabilisiert ist, tritt durch Zusatz von Soja-, Raps- oder auch Sonnenblumenlecithin eine Verderbsverzögerung bei Raumtemperaturlagerung im Dunkeln unter Luftatmosphäre auf (4.3.3.f.). Hochangereichertes Soja-PC wirkt unter diesen Bedingungen prooxidativ. Die Frage, ob Pflanzenlecithine in der Lage sind oxidationsempfindliche Lebensmittel zu stabilisieren wurde anhand von vier verschiedenen Produkten untersucht: an Butter, einem Buttergebäck und an einfachem bzw. einem kompletten Kartoffelpüreepulver (7.1.). An Butter wurde nur der Effekt von 1% Sojalecithin (SL1) bzw. Soja-PC untersucht. Bei den selbst gebackenen Butterwaffel-Tüten und den beiden Chargen Kartoffelpüreepulver wurden sowohl 0,5% SL1 als auch SL2, Rapslecithin bzw. Sonnenblumenlecithin eingesetzt. Neben Blindwerten wurden auch Proben angesetzt, die außer Pflanzenlecithin zusätzlich 0,005% (50 μ g/g) α -Tocopherol enthielten. Das Buttergebäck (Pulverform) und die Kartoffelpüreeproben wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und der Verderb über die Extinktion von Hexanextrakten bei 233nm verfolgt. Dazu wurden 0,30g Pulver in 4ml-Vials eingewogen und mit 3ml Hexan 5min bei 55°C extrahiert. Der klare Überstand wurde nach Verdünnung (Püree: 1+1; Tüten: 100 μ l/2ml) mit Hexan in 1cm-UV-Küvetten vermessen. Die Butter wurde im Kühlschrank gelagert und neben der Extinktion bei 233nm über die Anisidinzahl (7.3.2.) charakterisiert.

Zur Butter wurde Sojalecithin bzw. Soja-PC zum einen als Pulver bei 25°C direkt eingerührt. Da dies nur zu einer ungenügenden Verteilung führte, wurde zum anderen das Pflanzenlecithin in 5% Butterschmalz bei 60°C vorgelöst und in noch flüssiger Form unter die Butter gerührt.

Die Butterwaffel-Tüten wurden aus einem Teig: 125g Mehl, 100g Zucker, 45g Butter, 5g Schweineschmalz, Prise Salz, 200ml Wasser und 1 Eiweiß im Waffeleisen gebacken und gerollt (ca. 7,5g pro Stück). Der flüssige Teig wurde jeweils vorher in einer Tasse mit Pflanzenlecithin (37,5mg, in Ethanol) bzw. Pflanzenlecithin und α -Tocopherol (37,5mg+0,375mg, in Ethanol) verrührt. Auch eine α -Tocopherol-Vergleichsprobe wurde gebacken und mit einer Moulinette fein gemahlen.

Beim Kartoffelpüreepulver wurden je 5g in einem 100ml Rundkolben mit 25mg Pflanzenlecithin bzw. Pflanzenlecithin und α -Tocopherol (25mg + 0,25mg) in 5ml Hexan versetzt und bis zur Trockene einrotiert. Auch hier wurde in α -Tocopherol-Vergleichswert mitgeführt.

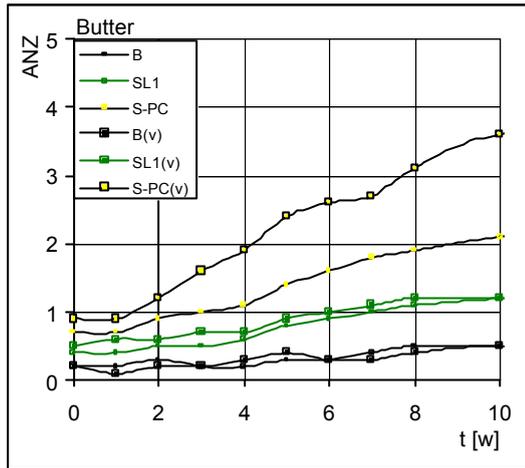


Abbildung 6.1 Verderb von Butter, mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin, SL1) bzw. Soja-PC, Zugabe direkt bzw. vorgelöst in 5% Butterschmalz

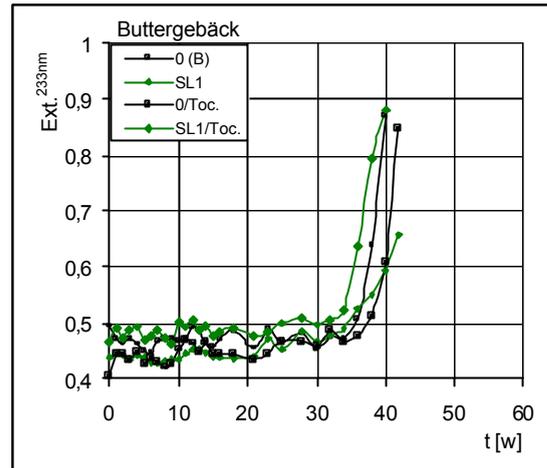


Abbildung 6.2 Verderb von Buttergebäck, mit Zusatz von 0,5% techn. Sojalecithin (Asolectin, SL1) bzw. 0,5% Sojalecithin und -Tocopherol (0,005%)

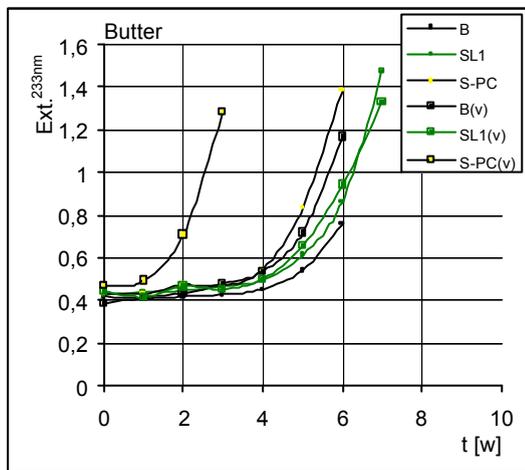


Abbildung 6.1a Verderb von Butter, mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin, SL1) bzw. Soja-PC, Zugabe direkt bzw. vorgelöst in 5% Butterschmalz

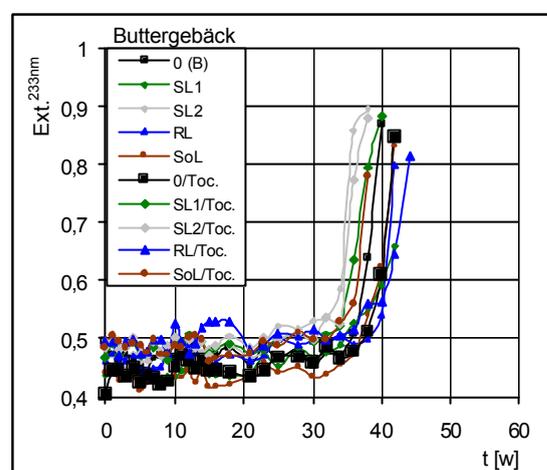


Abbildung 6.2a Verderb von Buttergebäck, mit Zusatz von 0,5% techn. Soja- (SL1 und SL2), Raps- bzw. Sonnenblumenlecithin sowie 0,5% Lecithin und -Tocopherol (0,005%)

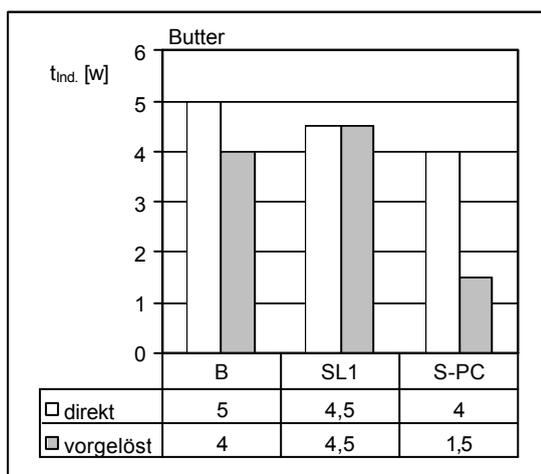


Abbildung 6.1b Induktionsperiode von Butter, mit Zusatz von 1% techn. Sojalecithin (Asolectin, SL1) bzw. Soja-PC, Zugabe direkt bzw. vorgelöst in 5% Butterschmalz

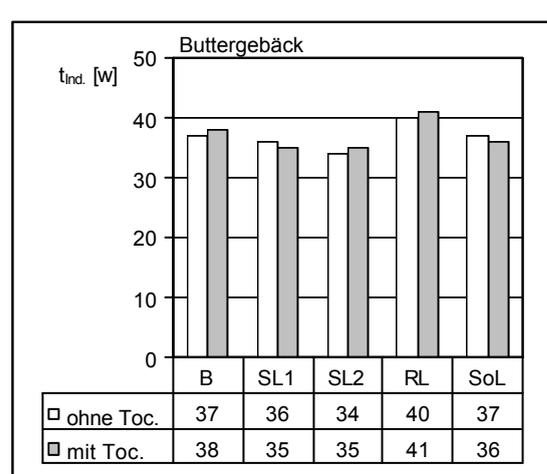


Abbildung 6.2b Induktionsperiode von Buttergebäck, mit Zusatz von 0,5% techn. Soja- (SL1 und SL2), Raps- bzw. Sonnenblumenlecithin sowie 0,5% Lecithin und -Tocopherol (0,005%)

In Butter zeigt Sojalecithin 1 keinen stabilisierenden Effekt. Soja-PC verursacht einen schnelleren Verderb und wirkt prooxidativ. Der Effekt ist weit stärker ausgeprägt, wenn das Soja-PC in Butterschmalz vorgelöst zugesetzt wird, was durch die bessere Verteilung begründet ist. Auch bei den Butterwaffel-Tüten konnte keine Stabilisierung beobachtet werden. Sowohl 0,5% Pflanzenlecithin, als auch die zusätzliche Zugabe von α -Tocopherol bringen keinen Effekt. Interessante Ergebnisse wurden aber bei den beiden Kartoffelpüreepulvern erhalten. Hier konnte der Verderb erfolgreich über die Extinktion bei 233nm verfolgt werden. Die Kombination von 0,5% Pflanzenlecithin mit 0,005% α -Tocopherol führt zu einer signifikanten Verderbsverzögerung. Der Effekt tritt mit allen Pflanzenlecithinen und sowohl in einfachem, als auch

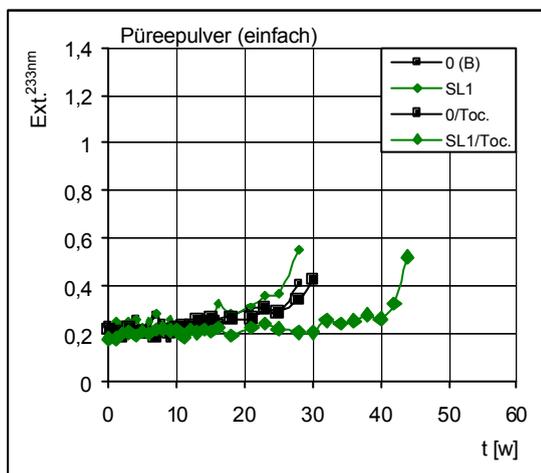


Abbildung 6.3 Verderb von Kartoffelpüreepulver (einfach), mit Zusatz von 0,5% techn. Sojalecithin (Asolectin, SL1) bzw. 0,5% Sojalecithin und α -Tocopherol (0,005%)

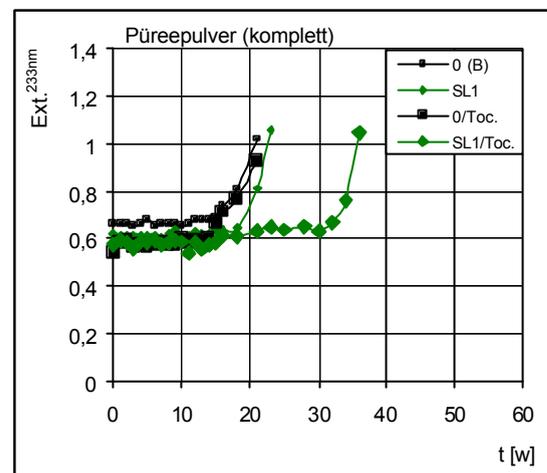


Abbildung 6.4 Verderb von Kartoffelpüreepulver (komplett), mit Zusatz von 0,5% techn. Sojalecithin (Asolectin, SL1) bzw. 0,5% Sojalecithin und α -Tocopherol (0,005%)

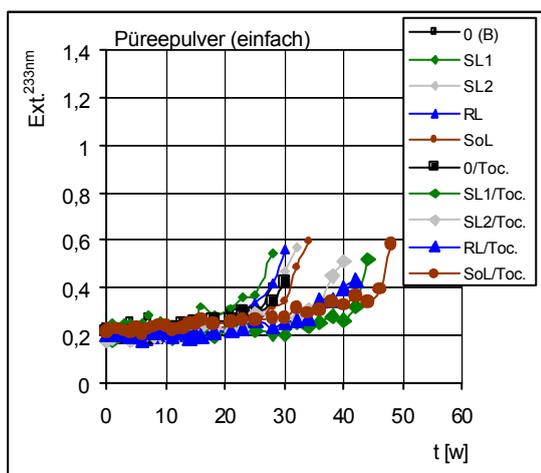


Abbildung 6.3a Verderb von Kartoffelpüreepulver (einfach), mit Zusatz von 0,5% techn. Soja- (SL1 und SL2), Raps- bzw. Sonnenblumenlecithin sowie 0,5% Lecithin und α -Tocopherol (0,005%)

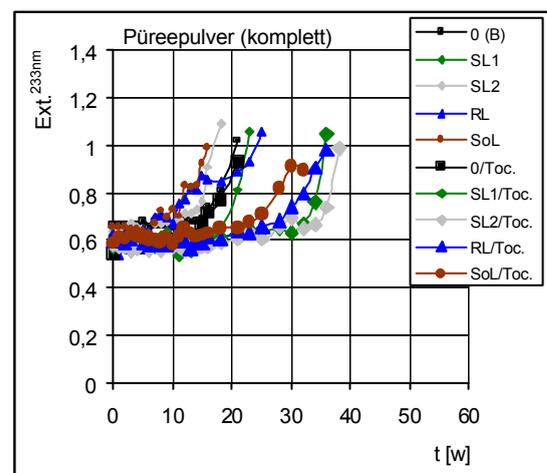


Abbildung 6.4a Verderb von Kartoffelpüreepulver (komplett), mit Zusatz von 0,5% techn. Soja- (SL1 und SL2), Raps- bzw. Sonnenblumenlecithin sowie 0,5% Lecithin und α -Tocopherol (0,005%)

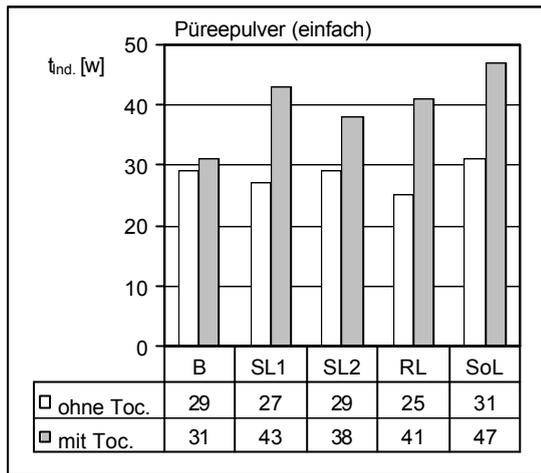


Abbildung 6.3b Induktionsperiode von Kartoffelpüree-flocken (einfach), mit Zusatz von 0,5% techn. Soja- (SL1 und SL2), Raps- bzw. Sonnenblumenlecithin sowie 0,5% Lecithin und -Tocopherol (0,005%)

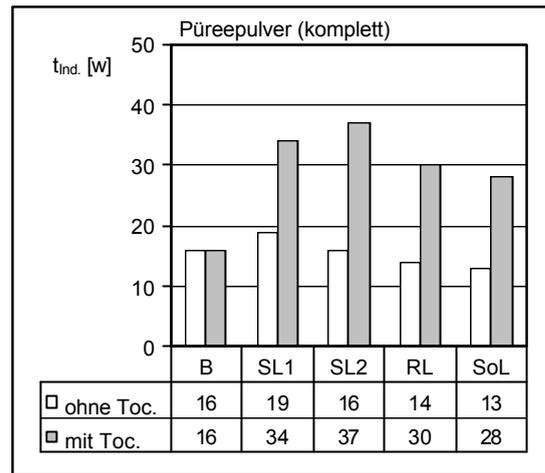


Abbildung 6.4b Induktionsperiode von Kartoffelpüree-flocken (komplett), mit Zusatz von 0,5% techn. Soja- (SL1 und SL2), Raps- bzw. Sonnenblumenlecithin sowie 0,5% Lecithin und -Tocopherol (0,005%)

Püreepulver (einfach)	pro 100g zubereitetes Püree
Eiweiß	2g
Kohlenhydrate	10g
davon Zucker	1,5g
Fett	0,9g
davon gesättigte Fettsäuren	0,6g
Ballaststoffe	1,5g
.....	
Zutaten	98% Kartoffeln,
Emulgator:	Mono-, Diglyceride
Stabilisator:	Natriumcitrat
Antioxidationsmittel:	Ascorbylpalmitat
	Natriummetabisulfit
	Aroma
MHD	8/2008

Tab 6.1 Zusammensetzung Püreepulver (einfach) Packungsangabe

Püreepulver (komplett)	pro 100g zubereitetes Püree
Eiweiß	1g
Kohlenhydrate	11g
davon Zucker	0,9g
Fett	1g
davon gesättigte Fettsäuren	0,5g
Ballaststoffe	0,8g
.....	
Zutaten	84% Kartoffeln
	4,5% Magermilchpulver
	Milchzucker, Milcheiweiß
Emulgator:	Mono-, Diglyceride
Antioxidationsmittel:	Ascorbylpalmitat
	Speisesalz, Aroma
MHD	7/2008

Tab 6.2 Zusammensetzung Püreepulver (komplett) Packungsangabe

komplettem Püreepulver auf. Über den genauen synergistischen Effekt lässt sich keine Angabe machen, da es sich um gekauftes Püreepulver handelt und der Verderb nicht ab Herstellung verfolgt wurde. Die alleinige Zugabe von -Tocopherol bzw. Pflanzenlecithin hat jeweils keinen antioxidativen Effekt zu Folge. Es ist auch davon auszugehen, dass die enthaltenen Zusatzstoffe (Natriumcitrat, Natriummetabisulfit und Ascorbylpalmitat) – und zwar insbesondere das Ascorbat – den Effekt entscheidend mitbeeinflussen. Man kann davon ausgehen, dass die Stabilisierung durch das System PL/Ascorbat/ -Tocopherol verursacht wird. Eine Wechselwirkung mit Kohlenhydraten aus dem Kartoffelpüree wäre ebenfalls denkbar, ein deutlicher Einfluß von Lactose war aber im kompletten Püreepulver nicht zu erkennen. Grund könnte sein, dass die Lagerfähigkeit vom kompletten Kartoffelpüreepulver unter Luftatmosphäre ohnehin geringer war (Blindwerte).

