

# **FORSCHUNGSBERICHT AGRARTECHNIK**

des Fachausschusses Forschung und Lehre der  
Max-Eyth-Gesellschaft Agrartechnik im VDI (VDI-MEG)

**540**

Severin Ramona Thierau

**Einfluss von Erhitzung und Gefriertrocknung  
auf die Lutein- und Zeaxanthin-Konzentrationen  
in Eigelb**

Dissertation

Witzenhausen/Fulda 2014





Universität Kassel  
Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften  
Fachgebiet Agrartechnik  
Prof. Dr. Oliver Hensel

Hochschule Fulda  
Fachbereich Lebensmitteltechnologie  
Fachgebiet Ernährungswissenschaften  
Prof. Dr. Ingrid Seuß-Baum

## **Einfluss von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Lutein- und Zeaxanthin-Konzentrationen in Eigelb**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktorin der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)

Vorgelegt im Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften  
der Universität Kassel

Von M. Sc. Severin Ramona Thierau  
aus Herborn/Dillenburg

Die vorliegende Arbeit wurde am 16.09.2014 vom Fachbereich für Ökologische Agrarwissenschaften, Fachgebiet Agrartechnik der Universität Kassel als Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Agrarwissenschaften angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2014

Hauptberichter: Prof. Dr. Oliver Hensel  
Mitberichter: Prof. Dr. Ingrid Seuß-Baum

Mündliche Prüfung: Prof. Dr. Oliver Hensel  
Prof. Dr. Ingrid Seuß-Baum  
Prof. Dr. Angelika Ploeger  
Prof. Dr. Stefan Schildbach

Alle Rechte vorbehalten. Die Verwendung von Texten und Bildern, auch auszugsweise, ist ohne Zustimmung des Autors urheberrechtswidrig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigung, Übersetzung, Mikroverfilmung sowie die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

© 2014.

Im Selbstverlag: Severin Ramona Thierau  
Bezugsquelle: Universität Kassel  
Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften  
Fachgebiet Agrartechnik  
Nordbahnhofstraße 1a  
37213 Witzenhausen

Hochschule Fulda  
Fachbereich Lebensmitteltechnologie  
Fachgebiet Ernährungswissenschaften  
Marquardstraße 35  
36039 Fulda

## Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Lebensmitteltechnologie der Hochschule Fulda.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Oliver Hensel und Frau Prof. Dr. Ingrid Seuß-Baum für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die bereichernden und hilfreichen Anregungen und Diskussionen sowie Herrn Prof. Dr. Stefan Schildbach für seine Unterstützung und die Durchsicht der Arbeit.

Bei Frau Dr. Stefanie Retz bedanke ich mich herzlich für die konstruktive und freundliche Beratung und Hilfe bei wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen, die Durchsicht der Arbeit sowie ihre moralische Unterstützung.

Ich danke Herrn Dr. Michael Wenzel für die Hilfestellung bei der Einarbeitung in das geräte-technische Equipment, Frau Dipl.-Chem. Karin Fischer, die stets bei allen analytischen Problemen hilfsbereit zur Seite stand, Frau M. Sc. Désirée Schneider für die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen, besonders hinsichtlich der statistischen Auswertungen, und Frau M. Sc. Helena Keil, die mich im Rahmen ihrer Master-Thesis bei den DSC-Messungen unterstützte, für die gute Zusammenarbeit.

Herzlich möchte ich mich auch bei Frau M. Sc. Lena Schäfer für die Durchsicht der Arbeit und besonders die unermüdliche und geduldige Unterstützung in allen persönlichen Belangen bedanken, die stets mit liebevoll hartnäckigem Bestreben die *work-life-balance* wiederherstellte.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Mutter Iris und meiner Schwester Jacqueline, die immer für mich da sind und deren Unterstützung und Liebe die beste Motivation für mich sind.

*Für Mogli*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Hypothesenformulierung</b> .....	1
<b>2. Stand der Forschung</b> .....	4
<b>2.1 Das Lebensmittel Ei und die Zusammensetzung des Eigelbs</b> .....	4
<b>2.2 Einfluss von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Proteine und Lipoproteine in Eigelb</b> .....	8
2.2.1 Erhitzung .....	9
2.2.2 Gefriertrocknung.....	11
<b>2.3 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Carotinoiden</b> .....	15
2.3.1 E/Z-Isomerisation .....	16
2.3.2 Degradation.....	18
<b>2.4 Vorkommen von Carotinoiden in natürlichen Matrices</b> .....	20
2.4.1 Aggregation und Kristallisation .....	20
2.4.2 Membrane .....	20
2.4.3 Proteine.....	21
<b>2.5 Metabolismus von Carotinoiden</b> .....	22
<b>2.6 Carotinoide in Lebensmitteln</b> .....	24
2.6.1 Carotinoide in Eigelb .....	25
2.6.2 Einflüsse auf den Carotinoid-Gehalt .....	26
<b>2.7 Bioverfügbarkeit</b> .....	28
<b>2.8 Physiologische Wirkungen von Carotinoiden</b> .....	30
<b>2.9 Analytik von Carotinoiden</b> .....	32
2.9.1 Probenaufbereitung und Extraktion .....	33
2.9.2 Chromatographische Trennung mittels HPLC.....	34
2.9.3 Identifizierung .....	37
2.9.4 Quantifizierung .....	44
<b>2.10 Analytische Methodvalidierung</b> .....	44
<b>3. Material und Methoden</b> .....	47
<b>3.1 Vorbereitung des Eigelbs</b> .....	49
<b>3.2 Fraktionierung von Eigelb in Plasma und Granula</b> .....	49
<b>3.3 Bestimmung der Trockenmasse (TM)</b> .....	49
<b>3.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)</b> .....	50

<b>3.5 Bestimmung von Lutein und Zeaxanthin</b> .....	51
3.5.1 HPLC-PDA-Analyse .....	51
3.5.2 Extraktion .....	52
3.5.3 Richtigkeit und Wiederholpräzision der Bestimmungsmethode.....	53
3.5.4 Identifizierung von Lutein und Zeaxanthin .....	54
<b>3.6 Erhitzung</b> .....	54
<b>3.7 Gefriertrocknung</b> .....	55
<b>3.8 Statistische Auswertung der Messergebnisse</b> .....	55
<b>4. Ergebnisse</b> .....	57
<b>4.1 Fraktionierung von Eigelb in Plasma und Granula</b> .....	57
<b>4.2 Bestimmung der Trockenmasse (TM)</b> .....	57
<b>4.3 Bestimmung von Lutein und Zeaxanthin</b> .....	59
4.3.1 HPLC-PDA-Analyse .....	59
4.3.2 Extraktion .....	63
4.3.3 Richtigkeit und Wiederholpräzision der Bestimmungsmethode.....	67
4.3.4 Identifizierung von Lutein und Zeaxanthin .....	69
4.3.5 Berechnung der Massenkonzentrationen von Lutein und Zeaxanthin.....	80
4.3.6 Zusammenfassung zur Optimierung der Bestimmungsmethode.....	80
<b>4.4 Erhitzung und Gefriertrocknung</b> .....	82
4.4.1 Nativzustand .....	83
4.4.2 Erhitzung.....	84
4.4.3 Gefriertrocknung.....	95
<b>5. Diskussion</b> .....	103
<b>5.1 Nativzustand</b> .....	103
<b>5.2 Diskussion zum Einfluss der Erhitzung</b> .....	108
<b>5.3 Diskussion zum Einfluss der Gefriertrocknung</b> .....	125
<b>5.4 Zusammenfassende Diskussion</b> .....	136
5.4.1 Modell zur Beeinflussung der Xanthophyll-Massenkonzentrationen .....	136
5.4.2 Evaluation der Ergebnisse im Kontext der formulierten Hypothesen.....	140
5.4.3 Methodische Aspekte .....	145
<b>6. Ausblick</b> .....	146
<b>Zusammenfassung</b> .....	147
<b>Summary</b> .....	149
<b>Literatur</b> .....	XIII
<b>Anhang</b> .....	XXXV

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1: Darstellung des Studiendesigns zum Einfluss von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Xanthophyll-Konzentrationen in Eigelb
- Abb. 2-1: Schematischer Aufbau der *core-shell*-Struktur der LDL [modifiziert nach Forti und Diamant 2006]
- Abb. 2-2: Domänenorganisation des HDL-Monomers (links) und X-förmige Struktur des HDL-Dimers (rechts) [modifiziert nach Anderson *et al.* 1998]
- Abb. 2-3: Zusammensetzung von Eigelb, Plasma und Granula [modifiziert nach Li-Chan und Kim 2008; Belitz *et al.* 2008; Anton 2007; Moussa *et al.* 2002; Li-Chan *et al.* 1995; Ternes *et al.* 1995; Dyer-Hurdon und Nnanna 1993; Itoh *et al.* 1986; Powrie und Nakai 1986; McBee und Cotterill 1979; Evans *et al.* 1968; Martin *et al.* 1964]
- Abb. 2-4: Temperaturabhängiger Viskositätsverlauf von Eigelb [modifiziert nach Ternes 2008b]
- Abb. 2-5: Modell der Hydrathülle des LDL-Moleküls [modifiziert nach Wakamatu 1993]
- Abb. 2-6: Bezifferung des Carotinoid-Moleküls am Beispiel der Strukturformel von Lycopin ( $\psi,\psi$ -Carotin) [Weedon und Moss 1995]
- Abb. 2-7: Molekülstrukturen von all-E-Lutein (links) und all-E-Zeaxanthin (rechts)
- Abb. 2-8: E-Konfiguration (Priorität Substituent a > b und d > c; links) und Z-Konfiguration (Priorität Substituent a > b und c > d; rechts) [modifiziert nach Weedon und Moss 1995]
- Abb. 2-9: Stereoisomerentrennung eines Lutein-Zeaxanthin-Standardgemischs auf einer C<sub>30</sub>-Phase ohne (links) und mit (rechts) Endcapping [Glaser 2001]
- Abb. 2-10: Vergleich der Filmdicke einer C<sub>18</sub>- und einer C<sub>30</sub>-Phase mit der Moleküllänge von  $\beta$ -Carotin (links) [modifiziert nach YMC 2011] und Stereoisomerentrennung von Lutein, Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin mit einer C<sub>30</sub>-Phase bei Spinat-Extrakt (rechts) [Dachtler 2000]
- Abb. 2-11: Ermittlung der Schwingungsfeinstruktur (%III/II) bei all-E-Lutein mit Kennzeichnung der Absorptionsmaxima (I, II, III)
- Abb. 2-12: Bestimmung der relativen Intensität (%A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>) der Z-Bande bei 13-Z-Zeaxanthin
- Abb. 2-13: Aufbau eines Massenspektrometers (oben) und Ionisierung bei der APCI (unten links) [modifiziert nach University of Bristol 2005] basierend auf den Prinzipien nach Tab. 2.2
- Abb. 2-14: Fragmentierungsschema von Lutein und Zeaxanthin [modifiziert nach Dachtler 2000]
- Abb. 3-1: Vorbereitung (1), Behandlung (2) und Analytik (3) von Eigelb, Plasma und Granula
- Abb. 3-2: Auswertung der DSC-Thermogramme
- Abb. 4-1: Verdünnte Plasmafraktion (1:1 destilliertes Wasser; links) und hochmolekulares Granula-Sediment (rechts)
- Abb. 4-2: Elution der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bei nativem Eigelb
- Abb. 4-3: 5-Punkt-Kalibrierung (0,10 - 2,50  $\mu\text{g/mL}$ ) der all-E-Isomere von Lutein und Zeaxanthin
- Abb. 4-4: Probenaufbereitung und -analyse zur Bestimmung der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Granula, Plasma und Eigelb
- Abb. 4-5: Elutionsreihenfolge der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin am Beispiel von gefriergetrocknetem Plasma
- Abb. 4-6: Elution der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere auf einer C<sub>30</sub>-Phase mit Endcapping – Chromatogrammausschnitt einer sprühgetrockneten Eigelbprobe (links) [Wenzel 2010]; Standardgemisch von Lutein und Zeaxanthin (rechts) [Glaser 2001]
- Abb. 4-7: Standardsubstanzen – Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (422/444/473) mit Schwingungsfeinstruktur (64 %III/II) von all-E-Lutein (links) und Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (430/451/477) mit Schwingungsfeinstruktur (38 %III/II) von all-E-Zeaxanthin (rechts)

- Abb. 4-8: Standardstammlösung (100 µg/mL) – Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (412/440/470) mit Schwingungsfeinstruktur (36 %III/II) von 13-Z-Lutein (links) und Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (421/445/471) mit Schwingungsfeinstruktur (16 %III/II) und Z-Bande (336 nm, 57 %A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>) von 13-Z-Zeaxanthin (rechts)
- Abb. 4-9: Gefriergetrocknetes Plasma – Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (415/440/471) mit Schwingungsfeinstruktur (28 %III/II) und Z-Bande bei 329 nm (40 %A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>) von 13-Z-Lutein (links) und Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (421/446/471) mit Schwingungsfeinstruktur (19 %III/II) und Z-Bande bei 336 nm (52 %A<sub>B</sub>/A<sub>II</sub>) von 13-Z-Zeaxanthin (rechts)
- Abb. 4-10: TIC am Peakmaximum von all-E-Lutein
- Abb. 4-11: Parameteroptimierung (corona 2,9 kV, cone 30 V) bei Zeaxanthin – Chromatogramm (oben) und TIC-Messung von Zeaxanthin (unten)
- Abb. 4-12: DSC-Thermogramme der nativen Proben von Granula (links), Plasma (Mitte) und Eigelb (rechts)
- Abb. 4-13: DSC-Thermogramme nativer und erhitzter Granula der Chargen 1 und 2
- Abb. 4-14: DSC-Thermogramme nativen und erhitzten Plasmas der Chargen 1 und 2
- Abb. 4-15: DSC-Thermogramme nativen und erhitzten Eigelbs der Chargen 1 und 2
- Abb. 4-16: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [µg/100 g] nativer und erhitzter Granula von Charge 1 (grau) und Charge 2 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )
- Abb. 4-17: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [µg/100 g] nativen und erhitzten Plasmas von Charge 1 (grau) und Charge 2 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )
- Abb. 4-18: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [µg/100 g] nativen und erhitzten Eigelbs von Charge 1 (grau) und Charge 2 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )
- Abb. 4-19: DSC-Thermogramme nativer, rehydrierter und gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4
- Abb. 4-20: DSC-Thermogramme nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4
- Abb. 4-21: DSC-Thermogramme nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4
- Abb. 4-22: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [µg/100 g] nativer und gefriergetrockneter Granula von Charge 3 (grau) und Charge 4 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )
- Abb. 4-23: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [µg/100 g] nativen und gefriergetrockneten Plasmas von Charge 3 (grau) und Charge 4 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )
- Abb. 4-24: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [µg/100 g] nativen und gefriergetrockneten Eigelbs von Charge 3 (grau) und Charge 4 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )
- Abb. 5-1: Thermoinduzierte Strukturveränderungen der Livetine, LDL, HDL und von Phosvitin in Eigelb [nach Jaekel und Ternes 2009; Li-Chan und Kim 2008; Ternes 2008b; Bircan und Barringer 2002; Le Denmat *et al.* 1999; Acker und Ternes 1994; Ternes und Acker 1994a und 1994c; Mohr und Simon 1992]
- Abb. 5-2: Einflüsse der Erhitzung auf die Massenkonzentrationen der Xanthophylle – Kennzeichnung von Erhöhung (grüner Pfeil) oder Verminderung (roter Pfeil) der Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierung und oxidativen Degradation der Xanthophylle

- Abb. 5-3: Hitzeinduzierte Strukturveränderungen der Livetine, LDL und HDL [in Einklang mit Jaekel und Ternes 2009; Ternes 2008b, Bircan und Barringer 2002, Le Denmat *et al.* 1999; Acker und Ternes 1994; Ternes und Acker 1994a und 1994c; Mohr und Simon 1992]
- Abb. 5-4: Hitzeinduzierte Massenkonzentrationsänderungen der Xanthophylle
- Abb. 5-5: Einflüsse der Gefriertrocknung auf die Massenkonzentrationen der Xanthophylle – Kennzeichnung von Erhöhung (grüner Pfeil) oder Verminderung (roter Pfeil) der Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierung und oxidativen Degradation der Xanthophylle
- Abb. 5-6: Einflüsse von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Massenkonzentrationen der Xanthophylle gegliedert nach der Makro-, Meta- und Mikroebene – Kennzeichnung von Erhöhung (grüner Pfeil) oder Verminderung (roter Pfeil) der Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierung und oxidativen Degradation der Xanthophylle

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 2-1: Gehalte an Lutein und Zeaxanthin [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] in Eigelb in Abhängigkeit der Haltungsform (Klasse 0 - 3) [Schlatterer und Breithaupt 2006] sowie in den Futterpflanzen [USDA 2014; Gregory *et al.* 1986]
- Tab. 2-2: Ionisierung bei der Chemischen Ionisation [modifiziert nach Lehmann 1996; Schröder 1991]
- Tab. 3-1: Bio-Eier-Chargen für die Versuchsreihen zur Ermittlung des Erhitzungs- und Gefrier-trocknungseffekts – Angabe von Erzeugercode, Packstellen-Nummer (PN) und Mindest-Haltbarkeits-Datum (MHD)
- Tab. 3-2: Parameter der statistischen Auswertung der Daten
- Tab. 4-1: Trockenmassen [%] nativer und erhitzter Proben von Granula, Plasma und Eigelb
- Tab. 4-2: Trockenmassen [%] nativer und gefriergetrockneter Proben von Granula, Plasma und Eigelb
- Tab. 4-3: Analyseparameter der optimierten HPLC-Trennmethode
- Tab. 4-4: Steigung, Verfahrensvariationskoeffizient und Geradengleichung der linearen Regression von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin bei Auswertung von Peakfläche und Peakhöhe
- Tab. 4-5: LOD und LOQ von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin im Vergleich zu Wenzel *et al.* (2010)
- Tab. 4-6: Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion durch Variation des Extraktionslösungsmittels und der Ultraschallbehandlungszeit unter Bestimmung der Wiederfindungsraten von Lutein und Zeaxanthin
- Tab. 4-7: Konzentrationsabhängige Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin
- Tab. 4-8: Variationskoeffizienten [%] der Mess- und Methodenpräzision (Wiederholbarkeit) von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin (Sechsfachbestimmung)
- Tab. 4-9: Vergleich der Retentionszeiten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin in einer Kalibrierlösung und unter Einfluss von Eigelbmatrix (Probenextrakt)
- Tab. 4-10: Literaturwerte der Absorptionsmaxima I/II/III der Hauptabsorptionsbande sowie der Schwingungsfineinstruktur (%III/II) der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin
- Tab. 4-11: Vergleich der Absorptionsmaxima (I/II/III) und der Schwingungsfineinstruktur (%III/II) der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin unter Matrixeinfluss und in Standardlösung
- Tab. 4-12: Optimierte Analyseparameter der Massenspektrometrie
- Tab. 4-13: Mittelwerte des Onsets, der  $T_d$  und von  $\Delta H \pm SD$  der DSC-Peaks der nativen Proben von Granula, Plasma und Eigelb (berechnet aus Tab. 4-14 bis 4-17 und 4-24 bis 4-26)
- Tab. 4-14: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  des DSC-Peaks nativer und erhitzter Granula der Chargen 1 und 2
- Tab. 4-15: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  von Peak 1 nativen und erhitzten Plasmas der Chargen 1 und 2
- Tab. 4-16: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  von Peak 2 nativen und erhitzten Plasmas der Chargen 1 und 2
- Tab. 4-17: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  des DSC-Peaks nativen und erhitzten Eigelbs der Chargen 1 und 2
- Tab. 4-18: Massenkonzentrationen  $\pm SD$  [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativer und erhitzter Granula – Charge 1 (oben) und Charge 2 (unten)
- Tab. 4-19: Massenkonzentrationsänderungen [%] von all-E-Lutein, all-E-Zeaxanthin und 13-Z-Lutein erhitzter Granula – Charge 1 (links) und Charge 2 (rechts)

- Tab. 4-20: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und erhitzten Plasmas – Charge 1 (oben) und Charge 2 (unten)
- Tab. 4-21: Massenkonzentrationsänderungen [%] von 13-Z-Lutein erhitzten Plasmas – Charge 1 (links) und Charge 2 (rechts)
- Tab. 4-22: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und erhitzten Eigelbs – Charge 1 (oben) und Charge 2 (unten)
- Tab. 4-23: Massenkonzentrationsänderungen [%] von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin erhitzten Eigelbs – Charge 1 (links) und Charge 2 (rechts)
- Tab. 4-24: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm$  SD des DSC-Peaks nativer, rehydrierter und gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-25: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm$  SD des DSC-Peaks nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-26: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm$  SD des DSC-Peaks nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-27: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativer und gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-28: Massenkonzentrationsänderungen [%] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-29: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-30: Massenkonzentrationsänderungen [%] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-31: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4
- Tab. 4-32: Massenkonzentrationsänderungen [%] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4
- Tab. 5-1: Vergleich der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in nativem Eigelb mit Literaturangaben nach Wenzel (2010) und Schlatte-  
rer und Breithaupt (2006)
- Tab. 5-2: Prozentuale Anteile an 13-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration in Eigelb, Plasma und Granula im Nativzustand im Vergleich zu Wenzel (2010)
- Tab. 5-3: Signifikante Veränderungen der Xanthophyll-Massenkonzentrationen bei Granula, Plasma und Eigelb bei der Erhitzung

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	→	<b>Abbildung</b>
ARM D	→	<b>Age-Related Macula Degeneration</b>
ANOVA	→	<b>Analysis of Variance</b> (Varianzanalyse)
APCI	→	<b>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</b>
AU	→	<b>Absorption Unit</b>
DSC	→	<b>Differential Scanning Calorimetry</b>
EFSA	→	<b>European Food Safety Authority</b>
ESI	→	<b>Electrospray Ionization</b>
HDL	→	<b>High-Density Lipoprotein</b>
HPLC	→	<b>High Performance/Pressure Liquid Chromatography</b>
IUPAC	→	<b>International Union of Pure and Applied Chemistry</b>
KHK	→	<b>Koronare Herzkrankheit</b>
LDL	→	<b>Low-Density Lipoprotein</b>
LLE	→	<b>Liquid-Liquid-Extraction</b> (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
LOD	→	<b>Limit of Detection</b>
LOQ	→	<b>Limit of Quantification</b>
MHD	→	<b>Mindest-Haltbarkeits-Datum</b>
MS	→	<b>Massenspektrometrie</b>
MSPD	→	<b>Matrix Solid Phase Dispersion</b>
MTBE	→	<b>Methyl-tert-butylether</b>
n. b.	→	nicht bestimmbar
n. d.	→	nicht detektiert
PDA	→	<b>Photodiodenarray</b>
RC	→	<b>Regenierte Cellulose</b>
PN	→	<b>Packstellen-Nummer</b>
RP	→	<b>Reversed Phase</b>
SD	→	<b>Standard Deviation</b> (Standardabweichung)
SLAMEN GHI	→	<b>Species of carotenoid</b> Linkages at the molecular level <b>Amount of carotenoids</b> <b>Matrix</b> <b>Effectors</b> <b>Nutrient status</b> <b>Genetic</b> <b>Host-related factors</b> Interactions among these variables
SPE	→	<b>Solid Phase Extraction</b>
Tab.	→	<b>Tabelle</b>
THF	→	<b>Tetrahydrofuran</b>
TIC	→	<b>Total Ion Current</b>
TM	→	<b>Trockenmasse</b>
VDL D	→	<b>Very-Low-Density Lipoprotein</b>
WR	→	<b>Wiederfindungsrate</b>

## Formelzeichenverzeichnis

$\alpha$	→	Signifikanzniveau
$b$	→	Achsenabschnitt/Ordinatenschnittpunkt
$\beta$	→	Konzentration Xanthophyll
$\text{CHCl}_3$	→	Trichlormethan (Chloroform)
$\text{CHOOH}$	→	Methansäure
$\Delta$	→	Differenz
$\bar{\Delta}$	→	gemittelte Differenz
$E$	→	Einwaage
$\text{EtOH}$	→	Ethanol
$\emptyset$	→	Durchmesser
$F_{\text{critical}}$	→	kritischer F-Wert
$\text{H}_2\text{O}$	→	Wasser
$H_0$	→	Nullhypothese
$H_1$	→	Alternativhypothese
$\Delta H$	→	normierte Gesamtenthalpie
$\lambda_{\text{max}}$	→	Hauptabsorptionsmaximum II (Wellenlänge mit maximaler Absorption)
$m$	→	Steigung
$m/z$	→	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
$M$	→	Analytmoleküle
$[\text{M}+\text{H}]^+$	→	Molekülion
$\text{MeOH}$	→	Methanol
$\mu_U$	→	unbehandelte Proben
$\mu_B$	→	behandelte (erhitzte und gefriergetrocknete) Proben
$\mu_{B1}$ bis $\mu_{Bn}$	→	unterschiedlich behandelte Proben
$\text{N}_2$	→	Stickstoff
$r$	→	Korrelationskoeffizient
$R_T$ ( $R_{T,\text{min}}/R_{T,\text{max}}$ )	→	Retentionszeit (minimal/maximal)
$s_x$	→	abgeschätzte Standardabweichung der normalverteilten Messwerte
$T_d$	→	Temperatur am Peakmaximum (Peak-Temperatur)
$u$	→	unit/atomare Masseneinheit ( $1 \text{ u} = 1,660539 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ )
$V_K$	→	Variationskoeffizient
$V_{x0}$	→	Verfahrensvariationskoeffizient
$w$	→	Massenkonzentration Xanthophyll
$x$	→	Bestimmungsgröße
$x_R$	→	theoretisch richtige Analyt-Konzentration
$\text{X}^+/\text{XH}^+$	→	Sekundärreaktantgasionen
$\bar{x}$	→	abgeschätzter Mittelwert der normalverteilten Messwerte/Mittelwert der gemessenen Analyt-Konzentration
$y$	→	Messgröße/Signal