7. Material und Methoden

7.1. Untersuchungsmaterial

Soweit nicht anders angegeben entspricht die Reinheit der aufgelisteten Chemikalien Analysenqualität (p.a.).

Degussa Texturant Systems, Hamburg

Sojalecithin entölt (Metharin P, SL2 und SL3), Rapslecithin entölt, Sonnenblumenlecithin entölt, hochangereichertes Soja-PC (Epikuron 200)

Fluka, Buchs (Schweiz)

Asolectin (SL1), 4-Methoxyanilin (p-Anisidin), Ascorbylpalmitat, -Tocopherolacetat, BHA, BHT, Propylgallat, Nordihydroguajarsäure (NDGA), Kaffeesäure, Quercetin, Rutin, Dihydroxybenzoesäure (2,4-, 2,5-, 3,4- und 3,5-), 3,4-Dihydroxybenzoesäure-Ethylester,

L- -Dipalmitoyl- -phosphatidsäure, DL- -Dipalmitoyl- -lecithin Monohydrat, L- -Dipalmitoyl- -cephalin, L- -Dipalmitoyl- -inosit, rac.-1,2-Dipalmitoylglycero-3-phosphoryl-L-serin; aus Sojabohnen: PA, PC, PE, PI;

Ameisensäure (98%), Citronensäure, Ethylendiamintetraessigsäure Trihydrat, Ethyllinolat (99%), Ethyllinolat (65-70%), Palmitinsäure, Salpetersäure (65%), Schwefelsäure (konz.),

Glycolaldehyd, D-Glucose, D-Fructose, D-Galactose, D-Mannose, D-Lactose Monohydrat, D-Maltose Monohydrat, o-Phenyldiamin, 4-Dimethylaminobenzaldehyd, Pyrrol, N-Methylpyrrol, Dansylhydrazin (D100), Bipyridyl, Natriumhydroxid, Natriummolybdat Dihydrat, Hydraziniumsulfat, Kupfermyristat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumiodid, Kaliumrhodanid, Magnesiumnitrat, Wasserstoffperoxid (30%)

Macherey-Nagel, Düren

N-Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)

Merck, Darmstadt

L-Ascorbinsäure, -, -, -, -Tocopherol, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, ca. 90%), Salzsäure (konz.), Eisen(III)-chlorid Hexahydrat, Kupfersulfat Pentahydrat, Natriumsulfat wasserfrei, Natriumthiosulfat Titrisol (0,1N), Phenolphthalein, ortho-Phorsorsäure (85%), ortho-Phosphoethanolamin, Saccharose, Stärke (reinst), Aceton, Ammoniak (konz.), Chloroform, Dichlormethan, Diethylether, Eisessig, Ethanol (96%), Ethylacetat, n-Hexan (HPLC), Isooctan, Methanol, MTB-Ether (HPLC), 2-Propanol (HPLC), Toluol, Kieselgel (65-230 mesh), Glaswolle

Roth, Karlsruhe

Methanol (HPLC)

Sigma-Aldrich, Sternheim

2-Thiobarbitursäure (TBA), Hexanal, 2-Octenal, trans,trans-2,4-Decadienal, -Tocopherylechinon,

lokaler Kaisers Supermarkt

Rapsöl (R1, R2), Sojaöl, Butter, Butterschmalz, Kartoffelpüreepulver (einfach und komplett, Pfanni), Zutaten für Buttergebäck: Weizenmehl Typ405, Zucker, Schweineschmalz, Butter, Eier, Salz

7.2. chromatographische Methoden

7.2.1. Tocopherole, HPLC-Fluoreszenz

Pumpe:	HPLC-Pump 420 Kontron Instruments
Injektion:	20µl, Autosampler 450 Kontron Instruments
Eluent:	Isooctan/Isopropanol 96 :4,1 v+v
Fluß, Temp.:	1ml·min ⁻¹ , 25°C
Säule:	Knauer: Zorbax Sil, 5µM, 4,6x250mm
Detektor:	Fluoreszenz Spektrophotometer Model F 1000 Merck-Hitachi
Messwellenlängen:	Ex.: 296nm, Em: 330nm
Integrator :	Shimadzu C-R6A Chromatopac, Attenuation: 5
Elutionsfolge:	-, -, -, -Tocopherol, kritisches Paar: ,

0,1-0,3g Probe werden ad 1ml in Isooctan gelöst, ggf. filtriert, und injiziert. Die Kalibrierung erfolgt über externe Kalibriergeraden (2,0-20µg/ml).

7.2.2. -Tocopherol, chirale-HPLC-UV

Eluent:	Heptan/1-Butanol 95 :5 v+v
Fluß, Temp.:	1ml·min ⁻¹ , 25°C
Säule:	Europac 01 5µM, 250x4,6mm (3,5-Dimethylphenylcarbamat-Cellulose)
Messwellenlänge:	290nm
Injektion:	20µl
Integrator :	Shimadzu C-R6A Chromatopac, Attenuation 5
Elutionsfolge:	(-)-SRR-, (+)RRR- -Tocopherol

Die Probe wird in Isooctan ad 1ml gelöst, filtriert und injiziert.

7.2.3. Phospholipide, HPLC-UV

Pumpe:	HPLC-Pump 420 Kontron Instruments
Injektion:	20µl, Autosampler 450 Kontron Instruments
Eluent:	Isooctan/Isopropanol/0,1%Ameisensäure 8 :8 :1 v+v+v
Fluß, Temp.:	1ml·min ⁻¹ , 25°C
Säule:	Knauer: Zorbax Sil, 5µM, 4,6x250mm
Detektor:	UV-Monitor 655A, Merck-Hitschi, Scale: 0,04
Messwellenlänge:	205nm
Integrator :	Shimadzu C-R6A Chromatopac, Attenuation: 3
Elutionsfolge:	NL, Cer., PE, NAPE, PA, PI, PC kritisches Paar: PE, PA

0,1-0,4g Probe werden im Laufmittel ad 1ml gelöst, ggf. filtriert und injiziert. Die Kalibrierung erfolgt extern über Sojalecithin-Standardverbindungen.

7.2.4. phenolische Antioxidantien, HPLC-UV

Pumpe:	HPLC-Pump 420 Kontron Instruments
Injektion:	20µl, Autosampler 450 Kontron Instruments
Eluent:	Methanol/Wasser/MTB-Ether/Phosphorsäure 75 :25 :5 :0,1 v+v
Fluß, Temp.:	1ml·min ⁻¹ , 25°C
Säule:	Knauer: Nukleosil-100 C18, 5 µM, 200x4,5mm
Detektor:	UV-Monitor 655A, Merck-Hitschi, Scale: 0,02
Messwellenlänge:	280nm (innerer Standard: NDGA – externer Responsfaktor)
Integrator :	Shimadzu C-R6A Chromatopac, Attenuation: 4

Die Probe wird im Laufmittel ad 0,8ml gelöst, mit 0,2ml NDGA-Standard (in Methanol) versetzt und injiziert. Die Kalibrierung erfolgt über die ermittelten Responsfaktoren. Die Propylgallatmessungen wird bei 274nm durchgeführt und extern kalibriert (20-140µg/ml).

7.2.5. Ascorbinsäure, HPLC-elektrochemische Detektion

Pumpe:	HPLC-Pump 420 Kontron Instruments
Injektion:	20µl, Autosampler 450 Kontron Instruments
Eluent:	Wasser/Methanol 95:5 v+v
Fluß, Temp.:	1ml·min ⁻¹ , 25°C
Säule:	Knauer: Nukleosil-100 C18, 5 µM, 200x4,5mm
Detektor:	Dionex Pulsed Amperometric Detector PAD-2
Potential:	+0,04·10 ⁻² V, Range: 4
Integrator :	Shimadzu C-R6A Chromatopac, Attenuation: 5

Die entfettete Probe (7.2.7.) wird unmittelbar nach der Entfettung injiziert. Kalibriert wird extern im Bereich 0,02-3µg/ml.

7.2.6. Hydroperoxide, HPLC-UV

Pumpe:	HPLC-Pump 420 Kontron Instruments
Injektion:	20µl, Autosampler 450 Kontron Instruments
Eluent:	Isooctan/Diethylether 88 :12 v+v
Fluß, Temp.:	1ml·min ⁻¹ , 25°C
Säule:	Knauer: Zorbax Sil, 5µM, 4,6x250mm
Detektor:	UV-Monitor 655A, Merck-Hitschi, Scale: 0,04
Potential:	233nm
Integrator :	Shimadzu C-R6A Chromatopac, Attenuation: 4
Elutionsfolge:	13-cis,trans; 13-trans,trans; 9-cis,trans; 9-trans,trans

Die Ethyllinolat-Probe wird in Isooctan ad 1ml gelöst und injiziert. Die Identifizierung der Peaks erfolgt Anhand von Literaturdaten [191]. Auf quantitative Auswertung über Standards wurde verzichtet.

7.2.7. -Dicarbonyle, HPLC-UV

Pumpe:	LC-10AT Shimadzu
Injektion:	40µl, Gina 50 Dionex
Eluent:	Methanol/Wasser – Gradient (Mischkammer: FCV-10 AL)
Gradient:	0-5min 30% MeOH, 5-12min 30-50% 12-20min 50-100% 20-30min 100% MeOH
Fluß, Temp.:	1ml min ⁻¹ , 30°C (Säulenofen: CTO-6A Shimadzu)
Säulen:	Vorsäule: Macherey-Nagel, CC8/4 Nukleosil 120-5 C18 Trennsäule: Macherey-Nagel, EC 250/4,6 Nukleosil 120-5 C18
Detektor:	UVD 340S DAD Gynkotheke
Wellenlänge:	318nm
Elutionsfolge:	D-Glucoson, 1-DH, 3-DH, 3-DP, 1,4-DDH, Glyoxal, 1,4-DDP, Methylglyoxal, Diacetyl; kritisches Paar: Glyoxal, 1,4-DDP

Gearbeitet wird sowohl mit Prä- als auch mit Postderivatisierung, d.h. die Proben werden entweder vor der Erhitzung oder erst danach mit o-Phenylendiamin behandelt. Die Abfangreaktion geht auf Morita et al. zurück [166]. Zu den Proben, die in 4-ml-Vials jeweils 0,1mg Ethyllinolat enthalten, werden je 3mg OPD in Methanol zugesetzt. Bei der Präderivatisierung wird mit N₂ das Lösungsmittel vertrieben und dann im Trockenschrank erhitzt. Mit Hilfe der Phasentrennung Chloroform-Hexan (1ml+2ml) / Methanol-Wasser (0,25ml+0,75ml) werden die Proben nach der Erhitzung zunächst entfettet. Nach der Phasentrennung wird die organische Phase möglichst vollständig abgenommen und nach weiterer 2ml-Hexanzugabe erneut entfernt. Von der verbleibenden polaren Phase werden 500µl zusammen mit 500µl Methanol in die Autosamplervials gefüllt und entsprechend vermessen. Bei der Postderivatisierung wird das OPD erst in den Autosamplervials über die 500µl Methanol zugegeben. Identifiziert und berechnet wird über eine Standardmischung (je 2,5µg/ml).

7.2.8. Fettsäuren, GC-FID

Chromatograph:	GC-14A Shimadzu
Injektion:	Autosampler AOC-14 Shimadzu (Split-Splitless-Injektor)
Trägergas:	Helium (He 21,34 PSI), 10ml min ⁻¹
Säule:	SP 2380-Kapillarsäule (Supelco, Bellefonte, USA); 30m x 0,25mm; Filmdicke: 0,25µm
Temp.-Programm:	100°C-175°C, 5°C min ⁻¹ , 10min isotherm; 175°C-220°C, 8°C min ⁻¹ , 10min isotherm
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Temp. 250°C
Brenngase:	Wasserstoff, Sauerstoff
Integrator:	C-R4AX Chromatopac Shimadzu

Die Überführung in Methylester erfolgt mit TMSH (N-Trimethylsulfoniumhydroxid) [6]. Ca. 10mg Fett-Probe werden in 0,5ml MTB-Ether gelöst mit 100µl TMSH versetzt und davon 1µl injiziert. Die Identifizierung erfolgt über einen Standardmix. Berechnet wird über die Flächen unter Annahme gleicher Responsfaktoren.

7.2.9. flüchtige Verbindungen, GC-MS (Headspace)

Chromatograph: GC-14A Shimadzu
 Injektion: Headspace Sampler: Agilent G1888 Headspace Sampler
 Split ratio: 1:1 (280°C, 196,8kPa)
 20ml-Vials, Ofentemp.: 60°C, Probenschleifentemp.: 165°C
 Trägergas: Helium (He 21,34 PSI)
 Fluß: 8,0ml min⁻¹ (2,5ml Split flow)
 Säule: Kapillarsäule: JW voc45 30db5+15db1701; 45m x 0,25mm,
 Filmdicke: 0,25µm, stabil bis 300°C
 Temp.-Programm: 50°C-200°C, 5,8°C min⁻¹;
 200°C-300°C, 12,0°C min⁻¹, 3min isotherm
 Detektor: MSD 5975, Agilent
 Scan-Bereich: 40,6-550,0

0,1g Ethyllinolat in Chloroform wird mit 0,1% -Tocopherol (in Isooctan), 0,5% Ascorbinsäure (in Methanol) und 1% Phospholipid (in Chloroform/ Methanol 3+1) und 1% p-Anisidin (in Methanol) versetzt und im 20ml-Probenvial am Stickstoffstrom eingengt. Nach Zugabe der inneren Standards wird verschlossen und im Trockenschrank 10h auf 110°C erhitzt. Die überstehende Gasphase wird bei 60°C über den Sampler injiziert. Gemessen wird im Scan-Modus (EI). Die Auswertung erfolgt über die Spektrenbibliotheken: [NIS_054k.L] bzw. [Wiley_7.L] und interne Standards.

7.2.10. Lipidklassen, Säulenchromatographie

Die Auftrennung der entölten Pflanzenlecithine in Neutrallipide (NL), Glycolipide (GL) und Phospholipide (PL) erfolgt entsprechend Rouser et al. [204] über Säulenchromatographie an aktiviertem Kieselgel (65-230 mesh, Merck). Das Kieselgel wird mit Chloroform in eine 20mm Säule ca. 300mm hoch eingeschlemmt. Eine Menge von 200mg Probe wird in Chloroform gelöst und auf die Säule aufgebracht. Mit mindestens 3 Säulenvolumina Chloroform werden die Neutrallipide eluiert, danach erfolgt die Elution der Glycolipide mit mindestens 5 Säulenvolumina Aceton und schließlich die der Phospholipide mit 4 Säulenvolumina Methanol.

7.2.11. Phospholipide, DC [109,165]

Platten:	Kieselgel-Glasplatten, Fluka 5x10cm, Schichtdicke: 0,25mm, mittlerer Porendurchmesser: 60Å
Laufmittel:	a.) Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 8,5+1,5+1+0,36 b.) Chloroform/Methanol/Ammoniak 8,1+3,1+0,5 c.) Chloroform/Methanol/Aceton/Eisessig/Wasser 10+4+4+2+1 d.) Dichlormethan/Eisessig/Methanol/Wasser 14+6+4+3
Detektion:	a.) Molybdat: 0,137g Natriummolybdat Dihydrat, 0,008g Hydraziniumsulfat, in Wasser lösen + 2ml konz H ₂ SO ₄ / 20ml; besprühen, 5min 110°C b.) reduzierende Verbindungen: 1.) 0,02g Eisen(III)-chlorid Hexahydrat in 10ml Ethanol 2.) 0,05g 2,2'-Bipyridyl in 10ml Ethanol Lösung 1 + Lösung 2, besprühen

7.3. nasschemische/ photometrische Methoden

7.3.1. Peroxidzahl

DFG-Einheitmethode C-VI 6a (98)

Kaltmethode nach Wheeler. Probe (0,1-5g) wird in Isooctan/ Eisessig 3+2 gelöst und mit Kaliumjodid versetzt. Das freigesetzte Iod wird mit Natriumthiosulfat-Lösung (0,002M) gegen Stärke als Indikator titriert. Berechnung als mmol O₂·kg⁻¹.

$$POZ = \frac{V[ml]}{Einwaage[g]}$$

7.3.2. Anisidinzahl

DFG-Einheitmethode C-VI 6e (84)

0,05-0,3g Probe werden ad 2ml Isooctan gelöst in in 1cm Küvetten bei 350nm vermessen (B). Nach Zusatz von 0,4ml p-Anisidin-Reagenz (0,025g in 10ml Eisessig) wird nach 10min (im Dunkeln) erneut vermessen (H).

$$AnZ = \frac{2 (1,2 H - B)}{Einwaage[g]}$$

7.3.3. Säurezahl [157]

1-5g Probe werden in ca. 100ml Ethanol (95%) /Diethylether (1+1, gegen Phenolphthalein neutralisiert) gelöst und mit 0,01N ethanolischer KOH gegen Phenol-

phthalein (1%ig in Ethanol) titriert. Der Faktor der KOH wird z.B. mit 0,01N HCl bestimmt.

$$SZ = \frac{V[\text{ml}] \cdot F \cdot 56,1}{\text{Einwaage}[\text{g}]}$$

7.3.4. DPPH-Aktivität

Mit DPPH wird eine Kalibriergerade erstellt: $\text{Ext.}^{515\text{nm}} = 0,0107 \cdot c [\mu\text{M}] - 0,032$. Eine Extinktion von 1 entspricht grob einer Konzentration von 100 μM (96,45 μM). Die konzentrierte DPPH-Stammlösung in Toluol wurde im Tiefkühler aufbewahrt. Sie wird so verdünnt (Reagenzlösung), dass 1ml + 1ml Toluol eine Extinktion von ca. 1,0-1,1 ergibt. Die Probe wird in Toluol gelöst und ein Aliquot ad 1ml in eine Küvette gefüllt. Nach Zusatz von 1ml DPPH-Reagenzlösung wird die Extinktion bei 515nm über die Zeit gegen einen Blindwert vermessen. Der Abbau $[\text{DPPH}]_{\text{abg.}}$ wird in den Diagrammen aufsteigend in μM dargestellt.

7.3.5. konjugierte Oxidene (Ext. 233nm)

Die Messung erfolgt mit dem Spektrophotometer: UV/visible-UV-260 Shimadzu. Das Ethyllinolat wird zu 5 $\mu\text{g/ml}$ in Hexan gelöst. Von der Lösung werden 200 μl ad 2ml in einer UV-Küvette vermessen.

7.3.6. p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktive Substanz, Pyrrole

Die Pyrrol-Strukturen werden über die Reaktion mit p-(Dimethylamino)-benzaldehyd bestimmt. Die Umsetzung wird wie bei Hidalgo et al. [92] beschrieben durchgeführt. Die Kalibrierung mit N-Methylpyrrol erbringt nach 1h bei 60°C, wahrscheinlich infolge von thermischen Abbaureaktionen, nur eine geringe Färbung. Daher wurde 0,5g Ethyllinolat in 1ml Hexan nach Zugabe von 1400 μl 0,1N HCl in 2-Propanol und 350 μl Ehrlich's-Reagenz (500mg p-(Dimethylamino)-benzaldehyd / 25ml 0,1N HCl in 2-Propanol) über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Die Rotfärbung wird gegen einen Blindwert bei 560nm vermessen und als N-Methylpyrrol berechnet. Das Absorptionsmaximum des Pyrrol-Produkts beträgt 548nm.

7.3.7. Fällung der Phospholipide

Ca. 10g Pflanzenlecithin oder Soja-PC (stabilisiert mit α -Toc.) werden in 10ml Diethylether gelöst und in 300ml Aceton unter starkem Rühren eingeschüttet. Nach dem Absetzen wird der Acetonüberstand verworfen und der Rückstand mit N_2 getrocknet.

7.3.8. Phosphat

DFG-Einheitmethode C-III 16a (97)

Die Probe wird mit Magnesiumacetat verascht und bei 800°C geglüht. Mit 2N-Schwefelsäure wird in der Wärme gelöst (Wasserbad). Umsetzung mit Natriummolybdat/ Hydraziniumsulfat und Photometrie bei 830nm. Kalibrierung mit Kaliumdihydrogenphosphat.

7.3.9. reduzierende Zucker

Die Bestimmung der reduzierenden Zucker erfolgt über die reduktometrische Methode nach Luff-Schoorl [157]. Die Hydrolyse der Glycolipide wird entsprechend der Saccharoseinversion (Zollinversion) mit Salzsäure durchgeführt [157]. Die Berechnung erfolgt als Galactose.

7.4. apparative Methoden

7.4.1. Atom-Absorptions-Spektroskopie (Graphitrohr AAS)

Je 0,3g Probe werden verascht, 2h bei 550°C geglüht und mit 5ml Salpetersäure (65%) und 2ml Wasserstoffperoxid (30%) zunächst bei 50°C und nach dem Ausgasen bei 150°C bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 2ml Salpetersäure bei 80°C aufgenommen und ad 10ml mit bidest. Wasser aufgefüllt. Die Messung von Fe und Cu erfolgt mit einem Perkin/ Elmer Zeeman Atom-Absorption-Spektrometer 4100 ZL 4335 über externe Kalibrierung. Die Verdünnung der Proben erfolgt mit 0,2% HNO_3 . Es werden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Modifier wird Magnesiumnitrat (0,015mg/5 μ l) eingesetzt. Injiziert werden 20 μ l Probe und 5 μ l Modifier. Temperaturführung des Graphitrohrs: 110°C -1s, 130°C -30s, 1400°C -10s, 2100°C -0s (Messung), 2450°C -1s.

7.4.2. Massenspektroskopie

Typ: LCQ 3000 Applied Biosystems

Die Proben wurden direkt über eine Spritzenpumpe in das Massenspektrometer injiziert. Das Electrospray-Interface wurde zum Entfernen des Eluenten, bzw. zur Erzeugung von Analytmolekülen genutzt.

Messen der Proben im Manuellen Tune-Modus – Q1-MS, d.h. Full-Scan

1. Zuerst wurde ein bestimmter Massenbereich eingestellt (in dem der zu untersuchende Analyt sich befindet) und abgescannt.
2. Die Polarität der ESI-Needle (positiv oder negativ) wird ausgewählt.
3. Die Potentiale: Declustering Potential (DP; -90V/-50V, 90V/50V), Entrance Potential (EP; -10V, 10V), die Temperatur der Quelle (450°C/500°C), die Gase GS1 (12-40psi-12psi) und GS2 (0-35psi). Diese werden manuell eingegeben.

Messen der Proben im Compound Optimization Modus – Fragmentierung einer vorgegebenen Masse, MRM

1. Es wurden jeweils die 6 intensivsten Fragmente nach Kollision im Q2 des vorgegebenen MW im Q3 gemessen
2. Die jeweiligen Potentiale, die nötig sind für den jeweiligen Zerfall in ein bestimmtes Fragment werden im jeweiligen Ausdruck angegeben (CE- Kollisionsenergie, CXP: Collision Cell Exit Potential).

7.4.3 Magnetische Resonanzspektroskopie

NMR-Gerät: DRX 400 der Firma Bruker (1H 400MHz und 13C 100.6 MHz)

Die Proben wurden in deuteriertem Methanol gelöst und vermessen.

8. Zusammenfassung und Diskussion

Die antioxidativen Eigenschaften der Phospholipide lassen sich nicht wie bei phenolischen Antioxidantien direkt auf die Inaktivierung freier Radikale durch Abgabe von H-Atomen zurückführen. Für keines der Phosphatide wird ein Abbau des DPPH-Radikals beobachtet. Pflanzenlecithine als solches entwickeln aber bei thermischer Behandlung (110°C) unter Bräunungsentwicklung eine DPPH-Aktivität (S.58ff). Unter Röstbedingungen (5min, 150°C) wird diese auch nur von einer sehr schwachen Bräunung begleitet. Die durchgeführten Untersuchungen (4.3. S.100ff) haben gezeigt, dass der Zusatz von 1% Sojalecithin zu raffinierten Pflanzenölen, sowohl bei Lagerung unter Raumtemperatur als auch bei 110°C, den oxidativen Verderb verlangsamt. Die genaue Identifizierung der Gründe für die antioxidativen Eigenschaften wird zum einen durch den komplexen Aufbau der Pflanzenlecithine und zum anderen durch die vielfältigen Wechselwirkungsmöglichkeiten der polyfunktionellen Phosphatide im Gesamtprozess der Lipidperoxidation erschwert.

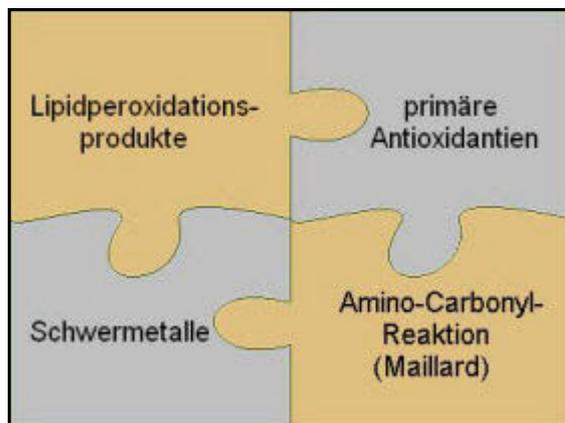


Abbildung 8.1 Phospholipide; komplexe Wechselwirkungen in der Lipidperoxidation

So ist z.B. eine geringe Peroxidzahl eines Öls bei Phosphatidanwesenheit formal über jede der 4 dargestellten Wechselwirkungen erklärbar. Prooxidative Übergangsmetallionen können komplexiert worden sein, der Abbau primärer Antioxidantien über den synergistischen Effekt verlangsamt, oder die Peroxide auch abgebaut wurden sein – dies sowohl über ionische Mechanismen, als auch über eine Beteiligung an Bräunungsreaktionen. Die einzelnen Prozesse bedingen einander und können nicht separat betrachtet werden. So gibt es z.B. kein eisenfreies Ölsystem. Als Schlüsselstellen zur Erklärung der antioxidativen Wirkung der Phospholipide konnte

erstens ihre Wechselwirkung mit Übergangsmetallionen und zweitens die Regeneration von primären Antioxidantien herausgearbeitet werden. Über den Einfluss von Aminophosphatiden auf die thermische Bräunung und die Wechselwirkung mit Glycolipiden wurden nur anhand von Modelluntersuchungen mit einfachen Kohlenhydraten hinsichtlich der Verzögerung der Lipidoxidation erste interessante Ergebnisse erzielt.

1.) Wechselwirkung mit Schwermetallen und Lipidperoxidationsprodukten

Durch die von Übergangsmetallionen katalysierte Peroxidzersetzung besteht ein enger Zusammenhang zwischen den Wechselwirkungen mit Schwermetallen und denen mit Lipidperoxidationsprodukten. Saure Phosphatide besitzen eine Metallaffinität und können die prooxidativen Effekte der Übergangsmetalle beeinflussen. Schwermetalle wirken prooxidativ, da sie aus Peroxiden reaktive Radikale freisetzen (Fenton-Reaktion). Die freie Phosphatidsäure zeigt als einziges Phosphatid eine deutliche Inaktivierung. Die Menge (m) an Eisen(III)- bzw. Kupfer(II)-Ionen die inaktiviert werden ist etwa gleich. Der Effekt lässt sich durch eine Maskierung über die Bildung von MePA_2 -Komplexen mit K_B -Werten um $3 \cdot 10^8 \text{ l}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$ erklären. Beim $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ bewirkt die Komplexbildung eine Entfärbung der Lösung. Unter Röstbedingungen erhöht sich beim Sojalecithin aber auch die Schwermetalltoleranz. Sein Eigengehalt an Fe liegt im Bereich 20-70ppm, der an Cu bei 1,5-3,5ppm.

Die von Saito et al. [205] beschriebene Eigenschaft der Peroxidzersetzung durch Phospholipide lässt sich bei 12-stündiger Inkubation in Ethyllinolat nicht beobachten. Andererseits steigt in Rapsöl nach Zugabe von 1% Sojalecithin bei 110°C-Lagerung die Anisidinzahl vor der Peroxidzahl. Der Verderb von Ethyllinolat unter Phosphatiden liefert als flüchtige Verbindung insbesondere Hexanal, was mit der sauren Peroxidzersetzung zusammenhängen kann. (Von Saito et al. [205] wird der Effekt aber basischen Strukturen zugeschrieben.) Die gebildeten Hexanalmengen fallen in der Reihe: PE > PA > PI > PC. Durch Inkubation von PE mit Aldehyden konnten entsprechende fluoreszierende Schiff-Basenstrukturen nachgewiesen werden. Dadurch werden einerseits prooxidative Verbindungen wie 2-Octenal oder 2,4-Decadienal gebunden, andererseits führt die Blockierung der Aminogruppe zur pH-Absenkung. Die von Farmer & Mottram [48] an Rindertalg durch PE beobachtete

Verschiebung von 2-Alkenalen hin zu Methylketonen konnte in Ethyllinolat nicht beobachtet werden.

2.) Synergistischer Effekt mit primären Antioxidantien

Phospholipide sind in der Lage synergistisch den Effekt von primären Antioxidantien zu verstärken [37,38,100,101]. Der synergistische Effekt tritt insbesondere bei phenolischen Verbindungen auf, deren Semichinonradikale sich nicht durch Disproportionierung zu Chinonen stabilisieren können (BHA, Tocopherol, Flavonoide). Die synergistische Wirkung ist bei PE größer als bei PC; sie tritt zudem nur bei unpolaren Phosphatiden auf, so z.B. nicht beim Dibutyryl-PC [126]. Segawa et al. [215] erklären den höheren synergistischen Effekt von PE gegenüber PC mit einem H-Transfer aus der Aminogruppe zum Tocopheryl-Radikal und damit über eine Tocopherol-Regenerierung. Der synergistische Effekt steigt proportional zur Anzahl der Amino-Wasserstoffe im Phospholipid-Molekül [216]. Weng & Godon [254] konnten 1993 andererseits zeigen, dass PE auch α -Tocopherylchinon zu α -Tocopherol regenerieren kann. Den größten Effekt besitzen Lecithine in Verbindung mit Tocopherolen und Ascorbinsäure [29,77,129,150,212,255]. Die Regeneration von Tocopheryl-Radikalen durch Ascorbinsäure wurde erstmals von Packer et al. [183] 1979 beschrieben.