## Kurzfassung

Veränderungen der Matrixbindung und der molekularen Struktur der antioxidativ wirkenden Carotinoide können die Bioakzessibilität dieser Substanzen beeinflussen. Die vorliegende Studie untersuchte die Einflüsse von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Eigelb und dessen Fraktionen Plasma und Granula. Dabei wurden die Strukturveränderungen der Lipoproteine, mit deren Lipiden die Eigelb-Xanthophylle assoziiert sind, betrachtet. Die Strukturentfaltungen der *Low-Density* und *High-Density* Lipoproteine (LDL und HDL) erhöhten die Extrahierbarkeit sowie Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle, die der Temperatureinfluss und Reaktanten katalysierten. Die Extrahierbarkeit, Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle waren durch den Aufschluss, die Gelbildung, die Oberflächenvergrößerung und die Erhöhung des Trockenmassegehalts der Matrix beeinflusst. Die Strukturentfaltung der in hohen Mengen in Plasma enthaltenen LDL findet bei geringeren Temperaturen (ca. 65 - 76 °C) als die der in Granula dominanten HDL (ca. 75 - 84 °C) statt. Zudem schien die gefriertrocknungsinduzierte Strukturentfaltung der LDL im Gegensatz zu HDL und Granula durch Rehydratation nicht vollständig reversibel zu sein. Daher wies Plasma eine geringere Stabilität bei der Erhitzung und Gefriertrocknung als Eigelb und Granula auf. Die Entfaltung von Lipoproteinstrukturen und die thermisch katalysierte Z-Isomerisierung sind wahrscheinlich für die signifikante 13-Z-Lutein-Zunahme nach Erhitzung von Plasma und Granula bei 82 und 87 °C sowie von Granula bei 77 °C verantwortlich. Der signifikante Verlust der all-E-Isomere der bei 87 °C erhitzten Proben von Eigelb und Granula war vermutlich durch 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle bedingt. Marginale Veränderungen der Xanthophylle basierten vermutlich darauf, dass die multifaktoriellen Einflüsse bei der Erhitzung einander kompensierten. Die Erhitzung bei 67 °C bedingte zudem aufgrund der weitgehenden Erhaltung der Lipoproteine ähnliche Xanthophyll-Gehalte wie bei den unerhitzten Proben. Bei der Gefriertrocknung führten die Strukturentfaltung der Lipoproteine unter Abspaltung der Lipide und die abtrocknungsbedingte Oberflächenvergrößerung zu signifikanten Zunahmen der Xanthophylle bei Plasma und Granula. Dies bestätigte sich für gefriergetrocknetes Eigelb vermutlich aufgrund von oxidativen Degradationen und Aggregationen der Xanthophylle nicht. Unterschiedliche Massenkonzentrationsänderungen der Xanthophylle im Vergleich der beiden Chargen wurden mit unterschiedlichen Anteilen an ungesättigten Fettsäuren erklärt. Die charakteristischen Anteile an Proteinen und Lipoproteinen, deren Gelbildungseigenschaften und die Lipidkomposition der Lipoproteine sowie die methodisch bedingte Verdünnung von Plasma waren vermutlich für die bei Granula, Plasma und Eigelb differierenden Massenkonzentrationsänderungen der Xanthophylle verantwortlich. Die Ergebnisse ließen eine höhere 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein im Vergleich zu all-E-Zeaxanthin vermuten.

## Abstract

Modifications of the matrix association and the molecular structure of antioxidative-acting carotenoids can influence the bioaccessibility of these substances. The present study investigated the influences of heating and freeze-drying on the mass concentrations of the all-E- and 13-Z-isomers of lutein and zeaxanthin in egg yolk and its plasma and granule fractions. Concomitantly, structural modifications of the lipoproteins were examined because egg yolk xanthophylls are associated with the lipids of lipoproteins. Structural unfolding of low-density and high-density lipoproteins (LDL and HDL, respectively) increased the extractability, and Z-isomerization and oxidative degradation of the xanthophylls, which were catalyzed by heating and the presence of reactants. The extractability, Z-isomerization and oxidative degradation of the xanthophylls were influenced by disintegration, gelling, surface enlargement and a higher dry matter content of the matrix. The unfolding of the structure of the LDL, which account for high amounts in plasma, occurred at lower temperatures (approximately 65 - 76 °C) than that of the HDL (approximately 75 - 84 °C), which are contained in high amounts in granules. Furthermore, adverse to HDL and granules the structural unfolding of the LDL induced by freeze-drying did not appear to be completely reversible upon rehydration. Therefore, plasma was less stable during heating and freeze-drying than the egg yolk or granules. The unfolding of lipoprotein structures and the thermally catalyzed Z-isomerization are most likely responsible for the significant increase of 13-Z-lutein after heating the plasma and granules to 82 and 87 °C or the granules to 77 °C. The significant decrease of the all-E-isomers in egg yolk and granules heated to 87 °C was presumably caused by 13-Z-isomerization and oxidative degradation of the xanthophylls. Marginal changes in the xanthophylls were most likely due to the compensation of the multifactorial influences upon heating. In addition, the considerable preservation of the lipoproteins in the samples heated to 67 °C accounted for similar mass concentrations of the xanthophylls compared with the unheated samples. During freeze-drying the unfolding of the lipoprotein structures with separation of the lipids and the enlarged sample surface in consequence of the drying caused significant increases in the xanthophylls for plasma and granules. This was not confirmed by freeze-dried egg yolk most likely because of the oxidative degradation and aggregation of the xanthophylls. Different changes in the mass concentrations of the xanthophylls of the two individual batches were explained by differences in the unsaturated fatty acid content. The characteristic contents of proteins and lipoproteins, their gelling properties, the lipid composition of the lipoproteins and the dilution of plasma due to methodical reasons presumably caused the different changes in the mass concentrations of the xanthophylls among granules, plasma and egg yolk. The results indicated a higher potential for all-E-lutein to 13-Z-isomerization than of all-E-zeaxanthin.

## 1. Einleitung und Hypothesenformulierung

Zahlreiche Studien lassen gesundheitliche Vorteile hinsichtlich der Verminderung des Risikos degenerativer Erkrankungen durch die Aufnahme von hohen Mengen an antioxidativ wirkenden Carotinoiden mit der Nahrung vermuten [Stracke *et al.* 2009; Watzl und Bub 2001; Castenmiller und West 1998]. Dabei spielt neben der Anwesenheit von Carotinoiden nach Art und Menge in Lebensmitteln deren Matrixassoziation für die Bioakzessibilität eine Rolle. Technologische Einflüsse während der Lebensmittelverarbeitung können die Matrixassoziation der Carotinoide sowie deren chemisch-physikalischen Eigenschaften und biologischen Funktionen durch Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen verändern.

Die in Carotine und die sauerstoffhaltigen Xanthophylle eingeteilten Carotinoide werden in Pflanzen *de novo* synthetisiert. Daher weisen pflanzliche Nahrungsmittel ein breites Spektrum an Carotinoiden auf [Rodriguez-Amaya 2001]. In tierischen Lebensmitteln sind die Carotinoid-Konzentrationen meist geringer, da Tiere Carotinoide aufgrund der fehlenden enzymatischen Ausstattung zur Biosynthese über die Nahrung aufnehmen müssen [Rodriguez-Amaya 2003]. Wichtige tierische Carotinoid-Quellen sind Eier, Milchprodukte, Fische und Meeresfrüchte [Britton und Khachik 2009]. Eigelb ist eine gute Lutein- und Zeaxanthin-Quelle, da die beiden lipophilen Xanthophylle aufgrund ihrer Assoziation mit den Lipiden der *Low-Density-* und *High-Density-Lipoproteine* (LDL und HDL) im Vergleich zu pflanzlichen Matrices besser bioverfügbar sind [Ternes 2008a; Greene *et al.* 2006; Chung *et al.* 2004; Handelman *et al.* 1999]. Zudem werden bei der Fütterung der Hühner xanthophyllreiche Pflanzen wie *Tagetes*-Arten, Erbsen, Spinat und Mais eingesetzt.

Neben der Farb- und Aromagebung ist Eigelb aufgrund der durch Proteine und Lipoproteine vermittelten Emulgierfähigkeit, Schaumbildung und Koagulierbarkeit ein wichtiger Rohstoff bei der Lebensmittelherstellung. Die zentrifugale Trennung von Eigelb in die Fraktionen Plasma (78 %) und Granula (22 %), die sich in ihrer Protein- und Lipoprotein-Zusammensetzung unterscheiden, ist aufgrund ihrer technofunktionellen Potentiale von Interesse für die Lebensmittelindustrie [Kulozik und Strixner 2011; Powrie und Nakai 1986]. Granula enthalten neben 12 % an LDL hauptsächlich HDL (70 %), die mit Phosvitin (16 %) über Phosphocalciumbrücken die komplexe Granulastruktur bilden [Anton 2007]. Plasma zeichnet sich durch seinen hohen LDL-Anteil (85 %) aus und enthält zudem 15 % Livetine [Anton 2007]. Bei der industriellen Verarbeitung von Eigelb spielen Temperatureinwirkungen beim Erhitzen, Gefrieren und Auftauen und Dehydrierungen bei der Herstellung pulverförmiger Produkte durch Sprüh- und Gefriertrocknung eine Rolle. Dabei bedingen hitzeinduzierte Strukturentfaltungen sowie die Entfernung der strukturstabilisierenden Hydrathülle bei der Abtrocknung Veränderungen der originären Strukturen der Proteine und Lipoproteine.

Hohe Temperaturen, Licht, Säure, Metallkationen und Enzyme katalysieren Z-Isomerisierungen und Degradationen der Carotinoide, wobei Degradationen zudem unter Sauerstoffeinfluss und durch Radikale initiiert werden [Shen *et al.* 2009; Belitz *et al.* 2008; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Stereochemisch und thermodynamisch basiert entstehen bei der Z-Isomerisierung bevorzugt 13-Z-Isomere [Britton und Khachik 2009]. Z-Isomere sind aufgrund ihrer geringeren Aggregationsneigung besser löslich und bioverfügbar als all-E-Isomere [Britton und Khachik 2009; Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008].

Aufgrund der geringen Anzahl an Studien zum Einfluss verarbeitungstechnologischer Faktoren auf die Eigelb-Xanthophylle werden in der vorliegenden Arbeit die nach Erhitzung und Gefriertrocknung extrahierbaren Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin untersucht. Dabei erfolgt die Betrachtung im Kontext der Strukturveränderungen der Lipoproteine bei Granula, Plasma und Eigelb, da die Xanthophylle mit den Lipiden der LDL und HDL assoziiert sind. Zur Absicherung der Ergebnisse und zur Berücksichtigung des Einflusses der Biodiversität hinsichtlich der Matrixkomposition werden je zwei Chargen von Bio-Eiern untersucht. Die Erhitzung und Gefriertrocknung von Granula, Plasma und Eigelb sowie die anschließende Analyse der Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine und der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin werden dabei jeweils in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

Mittels der Versuchsreihen zum Einfluss der Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Konzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Granula, Plasma und Eigelb sollen die folgenden Hypothesen untersucht werden:

1. Die Erhitzung und Gefriertrocknung induzieren Veränderungen der Strukturen der Proteine und Lipoproteine. Da die Xanthophylle mit den Lipiden der LDL und HDL assoziiert sind, kommt es daher auch zu Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte. Dabei unterscheiden sich die unbehandelten und behandelten Proben hinsichtlich der Protein- und Lipoproteinstrukturen sowie der Xanthophyll-Massenkonzentrationen komplementär zur Nullhypothese ( $H_0: \mu_U = \mu_B$  und  $\mu_{B1} = \mu_{B2} = \dots = \mu_{Bn}$ ) gemäß der Alternativhypothese ( $H_1: \mu_U \neq \mu_B$  und  $\mu_{B1} \neq \mu_{B2} \neq \dots \neq \mu_{Bn}$ )<sup>1</sup> signifikant.
2. Eigelb und dessen Fraktionen Plasma und Granula sind durch die charakteristischen Gehalte an Proteinen und Lipoproteinen gekennzeichnet. Damit sind unterschiedliche Matriceigenschaften im Nativzustand und Veränderungen infolge von Erhitzung und Gefriertrocknung verbunden, welche die Xanthophyll-Gehalte von Granula, Plasma und Eigelb beeinflussen.

---

<sup>1</sup> $\mu_U$  = unbehandelte Proben;  $\mu_B$  = behandelte (erhitzte und gefriergetrocknete) Proben;  $\mu_{B1}$  bis  $\mu_{Bn}$  = unterschiedlich behandelte Proben

3. Biodiversitätsbedingt werden Unterschiede im Ausmaß oxidativer Degradationen und damit hinsichtlich der Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte infolge von Erhitzung und Gefriertrocknung bei den untersuchten Chargen, die aus unterschiedlichen Legebetrieben stammen, erwartet.
4. Aufgrund der Unterschiede in der Molekülstruktur ist das während der Erhitzung und Gefriertrocknung induzierte Ausmaß der 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin unterschiedlich.