Die Untersuchungen an raffiniertem Rapsöl bzw. Sojaöl (4.3. S.100ff) haben gezeigt, dass der Zusatz von 1% Sojalecithin den Abbau der enthaltenen Tocopherole, sowohl bei Lagerung unter Raumtemperatur als auch bei 110°C, verlangsamt. Eine Menge von 1% Sojalecithin wurde gewählt, da der antioxidative Effekt ($IP^{110^\circ C}$) im Modell: Ethyllinolat/ 0,05% α -Tocopherol gerade bei ca. 1% Lecithinzugabe einen gewissen Sättigungspunkt erreicht. Die Induktionsperiode^{110°C} des Ethyllinolats erhöht sich hierbei von ca. 1,5h auf ca. 5,5h. Modelluntersuchungen mit Dipalmitoyl-PC und Dipalmitoyl-PE zeigten weiter, dass sich die Induktionsperiode durch Zugabe von 0,5% L-Ascorbinsäure noch deutlich steigern lässt:

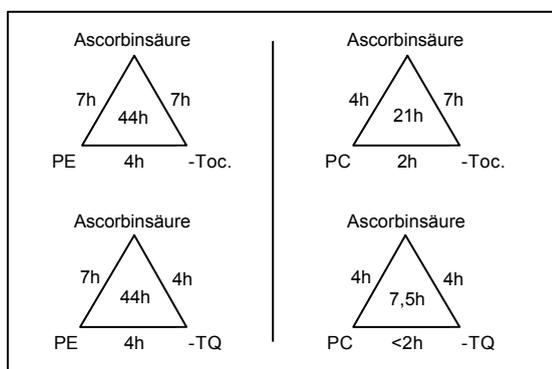


Abbildung 8.2 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C, unter Zusatz von 1% PE bzw. PC, 0,5% Ascorbinsäure sowie 0,05% α -Tocopherol bzw. α -Tocopherylchinon (-TQ)

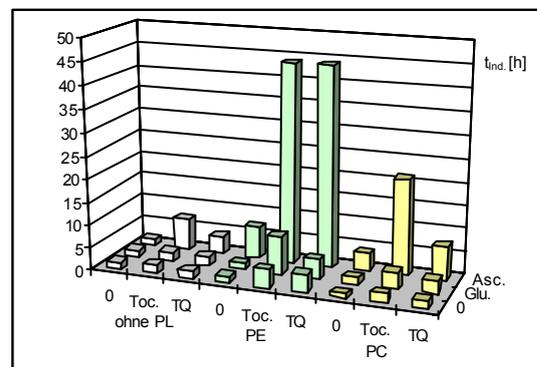


Abbildung 8.3 Induktionsperiode von Ethyllinolat bei 110°C, unter Zusatz von 1% PE bzw. PC, 0,5% Glucose bzw. Ascorbinsäure sowie 0,05% α -Tocopherol (Toc.) bzw. α -Tocopherylchinon (TQ)

Allerdings ist der PC-Effekt nur etwa halb so groß wie der des PE's. Die Werte, die bei Austausch von α -Tocopherol durch α -Tocopherylchinon erhalten werden, deuten ein Regenerationsphänomen an, das beim PC nicht auftritt und nur in Verbindung mit L-Ascorbinsäure effektiv die Lipidperoxidation verzögert. Der PE-Effekt ist für α - und β -Tocopherol größer als bei γ und δ . Auch bei Untersuchungen mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure zeigt sich, dass der Gesamteffekt etwa zu gleichen Anteilen aus einem physikalischen Dispersionseffekt (PC) und einer chemischen Regeneration (PE) verursacht wird. Eine quantitativ kleinere, aber prinzipiell ähnliche synergistische Wirkung wird auch bei Einsatz von D-Glucose anstelle der L-Ascorbinsäure erhalten. Im System 1%PE /0,5%D-Glu. /0,05% α -Toc. ist $IP^{110^\circ C}$ von Ethyllinolat: 11 3 h.

Die Regeneration von α -Tocopherol aus α -Tocopherylchinon gelingt bei erhöhter Temperatur mit PS und PE, aber auch mit Sojalecithin (S.108ff). Die Reaktion mit PE lässt sich durch Essigsäure katalysieren. Die Ausbeute beträgt ca. 35%. Wird RRR- α -Tocopherol oxidiert und mit PE/Ascorbinsäure regeneriert, bildet sich nur das (2R)-konfigurierte α -Tocopherol (S.139). Das bedeutet, dass keine freie Drehbarkeit der Molekülgruppen am C2 gegeben ist und bei der Recycling die biologische Aktivität erhalten bleibt. Da Ascorbinsäure nur α -Tocopherylradikale regenerieren kann, nicht aber das α -Tocopherylchinon selbst, muss PE irgendeine Aktivierung bewirken. In Abb. 8.4 und 8.5 sind zwei verschiedene Aktivierungen zur Diskussion gestellt.

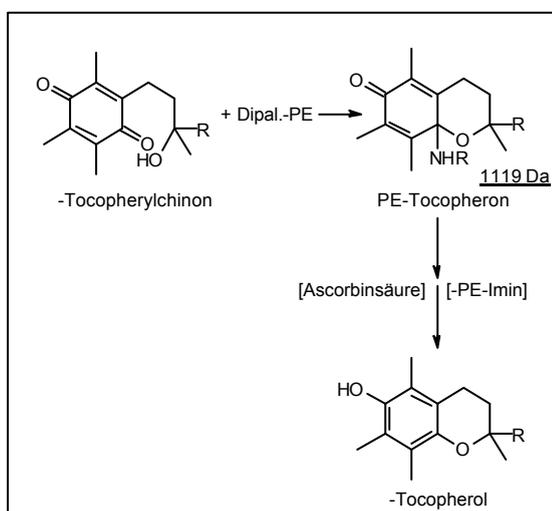


Abb. 8.4 Regeneration durch PE-Toc.-Aktivierung

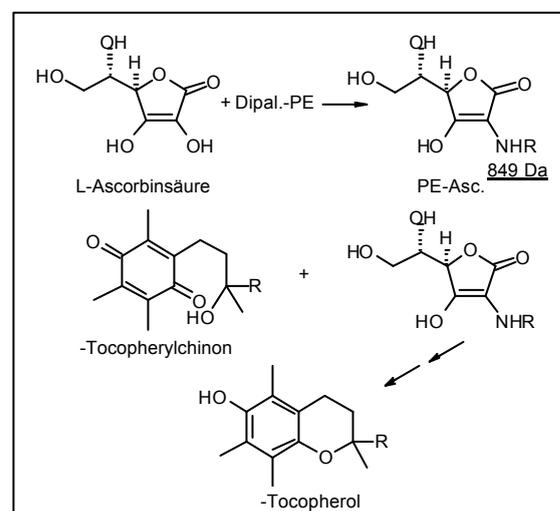


Abb. 8.5 Regeneration durch PE-Asc.-Aktivierung

Zum einen die Aktivierung des α -Tocopherols durch ein PE-Kondensat (1119Da), dass dann durch Ascorbinsäure reduziert werden kann; zum anderen die Aktivierung von Ascorbinsäure selbst durch Bildung eines PE-Asc.-Kondensats (849Da). Beide Massenspuren wurden bei MS-Untersuchungen gefunden. Der NMR-Beweis für die angegebenen Strukturen steht aber noch aus. Da PE nur in Verbindung mit Ascorbinsäure oder auch Glucose aus α -Tocopherylchinon eine Precursor-Verbindung bildet, die bei der HPLC-Messung der Tocopherole (7.2.1.) vor α -Tocopherol (8min und β -Toc.: 12min) eluiert, scheint es auch zwei verschiedene Reaktionswege zu geben. Nach den Brown-Substituentenkonstanten (S.70) für Amine und Alkylamine ist für PE-Kondensate eine Absenkung des Redoxpotentiale anzunehmen. Geht man davon aus, dass gleiches auch für das Ascorbinsäure-Kondensat gilt, ist die α -Tocopherylchinon-Reduktion auch über das erhöhte Reduktionsvermögen erklärbar. Nach der Literatur sind Verbindungen mit Tocopheronstruktur bereits durch Ascorbinsäure regenerierbar [177]. Tocopherone lassen sich anhand ihrer typischen UV-Absorption bei 240nm gut von Tocopherol (290nm), Tocopherylchinon (270nm), dem Dihydroxydimer (300nm) und dem Spirodienonether (300nm) unterscheiden [130]. Die Fraktion in der die Massenspur 1119Da gemessen wurde, zeigt eine Absorption bei 250nm und eine gelb/grünliche Fluoreszenz. Werden α -Tocopherone mit Salzsäure behandelt, zerfallen sie in α -Tocopherylchinon, daneben wird auch α -Tocopherol gebildet, da zwischen α -Tocopherol und α -Tocopherylchinon ein Redoxgleichgewicht besteht [108]. Das α -Hydroxytocopheron wird mit Ascorbinsäure vollständig zu α -Tocopherol umgesetzt [111,170,177]. Beim Abbau von PE entsteht zudem u.a. PA (648 Da, S.165f), welche Schwermetalle binden kann. Der Spaltung soll über ein cyclisches Immonium-Ion ablaufen [220].

2a.) Kohlenhydrat-Synergismus

In Verbindung mit PE/Glucose konnte der synergistische Effekt mit α -Tocopherol in Zusammenhang mit der Maillard-Reaktion gebracht werden. Die Regeneration von α -Tocopherol läuft hier im Gegensatz zu PE/Ascorbinsäure der Bräunung hinterher. Durch Röstversuche wurde gezeigt, dass Produkte der frühen Phase der Maillard-Bräunung für den Effekt verantwortlich sind. So genügt das Erhitzen von PE und Glucose für 5min auf 150°C um die Induktionsperiode von Ethyllinolat/ 0,05% α -

Tocopherol bei 25°C von ca. 4 auf über 18 Wochen zu erhöhen (S.142). Nach dieser kurzen Röstung tritt nur eine vernachlässigbar kleine Bräunung auf, dennoch ist die beginnende Bräunung auch gleichzeitig ein guter Indikator für den antioxidativen Effekt von PE/Glucose/ -Tocopherol über den „Kohlenhydrat-Synergismus“. In Präderivatisierungsversuchen mit o-Phenylendiamin konnte hier D-Glucoson nachgewiesen werden, das als Reducton die Rolle der Ascorbinsäure übernimmt. Nach 2min sind ca. 3% und nach 10min ca. 6% der enthaltenen Glucose zu D-Glucoson oxidiert (S. 161). Die Oxidation von Amadori-Produkten führt nach Kawakishi et al. [116] zum D-Glucoson. Das PE-Glu.-Kondensat (Schiff-PE bzw. Amadori-PE) wurde über die Massenspur 853Da gemessen. Im Sojalecithin selbst konnte kein D-Glucoson bestimmt werden, obwohl es durch die enthaltenen Glycolipide ca. 6,5% hydrolysierbare Kohlenhydrate (vor allem Galactose) enthält. Beim Erhitzen von 1% Sojalecithin in Ethyllinolat/ 0,05% -Tocopherol auf 110°C wurde aber ein Anstieg der p-(Dimethylamino)-benzaldehyd-reaktiven Verbindungen (Pyrrole) schon während der ersten Erhitzungsminuten gemessen. Die Stoffe werden ohne -Tocopherol erst nach ca. 3 h gebildet (S. 67). An dieser Stelle kann daher die These aufgestellt werden, dass auch Pyrrol-Verbindungen aus der Maillard-Bräunung/ Lipidperoxidation ähnlich wie Reducton-Strukturen als Antioxidantien wirken und mit der -Tocopherolrecyclierung in Verbindung stehen. Von den heterocyclischen Verbindungen der Maillard-Reaktion ist bekannt, dass Pyrrole stärker antioxidativ wirken als Furane [131]. Formyl- oder Acetyl-Seitenketten erhöhen bei den Pyrrolen die antioxidative Aktivität, haben aber bei einfachen Furanen keinen Einfluss. Bei den Furanonen wird der antioxidative Effekt auf die -OH-Gruppe zurückgeführt [245]. Da sämtliche OH-Gruppen in -Stellung zum Pyrrol-Ring leicht nukleophile Substitutionsreaktionen eingehen, neigen solche Strukturen zur Polymerisation [11]. Bei MS-Scans wurden im PE/Glucose-Modellversuch neben Amadori-Dipal.-PE (853) u.a. auch die Massenspuren 835 (853-18), 799 (853-3·18) und 648 (PA) gefunden (S.163ff). Die 799 entspricht formal dem Pyrrol-PE, dem Pyridiniumbetain oder dem Furosin. Letzteres bildet sich bei der sauren Hydrolyse von Amadori-Produkten über das 4-DH^{Amin} [132]. Das 4-DH^{Amin} (835) gilt auch als Precursor für das Aminoreducton: 4,5-DDH^{Amin} [143].

Auch bei Propylgallat und 2,5-Dihydroxybenzoesäure treten in Verbindung mit PE Regenerationseffekte auf. Bemerkenswert ist die schnelle und vollständige Regeneration der Tocopherole in Ethyllinolat durch PE oder Sojalecithin bei Erhitzung auf 110°C (S.113). Hier scheint ein Gleichgewichtsphänomen bzw. eine katalytische H-Übertragung vorzuliegen. Der Effekt tritt mit PC nicht auf. Möglicherweise oxidiert PE in Form eines Aminoxids Linolsäurealkoxyradikale zur Ketosäure + Aminoxid-H und überträgt den Wasserstoff auf Tocopherylradikale [192]. Lin et al. [147] haben auch freie Aminoxide von Prolin, Histidin und Tryptophan erfolgreich als Antioxidantien in Lipiden eingesetzt.

In Schema 8.6. sind die unter 1. und 2. beschriebenen Effekte der Phosphatide nocheinmal stark vereinfacht zusammengestellt:

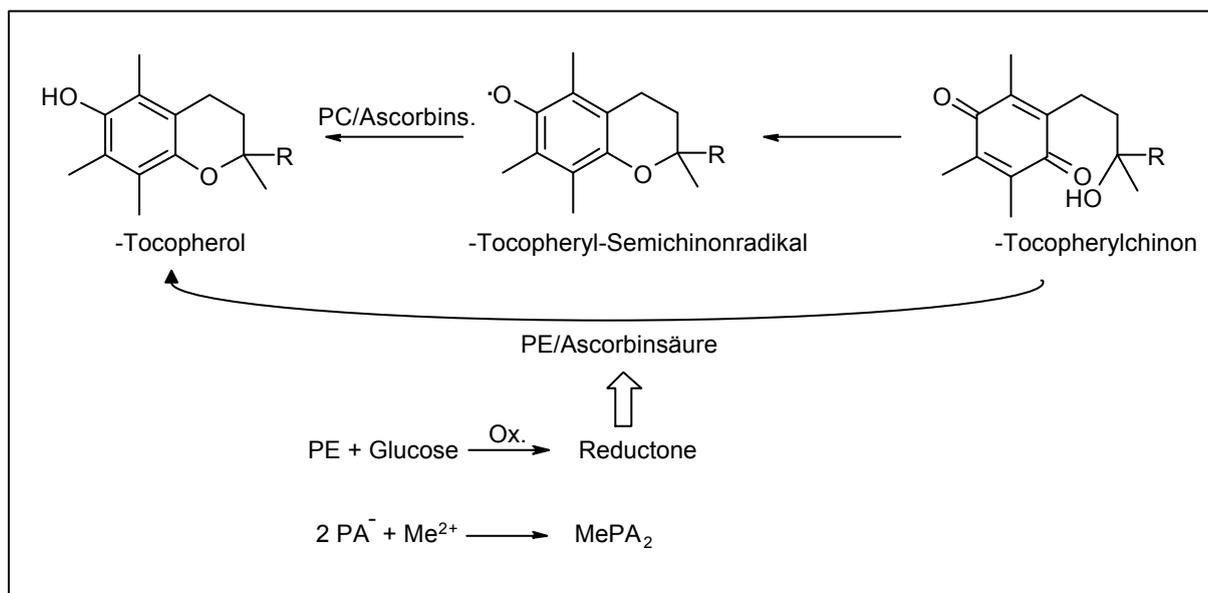


Abb. 8.6 Effekte der Phosphatide

Der bei Anwesenheit von Ascorbinsäure nur etwa halb so große antioxidative Effekt von PC gegenüber PE erklärt sich dadurch, dass PC nur die -Tocopherol-Semichinonradikale regenerieren kann. Prinzipiell gleiches wurde auch für die anderen Tocopherol-Homologen gefunden, aber auch für BHA und für größere Mengen an 2,5-Dihydroxybenzoesäure (S. 130ff). Für - und -Tocopherol ist der Effekt von PE sogar mehr als doppelt so hoch, wie der des PC's. Der Grund dafür liegt im besonderen Abbauverhalten dieser Homologen, speziell im Auftreten der antioxidativen Etherdimere.

3.) Mechanistische Betrachtung: Tocopheryliumphosphat-Theorie

Wie bereits dargestellt spielt bei den antioxidativen Effekten der Phospholipide die Regeneration primärer Antioxidantien eine entscheidende Rolle. Es stellt sich nun die Frage, wie diese Regeneration beim wichtigsten natürlichen Antioxidants, dem α -Tocopherol, abläuft. Aus den Grafiken 8.2, 8.3 und 8.6 geht hervor, dass für den antioxidativen Effekt neben Phosphatiden zusätzliche Reduktionsäquivalente – z.B. in Form von Ascorbinsäure – nötig sind. Für PE und PS als solches ist die Regeneration von α -Tocopherylchinon zu α -Tocopherol aber auch ohne weitere reduzierende Stoffe möglich (S.108). Das bedeutet, dass PE bzw. PS oxidiert werden. Die Möglichkeit, dass die beiden Amino-Phosphatide lediglich eine Disproportionierung des α -Tocopherylchinons bewirken, lässt sich zwar nicht sicher ausschließen, erscheint aber in Anbetracht des bevorzugten Abbaus dieser Phosphatide bei thermischer Behandlung eher unwahrscheinlich. Zudem ist fraglich, was das Oxidationsprodukt des α -Tocopherylchinons sein soll. Andererseits war auch der Nachweis oxidierter Spezies der Amino-Phosphatide unmöglich, zumal primäre Amine keine „glatten“ Oxidationsreaktionen eingehen. Als Produkte kommen u.a. Imine, cyclische Imine, Hydroxylamine oder auch Aminoxide in Betracht. Geht man davon aus, dass die bei der Regenerations-Reaktion in Toluol bei 100°C gebildeten α -Tocopherol-Moleküle nicht durch eine Oxidation des Toluols entstanden sind, dann stammt der dazu nötige Wasserstoff aus den Aminogruppe des PE's.

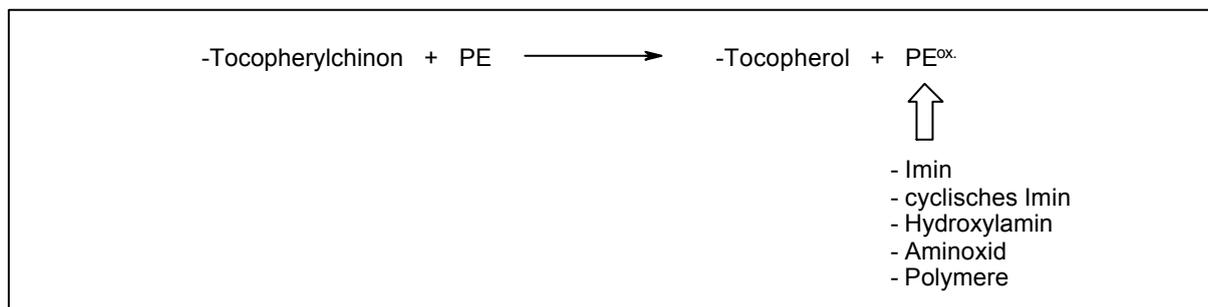


Abb. 8.7 PE als Reduktionsmittel für α -Tocopherylchinon: Brutto-Reaktion

Da aber das α -Tocopherylchinon weder durch Ascorbinsäure noch durch Ascorbinsäure/PC regeneriert wird, fungieren die Aminogruppen nicht nur als Reduktionsäquivalente, sondern sind auch als nukleophile funktionelle Gruppen von Bedeutung. Die bereits in Abb. 8.4 dargestellte Aktivierung des α -Tocopherylchinons

mit Dipalmitoyl-PE zu einem PE-Kondensat (1119Da, S.123) rückt daher ins Zentrum des Interesses.

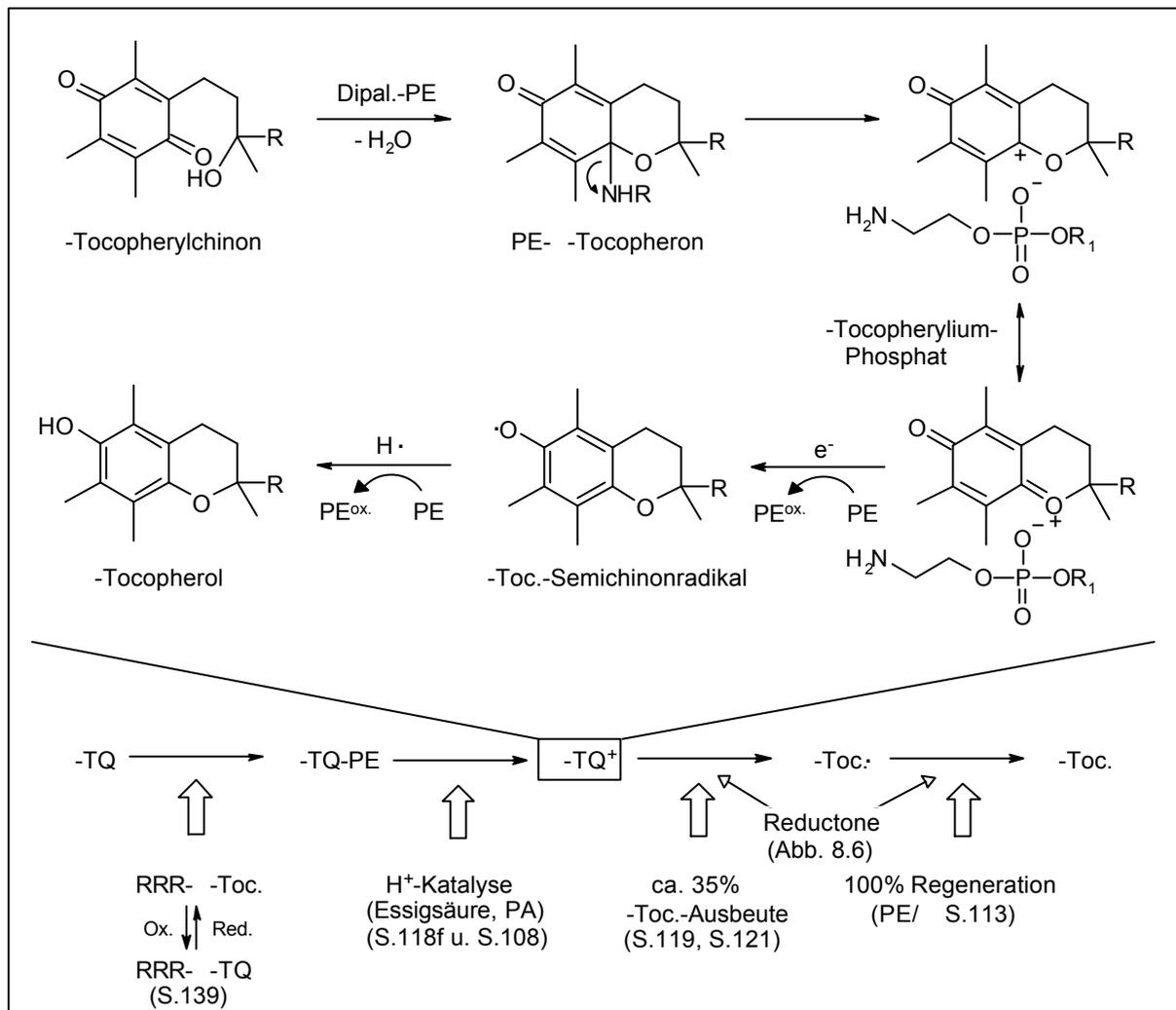


Abb. 8.8 mechanistische Deutung der Ergebnisse: Tocopheryliumphosphat-Theorie

Durch den nukleophilen Angriff der Amino-Gruppe auf die Chinon-Carbonyl-Gruppe bildet sich ein reaktiveres cyclisches Halbaminale. Das fluoreszierende Kondensat ist säurelabil, was insbesondere die Isolierung der entsprechenden ortho-PE-Verbindung erschwert. Darüberhinaus kann beim PE-Tocopheron auch über seiner Schwermetallaffinität eine bevorzugte Redoxaktivität vermutet werden. Die These, dass das eigentliche Target der Reduktion ein Tocopheryliumion ist, wird dadurch gestützt, dass Säuren wie PA oder Essigsäure den Regenerationsprozess beschleunigen. Der Übergang des PE-Kondensats in das mesomeriestabilisierte Tocopherylium-Salz besitzt offenbar eine höhere Aktivierungsbarriere und ist als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt anzusehen. Arrhenius-Verhalten der Reaktion vorausgesetzt, ist

über die Absenkung der Aktivierungsenergie durch die saure Katalyse die Reaktionsgeschwindigkeit auch kaum noch über die Temperatur beeinflussbar. Die besonders gute Recyclierung im Falle von PS (Abb. 4.43 S.108) lässt sich zwanglos über die enthaltene Carboxyl-Abgangsgruppe erklären. Es stellt sich aber die Frage; warum durch PE nicht einmal die Hälfte alle α -Tocopherylchinon-Moleküle regeneriert werden? Die Ausbeute beträgt gut 35% und wird von der Essigsäure-Katalyse nicht beeinflusst (S.119, S.121). Geht man zunächst einmal davon aus, dass der zweite Schritt der Regeneration, die Reduktion des Semichinon-Radikals zum α -Tocopherol, problemlos und mit 100%iger Ausbeute abläuft – diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Versuche des thermischen Abbaus von α -Tocopherol in Linolsäureethylester (S.113) gestützt – so ist allein die Umsetzungsrate des α -Tocopheryliumions ausschlaggebend. Für die Reaktion stehen für n Tocopheryliumionen n Elektronen (im PE-Phosphat) zur Verfügung. Nimmt man eine zufällige Verteilung der Elektronen an, ist die Wahrscheinlichkeit p , dass bei n Tocopheryliumionen alle n Elektronen in anderen Tocopherylium-Teilchen sind, im Grenzwert für $n \rightarrow \infty$:

$$p = \lim_{n \rightarrow \infty} \left(\frac{n-1}{n} \right)^n = \lim_{n \rightarrow \infty} \left(1 - \frac{1}{n} \right)^n = \frac{1}{e}$$

D.h. werden n Elektronen völlig zufällig auf n α -Tocopheryliumionen verteilt, geht die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tocopheryliumion kein oder genau ein Elektron enthält gegen: $\frac{1}{e} \approx 0,3679\dots$ bzw. $\sim 37\%$, für $n \rightarrow \infty$.

Reagieren im zweiten Schritt der Reduktion diese 37% Semichinoradikale nun nahezu vollständig zu α -Tocopherol, erklärt sich damit auch die Ausbeute von ca. 35%. Die Regeneration von nur knapp jedem α -Tocopherylchinon-Teilchen, liefert auch eine Begründung für die geringen antioxidativen Eigenschaften des PE's als solches. Erst durch die Anwesenheit von ausgewiesenen Reduktionsmitteln wie L-Ascorbinsäure, oder des in der Kohlenhydrat-Bräunung bzw. -Oxidation auftretenden D-Glucosons kommt es zur Ausbildung eines praktisch nutzbaren antioxidativen Effekts, etwa zur Oxidationsstabilisierung von Samenölen. Die Beobachtung, dass RRR- α -Tocopherol nach vollständiger Oxidation mit Blei(IV)-acetat durch PE/Ascorbat wieder zur RRR-

Form der α -Tocopherols regeneriert wird, zeigt meiner Meinung nach, dass an keiner Stelle α -Tocopherol-C2-Radikale bzw. α -Ionen gebildet werden. Der vorgeschlagene Mechanismus trägt dem Rechnung. Der in Verbindung mit Ascorbinsäure nur etwa halb so große antioxidative Effekt von PC gegenüber PE erklärt sich – wie bereits in Abb. 8.6. gezeigt wurde – dadurch, dass PC nur die α -Tocopherol-Semichinonradikale regenerieren kann. Zwar kommt der in Abb. 8.8 vorgestellte Mechanismus ohne die spezielle Aktivierung der Ascorbinsäure durch PE aus, ich bin aber davon überzeugt, dass die gemeinsame Affinität beider Stoffe zum PE letztlich der Schlüssel für die beobachteten antioxidativen Effekte ist.

4.) Stabilisierung von Lebensmitteln durch Pflanzenlecithine

Wie bereits eingangs erwähnt, wird durch Zusatz von 1% Sojalecithin zu raffinierten Pflanzenölen, sowohl bei Lagerung unter Raumtemperatur als auch bei 110°C, deren oxidativer Verderb verlangsamt. Bei den weiterführenden Untersuchungen an komplexeren Lebensmittelsystemen konnten keine stabilisierenden Effekte bei der untersuchten Butter und dem untersuchten Buttergebäck beobachtet werden. Interessante Ergebnisse wurden aber mit Kartoffelpüreepulvern erhalten. Hier konnte der Verderb erfolgreich über die Extinktion eines Hexanextrakts bei 233nm verfolgt werden. Die Kombination von 0,5% Pflanzenlecithin mit 0,005% α -Tocopherol führt zu einer signifikanten Verderbsverzögerung. Es ist davon auszugehen, dass die enthaltenen Zusatzstoffe (Natriumcitrat, Natriummetabisulfit und Ascorbylpalmitat) – und zwar insbesondere das Ascorbat – den Effekt entscheidend mitbeeinflussen. Vermutlich wird die Stabilisierung auch hier durch das System: PL/Ascorbat/ α -Tocopherol verursacht. Hinsichtlich der Stabilisierungswirkung wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Soja-, Raps- und Sonnenblumenlecithin festgestellt (S.176f). Auch in den Modelluntersuchungen an Linolsäureethylester/ α -Tocopherol wurden für die Lecithine aus allen drei Pflanzenquellen unter oxidativen Stressbedingungen (110°C, S.103) vergleichbares antioxidatives Verhalten gemessen. Damit zeigt sich, dass sowohl der erhöhte Gehalt an Glycolipiden im Rapslecithin, als auch der verminderte Linolsäuregehalt (S.16f) seine antioxidativen Eigenschaften nicht steigern können. Hochangereichertes Soja-PC war im Gegensatz zu den

untersuchten antioxidativen Pflanzenlecithinen sowohl bei Raumtemperatur (S.140), als auch bei 110°C (S.103) im Ethyllinolat-Modell inaktiv bis leicht prooxidativ. Unter verminderter Sauerstoff-Sättigung (diffusionskontrolliert oder O₂-Ausschluss, S.62ff) zeigt aber auch 1% hochangereichertes Soja-PC bei 110°C in entlecithiniertem Rapsöl bzw. im Ethyllinolat-Modell antioxidatives Verhalten. Im Vergleich zum Sojalecithin steigen hier aber die Carbonylgehalte schneller an. Beim Sojalecithin können diese durch das enthaltene PE über Schiff-Basen zu Folgestrukturen abreagieren.

5.) Ausblick

Ausgehend von den durchgeführten Untersuchungen ergeben sich folgende Fragestellungen für die zukünftige Forschung:

Lassen sich Reducton-PE-Kondensate herstellen? Welche Redoxpotentiale haben diese Stoffe und sind sie als Antioxidantien einsetzbar?

Wie beeinflussen Bräunung und Oxidation der Glycolipide die antioxidativen Eigenschaften von Lecithinen? Wie wird die Entstehung von D-Galactoson und Pyrrolverbindungen durch Tocopherole beeinflusst?

Eignet sich das System: Maislecithin/L-Ascorbinsäure/ -Tocopherol aufgrund des geringeren PE-Gehalts als Antioxidans für thermisch stärker belastete Produkte (geringere Bräunung)?

9. Literatur

- 1 Ahmed, M.U., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Identification of N -carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein, *J. Biol. Chem.* 261, 4886-4894 (1986)
- 2 Ahmed, M.U., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., N -(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins, *Biochemistry* 324, 565-570 (1997)
- 3 Al-Sheikhly, M., Simic, M.G. *J. Phys. Chem.* 1988, 93, 3103-3106
- 4 Amadori, M., *Atti R. Acad. Naz. Lincei Mem. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat.* 13 (1991) 72
- 5 Ansell, G.B., Hawthorne, J.N., *Phospholipids*, Elsevier, Amsterdam, 1964
- 6 Arens, M., Schulte, E., Weber, K., Fettsäuremethylester, Umesterung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (Schnellverfahren), *Fett. Wiss. Technol.*, 96, 67-68 (1994)
- 7 Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeschbach, R. and Loligers, J., Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents – carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* 22 (2), 257-268 (1992)
- 8 Atkins, P.W., *Physikalische Chemie*, VCH Weinheim, 1990
- 9 Bandarra, N.M., Campos, R.M., Batista, I., Nunes, M.L. and Empis, J.M., Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 8, 905-913 (1999)
- 10 Bateman, L. Hughes, H. and Morris, A.L. Hydroperoxide decomposition in relation to the initiation of radical chain reactions *Disc. Faraday Soc.* 14: 190-194 (1953)
- 11 Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Berlin, Springer Verlag (2001)
- 12 Benson, S.W. Kinetics of pyrolysis of alkyl hydroperoxides and their O–O bond dissociation energies *J. Chem. Phys.*, 40 (1964) 1007-13
- 13 Beyer, H., *Lehrbuch der Organischen Chemie*, Hitzel Verlag Leipzig (1963)
- 14 Bishop, S.J. & Henick, A.S., Antioxidant effect of protein hydrolysates in a freeze-dried model system, *J. Food Sci.*, 37, 873-875 (1972)
- 15 Blekas, G., Tsimidou, M., Boskou, D., Contribution of α -tocopherol in olive oil stability, *Food Chemistry* 52, 289-294 (1995)
- 16 Boguth, W., Niemann, H., *Biochim. Biophys. Acta* 248, 121-130 (1971)
- 17 Boguth, W., Repges, R., Zell, R., *Int. Z. Vit. Forschung*, 40, 323 (1970)
- 18 Böhm, F. Edge, R., Land, E.J., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 621-622 (1997)
- 19 Bolland, J.L. and Gee, G. Kinetics in the chemistry of rubber and related materials *Trans. Faraday Soc.* 42: 236-243 (1946)
- 20 Bonnie, T.Y.P. and Choo, Y.M. Valuable minor constituents of commercial red palm olein: carotenoids, vitamin E, ubiquinone and sterols, *J. Oil Palm Res.* 12, 14 (2000)
- 21 Brown, H.C., *Adv. Phys. Org. Chem.* 1, 35 (1963)
- 22 Bucala, R., Makita, Z., Koschinsky, T., Cerami, A., Vlassara, H., Lipide advanced glycosylation: Pathway for lipid oxidation in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, 6434-6438
- 23 Burton, G.W. Antioxidant action of carotenoids, *J. Nutr.* 119, 109-111 (1989)
- 24 Burton, G.W., Doba, T., Gabe, E.J., Hughes, L., Lee, F.L., Prasad, L. and Ingold, K.U., Autooxidation of biological molecules, Maximizing the antioxidant activity of phenols, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 7053-7065 (1985)
- 25 Burton, G.W., Ingold, K.U., *Science* 1984, 569-573
- 26 Cämerer, B., Jalyschko, V., Kroh, L.W., Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton, *J. Agric. Food Chem.* 50, 2083-2087 (2002)
- 27 Chahine, M. H., *Grasas Aceites (Seville)* 29, 423-430 (1978)
- 28 Chan, H.W.-S. and Newby, V.K. *Biochim. Biophys. Acta* 617, 353-362 (1980)
- 29 Chang, S.S., Wu, K., US Patent 5 007 069 (1991)
- 30 Chapman, D., Williams, R.M., Ladbrooke, B.D., *Chem. Phys. Lipids* 1, 445 (1967)
- 31 Choe, E. Effects and mechanism of minor compounds in oil on lipid oxidation, in *Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3rd ed., C.C. Akoh and D.B. Min, eds., CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, 449ff
- 32 Choe, E. and Min, D.B., Mechanisms and factors for edible oil oxidation, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safty*, 5, 169, 2006
- 33 Davidek, T., Robert, F., Devaud, S., Blank, I., Sugar fragmentation in the Maillard reaction cascade: Formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative α -dicarbonyl cleavage pathway, *J. Agric. Food Chem.* 54, 6677-6684 (2006)