Die Studie ermöglicht die Betrachtung der durch Erhitzung und Gefriertrocknung veränderten Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin im Kontext der Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine bei Granula, Plasma und Eigelb (Abb. 1-1). Die Extrahierbarkeit und die resultierende Bioakzessibilität werden dabei durch die veränderte Matrixassoziation sowie die Bildung besser löslicher 13-Z-Isomere beeinflusst, was aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der Eigelb-Xanthophylle ernährungsphysiologische Vorteile bieten könnte. In diesem Zusammenhang könnten weiterführende Studien die gastrointestinale Resorptionsverfügbarkeit der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere bei erhitzten und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb untersuchen.

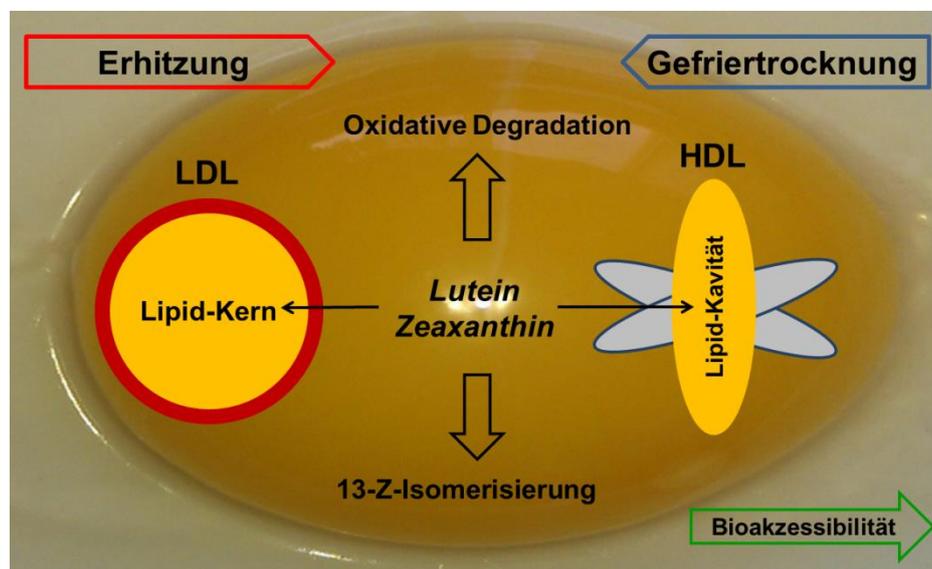


Abb. 1-1: Darstellung des Studiendesigns zum Einfluss von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Xanthophyll-Konzentrationen in Eigelb

## 2. Stand der Forschung

### 2.1 Das Lebensmittel Ei und die Zusammensetzung des Eigelbs

Das Hühnerei hat aufgrund seiner hohen Dichte an vielfältigen, leicht resorbierbaren Nährstoffen wie essentiellen Aminosäuren, Fettsäuren, Vitaminen (K, A, D, E und verschiedene B-Vitamine), Mineralien und Spurenelementen und des relativ geringen kalorischen Beitrags einen hohen nutritiven Wert [Hatta *et al.* 2008; Seuß-Baum 2005; Ternes *et al.* 2005; Vaghefi 2002; Hasler 2000; McNamara 2000]. Zudem enthält das Eigelb Substanzen mit potenziell antibakterieller, antioxidativer, entzündungshemmender und immunverstärkender Wirkung [Hatta *et al.* 2008]. Hinsichtlich des mit ca. 215 mg/Ei hohen Cholesterin-Gehalts und dessen möglichem Beitrag bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit ist zu beachten, dass beim Gesunden durch Nahrungscholesterin nur marginale Veränderungen des Plasmacholesterins induziert werden [McNamara 2000; Howell *et al.* 1997]. Die Gehalte einzelner Nährstoffe sind durch deren Anteile im Futter aber auch durch physiologische Faktoren (Alter, Rasse, Belastung) beeinflusst [Stadelman und Schmieder 2002; Kuksis 1992]. Aufgrund der höheren Aufnahme von Grünfutter durch die Tiere enthalten Bio-Eier meist hohe Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wobei sich das günstige Verhältnis an  $\omega$ -6- und  $\omega$ -3-Fettsäuren in den Eiern [Grashorn und Grimrath 2005] positiv auf die Inzidenz kardiovaskulärer und entzündungsinduzierter Krankheiten auswirken kann [Li-Chan und Kim 2008]. Neben ihren nutritiven Vorteilen haben Eier aufgrund ihrer technologischen und sensorischen Eigenschaften einen hohen ökonomischen Wert [Vaghefi 2002].

Eier bestehen aus Eiklar (ca. 57 %), Eigelb (ca. 33 %) und der Kalkschale (ca. 10 %) und enthalten 65,6 % Wasser, 12,1 % Proteine, 10,5 % Fett, 10,9 % Mineralstoffe und 0,9 % an Kohlenhydraten [Ternes *et al.* 2005]. Proteine sind in Eiklar und Eigelb enthalten, Fette fast ausschließlich im Eigelb und Mineralien hauptsächlich in der Schale [Li-Chan und Kim 2008].

Das von einer Vitellin-Membran umgebene Eigelb enthält Wasser (ca. 50 %), Proteine (ca. 15,7 - 16,6 %), Fett (ca. 32 - 35 %) und geringe Mengen an Kohlenhydraten und Mineralstoffen (ca. 1 %) [Ternes 2008a; Ternes *et al.* 2005]. Bezogen auf die Trockenmasse besteht Eigelb zu ca. 64 % aus Lipiden und 32 % aus Proteinen [Powrie und Nakai 1986]. Die größtenteils als Lipoprotein-Aggregate vorliegenden Eigelblipide setzen sich aus Triglyceriden (ca. 62 %), Phospholipiden (ca. 33 %) und Cholesterin und Cholesterinestern (ca. 5 %) zusammen, wobei ca. 30 - 35 % gesättigte (Myristin-, Palmitin-, Stearinsäure), 40 - 45 % einfach (Palmitolein-, Ölsäure) und 20 - 25 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren ( $\omega$ -3: Linolen-, Eicosapentaen-, Docosahexaensäure;  $\omega$ -6: Linol-, Arachidonsäure) vorkommen [Anton 2007]. Carotinoide sind zu weniger als 1 % in den Eigelb-Lipiden enthalten [Anton 2007].

Neben 10 % an globulären, wasserlöslichen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Livetinen [Ternes 2008a], 4 % an Phosvitin und 2 % an Minorproteinen, die keine Lipide enthalten, bestehen die Eigelbproteine zu 68 % aus *Low-Density* Lipoproteinen (LDL) und 16 % aus *High-Density* Lipoproteinen (HDL) [Powrie und Nakai 1986]. Phosvitin ist ein wasserlösliches Glycophosphoprotein mit hohem Phosphoranteil (10 %), das antioxidativ wirkt, da die Phosphatgruppe mit zwei- und dreiwertigen Metallkationen Chelatkomplexe bildet, was die metallionenkatalysierte Bildung von Radikalen und die Oxidation der Phospholipide verhindert [Hatta *et al.* 2008; Li-Chan und Kim 2008; Ternes 2008a]. Phosvitin bindet 95 % der Eisenionen in Eigelb als  $\text{Fe}^{3+}$  und zeichnet sich daher durch seine hohe Bindungskapazität für Eisenionen aus [Ternes 2008a]. Phosvitin ist widerstandsfähig gegenüber enzymatischer Proteolyse [Juneja und Kim 1997] und thermischer Denaturierung [Anton *et al.* 2000]. Daher ist die Komplexbildung der Metallkationen bis über 100 °C hitzestabil [Li-Chan und Kim 2008; Ternes 2008a; Acker und Ternes 1994].

Die LDL (Lipoproteine) bestehen aus den beiden Unterfraktionen  $\text{LDL}_1$  und  $\text{LDL}_2$  [Hatta *et al.* 2008] und weisen eine *core-shell*-Struktur auf (Abb. 2-1), die ihre amphiphilen Eigenschaften bedingt. Der lipophile Triglyceridkern mit Cholesterinestern ist von einer hydrophilen unilamellaren Schicht aus amphiphilen Apoproteinen, Phospholipiden und Hydroxygruppen unveresterten Cholesterins umgeben [Anton 2007; Anton *et al.* 2003; Holdsworth und Finean 1972]. Wechselwirkungen zwischen apolaren Aminosäureseitenketten der Proteine und Acylresten der Lipide sowie geladenen Aminosäureseitenketten und den Kopfgruppen der Phospholipide bedingen die Stabilität der LDL [Belitz *et al.* 2008].

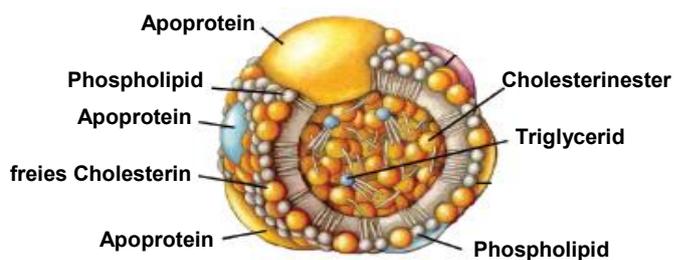


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau der *core-shell*-Struktur der LDL [modifiziert nach Forti und Diamant 2006]

Die LDL bestehen zu 88 % aus Lipiden und zu 10 % aus Proteinen [Powrie und Nakai 1986] und bilden in Eigelb sphärische Mizellen ( $\varnothing = 25 - 60 \text{ nm}$ ) [Ternes 2008a]. LDL fungieren als grenzflächenaktive Substanzen bei der Emulsionsbildung, da die bei der Abspaltung des Lipidanteils oberhalb von 75 °C freigesetzten Phospholipide [Ternes 2008a] zusammen mit den Apoproteinen, die eine hohe Adsorptionskapazität an Grenzflächen aufweisen, emulsionsstabilisierende Grenzflächenfilme bilden [Anton 2007; Anton *et al.* 2003].

Die HDL (Lipoproteine) bestehen aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -HDL-Untereinheiten, die sich in ihrer Zusammensetzung an Aminosäuren, Phosphor und Oligosacchariden unterscheiden. Das HDL-Monomer bilden fünf Hauptapoproteine, deren Wechselwirkungen die dreidimensionale Molekülorganisation ergeben (Abb. 2-2, links) [Anton 2007]. Die helikale Domäne ist eine aus einem Band von  $\alpha$ -Helices bestehende Supersekundärstruktur, während  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen die Domänen des N- (grün), A- (blau) und C- (rot) Sheets kennzeichnen. Als Lipidliganden enthält das HDL-Monomer ein Molekül Phosphatidylcholin (L1) und eine aus 13 C-Atomen bestehende Kohlenwasserstoffkette (L2; Abb. 2-2, links).

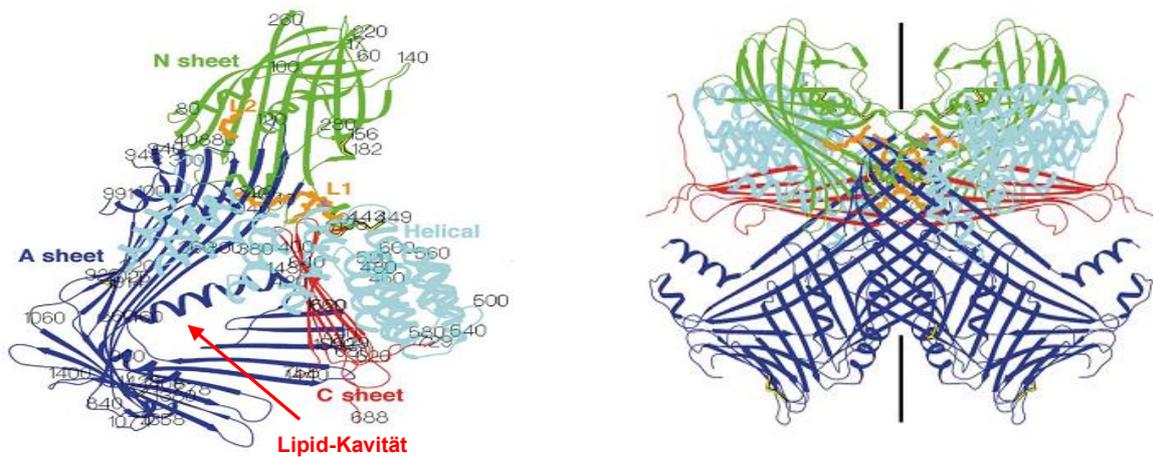


Abb. 2-2: Domänenorganisation des HDL-Monomers (links) und X-förmige Struktur des HDL-Dimers (rechts) [modifiziert nach Anderson *et al.* 1998]

Im Zentrum des HDL-Monomers bilden hauptsächlich  $\beta$ -Faltblattstrukturen der A- und C-Sheets und ein kleiner Bereich der helikalen Domäne eine lipidbindende Kavität, die durch hydrophobe Reste der Aminosäuren ausgekleidet ist [Anton 2007; Anderson *et al.* 1998]. Die Öffnung der Kavität ist von einem Ring aus polaren Aminosäureseitenketten umgeben, mit dem der hydrophile Phosphatrest von Phosphatidylcholin über H-Brücken interagiert, während die Fettsäuren des Phosphatidylcholin-Moleküls über Van-der-Waals-Kräfte mit den Aminosäureseitenketten der A- und C-Sheets wechselwirken [Anderson *et al.* 1998]. Die Phospholipide bilden die Grenzfläche zur wässrigen Phase, was die Inkorporation von Lipiden in die Kavität ermöglicht [Anton 2007; Anderson *et al.* 1998]. Durch die Wechselwirkungen zwischen den Apoproteinen und den Lipiden ist die Lipidkavität stabilisiert [Anderson *et al.* 1998], und die Abschirmung der hydrophoben Acylketten im Kern der Lipidkavität stabilisiert den Lipoproteinkomplex [Banaszak 1991]. Der Lipidanteil des HDL-Monomers ähnelt einer Mikrodomäne innerhalb des Polypeptidgerüsts [Kuksis 1992] und ist aufgrund der an beiden Enden zugänglichen Lipidkavität mittels organischer Lösungsmittel leicht extrahierbar [Anderson *et al.* 1998].

In der Oozyte entstehen die HDL durch hydrolytische Spaltungen des Vitellogenin-Dimers [Anderson *et al.* 1998; Banaszak 1991]. In Eigelb sind daher zwei HDL-Monomere durch Wechselwirkungen der Apoproteine symmetrisch als Dimer in einer globulären, X-förmigen Struktur organisiert, deren Diagonalen je einem HDL-Monomer entsprechen (Abb. 2-2, rechts) [Anton 2007; Anderson *et al.* 1998]. Die HDL bestehen zu 25 % aus Lipiden und zu 75 % aus Proteinen [Powrie und Nakai 1986] und weisen Partikeldurchmesser von 7 - 20 nm auf [Anton 2007]. Aus der Komplexierung der HDL-Dimere mit Phosvitin über Phosphocalciumbrücken resultiert die mikrokristalline, wasserunlösliche Granulastruktur ( $\varnothing = 1 - 1,3 \mu\text{m}$ ) [Belitz *et al.* 2008; Li-Chan und Kim 2008; Ternes 2008a]. Bei hoher Ionenstärke ersetzt das einwertige Natrium das zweiwertige Calcium, was die HDL-Phosvitin-Komplexe destabilisiert [Ternes 2008a; Anton 2007]. Bei Zugabe acider oder alkalischer Agenzien werden Granula aufgrund des positiven oder negativen Ladungsüberschusses durch elektrostatische Abstoßungen und Bindungsbrüche zerstört [Anton 2007].

Rohes Eigelb ist eine pseudoplastische<sup>2</sup> Nicht-Newtonsche Flüssigkeit mit einem pH-Wert von 6,0 [Belitz *et al.* 2008; Ternes und Acker 1994a], die neben einer Fett-in-Wasser-Emulsion und einer echten Lösung als polydisperse, kolloidale Lösung mit komplexen, supramolekularen Assoziationen<sup>3</sup> von Fetten und Proteinen beschrieben werden kann. Eigelb besteht aus membranumhüllten polyedrischen Körnern ( $\varnothing = 50 - 70 \mu\text{m}$ ), die leicht durch mechanische Bearbeitung wie Rühren oder Verdünnen zerstörbar und für die mehligkeit Struktur gekochten Dotters verantwortlich sind [Ternes 2008a; Ternes *et al.* 2005]. Zusammen mit den Dottertröpfchen ( $\varnothing = 15 - 45 \mu\text{m}$ ) sind die LDL-Mizellen und Granula in die polyedrischen Körner eingebunden [Ternes 2008a].

Mittels Zentrifugation können aus Eigelb aufgrund der Dichteunterschiede der LDL (0,98 g/mL) und HDL (1,12 g/mL), unterstützt durch die Viskositätsverringering mittels Verdünnung (1:1 oder 1:2) mit einer gering molaren isotonischen Salzlösung oder destilliertem Wasser, die beiden Hauptfraktionen Plasma und Granula separiert werden (Abb. 2-3). Diese unterscheiden sich in ihren charakteristischen Anteilen an Lipiden, Proteinen und Lipoproteinen [Li-Chan und Kim 2008; Moussa *et al.* 2002; Ternes *et al.* 1995; Dyer-Hurdon und Nnanna 1993; Itoh *et al.* 1986; McBee und Cotterill 1979; Evans *et al.* 1968; Martin *et al.* 1964]. Der fast klare, gelborangefarbene wässrige Überstand ist Plasma, das bezogen auf die Trockenmasse zu 73 % aus Lipiden und zu 25 % aus Proteinen besteht [Anton 2007; Li-Chan *et al.* 1995; Powrie und Nakai 1986].

<sup>2</sup>Kleine Schergeschwindigkeit: Verhalten als Newton'sches Fluid

Überschreiten der kritischen Schergeschwindigkeit: Abnahme der Viskosität (Strukturviskosität)

<sup>3</sup>Selbstassemblierung durch nichtkovalente Bindungen (H-Brücken, Van-der-Waals-Kräfte)

Die sich als dichtgepacktes blasses Sediment ansammelnden hochmolekularen Granula zeichnen sich durch einen Lipidgehalt von 31 % und einen Proteinanteil von 64 % aus [Anton 2007; Powrie und Nakai 1986; Dyer-Hurdon und Nnanna 1993].

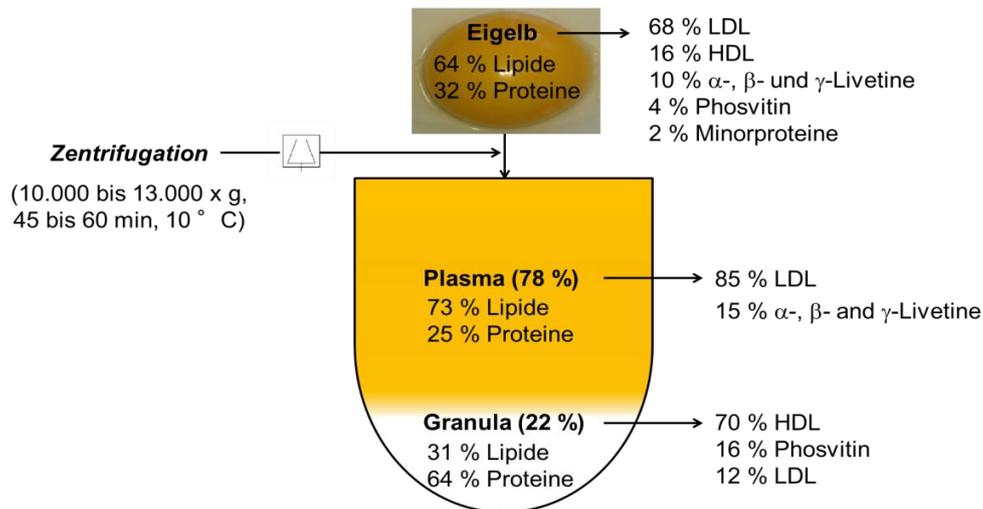


Abb. 2-3: Zusammensetzung von Eigelb, Plasma und Granula [modifiziert nach Li-Chan und Kim 2008; Belitz *et al.* 2008; Anton 2007; Moussa *et al.* 2002; Li-Chan *et al.* 1995; Ternes *et al.* 1995; Dyer-Hurdon und Nnanna 1993; Itoh *et al.* 1986; Powrie und Nakai 1986; McBee und Cotterill 1979; Evans *et al.* 1968; Martin *et al.* 1964]

Plasma besteht neben Livetinen (15 %) hauptsächlich aus LDL (85 %) und zeichnet sich daher durch sein hohes Emulgiervermögen aus [Anton 2007; Anton *et al.* 2003]. Die Granula enthalten neben LDL (12 %) und Phosvitin (16 %) als Hauptlipoprotein 70 % HDL [Belitz *et al.* 2008; Anton 2007]. Aufgrund der Strukturbildungseigenschaften fungieren sprühgetrocknete Granula als Stabilisator in Mayonnaise [Kulozik und Strixner 2011]. Während die polyedrischen Körner und Dottertröpfchen bei der Zentrifugation zerfallen, bleiben die LDL-Mizellen und Granula-Partikel erhalten [Ternes 2008a].

## 2.2 Einfluss von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Proteine und Lipoproteine in Eigelb

In der Lebensmittelindustrie wird Eigelb aufgrund seiner Emulgatorfunktion, der Gel- und Schaumbildungseigenschaften sowie zur Farbgebung vielseitig in Back- und Teigwaren, Suppen, Speiseeis, Mayonnaise, Saucen und Dressings eingesetzt [Belitz *et al.* 2008]. Bei der Verarbeitung beeinflussen besonders Temperatureinwirkungen während der Erhitzung, des Gefrierens und des Auftauens sowie Dehydrierungen bei der Sprüh- und Gefriertrocknung die Strukturen der Proteine und Lipoproteine in Eigelb und die durch sie induzierten technofunktionellen Eigenschaften.

### 2.2.1 Erhitzung

Um von der Eischale übertragene pathogene Keime (Salmonellen, coliforme Bakterien, Staphylokokken) zu inaktivieren ist bei Verarbeitungsprozessen für Eiprodukte meist eine Pasteurisierung vorgeschaltet. Zur Vermeidung von Denaturierungen der Proteine ist dabei die geeignete Kombination von Temperatur und Erhitzungszeit wichtig. Die industrielle Pasteurisation von Eigelb findet bei Temperaturen im Bereich von 61 - 68 °C und Heißhaltezeiten von 30 - 120 s [Ternes 2008b] bzw. 3 bis 10 min [Kulozik und Daimer 2007] mittels Platten- oder Röhrenwärmetauschern [Foissy 2005] statt. Im Vergleich zu nativem Eigelb sind die Schaumstabilität und die Stärke des hitzeinduziert gebildeten Gels bei industriell hergestelltem Flüssigeigelb deutlich geringer [Jaekel *et al.* 2008]. Gefriergetrocknetes Eigelb, das zuvor oberhalb 64 °C pasteurisiert wurde, weist keine Schaumbildungskapazität mehr auf [Jaekel *et al.* 2008]. Da zudem oberhalb 63 °C die Emulsionskapazität sinkt und eine Erhitzung bei 68 °C zu Veränderungen der Proteine führen kann, wird eine Pasteurisation bei 61 bis 62,3 °C über 3,5 bis 4 min oder 63 °C über 2 min empfohlen [Ternes 2008b; Ros 1994].

Aufgrund der hitzeinduzierten Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine zeigt Eigelb einen typischen Viskositätsverlauf bestehend aus dem Viskositätsanstieg bis zum ersten Viskositätsmaximum, der folgenden Viskositätsabnahme bis zum Viskositätsminimum und dem erneuten Viskositätsanstieg bis zum zweiten Viskositätsmaximum (Abb. 2-4).

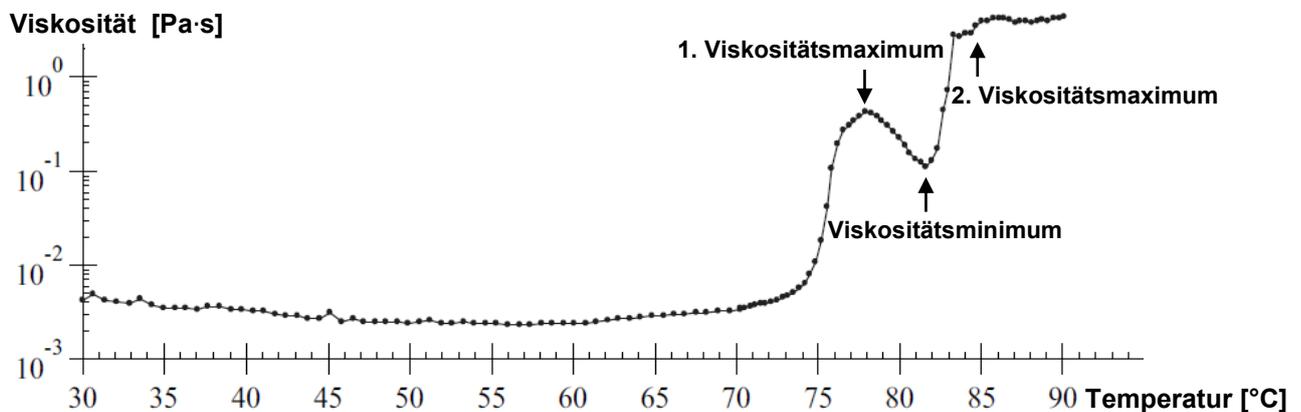


Abb. 2-4: Temperaturabhängiger Viskositätsverlauf von Eigelb [modifiziert nach Ternes 2008b]

Die Denaturierung der Livetine, vor allem von  $\gamma$ -Livetin, beginnt bei 60 °C, wobei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetin bis ca. 69 °C in nativem Eigelb stabil sind [Ternes und Acker 1994c, Mohr und Simon 1992]. Die  $\beta$ -Livetine sind bei 81 °C denaturiert [Ternes und Acker 1994c]. Nach den elektrophoretischen Untersuchungen von Le Denmat *et al.* (1999) nimmt die Intensität der oberhalb 69 °C fehlenden  $\gamma$ -Livetin-Bande nach der Erhitzung bei 62 °C ab. Während die  $\alpha$ -Livetin-Bande nach der Erhitzung bei 76 °C fehlt, zeigt sich bereits bei 72 °C eine schwächere Bande [Le Denmat *et al.* 1999].