- 34 Dawson, P.L., Sheldon, B.W., Larick, D.K. and Turner, B.E., Role of glycerophosphorylcholine and glycerophosphorylethanolamine in linoleic acid oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 39, 12-16 (1991)
- 35 Decker, E.A., Antioxidant Mechanisms, in *Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3rd ed., C.C. Akoh and D.B. Min, eds., CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, 475ff
- 36 Dunn, J.A., Ahmed, M.U., Murtiashaw, M.H., Richardson, J.M., Walla, M.D., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Reaction of ascorbat with lysine and protein under autoxidizing conditions: Formation of N-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbat, *Biochemistry* 29, 10964-70 (1990)
- 37 Dziedzic, S.Z. & Hudson, B.J.F., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1042 (1984)
- 38 Dziedzic, S.Z., Robinson, J.L. and Hudson, B.J.F., Fate of propyl gallate and diphosphatidylethanolamine in lard during autoxidation at 120°C, *J. Agric. Food Chem.* 34, 1027-1029 (1986)
- 39 Ecker, Gerhard, *Biophysikalische Pharmazeutische Chemie*, Wien Okt. 2006
- 40 Eichberg, J., Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology* (Hrsg. M. Grayson & D. Eckroth), 3. Aufl. Bd. 14, 250-269; Wiley, New York 1981
- 41 Eitenmiller, R., Lee, J., *Vitamin E – Food chemistry, composition and analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, 2004, 39ff
- 42 Eliasson, A.C., Larsson, K., *Cereals in breadmaking, A molecular colloidal approach*, Marcel Dekker, Inc., New York (1993)
- 43 El-Tarras, M., Fayez, M., Abdel Moetzy, E.M., Abdel Kadar, A.S., Amer, M.M., *Oleagineux* 34, 3, 139 (1979)
- 44 El-Zeany, B.A., Pokorný, J., Velíšek, J.D., Janíček, G., Antioxidant activity of some brown pigments in lipids, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 153, 316-321 (1973)
- 45 Erickson, M.C. Lipid Oxidation of Muscle Food, in *Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3rd ed., C.C. Akoh and D.B. Min, eds., CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008
- 46 Fakourelis, N., Lee, E.C. and Min, D.B. Effect of chlorophyll and β -carotene on the oxidation stability of olive oil, *J. Food Sci.* 52; 234, (1987)
- 47 Farmer, E.H., Bloomfield, G.F., Sundaralingam, A. and Sutton, D.A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances including rubber *Trans. Faraday Soc.* 38: 348-356 (1942)
- 48 Farmer, J.L., Mottram, D.S., Effect of cysteine and ribose on the volatile thermal degradation products of a triglyceride and three phospholipids, *J. Sci. Food Agric.* 1992, 60, 489-497
- 49 Fenton, H.J.H. Jackson, H. *J. Chem. Soc. (London)* 1899, 75, 1
- 50 Fiedler, T., Beitrag zur Chemie von α -Dicarbonylverbindungen in der Maillard-Reaktion von Saccharose unter Bildung von Melanoidinen, Diss., Berlin 2006
- 51 Flider, F.J. and Orthoeffer, F.T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 270-272 (1981)
- 52 Folch, J., *J. Biol. Chem.*, 146, 35 (1942)
- 53 Foote, C.S., Chang, Y.C. and Denny, R.W., Chemistry of singlet oxygen, X. Carotenoid quenching parallels biological protection, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 5216 (1970)
- 54 Förster, A., Quantitative Untersuchungen zu Vorkommen und metabolischem Transit alimentärer Maillard-Reaktions-Produkte, Diss., Dresden 2006
- 55 Frankel, E.N. in *Flavor Chemistry in Fats and Oils*, D.B. Min and T.H. Smouse, eds., American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, 1985
- 56 Frankel, E.N., Evans, C.D., McConnell, D.G. and Jones, E.P., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38, 134-137 (1961)
- 57 Fu, M.X., Requena, J.R., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Baynes, J.W., Thorpe, S.R., N-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions, *J. Biol. Chem.* 271, 9982-86 (1996)
- 58 Fujimaki, M., Kanamaru, K., Kurata, T., Igarashi, O., *Agric. Biol. Chem.* 34(12), 1781-1786 (1970)
- 59 Gardner, H.W. Reactions of Hydroperoxides – Products of High Molecular Weight, in *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, H.W.-S. Chan, ed., Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, 1987
- 60 Gardner, H.W., Linoleate hydroperoxide are cleaved heterolytically into aldehydes by Lewis acid in aprotic solvent, *Lipids*, 19, 4, (1984)
- 61 Gardner, W.H., Weisleder, D. and Nelson, E.C., Acid catalysis of linoleic acid hydroperoxide: Formation of epoxides by an intramolecular cyclization of hydroperoxide group, *J. Org. Chem.* 49 (2), 508-515 (1984)
- 62 Gassenmeier, K., Schieberle, P., Formation of the intensive flavor compound trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal in thermally treated fats, *JAOCs*, Vol. 71, no. 12, 1315-1319 (1994)
- 63 Gibson, H.W., Correlation of ionization potentials and sums of substituent constants for substituted benzenes, *Can. J. Chem.*, 51, 3065-70 (1973)

- 64 Glomb, M.A., Voigt, M., Reactivity of 1-deoxy-D-erthro-hexo-2,3-diulose: A key intermediate in the Maillard chemistry of hexoses, *J. Agric. Food Chem.* 57, 11, 4765-4770 (2009)
- 65 Glomb, M.A., Monnier, V.M., Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates in the Maillard reaction, *J. Biol. Chem.* 270, 10071-10026 (1995)
- 66 Goble, M., *J. Pharm. Chem.* 9, 1, 81 (1846)
- 67 Goldberg, T., Cai, W., Peppas, M., Dardaine, V., Baliga, B.S., Uribarri, J., Vlassara, H., advanced glycation endproducts in commonly consumed foods, *J. Am. Diet. Assoc.* 104, 1287-91 (2004)
- 68 Goodhue, C.T., Risley, H.A., *Biochemistry* 4 (5), 854-858 (1965)
- 69 Gordon, M.H. The mechanism of antioxidant action in vitro, in *Food Antioxidants*, B.J.F. Hudson, ed., Elsevier Applied Food Science, New York 1990, 1ff
- 70 Gottstein, T., Grosch, W. Model study of different antioxidant properties of α - and γ -tocopherol in fats, *Fat Sci. Technol.* 92, 139-144 (1990)
- 71 Griffin, W.C., *J. Cosm. Chem.* 1, 311 (1949)
- 72 Grosch, W., Schieberle, P. and Laskawy, G., in: *Flavour '81* (ed. P. Schreier), pp. 443-444, Walter de Gruyter, Berlin 1981
- 73 Grosch, W. Reactions of Hydroperoxides – Products of Low Molecular Weight, in *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, H.W.-S. Chan, ed., Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, 1987
- 74 Grunger, E.H. and Tappel, A.L., Reactions of biological antioxidants. Fe(III)-catalysed reactions of lipid hydroperoxides with α -tocopherol, *Lipids* 5, 326-331 (1970)
- 75 Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. *Free Radikales in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, New York, 2001
- 76 Hamberg, M. and Gotthammar, B., *Lipids* 8, 737-744 (1973)
- 77 Han, D., Yi, O.-S., Shin H.-K., Solubilization of vitamin C in fish oil and synergistic effect with vitamin E in retarding autoxidation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 740-743 (1991)
- 78 Hasegawa, K. and Patterson, L.K. Pulse radiolysis in model lipid systems: formation and behavior of peroxy radicals in fatty acids *Photochem. Photobiol.*, 28, 817, 1987
- 79 Hawrysh, Z.J. Stability of canola oil. in: *Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology* (F. Shahidi, ed). Van Nostrand Reinhold, New York, 1990, pp. 99-122
- 80 Hawthorne, J.N., *J. Lipid Research*, 1, 255 (1960)
- 81 Hayashi, T., Namiki, M., Formation of two-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amine, *Agric. Biol. Chem.* 1980, 44, 2575-2580
- 82 Heaton, F.W. & Uri, N., The aerobic oxidation of unsaturated fatty acids and their esters *J. Lipid Res.*, 2 (1961) 125-60
- 83 Heinonen, M., Haila, K., Lampi, A.M., Piironen, V., Inhibition of oxidation in 10% oil-in-water emulsions by β -carotene with α - and γ -tocopherols, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1047-1052 (1997)
- 84 Helmerich, G. *Struktur-Wirkungsbeziehungen von Phospholipiden bei Backwaren*, Diss. München 2004
- 85 Henderson, T.O., Glonek, T., Myers, T.C., Magnetic resonance spectroscopy of phospholipids, *Biochem.* 13, 623-628 (1974)
- 86 Henle, T., Klostermeyer, H., Determination of protein-bound 2-amino-6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-hexanoic acid („pyrraline“) by ion exchange chromatography and photodiode array detection, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196, 1-4 (1993)
- 87 Hiatt, R. & Irvin, K.C. Homolytic decompositions of hydroperoxides V. Thermal decompositions *J. Org. Chem.*, 33 (1968) 1436-41
- 88 Hicks, M. and Gebicki, J.M., Inhibition of peroxidation in linoleic acid membranes by nitroxide radicals, butylated hydroxy toluene and γ -tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 56-63 (1981)
- 89 Hidalgo, F.J., León M.M., Zamora, R., Effect of tocopherols in the antioxidative activity of oxidized lipid-amine reaction products, *J. Agric. Food Chem.* 55, 4436-42 (2007)
- 90 Hidalgo, F.J., León, M.M., Zamora, R., Antioxidant effect of amino phospholipids and phospholipid/amino acid mixtures in edible oils as determined by the rancimat method, *J. Agric. Food Chem.* 54, 5461-5467 (2006)
- 91 Hidalgo, F.J., Nogales, F., Zamora, R., Changes produced in the antioxidant activity of phospholipids as a consequence of their oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 53, 659-662 (2005)
- 92 Hidalgo, F.J., Nogales, F., Zamora, R., Determination of pyrrolyzed phospholipids in oxidized phospholipid vesicles and lipoproteins, *Anal. Biochem.* 334, 155-163 (2004)
- 93 Hidalgo, F.J., Zamora, R., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, E., Non-enzymatic browning reactions of phospholipids, *Fat Sci. Technol.* 92, 5, 185-192 (1990)
- 94 Hodge, J.E., Dehydrated Foods – chemistry of browning reactions in model systems, *J. Agric. Food Chem.* 1953, 1, 928-943

- 95 Hofmann, T., Bors, W. Stettmaier, K., Studies on radical intermediats in the early stage of the nonenzymatic browning of carbohydrates and amino acids, *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 379-390
- 96 Hofmann, T., Studies on melanoidin-type colorants generated from Maillard reaction of protein-bond lysine and furan-2-carbaldehyde, Chemical characterisation of red colored domain, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 206, 251-258 (1998)
- 97 Holleman-Wiberg: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101. Auflage, Nils Wiberg, Walter de Gruyter, Berlin 1995
- 98 Hollnagel, A., Kroh, L.W., 3-Desoxypentosulose: An α -dicarbonyl compound predominating in nonenzymatic browning of oligosaccharids in aqueous solution, *J. Agric. Food Chem.* 50, 1659-1664 (2002)
- 99 Hu, Y.Z. and Jiang, L.J., Generation of semiquinone radical anion and reactive oxygen during the photosensitization of water-soluble perylenequinone derivative, *J. Photochem. Photobiol.*, 33, 51, 1996
- 100 Hudson, B.J.F., and Ghavami, M., Phospholipids as antioxidant synergists for tocopherols in the autoxidation of edible oils, *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 17, 191-194 (1984)
- 101 Hudson, B.J.F. and Lewis J.I., Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists, *Food Chemistry* 10, 111-120 (1983)
- 102 Husain, S.R., Terao, J., Matsushita, S., Effect of browning reaction of phospholipids on autoxidation of methyl linoleate, *JAOCS* 63, 11 (1986)
- 103 Ingold, K.U. *SIK-Rapport* 240, 11-41 (1968)
- 104 Ingold, K.U., Inhibition of autoxidation. *Adv. Chem. Ser.*, 75, 296-305 (1968)
- 105 Isodorides, A., The antioxidigenic synergism of various acids with α -tocopherol, *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 5146-8 (1951)
- 106 Jakubowski, A., *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1, 253 (1963)
- 107 Jander-Blasius, Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum, 14. Auflage, J. Strähle, E. Schweda; Hirzel-Verlag, Stuttgart 1995
- 108 Jore, D., Champion, B., Patterson, L.K., Ferradini, C., *Advances in the Biosciences*, Pergamon Press PLC, Vol. 71, 11-16 (1988)
- 109 Jork, Funk, Fischer, Wimmer, *Dümschichtchromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden*, Band 1a; VCH, Weinheim (1989)
- 110 Jovanovic, S.V., Tomic, M., Simic, M.G., *J. Phys. Chem.* 95, 10824-27 (1991)
- 111 Kagan, V., Serbinova, E., Packer, L., Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 851-857 (1990)
- 112 Kamal-Eldin, A. and Appelqvist, L.A. *Lipids* 31, 671, 1996
- 113 Kasaikina, O.T., Kortenska, V.D. and Yanishlieva, N.V. Effect of chain transfer and recombination/disproportionation of inhibitor radicals on inhibited oxidation of lipids, *Russ. Chem. Bull.*, 48, 1891, 1999
- 114 Kaur, K., Solomon, R.G., O'Neil, J. and Hoff, H.F., (Carboxyalkyl)pyrroles in human plasma and oxidized low density lipoproteins, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1387-1396 (1997)
- 115 Kawakishi, S., Okawa, Y. and Hayashi, T., Interaction between melanoidin and active oxygen producing system. in: *Trends in Food Science: Proceedings of the 7th World Congress of Food Science and Technology*, A.H. Ghee, L.W. Sze and F.C. Woo, eds., Singapore Institute of Food Science and Technology, Singapore, 1987, p. 15
- 116 Kawakishi, S., Tsunehiro, J., Uchida, K., Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion, *Carbohydrate Research*, 211, 167-171 (1991)
- 117 Keceli, T. and Gordon, M.H., Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil, *J. Food Sci.*, 67, 943, 2002
- 118 Kehrer, J.P., The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, 149, 43, 2000
- 119 Kharasch, M.S., Fono, A., Nudenberg, W. and Bischof, B., The chemistry of hydroperoxides, XI. Hydroperoxides as oxidizing and reducing agents, *J. Org. Chem.* 17 (2), 207-220 (1952)
- 120 Kharasch, M.S., Fono, A. and Nudenberg, W., The chemistry of hydroperoxides. VII. The ionic and free radical decomposition of α -phenylethyl hydroperoxide, *J. Org. Chem.* 16 (1), 128-130, 1951
- 121 Kikugawa, K., Kunugi, A and Kurechi, T., Chemistry and implication of degradation of phenolic antioxidants, in *Food Antioxidants*, B.J.F. Hudson ed., Elsevier Applied Science, New York (1990), 65ff
- 122 Kilic, B. and Richards, M.P., Lipid oxidation in poultry donor kebab: Prooxidative and antioxidative factors, *J. Food Sci.*, 68, 686, 2003
- 123 Kim, H.J., Min, D.B., Chemistry of lipid oxidation, in *Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3rd ed., C.C. Akoh and D.B. Min, eds., CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, 299ff