Gemäß der Intensitätsabnahme und dem Verschwinden der elektrophoretischen LDL-Bande bei 72 und 76 °C [Le Denmat *et al.* 1999] findet die Strukturentfaltung der LDL hauptsächlich zwischen 70 und 75 °C statt, wobei partielle Strukturentfaltungen und thermoinduzierte Aggregationen bereits oberhalb 65 °C auftreten [Acker und Ternes 1994]. Die frei werdenden Proteinketten der entfalteten Livetine und LDL vernetzen durch hydrophobe Wechselwirkungen, was zusammen mit vorzeitigen Thermoaggregationen der LDL den Viskositätsanstieg und die Entstehung des ersten Viskositätsmaximums zwischen 75 und 80 °C (Abb. 2-4) erklärt [Jaekel und Ternes 2009; Ternes 2008b]. Diese auch als „Punkt der Rose“<sup>4</sup> bezeichnete fließfähige, gelähnliche Struktur zeichnet sich durch eine hohe Schaumstabilität aus [Ternes 2008a]. Dabei sind die weitgehend erhaltenen Granula zusammen mit Fetttropfchen in das Netzwerk inkorporiert [Ternes 2008a].

Am ersten Viskositätsmaximum ist der Lipidanteil der LDL noch fast vollständig an das Protein gebunden [Ternes 2008a]. Bei weiterer Temperaturerhöhung kommt es unter Kollabierung des Gels zur Delipidation, d. h. der Freisetzung von Neutrallipiden aus dem Inneren der LDL-Mizellen, und zur Viskositätsabnahme bis zum Viskositätsminimum bei ca. 82 - 83 °C (Abb. 2-4) [Jaekel und Ternes 2009; Ternes 2008b] sowie zur Aggregation der Plasmaproteine [Ternes und Acker 1994a].

Die HDL entfalten ihre Struktur oberhalb 75 °C [Ternes und Acker 1994c, Mohr und Simon 1992], wobei sich die Intensität der  $\alpha$ -HDL-Bande bei der Elektrophorese nach der Erhitzung bei 72 und 76 °C zunehmend verringert, während die der  $\beta$ -HDL-Bande unverändert bleibt [Le Denmat *et al.* 1999]. Nach DSC-Messungen von Bircan und Barringer (2002) ist die HDL-Struktur bei 84,3 °C entfaltet.

Dem Viskositätsminimum folgt daher ein zweiter Viskositätsanstieg, der durch die Auflösung der Granula und die Strukturentfaltung der HDL dominiert wird, und durch fortschreitende, irreversible Aggregationen der Lipoproteine bestimmt ist [Ternes und Acker 1994a]. Die auf kovalenten Disulfidbrücken basierende Aggregation erfolgt unter Ausbildung eines kompakten, dreidimensional vernetzten, schnittfesten Gels, in dem Wasser und Ionen gebunden sind, was die Entstehung des zweiten Viskositätsmaximums oberhalb 85 °C erklärt (Abb. 2-4) [Jaekel und Ternes 2009; Jaekel *et al.* 2008]. Das hitzestabile Phosvitin wird bei der Aggregation der Lipoproteine in die Koagulate eingeschlossen [Ternes 2008a].

Aufgrund der auf Phosphocalciumbrücken basierenden HDL-Phosvitin-Komplex-Struktur sind Granula hitzestabiler gegenüber Eigelb und Plasma, die eine vergleichbare hitzeinduzierte Denaturierungsempfindlichkeit aufweisen [Le Denmat *et al.* 1999].

---

<sup>4</sup>Beim Anblasen der Masse bilden sich filigrane Linien, die an eine geöffnete Rosenblüte erinnern.

### 2.2.2 Gefriertrocknung

Aufgrund der Haltbarkeit von mindestens einem Jahr [Ros 1994], der mikrobiellen Sicherheit ( $a_w$ -Wert ca. 0,4  $\cong$  ca. 5 % Restwassergehalt) [Foissy 2005; Fehlhaber 1994] sowie des einfachen und wirtschaftlichen Transports sind getrocknete Eiprodukte bedeutende Ingredienzen in der Lebensmittelindustrie.

Die kontinuierlich mit hohen Durchsätzen betriebene Sprühtrocknung zur konvektiven Abtrocknung von Flüssigeigelb mittels trockener Heißluft (165 °C) erlaubt eine gezielte Steuerung der Produktparameter (Partikelgröße und -form, Restfeuchte, Schüttvolumen, Fließeigenschaften) und ist das industriell übliche Herstellungsverfahren [Belitz *et al.* 2008; Ros 1994]. Neben der Temperierung bei 63 °C zur Keimreduktion [Belitz *et al.* 2008] kann nach der Abtrocknung der Oberflächenfeuchte die über die Kühlgrenztemperatur hinausgehende Produkterwärmung (> 54 °C) zu Proteindenaturierungen führen [Jaekel *et al.* 2008], weshalb gefrorenes Eigelb ein besserer Emulgator für Mayonnaise als sprühgetrocknetes Eigelb ist [Conrad *et al.* 1993]. Trotz der hohen Trocknungsgeschwindigkeit bei der Sprühtrocknung ist die thermische Belastung daher gegenüber der Gefriertrocknung (Lyophilisation) höher.

Die Gefriertrocknung basiert auf der Sublimation des gefrorenen Wassers während der Haupttrocknung, der sich die Desorption des nicht ausgefrorenen Wassers auf höherem Temperaturniveau bei der Nachtrocknung anschließt. Während durch Proteine und im Glaszustand gebundenes Wasser bis zu einer Restfeuchte von 2 % zügig entfernt wird, benötigen höhere Trockenmassen längere Nachtrocknungszeiten, da die Diffusion der Wassermoleküle mit zunehmendem Abtrocknungsgrad erschwert ist [Roy und Gupta 2004]. Hier spielt die Einfriergeschwindigkeit, welche die Eiskristallgröße und damit die Trocknungsgeschwindigkeit sowie die Produkteigenschaften (Struktur, Porosität, Rekonstituierbarkeit, Farbe) beeinflusst, eine Rolle. Eine hohe Einfriergeschwindigkeit korreliert mit der Bildung kleiner Eiskristalle und deren zügiger Sublimation während der Haupttrocknung [Roy und Gupta 2004]. Die entstehenden feinen Poren bedingen eine verzögerte Diffusion der Wassermoleküle zur Produktoberfläche bei der Nachtrocknung und eine gute Erhaltung der Produktstruktur. Aus der Zuführung von Schmelz- und Verdampfungsenthalpie zum Gut, der Druckabsenkung in der Gefriertrocknungskammer und dem Betrieb des tiefgekühlten Kondensators resultieren die hohen Energiekosten bei der Gefriertrocknung.

Aufgrund der geringen thermischen Beanspruchung und der Stabilisierung der Matrix im Glaszustand ist die Gefriertrocknung von Eigelb für die Erhaltung der Proteine und Lipoproteine und deren technofunktionellen Eigenschaften vorteilhaft [Ternes 2008b].

## Einfrierprozess

Natives Eigelb gefriert bei ca.  $-0,601\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Ternes und Acker 1994a]. Beim Einfrieren führt die Eiskristallbildung zur Aufkonzentrierung gelöster Stoffe, z. B. einer fünffach höheren Salzkonzentration in der wässrigen Phase des Eigelbs bei  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Ternes und Acker 1994b]. Der Entzug der strukturstabilisierenden Hydrathülle und die veränderten physikochemischen Eigenschaften der flüssigen Phase (pH-Wert, Ionenstärke, Redoxpotential) erklären gefrierinduzierte Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine [Arakawa *et al.* 2001]. Das Gelierungsphänomen gefriergetauten Eigelbs basiert auf der Neuordnung der mizellären LDL-Struktur zwischen  $-7$  und  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  [Ternes 2008b; Telis und Kieckbusch 1998; Powrie *et al.* 1963]. Dabei entsteht ein dreidimensional perlschnurartig aggregiertes Netzwerk grober Struktur und hochviskoser, gelähnlicher Konsistenz [Ternes 2008a]. Nach dem Hydrationsmodell der LDL (Abb. 2-5) beträgt der bei  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht ausfrierbare, sich aus der Addition der monolamellaren ( $0,04\text{ g/g TM}$ ) und multilamellaren ( $0,06\text{ g/g TM}$ ) Hydrathülle ergebende Wasseranteil der LDL  $0,10\text{ g/g TM}$  [Wakamatu 1993]. Zur Stabilisierung der Struktur und Erhaltung der Löslichkeit benötigen die LDL einen Mindestwassergehalt von  $0,11 - 0,16\text{ g/g TM}$  (Abb. 2-5) [Wakamatu *et al.* 1982]. Wird diese kritische Restfeuchte unterschritten und der nicht ausfrierbare Wasseranteil nicht erreicht, kommt es zur Strukturentfaltung und Aggregation der LDL, was den Schlüsselfaktor der Gelierung während des Einfrierens und Auftauens darstellt [Wakamatu 1993; Wakamatu *et al.* 1983, 1982].

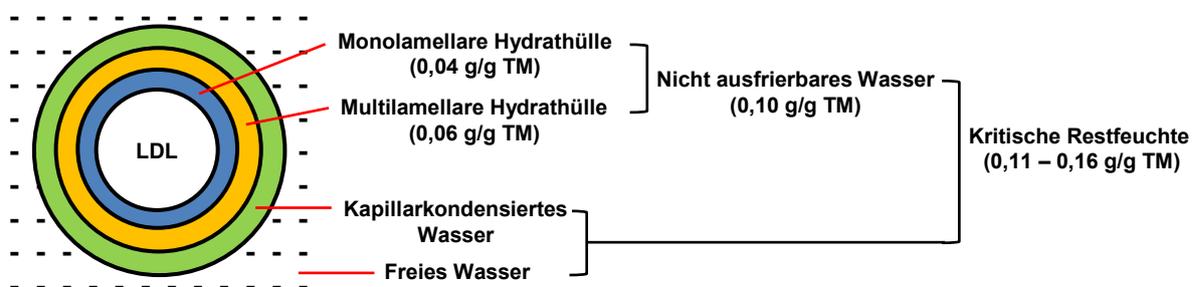


Abb. 2-5: Modell der Hydrathülle des LDL-Moleküls [modifiziert nach Wakamatu 1993]

Bei Verdünnung von Eigelb mit Wasser sinkt die Gelbildungsrate aufgrund der geringeren Konzentration an LDL und Salzen [Chang *et al.* 1977b]. Infolge der LDL-Strukturentfaltung weist gefriergetautes Eigelb eine geringere Stärke des bei Erhitzung gebildeten Gels auf als natives Eigelb [Jaekel *et al.* 2008].

Die hohen Gehalte nicht ausfrierbaren Wassers der Granula ( $0,29\text{ g/g TM}$ ) und der Livetine ( $0,38\text{ g/g TM}$ ) bedingen eine nahezu restfeuchteunabhängige Löslichkeit [Wakamatu *et al.* 1982], wobei die gefrierbedingte höhere Salzkonzentration und der veränderte pH-Wert die Granulastruktur destabilisieren können [Anton 2007].

Die nicht ausfrierbaren Wasseranteile des Plasmas (0,15 g/g TM) und Eigelbs (0,16 g/g TM) sind im Vergleich zu den Granula geringer, was in dem geringen Anteil nicht ausfrierbaren Wassers der LDL (0,10 g/g TM), die in Plasma mit 85 % und in Eigelb mit 68 % in hohen Mengen enthalten sind, begründet liegt [Wakamatu *et al.* 1982]. Nach Riedel (1972) sind 87 % des Wassergehalts von Eigelb bei -20/-30 °C ausfrierbar. Mit dem Anteil nicht ausfrierbaren Wassers korreliert die maximale Gefrierkonzentration einer thermodynamisch instabilen, übersättigten Flüssigkeit am sog. Glasübergang [Roy und Gupta 2004].

Um die für die Proteinstabilisierung kritischen Temperatur- und Konzentrationsbereiche durch eine rasche und vollständige Eiskristallbildung zügig zu durchschreiten werden bei der Herstellung gefrorener Eiprodukte Schnellgefrierverfahren bei -40 °C eingesetzt [Belitz *et al.* 2008]. Nach Lea und Hawke (1952) bleibt die Löslichkeit suspendierter Eigelb-HDL durch schnelles Einfrieren (-65/-183 °C) in Kombination mit schnellem Auftauen (37 °C) weitgehend erhalten. Da Proteine ihren Ionisierungszustand während des Einfrierens beibehalten („pH-memory“-Effekt) [Roy und Gupta 2004], führt trotz pH-Änderungen ein optimal stabilisierender Anfangs-pH-Wert beim Gefriertauprozess von Proteinlösungen gegenüber einem ungünstigen Ausgangs-pH-Wert zu einer besseren Proteinerhaltung [Arakawa *et al.* 2001]. Daher ist die Menge extrahierbarer Lipide einer gefriergetauten HDL-Suspension mit pH 6,8 (2 % Lipide) deutlich geringer als bei einem den isoelektrischen Punkt (ca. pH 5,5) unterschreitenden pH-Wert von 5,2 (40 % Lipide), bei dem die HDL-Struktur weniger stabilisiert ist [Lea und Hawke 1952]. Zudem können während des Einfrierens aufkonzentrierte Aminosäuren, Zucker und Salze kryoprotektive Eigenschaften aufweisen, wenn sie nach dem Theorem der „*preferential exclusion*“ von Timasheff (2002) von der Proteinoberfläche vorzugsweise ausgeschlossen sind, was die Proteine durch die begünstigte Hydrierung stabilisiert. Zur Hemmung der gefrierinduzierten Gelbildung bei Eigelb werden daher kryoprotektive Additive wie Natriumchlorid, Saccharose oder Glycerol eingesetzt [Ternes und Acker 1994b].

### ***Sublimations- und Desorptionstrocknung***

Im Nativzustand werden auf Van-der-Waals-Kräften und H-Brücken basierende intra- und intermolekulare Wechselwirkungen von Aminosäureseitenketten durch die von den Wassermolekülen gebildeten H-Brücken kompensiert [Finney und Poole 1985]. Da die Hydrathülle demnach ein stabilisierender, integraler Bestandteil der Proteinstruktur ist, resultiert ihre Entfernung bei der Sublimations- und Desorptionstrocknung in Strukturentfaltungen, besonders von  $\alpha$ -Helices unter verstärkter Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen, was die Hauptursache für Denaturierungen der Proteine während der Gefriertrocknung ist [Roy und Gupta 2004; Arakawa *et al.* 2001; Finney und Poole 1985].

Der gefriertrocknungsinduzierte Strukturverlust der Eigelb-HDL zeigt sich durch den höheren extrahierbaren Lipidanteil (24,5 %) im Vergleich zum Nativzustand (ca. 6 %) [Lea und Hawke 1952].

Im dehydrierten Zustand sind die molekulare Mobilität, Wechselwirkungen der Polypeptidketten sowie die Diffusion von Reaktanten und damit strukturelle Veränderungen und chemische Degradationen der Proteine eingeschränkt [Arakawa *et al.* 2001; Finney und Poole 1985; Rupley *et al.* 1983]. Daher steigt die Thermostabilität der Proteine mit Abnahme des Wassergehaltes, während die Denaturierungstemperatur mit zunehmendem Hydratationsgrad sinkt. Dabei besteht eine hohe Abhängigkeit bei Wassergehalten zwischen 0 - 0,35 g/g Protein [Westphal *et al.* 2003].

Basierend auf der restfeuchteabhängigen Strukturentfaltung der Proteine und Lipoproteine im dehydrierten Zustand korreliert die Stärke des bei Erhitzung gebildeten Gels von rehydriertem Eigelb negativ mit dem Restwassergehalt im getrockneten Zustand [Jaekel *et al.* 2008]. Da nach Powrie *et al.* (1963) ein Wasseranteil von 5,8 % vollständig matrixgebunden ist und die Proteine damit während des Auftauens im Glaszustand stabilisiert sind, wird ein Restwassergehalt unterhalb 6 % empfohlen [Jaekel *et al.* 2008]. Nach Ternes (2008b) muss der Restwassergehalt der Eigelbmatrix geringer als 4 % sein um die Gelbildung beim Auftauen zu unterbinden und so durch Stabilisierung der Eigelbproteine im Glaszustand die technofunktionellen Eigenschaften zu erhalten.

Da der Wasseranteil in Proteinen und Lipoproteinen ein stabilisierender Strukturbestandteil ist, können gefriertrocknungsinduzierte Strukturveränderungen, vor allem der Abbau  $\alpha$ -helikaler Strukturbereiche, durch Rehydrierung reversibel sein, während Aggregationen meist irreversibel sind [Roy und Gupta 2004; Arakawa *et al.* 2001; Finney und Poole 1985]. Bei der Hydrierung von Proteinen kommt es zunächst zu Wechselwirkungen der Wassermoleküle mit den geladenen Gruppen im Proteinmolekül unter Ausbildung einzelner Hydrierungsstellen gefolgt von der Bildung von H-Brücken zwischen den Wassermolekülen [Rupley *et al.* 1983]. Die entstehenden „cluster“ bedecken durch ihr Zusammenwachsen unter Bildung mono- und multilamellarer Schichten die Moleküloberfläche bis schließlich das gesamte Molekül bei Erreichen des Sättigungsdampfdrucks durch Kapillarkondensation infolge der Oberflächenspannung umhüllt ist [Rupley *et al.* 1983].

Aufgrund des marginal höheren extrahierbaren Lipidanteils bei rehydrierten gefriergetrockneten (8 - 9 %) gegenüber nativen Eigelb-HDL (ca. 6 %) ist der Strukturverlust der HDL unter beinahe völliger Wiederherstellung der nativen Löslichkeit durch Rehydratation größtenteils reversibel [Lea und Hawke 1952]. Auch Jaekel *et al.* (2008) berichten von einer Rekonstitution der Lipoproteinstrukturen gefriergetrockneten Eigelbs durch Rehydrierung.

Neben der Optimierung der Einfriergeschwindigkeit, Restfeuchte, Trocknungszeit und Temperatur und der Zugabe kryoprotektiver Additive werden zur Erhaltung der nativen Struktur und biologischen Aktivität der Proteine bei der Gefriertrocknung Lyoprotektanten wie Kohlenhydrate verwendet. Dabei basiert die Strukturstabilisierung während des Abtrocknens auf der Bindung der Lyoprotektanten, die als Substitut der Hydrathülle fungieren, durch H-Brücken an die polaren Gruppen des Proteinmoleküls [Crowe *et al.* 1990].

Zur Herstellung gefriergetrockneten Eigelbs ohne Additive, das bei Rehydratation mit den technofunktionellen Eigenschaften von gekühltem Flüssigeigelb vergleichbar sein sollte, eignet sich im Anschluss an die Pasteurisation (64 °C/2 min) ein Prozess aus Vorkristallisation (-6,3 °C/mind. 2 h) und Schockfrostung (-45 °C/1 min). Dies erlaubt ein Durchschreiten des Temperaturbereichs der LDL-Gelierung in weniger als fünf Sekunden. Anschließend erfolgt die Gefriertrocknung (5 h, 2,7 % Restfeuchte). [Jaekel *et al.* 2008]

### 2.3 Chemisch-physikalische Eigenschaften von Carotinoiden

Lebensmittel, die aufgrund ihres Gehaltes an funktionellen Inhaltsstoffen eine gesundheitsfördernde Wirkung zeigen, sind für den Verbraucher interessant. Darum sind die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide in Lebensmitteln zunehmend zum Forschungsgegenstand geworden. Synthetisch hergestellte oder als Extrakte aus natürlichen Quellen gewonnene Carotinoide werden zudem aufgrund ihrer lichtabsorbierenden Eigenschaften in Lebens-, Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln sowie der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie als farbgebende und funktionelle Supplemente eingesetzt [Breithaupt 2008].

Die zu den Tetraterpenen gehörenden Carotinoide sind methylsubstituierte Polyene, die als charakteristisches Strukturelement die zentrale Polyenkette aufweisen [Britton *et al.* 2004]. Aus der sich im Molekülzentrum umkehrenden Anordnung der Isopreneinheiten ergibt sich die Bezifferung des Carotinoid-Moleküls. Dabei werden nach der Nomenklatur der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) die linksseitigen ungestrichenen vor den rechtsseitigen gestrichenen Lokanten angegeben (Abb. 2-6).

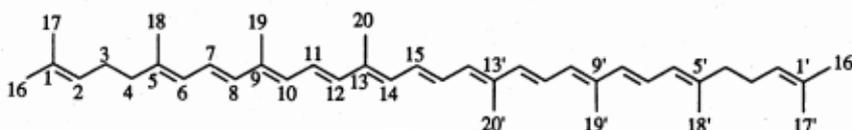


Abb. 2-6: Bezifferung des Carotinoid-Moleküls am Beispiel der Strukturformel von Lycopin ( $\psi,\psi$ -Carotin) [Weedon und Moss 1995]

Die mehr als 700 bekannten Carotinoide leiten sich aus der  $C_{40}H_{56}$ -Grundstruktur des Lycopins (Abb. 2-6) durch Hydrierung, Dehydrierung, Substitution, Eliminierung, Addition, Cyclisierung, Isomerisierung, Verschiebung von Doppelbindungen, Oxidation und Neuordnung ab [Rodriguez-Amaya 2001; Britton *et al.* 1995]. Carotinoide werden in die aus Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebauten Carotine und die sauerstoffhaltigen Xanthophylle mit endständigen Hydroxyl-, Aldehyd-, Carbonyl-, Epoxy-, Carboxyl- oder Ester-Gruppen eingeteilt. Das sich von  $\alpha$ -Carotin ableitende Lutein (3,3'-Dihydroxy- $\alpha$ -carotin) und das  $\beta$ -Carotin-Derivat Zeaxanthin (3,3'-Dihydroxy- $\beta$ -carotin) sind Stereoisomere ( $C_{40}H_{56}O_2$ ; 568,87 g/mol), die sich durch die endständigen Iononringe und die Anzahl konjugierter Doppelbindungen unterscheiden. Lutein besitzt einen  $\beta$ - und einen  $\epsilon$ -Iononring sowie zehn konjugierte Doppelbindungen und Zeaxanthin zwei  $\beta$ -Iononringe und 11 konjugierte Doppelbindungen (Abb. 2-7).

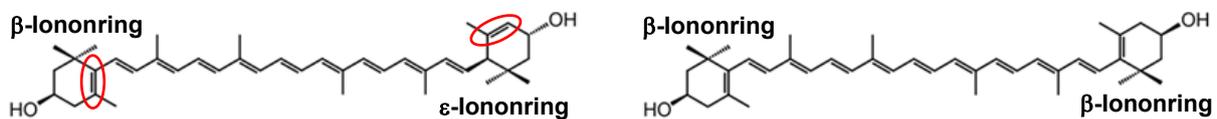


Abb. 2-7: Molekülstrukturen von all-E-Lutein (links) und all-E-Zeaxanthin (rechts)

Das konjugierte Doppelbindungssystem der Polyenkette bedingt neben der E/Z-Isomerisation die lipophilen, farbgebenden und antioxidativen Eigenschaften sowie die für ihre biologischen Funktionen wichtige chemische Reaktivität der Carotinoide [Britton *et al.* 2009a].

### 2.3.1 E/Z-Isomerisation

Das konjugierte Doppelbindungssystem der Carotinoidstruktur bedingt die Vielzahl möglicher geometrischer Isomere. Dabei kann mit Ausnahme von Ring-Doppelbindungen wie in den Iononringen von Lutein und Zeaxanthin jede der di- und trisubstituierten Doppelbindungen in E- oder Z-Konfiguration vorkommen. Substituenten höherer Priorität sind bei der E-Konfiguration (entgegen) auf gegenüberliegenden Seiten und bei der Z-Konfiguration (zusammen) auf der gleichen Seite der C=C-Achse angeordnet (Abb. 2-8) [Weedon und Moss 1995].



Abb. 2-8: E-Konfiguration (Priorität Substituent a > b und d > c; links) und Z-Konfiguration (Priorität Substituent a > b und c > d; rechts) [modifiziert nach Weedon und Moss 1995]

Die Anzahl möglicher E/Z-Isomere im stereochemischen Set eines Carotinoids errechnet sich in Abhängigkeit der Molekülsymmetrie und der Anzahl der Doppelbindungen [Weedon und Moss 1995]. Mit der gleichen Anzahl von neun konjugierten Doppelbindungen umfasst das stereochemische Set bei Zeaxanthin aufgrund des symmetrischen Molekülaufbaus 272 und bei Lutein mit asymmetrischer Struktur 512 E/Z-Isomere [Watzl und Bub 2001].

Z-Isomere weisen aufgrund der sterischen Hinderung zwischen Methylgruppen und H-Atomen eine geringere Stabilität auf, weshalb Carotinoide in natürlichen Matrices überwiegend in der thermodynamisch stabilen all-E-Konfiguration vorliegen [Rodriguez-Amaya 2001]. Da der Hinderungseffekt bei trisubstituierten Doppelbindungen wie an C<sub>13</sub> und C<sub>9</sub> und der disubstituierten Doppelbindung in der 15,15'-Position (Abb. 2-6) geringer ist, kommen in natürlichen Matrices am häufigsten 9-/9'-Z- und 13-/13'-Z-Isomere und in geringerem Maße 15-Z-Konfigurationen vor [Britton und Khachik 2009]. Neben einem deutlich höheren Anteil der all-E-Isomere ist bei Spinat-Extrakt ein natürliches Stereoisomeren-Muster aus 9-Z-/9'-Z- und 13-Z/13'-Z-Lutein sowie 9-Z- und 13-Z-Zeaxanthin identifizierbar [Dachtler 2000]. Bei nativem Eigelb beträgt der 13-Z-Luteinanteil am Gesamtluteingehalt ca. 3 - 4 % und der Anteil von 13-Z-Zeaxanthin am Gesamtzeaxanthingehalt 17 % [Wenzel 2010].

Aufgrund ihrer biologischen Funktionen werden Z-Isomere in tierischen Geweben durch endogene Stoffwechselprozesse gebildet. Die *in vivo*-Stereomutation von Lycopin bedingt das Vorkommen verschiedener Z-Isomere in Humanserum und im Prostatagewebe mit hohen Anteilen von 50 und 80 % des Gesamtlycopins [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008].