- 124 Kim, H.J., Min, D.B., Tocopherol stability and prooxidant mechanism of oxidized tocopherols in lipids, in *Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3rd ed., C.C. Akoh and D.B. Min, eds., CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, 435ff
- 125 King, M.F., Boyd, L.C. and Sheldon, B.W., Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 6, 545-551 (1992)
- 126 Koga, T. & Terao, J., Phospholipids increase radical-scavenging activity of vitamin E in a bulk oil model system, *J. Agric. Food Chem.* 43, 1450-1454 (1995)
- 127 Koidis, A. and Boskou, D., The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108, 323, 2006
- 128 Kornhurst, O.J. and Mavis, R.D., Microsomal lipid peroxidation: Characterization of the role of iron and NADPH, *Mol. Pharmacol.* 17, 400-407 (1979)
- 129 Koschinski, J., Mc Farlane, N., International Patent WO 93/10207 (1993)
- 130 Koswig, S., *-strahleninduzierte Veränderungen an -Tocopherol im Vergleich zu ausgewählten Oxidationsreaktionen*, Diss. Berlin 1991
- 131 Kramhöller, B., Pischetsrieder, M., Severin, T., Maillard reaction of lactose and maltose, *J. Agric. Food Chem.* 41, 347-351 (1993)
- 132 Krause, R., *Untersuchungen zur Bildung von Furosin und N-terminalen 2(1H)-Pyrazinonen*, Diss. Dresden 2005
- 133 Krinsky, N., *Free Rad. Biol. Med.* 7, 617-635 (1989)
- 134 Krog, N., *Amylose complexing effect of food grade emulsifiers*, *starch* 23, 206-210
- 135 Kroh, L.W., Caramelisation in food and beverages, *Food Chem.*, 1994, 51, 373-379
- 136 Kurechi, T. & Kato, T., *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1772 (1983)
- 137 Labuza, T.P. Kinetics of lipid oxidation in foods *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 2: 355-405 (1971)
- 138 Landi, L., Cabrini, L., Fiorentini, D., Stefanelli, C., Pedulli, G.F., The antioxidant activity of ubiquinol-3 in homogenous solution and in liposomes, *Chem. Phys. Lipids* 61, 121-130 (1992)
- 139 Lea, C.H., Deteriorative reactions involving phospholipids and lipoproteins, *J. Sci. Food Agric.* 1957, 8, 1-13
- 140 Lederer, M.O., Dreisbusch, C.M., Bundschuh, R.M., Amadori products from model reactions of D-glucose with phosphatidyl ethanolamine – Independent synthesis and identification of 1-desoxy-1-(2-hydroxyethanolamino)-D-fructose derivatives, *Carbohydrate Research* 301 (1997) 111-121
- 141 Lederer, M.O., Baumann, M., Formation of a Phospholipid linked pyrrolo-carbaldehyd from model reactions of D-glucose and 3-desoxyglucosone with phosphatidyl ethanolamine, *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 115-121
- 142 Lederer, M.O., Breitling-Utzmann, C.M., Unger, A., Friedl, D.A., Identification and quantification of phosphatidylethanolamine-derived glucosylamines and aminoketoses from human erythrocytes – Influence of glycation products on lipid peroxidation, *Archive of Biochemistry and Biophysics* 391, 245-254, 2001
- 143 Ledl, F. und Schleicher, E., Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin, *Angewandte Chemie* 120, 1990, 597-734
- 144 Ledl, F., Severin, T., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 175, 262 (1982)
- 145 Lesellier, E., Tchapala, A., Marty, C., Lebert, A., Analysis of carotenoids by high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr.* 633, 9-23 (1993)
- 146 Liedke, R. Bildung von -Dicarbonylverbindungen beim Abbau von Amadori-Umlagerungsprodukten, Diss., Münster 1999
- 147 Lin, J.S., Smith, V. and Olcott, H.S., *J. Agric. Food Chem.* 22, 682-684
- 148 Lindenmeier, M., Faist, V., Hofmann, T., Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity, *J. Agric. Food Chem.* 50, 6997-7006 (2002)
- 149 Linow, F., Mieth, G., *Nahrung* 11, 718 (1967)
- 150 Lölinger, J. Saucy, F., European Patent 326 829 (1989)
- 151 Machlin, J., *Vitamin E – a comprehensive treatise*, Marcel Dekker, Inc., New York 1980
- 152 Maillard, L.C., Action des aminés sur les sucres; Formation des mélanoidines par voie méthodique, *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 154 (1912), 66-68
- 153 Maillard, L.C., Réaction générale des acides amides sur les sucres. Ses conséquences biologiques, *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1912, 72, 599-601
- 154 Marcuse, R. and Fredriksson, P.-O. (1968) *SIK-Rapport* 240, 97-103

- 155 Mare de la, H.E., Coppinger, G.M., *J. Org. Chem.* 28, 106 (1963)
- 156 Martins, S.I.F.S., Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling, Diss., Wageringen 2003
- 157 Matissek, R., Schnepel, F.-M., Steiner, G., *Lebensmittelanalytik*, Springer Verlag Berlin 1989
- 158 McClements, D.J. Lipid-based emulsions and emulsifiers, in *Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3rd ed., C.C. Akoh and D.B. Min, eds., CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, 63ff
- 159 Mead, J.F., Stein, R.A., Wu, G.-S., Sevanian, A. and Gan-Elepano, M., Peroxidation of lipids in model systems and biomembrans, in: *Autoxidation in food and biological systems*, M. G. Simic and M. Karel (eds.), Plenum Press, New York (1979), 413ff
- 160 Mei, L. et al., Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsions as affected by surfactant, pH, and NaCl, *Food Chem.*, 61, 307, 1998
- 161 Micciche, F. et al., Oxidation of methyle linoleate in micellar solutions induced by the combination of iron(II)/ascorbic acid and iron(II)/H₂O₂, *Arch. Biochem. Biophys.*, 443, 45, 2005
- 162 Min, D.B. Lee, S.H. and Lee E.C. Singlet Oxygen Oxidation of Vegetable Oils in *Flavor Chemistry of Lipid Foods*, D.B. Min and T.H. Smouse, eds., American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, 1989
- 163 Min, D.B. and Lee, H.O. in *Food Lipids and Health*, R.E. Mc Donald and D.B. Min, eds., Marcel Dekker, New York, 1996, 241ff
- 164 Min, D.B. and Wen, J. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59, 310A (1982)
- 165 Möbius, U., Diplomarbeit, Berlin 1985
- 166 Morita, N., Ionue, K., Takagi, M., Quinoxalines derived from D-glucose and o-phenylenediamine in weekly acidic medium, *Agric. Biol. Chem.* 45, 2665-2668 (1981)
- 167 Morita, M. and Fujimaki, M *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo) 36, 1751-54 (1972)
- 168 Morita, M. and Fujimaki, M *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo) 36, 1163-67 (1972)
- 169 Morrill, G.A. et al., Interaction between ferric ions, phospholipid hydroperoxides, and the lipid phosphate moiety at physiological pH, *Lipids*, 39, 811-889, 2004
- 170 Mukai, K., Nishimura, M., Nagano, A., Tanaka, K. and Niki, E., Kinetic study of the reaction of vitamin C derivatives with tocopheroxyl (vitamin E radical) and substituted phenoxyradicals in solution, *Biochim. Biophys. Acta* 993, 168-173 (1989)
- 171 Mukai, K., Fukada, K., Ishizu, K., *Chem. Phys. Lipids* 35, 199-208 (1984)
- 172 Namiki, M., Hayashi, T., Development of novel free radicals during the Amadori-carbonyl reaction of sugars with amino acids, *J. Agric. Food Chem.* 23 (3), 487-491 (1975)
- 173 Namiki, M., Hayashi, T., A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation, in: „*The Maillard reaction in food and nutrition*“, ACS 215, Washington DC, 21-46 (1983)
- 174 Namiki, M., Chemistry of Maillard reaction: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens, *Advances in Food Research*, 32, 1988, 115-184
- 175 Nasibullin, R.S., Nikitina, T.I., Afanaseva, Y.G., Nasibullin, T.R., Spirikhin, L.V., Complex of 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavonol with phosphatidylcholine, *Pharmaceutical Chemical Journal* 36, 492-495 (2002)
- 176 Nilsson, J.L.G., Sievertsson, H., *Acta. Pharm. Suecica* 5, 517-524 (1968)
- 177 Nishikimi, N., Machlin, L.J., *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 684-689 (1975)
- 178 Nwosu, C.V., Boyd, L.C. and Sheldon, B. Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and active index, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 293-297 (1997)
- 179 Oak, J.-H., Nakagawa, K. and Miyazawa, T., UV analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in foods and biological samples, *Journal of Lipid Research* 43, 523-529 (2002)
- 180 Oak, J.-H., Nakagawa, K. and Miyazawa, T., Synthetically prepared Amadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid peroxidation via free radical reactions, *FEBS Letters* 481, 26-30 (2000)
- 181 Obretenov, T., Vernin, G., Melanoidins in the Maillard reaction, *Dev. Food Sci.* 1998, 40 455-482
- 182 Ohshima, T., Fujita, Y. and Koizumi, C., Oxidative stability of sardine and mackerel lipids with reference to synergism between phospholipids and -tocopherol, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 3, 269-276 (1993)
- 183 Packer, J.E., Slater, T.F. & Willson, R.L., Direct observation of free radical interaction between vitamin E and vitamin C, *Nature*, 278, 737-738 (1979)
- 184 Pardun, H., Pflanzenlecithine – wertvolle Hilfs- und Wirkstoffe? *Fat Sci. Technol.*, 91, 45-58 (1989)
- 185 Pardun, H., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 86, 55 (1984)
- 186 Pardun, H., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 85, 1, 7-12 (1983)
- 187 Pardun, H., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 84, 1-11 (1982)

- 188 Parkhurst, R.M., Skinner, W.A. and Strum, P.A., The effect of various concentrations of tocopherols and tocopherol mixtures on the oxidative stabilities of a sample of lard, *J. Am. Oil chem. Soc.* 45, 641-642 (1968)
- 189 Pazos, M., Andersen, M.L., Medina, I. and Skibsted, L.H., Efficiency of natural phenolic compounds regenerating α -tocopherol from α -tocopheroxyl radical, *J. Agric. Food Chem.* 55, 3661-3666 (2007)
- 190 Pedrielli, P. and Skibsted, L.H., Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate, *J. Agric. Food Chem.* 50, 7138-7144 (2002)
- 191 Pekkarinen, S.S., Stöckmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I. M., Hopia, A.I., Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate, *J. Agric. Food Chem.* 47, 3036-3043 (1999)
- 192 Pokorny, J., Major factors affecting the autoxidation of lipids, in *Autoxidation of unsaturated lipids*, H.W.-S. Chan, ed., Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, London, 1987, 141ff
- 193 Pokorný, J., Táí, P.-T., Janicek, G., Nonenzymatic browning. VIII. Autoxidation and browning reactions of phosphatidylethanolamine, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 153, 322-325 (1973)
- 194 Pokorný, J., Zwain, H., Hegedüsavá, B., Luan, N.-T., Janicek, G., Nonenzymatic browning, XIV. Reaction of phospholipids with 1,4-Benzoquinone, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 159, 287-292 (1975)
- 195 Pokorný, Táí, P.-T., Janicek, G., Lipid oxidation. Part.3 Oxidation of egg phosphatidylethanolamine, *Nahrung*, 20 (2) 149-155 (1976)
- 196 Pokorny, J. and Kondratenko, S.S. *Oleagineux* 22, 103-105 (1967)
- 197 Poli, G., Schaur, R.J., Siems, W.G., Leonarduzzi, G., 4-Hydroxynonenal: A membran lipid oxidation product of medicinal interest, published online 3. december 2007 in *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com), DOI 10.1002/med.20117
- 198 Porter, N.A. and Wujek, D.G. in *Reactive Species in Chemistry, Biology and Medicine*, A. Quintanilha, ed., NATO ASI Series, Series A: Life Science, Vol. 146, Plenum Press 1988, 55
- 199 Pratt, D.E., Hudson, B.J.F., Natural antioxidants not exploited commercially, in *Food Antioxidants*, B.J.F. Hudson ed., Elsevier Applied Science, New York (1990), 171ff
- 200 Psomiadou, E. and Tsimidou, M., Stability of virgin olive oil, *J. Agric. Food Chem.* 50, 716 (2002)
- 201 Reddy, S., Bichler, J., Wells-Knecht, K.J., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., N^ε-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins, *Biochemistry* 34, 10872-8 (1995)
- 202 Reische, D.W., Lillard, D.A. and Eitenmiller, R.R., Antioxidants, in *Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 3rd ed., C.C. Akoh and D.B. Min, eds., CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New York 2008, 409ff
- 203 Rhodes, D.N., Lea, C.H., *J. Daily Research* 25, 60-69 (1988)
- 204 Rouser, G., Kritchevsky, D., Simon, G., Nelson, G.J., Quantitative analysis of brain and spinach leaf lipids employing silicic acid column chromatography and acetone elution of glycolipids, *Lipids*, 2, 37-42 (1967)
- 205 Saito, H. and Ishihara, K., Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 74, 12, 1531-1536 (1997)
- 206 Schlesinger, D., Diplomarbeit, Berlin 1990
- 207 Schmidt, M., *Phenolische und polyenische Antioxidantien*, Diss., Düsseldorf 2001
- 208 Schneider, M., Industrial production of phospholipids – lecithin processing, *Lipid Technol.* 51, 109-116 (1997)
- 209 Schöneich, Ch. *Quantitative kinetische Untersuchungen zum reversiblen H-Atomtransfer durch Radikale von Thiolen und biologisch relevanten Verbindungen*, Diss. Berlin 1990
- 210 Scholfield, C.R., Composition of soybean lecithin, *JAOCs*, 58, 889-892 (1981)
- 211 Schroeder, M.T., Becker, E.M. and Skibsted, L.H., Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil, *J. Agric. Food Chem.* 54, 3445-3453 (2006)
- 212 Schuler, P., Natural antioxidants exploited commercially, in *Food Antioxidants*, B.J.F. Hudson, ed., Elsevier Applied Food Science, New York 1990, 99ff
- 213 Schulz, A., *α -Dicarbonylverbindungen – Intermediate der nichtenzymatischen Bräunung von L-Ascorbinsäure*, Diss., Berlin 2006
- 214 Schwetlick, K., *Kinetische Methoden zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen* (1971), 286ff
- 215 Segawa, T., Hara, S., Totani, Y., Antioxidant behavior of phospholipids for polyunsaturated fatty acids of fish oil. II. Synergistic effect of phospholipids for tocopherol, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 43, 515-519 (1994)
- 216 Segawa, T., Kamata, M., Hara, S., Totani, Y., Antioxidant activity of phospholipids for polyunsaturated fatty acids in fish oil. III. Synergism of nitrogen-containing phospholipids with tocopherol, *J. Jap. Oil Chem. Soc.* 44, 36-42 (1995)

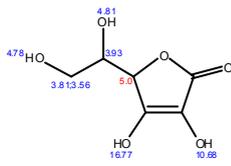
- 217 Seifert, S., *Synthese und Komplexbildungseigenschaften ausgewählter Maillard-Reaktionsprodukte*, Diss. Dresden 2009
- 218 Sell, S. Diss. Düsseldorf 2002
- 219 Sen Gupta, A.K., PS 4093540 US, *Purification process* (71), Lever Brothers Comp., 6.6.1978, 13.11.1975 UK 46894/75 (51) C11 B 3/00
- 220 Shapiro, D., *Chemistry of Sphingolipids*, Hermann, Paris (1969)
- 221 Sharman, W.M., Allen, C.M., and van Lier, J.E. *Methods of Enzymology*, L. Packer and H. Sies, eds., Academic Press, New York, 2000
- 222 Sharp, D.B. and Patrick, T.M., *J. Org. Chem.* 26 (5), 1389-1394 (1961)
- 223 Sherwin, E.R., Oxidation and antioxidants in fat and oil processing *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55: 809-814 (1978)
- 224 Simic, M.G. *J. Environ. Sci. Health* (1991), C9, 113-153
- 225 Simic, M.G., Taylor, K.A., in *Flavor Quality of Fresh Meat: Warmed-Over Flavor*, St. Angelo, A.J., Bailey, M.E., eds., Academic Press: New York, 1987, pp. 69-117
- 226 Singer, M., *Seifen – Öle – Fette – Wachse*, 96, 15, 516-518 (1970)
- 227 Speck, J.C. jr., The Lobry de Bruyn – Alberda van Ekenstein transformation, *Adv. Carbohydr. Chem.* 13, 63-103 (1958)
- 228 Stephan, A. *Entwicklung und Beeinflussung des Flavors von Sojalecithinen*, Diss. Hamburg 1999
- 229 Streitwieser, A., Heathcock, C.H., Kosower, E.M., *Organische Chemie*, 2. Auflage, VCH Weinheim (1994)
- 230 Sumarno, M., Atkinson, E., Suarna, C., Saunders, J.K., *Biochim. Biophys. Acta*, 920, 247-250 (1987)
- 231 Svanholm, U., Bechgaard, K., Parker, V.D., *J. Amer. Chem. Soc.* 86 (8), 2409-2413 (1974)
- 232 Szuhaj, B.F., *Lecithins – Sources, Manufacture & Use*, American Oil Chemists' Society, II. Series; Champaign, Illinois (1989)
- 233 Táai, P.-T., Pokorný, J., Janicek, G., Nonenzymatik browning. X. Kinetics of the oxidative browning of phosphatidylethanolamine, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 156, 257-262 (1974)
- 234 Tattrie, N.H., Benett, J.R., Cyr, R., Can, J., *Biochem.* 46, 219 (1968)
- 235 Thudichum, J.L.W., *A treatise on the chemical constitution of the brain*, Bailliere, Tinball u. Cox, London 1884
- 236 Tolboe, O., Krog, N., *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 124, 455 (1946)
- 237 Toume, M., *Gewinnung und Fraktionierung von Pflanzenlecithinen*, Diss. Berlin 1992
- 238 Tsai, L., Smith, L., Role of bases and phosphoryl bases of phospholipids in the autoxidation of linoleate emulsions, *Lipids* 6, 196 (1972)
- 239 Utmann, C.M., Lederer, M.O., Identification and quantification of aminophospholipid-linked Maillard compounds in model systems and egg yolk products, *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1000-1008
- 240 Utmann, C.M., Lederer, M.O., Independent synthesis of aminophospholipid-linked Maillard products, *Carbohydrate Research* 325 (2000) 157-168
- 241 van Boekel, M.A.J.S., Effect of heating on Maillard reaction in milk, *Food Chem.* 1998, 62, 403-414
- 242 Viljanen, K. et al., Carotenoids as antioxidants to prevent photooxidation, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 353 (2002)
- 243 Vlassara, H., Brownslee, M., Cerami, A. Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts, *J. Exp. Med.* 160, 197-207 (1984)
- 244 Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E., *Organische Chemie*, 4. Auflage (2005), Wiley-VCH, Weinheim
- 245 Wagner, K.-H., Derkits, S., Herr, M., Schuh, W., Elmadfa, I., Antioxidant potential of melanoidins isolated from roasted glucose-alanine model, *Food Chemistry*, 78, 375-382 (2002)
- 246 Wagner, H., Wolff, P., *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 62, 1115, (1960)
- 247 Wang, Y., Ho, C.-T., Formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone through Methylglyoxal: A Maillard reaction intermediate, *J. Agric. Food Chem.* 56, 4705-9 (2008)
- 248 Watts, B.M. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 27, 48-51 (1950)
- 249 Weber, E.J., Composition of commercial corn and soy lecithins, *JAOCS*, 58, 898-901 (1981)
- 250 Weenen, H., Reactive intermediates and carbohydrates fragmentation in Maillard chemistry, *Food Chem.* 62, 393-401 (1998)
- 251 Weenen, H., Apeldoorn, W., Carbohydrate cleavage in the Maillard reaction, in: *Flavour Science – Recent Developments*, A.J. Taylor, D.S. Mottram, Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge U.K., 1996, 211-250
- 252 Weete, J.D., Preferential degradation of noncholin phosphatides in soybean lecithin by thermalization, *JAOCS*, 71, 11, 1195-1199 (1994)
- 253 Wells-Knecht, M.C., Thorpe, S.R., Baynes, J., Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen, *Biochemistry* 34, 15134-15141 (1995)

- 254 Weng, X.C., Gordon, M.H., Antioxidant synergy between phosphatidyl ethanolamine and α -tocopherylquinone, *Food Chemistry* 48, 165-168 (1993)
- 255 Yi, O.-S., Han, D., Shin, H.-K., Synergistic antioxidative effects of tocopherol and ascorbic acid in fish oil/lecithin/water system, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 881-883 (1991)
- 256 Yoon, S.H., Jung, M.Y., Min, D.B., Role of phospholipids in the flavor stability of soybean oil, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 19, 23, 1987
- 257 Yukawa, Y., Tsuno, Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 32, 971 (1959)
- 258 Zamora, R., Hidalgo, F.J., Phosphatidylethanolamine modification by oxidative stress product 4,5(E)-Epoxy-2(E)-heptenal, *Chem. Res. Toxicol.* 2003, 16, 1632-41
- 259 Zamora, R., Olmo, C. Navarro, J.L. and Hidalgo F.J., Contribution of phospholipid pyrrolization to the color reversion produced during deodorization of poorly degummed vegetable oils, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4166-4171
- 260 Ziegelitz, R., *Lecithine – Eigenschaften und Anwendungen*, Lucas Meyer (Hrsg.) Hamburg 1989

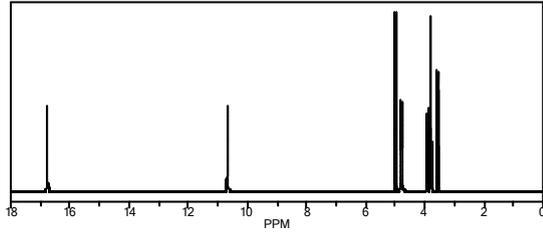
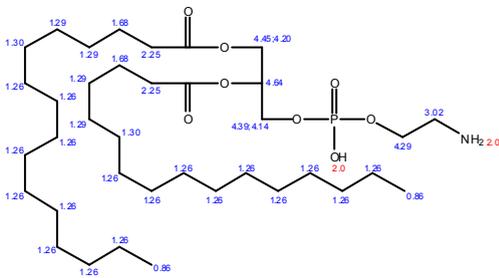
Anhang

Abkürzungen

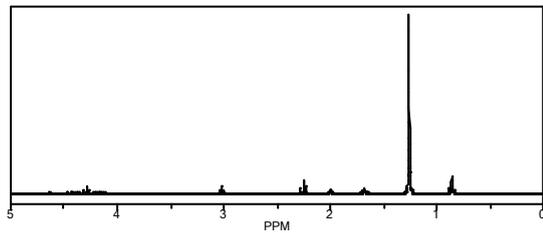
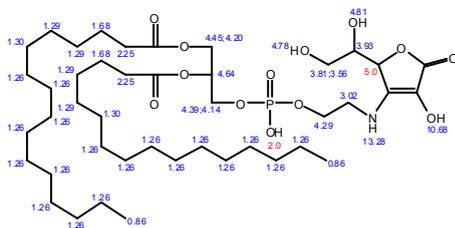
AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie	Mal.	Maltose
A6	Hexanal	Man.	Mannose
AcOH	Essigsäure	MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
	Anisidinzahl	MW	molecular weight
APE / A-PE	Amadori-PE	NAPE	N-Acyl-phosphatidyethanolamin
Asc.	Ascorbinsäure	n.g.	nicht gemessen
aq	Wasser als Ligand	NL	Neutrallipid
B	Blindwert	O/W	Öl-in-Wasser
	Bindungsenergie	o-PE	ortho-PE, Ethanolaminphosphat
BS	Dihydroxybenzoesäure	OPD	ortho-Phenylendiamin
bpy	Bipyridyl	P	Phospholipid-Fraktion
Car	Carotenoid	PA	Phosphatidsäure
CE-PE	Carboxyethyl-PE	Pal.	Palmitinsäure
Cer.	Ceramide	PC	Phosphatidylcholin
Chl.	Chloroform	PE	Phosphatidylethanolamin
CM	Chinonmethid	PE-Asc.	PE-Ascorbinsäure-Kondensat
CML	Carboxymethyllysin	PE- -TQ	PE- -Tocopheron
CM-PE	Carboxymethyl-PE	PE- Glu.	Amadori-PE / Schiff-PE
2,4-D	2,4-Decadienal	phen	o-Phenanthrolin
DDH	Didesoxyhexoson	PI	Phosphatidylinosit
DH	Desoxyhexoson	PL	Phospholipid
DHA	Docosahexaensäure	PO	Peroxid
Dipal.	Dipalmitoyl-	POZ	Peroxidzahl
Disp.	Disproportionierung	PrG	Propylgallat
DP	Desoxypentoson	PS	Phosphatidylserin
DPG	Di-phosphatidylglycerin	PUFA	poly unsaturates fatty acid
DPPH	Diphenyl-picryl-hydrazyl-Radikal	Q / Que.	Quercetin
DT	Desoxythreoson	R1 / R2	Rapsöl 1/2
EL	Ethyllinolat	RA-Add.	Retro-Aldol-Addition
Em.	Emissionswellenlänge	Red.	Reduktion
EtOH	Ethanol	RL	Rapslecithin
Ex.	Excitationswellenlänge	S	Substrat, Sojalecithin
Ext.	Extinktion	Sacc.	Saccharose
Fru.	Fructose	SF _{Syn.}	synergistischer schutzfaktor
FS	Fettsäure	SL	Sojalecithin
Gal.	Galactose	SoL	Sonnenblumenlecithin
GC	Gaschromatographie	SM	Schwermetall
GL	Glycolipid	S-PC	Soja-PC
Glu.	Glucose	SPM	Sphingomyelin
HLB	hydrophil-hydrophobe-Balance	t	Zeit
HMF	Hydroxymethylfurfural	T	Temperatur, Tocopherol
HPLC	high performance liquid chromatography	TBD	Toc.-Biphenyl-Dimer
	Induktionsperiode	TED	Toc.-Ether-Dimer
I	Induktionsperiode	TG	Triglycerid
ISTD	interner Standard	THQ	-Tocopherolhydrochinon
IP	Induktionsperiode	Toc.	Tocopherol/e
K	Gleichgewichtskonstante	TocAc.	-Tocopherolacetat
k	Geschwindigkeitskonstante	TQ	-Tocopherylchinon
konz.	konzentriert	TQges	Synthesegemisch Tocopherylchinon
Konz.	Konzentration	TQpur	-Tocopherylchinon (Standard)
LPC	lyso-PC	Tr	Trockenmasse
m	Masse	v _R	Reaktionsgeschwindigkeit
M	Molar, mol l ⁻¹	w / W	Woche
M / MG	Molekulargewicht		

ChemNMR ^1H Estimation

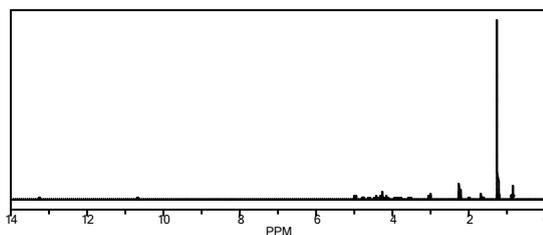
Estimation quality: blue = good, magenta = medium, red = rough

ChemNMR ^1H Estimation

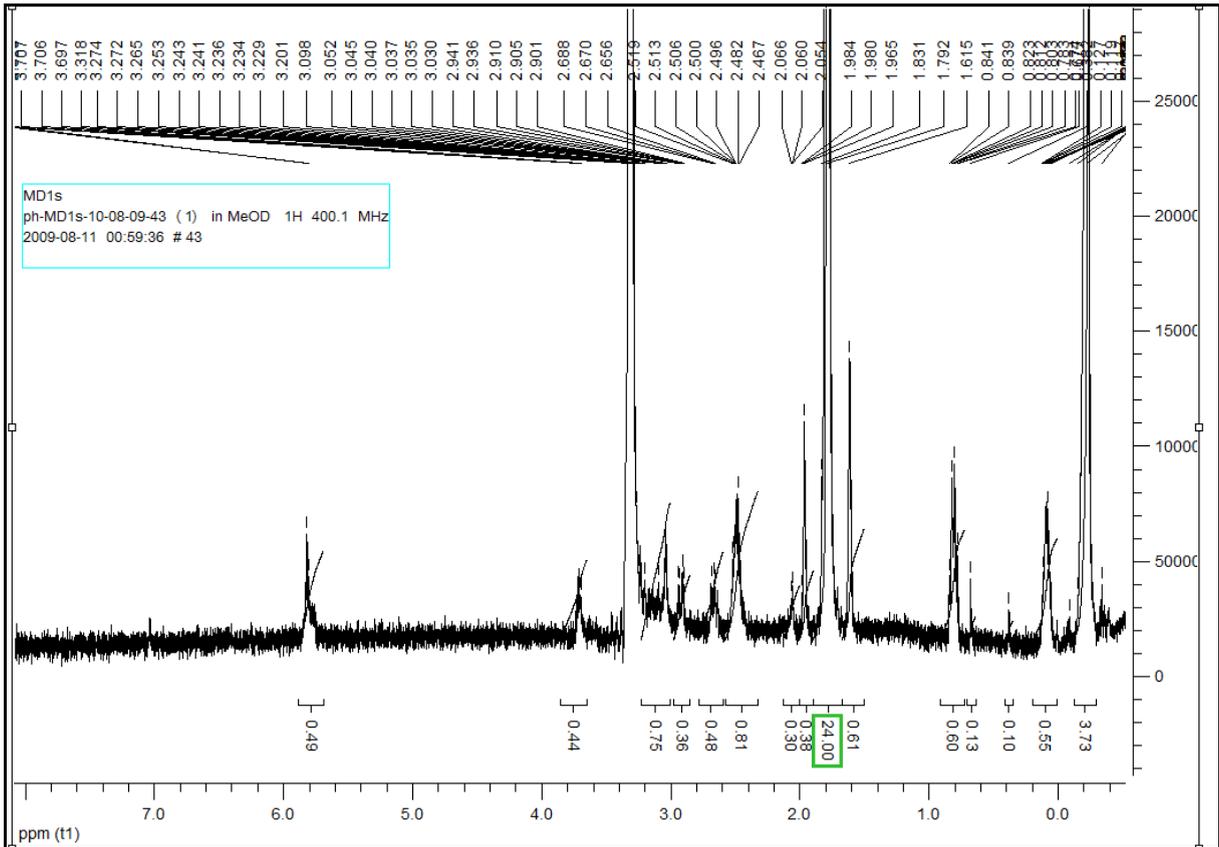
Estimation quality: blue = good, magenta = medium, red = rough

ChemNMR ^1H Estimation

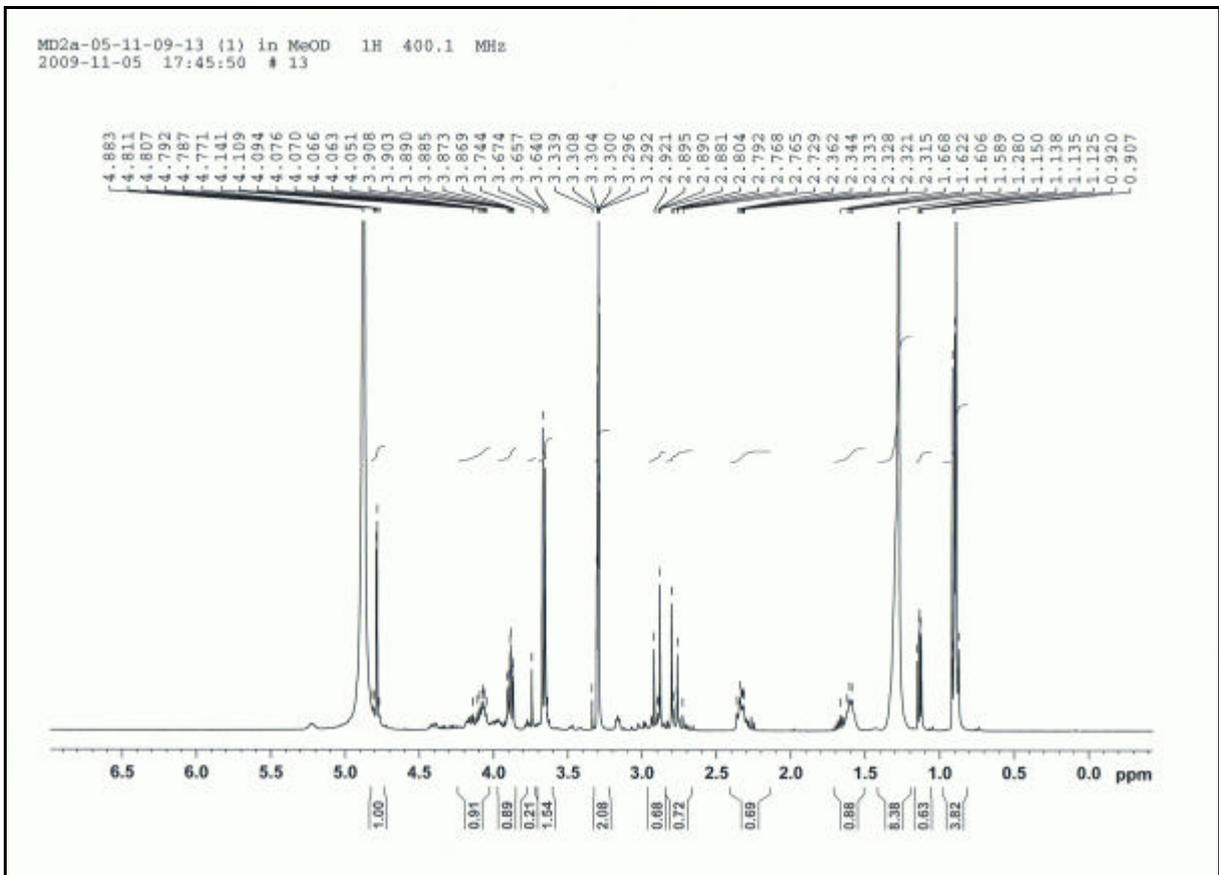
Estimation quality: blue = good, magenta = medium, red = rough



theoretische ^1H -NMR-Spektren: Ascorbinsäure, Dipal.-PE und Dipal.-PE-Ascorbinsäure [ChemDrawUltra9.0]



¹H-NMR-Spektrum von Dipalmitoyl-PE



¹H-NMR-Spektrum von „Dipalmitoyl-PE-Ascorbinsäure“

Danksagung

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Jörg-Thomas Mörsel danke ich für die interessante Themenstellung und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre. Herrn Prof. Dr. Lothar W. Kroh sei für die anregenden Diskussionen gedankt. Für die Durchführung von Messungen gilt mein besonderer Dank: Dr. Andreas Matulat, Andy Mechlinski und Susanne Kreuz, sowie Dr. Clemens Mügge, Constanze Richter, Arno Strähmel und Paul Haase. Nicht zuletzt danke ich der NaFöG-Kommission für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.