Zudem wird die bereits bei Raumtemperatur stattfindende endotherme Z-Isomerisierung durch hohe Temperaturen, Licht, Säure, Metallkationen und Enzyme katalysiert [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008]. Da die Z-Isomerisierung an der C<sub>13</sub>-Doppelbindung einer geringen Aktivierungsenergie bedarf, sollte die Bildung des 13-Z-Isomers besonders bei geringen Temperaturen dominieren [Britton und Khachik 2009], während bei intensiverer Erhitzung aus den mono-Z-Isomeren die stärker sterisch gehinderten di-Z-Isomere entstehen können [Chen *et al.* 1995]. Metallkationen katalysieren die Stereomutation der all-E-Form zu Z-Isomeren durch die Absenkung des Aktivierungspotentials. Die durch zweiwertige Eisenionen induzierte Isomerisierung von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin zu 13-Z-/13'-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin ist bei einem Massenverhältnis größer 8:1 (Fe(II):Xanthophylle) signifikant [Li und Han 2008].

In Lösung treten Stereoisomerisierungen leicht auf [Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Aus diesen Gründen werden Z-Isomere häufig während der Verarbeitung und Herstellung von Lebens- und Futtermitteln sowie der Probenaufbereitung bei der Analytik gebildet [Aman *et al.* 2005; Watzl und Bub 2001].

Neben den chemisch-physikalischen und strukturellen Eigenschaften der Carotinoide bestimmen Matrixeinflüsse, Bindungs-, Aggregations- und Kristallisationsmechanismen das Isomerisierungsverhalten [Aman *et al.* 2005, van het Hof *et al.* 1998]. Liegen die all-E-Isomere molekular assembliert in Aggregaten vor, ist die Z-Isomerisierungsneigung gering [Britton und Khachik 2009; Aman *et al.* 2005].

Z-Isomerisierungen bedingen Veränderungen von biologischen Funktionen, im Metabolismus und hinsichtlich der Bioverfügbarkeit. Die Einführung einer Z-Doppelbindung resultiert in der Bildung eines gewinkelten Moleküls geringerer Gesamtlänge, was die Aggregations- und Kristallisationsneigung vermindert und die Löslichkeit verbessert [Britton und Khachik 2009]. Dies erleichtert die Inkorporation in Mizellen und Chylomikronen sowie den intra- und interzellulären Transport und erhöht die Bioverfügbarkeit [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008].

### **2.3.2 Degradation**

Die Anfälligkeit der elektronenreichen Polyenkette der Carotinoide für elektrophile Stoffe wie Peroxid-Radikale bedingt die Oxidationsempfindlichkeit und bildet die Basis für die antioxidativen und prooxidativen Eigenschaften der Carotinoide [Schiedt und Liaaen-Jensen 1995].

Durch den Transfer von Elektronen und H-Atomen und die radikalische Addition können Carotinoide freie Radikale, die unter Licht-, Temperatur- und Sauerstoffeinfluss, durch Enzyme wie Lipoxygenasen und katalytisch aktive Metallkationen entstehen, abfangen. Dabei entstehen stabilisierte Carotinoid-Radikale. [El-Agamey und McGarvey 2008; Liaaen-Jensen 2008; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]

Da die Additionsrate der Radikale mit der Anzahl konjugierter Doppelbindungen korreliert, sind Carotinoide mit konjugierten Carbonyl- oder Carboxylgruppen wie Astaxanthin, Canthaxanthin oder Bixin effizientere Radikalfänger als Lutein,  $\beta$ -Carotin und Lycopin [Ternes 2008a]. Lycopin ist trotz der gleichen Anzahl von 11 konjugierten Doppelbindungen ein effizienteres Antioxidanz als  $\beta$ -Carotin [Rodriguez-Amaya 2003], da die Doppelbindungen der  $\beta$ -Iononringe bei  $\beta$ -Carotin durch die sterische Hinderung zwischen der Methylgruppe am C<sub>5</sub>-Atom des Ringes und dem H-Atom am C<sub>8</sub>-Atom der Kette nicht optimal konjugiert sind.

Aggregationen der Carotinoide vermindern das antioxidative Potential [El-Agamey und McGarvey 2008]. Mit anderen Antioxidantia wirken Carotinoide synergistisch [Lai *et al.* 1996; Terao *et al.* 1980]. Carotinoide mit mehr als sieben konjugierten Doppelbindungen können die Energie angeregter Moleküle aufnehmen, wobei die Anregungsenergie der Carotinoide in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben wird [Britton *et al.* 2009a; Su *et al.* 2002].

Das antioxidative Potential erklärt das Vorkommen von Carotinoiden in oxidativ belasteten biologischen Systemen wie dem Photosyntheseapparat [Palozza *et al.* 2009]. Zudem verringern Carotinoide oxidativen Stress<sup>5</sup>, der in den frühen Stadien der Pathogenese chronisch degenerativer Krankheiten eine Rolle spielen kann [Palozza *et al.* 2009].

Bei hoher Sauerstoffspannung und in hohen Konzentrationen neigen die beim Abfangen radikalischer Spezies gebildeten Carotinoid-Radikale zur Degradation unter Bildung prooxidativer Derivate, wie z. B. Carotinoid-Peroxyradikale und zytotoxische Aldehyde [Palozza *et al.* 2009; Yeum *et al.* 2009; Wang 2009].

Beim oxidativen Abbau von Carotinoiden entstehen Epoxy- und Apocarotinoide (weniger als 40 C-Atome), die enzymatisch und nicht-enzymatisch zu Substanzen geringen Molekulargewichts wie Aldehyden und Ketonen sowie einer Vielzahl an Nebenprodukten wie Toluol, Xylol und Dimethylcyclodecapentaen gespalten werden [Fleischmann und Zorn 2008; Aman *et al.* 2005; Pérez-Galvez *et al.* 2005; Rodriguez-Amaya 2001, van het Hof *et al.* 1998].

Zudem basieren Degradationen auf der durch Säure sowie durch Wärme und Licht induzierten Epoxid-Furanoid-Neuanordnung von 5,6-Epoxy-Carotinoiden zur furanoiden 5,8-Epoxy-Isomerenform [Britton und Khachik 2009]. Xanthophylle mit allylischer<sup>6</sup> OH-Gruppe wie Lutein dehydrieren in acidem Milieu zu Anhydroxanthophyllen [Britton und Khachik 2009]. Obwohl die meisten Carotinoide gegenüber Laugen stabil sind, kann es unter dem Einfluss von hohen Temperaturen, Licht und Sauerstoff bei der alkalischen Hydrolyse (Verseifung) auch zu Degradationen kommen [Khachik 2009; Britton *et al.* 2004]. Zudem ist die Degradationsneigung von Xanthophyllen gegenüber Carotinen meist höher [Watzl und Bub 2001].

Die Abbauprodukte der Carotinoide weisen Veränderungen des Absorptionsmaximums, der Polarität, der Löslichkeit und der biologischen Funktionen auf [Rodriguez-Amaya 2003]. Der hohe Carotinoidverlust in erhitztem Karottensaft zeichnet sich durch einen Farbwechsel von orange nach gelb aus [Chen *et al.* 1995], und die Epoxid-Furanoid-Neuanordnung resultiert in einem Verlust der Farbtintensität [Britton und Khachik 2009]. Bei der Metabolisierung von Carotinoiden entstehen Abbauprodukte mit antioxidativen Eigenschaften sowie signalvermittelnden und regulatorischen Funktionen [Wang 2009; Breithaupt 2008; Fleischmann und Zorn 2008]. Durch die enzymatische Spaltung von Vitamin A-Carotinoiden entstehen bei Säugetieren Retinoide [Parker 1996]. In Pflanzen werden Carotinoide mittels Carotinasen unter Bildung aromaaktiver Fragmente wie  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Damascenon gespalten, die als sensorische Signale für Insekten und Vögel fungieren [Britton *et al.* 2008; Fleischmann und Zorn 2008].

---

<sup>5</sup>Dysbalance zwischen Oxidation und Reduktion zugunsten der Oxidation

<sup>6</sup>Ungesättigter Kohlenwasserstoffrest der Formel  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-$  (2-Propenyl-Gruppe)

## 2.4 Vorkommen von Carotinoiden in natürlichen Matrices

In natürlichen Matrices sind die hydrophoben Carotinoide mit der lipophilen Umgebung wie in Mizellen, Öltröpfchen oder dem lipophilen Kern von Lipoproteinen und Membranen assoziiert. Aggregationen, Wechselwirkungen mit Proteinen und Lipiden und die Orientierung in zellulären und molekularen Strukturen korrelieren mit der Molekülstruktur der Carotinoide und beeinflussen deren chemisch-physikalische Eigenschaften, Bioverfügbarkeit, Transport und biologische Aktivität [Britton *et al.* 2008].

### 2.4.1 Aggregation und Kristallisation

Aufgrund ihrer stabähnlichen Molekülform neigen Carotinoide in wässrigen Medien, besonders an Grenzflächen und in Lipiddoppelschichten, zur molekularen Selbstassemblierung basierend auf H-Brücken-Bindungen, Dipol- und Van-der-Waals-Kräften [Köhn *et al.* 2008]. Wechselwirkungen der in Aggregaten nah beieinanderliegenden Chromophore bedingen Veränderungen beim Energie- und Elektronentransfer und damit der lichtabsorbierenden Eigenschaften der Carotinoide. Aufgrund der verminderten Kontaktgrenzfläche weisen aggregierte Carotinoide eine geringere Löslichkeit und Bioverfügbarkeit auf [Britton *et al.* 2008]. Zudem reduziert die Aggregation die antioxidativen Effekte [El-Agamey und McGarvey 2008] und die Z-Isomerisierungsneigung der Carotinoide [Britton und Khachik 2009; Aman *et al.* 2005].

Aufgrund der hydroxylierten Iononringe bilden Lutein und Zeaxanthin bevorzugt auf H-Brücken basierende Aggregate. Zudem steigt die Aggregationsneigung mit Zunahme der Carotinoid-Konzentration aufgrund der räumlichen Nähe der Moleküle. [Köhn *et al.* 2008]

Die Aggregation ist häufig die Vorstufe zur Kristallisation. Infolge der aktiven Carotinoid-Biosynthese kann bei der Reifung in den Chromoplasten die Carotinoid-Konzentration so stark ansteigen, dass es zu aggregationsbedingten Kristallisationen wie von  $\beta$ -Carotin in Karottenwurzeln und all-E-Lycopin in Tomaten kommt [Britton 2008a; Köhn *et al.* 2008].

### 2.4.2 Membrane

Als integraler Bestandteil des hydrophoben Lipidkerns beeinflussen Carotinoide aufgrund der Van-der-Waals-Wechselwirkungen der Polyenkette mit den Acylketten der Lipide ähnlich wie Cholesterol die Fluidität, Permeabilität und Stabilität von Phospholipiddoppelmembranen sowie die rezeptorvermittelte Signaltransduktion [Widomska *et al.* 2009; Britton *et al.* 2008, Britton und Helliwell 2008; Wisniewska *et al.* 2006; Kostecka-Gugala *et al.* 2003].

Zudem können die antioxidativen Carotinoide die membranzerstörende Lipidperoxidation der ungesättigten Acylketten vermindern [Britton 2008a; El-Agamey und McGarvey 2008]. Unpolare Carotine interagieren mit dem inneren, hydrophoben Bereich der Membran [Britton 2008a]. Bei dipolaren Xanthophyllen wie Lutein und Zeaxanthin sind die endständigen Hydroxylgruppen auf beiden Seiten mit der hydrophilen Kopfgruppenregion der Membran assoziiert, woraus ein transmembraner Einbau resultiert [Widomska *et al.* 2009; Britton 2008a; Wisniewska *et al.* 2006; Korger 2005; Lazrak *et al.* 1987].

### 2.4.3 Proteine

Da Carotinoide in wässrigen physiologischen Medien zur Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität mit Proteinen assoziiert sind, werden sie zusammen mit Lipiden in Lipoproteinen im Blut zu Geweben transportiert. Lipoproteine bestehen aus einem unpolaren Kern aus Triglyceriden und Cholesterinestern, der von einer hydrophilen Schicht aus amphiphilen Apoproteinen, Phospholipiden und Hydroxygruppen von unverestertem Cholesterin umhüllt ist. Carotine befinden sich bevorzugt im lipophilen Kern und Xanthophylle nahe der Oberflächenschicht [Greene *et al.* 2006; Parker 1996]. Im Humanserum sind Carotinoide zu 75 % in LDL und zu 25 % in HDL enthalten [Clevidence und Bieri 1993]. Bezogen auf den Lipidanteil sind die Carotinoid-Konzentrationen in den Lipoproteinen des Humanplasmas gleich [Ternes *et al.* 1995].

Zur Erfüllung ihrer lichtabsorbierenden und photoprotektiven Funktionen bei der Photosynthese sind Carotinoide in Chloroplasten als Pigment-Protein-Komplexe mit Chlorophyll in der Thylakoid-Membran gebunden [Britton 1995]. Die spezifische Orientierung der Carotinoide zu Chlorophyll ermöglicht den effizienten Energietransfer bei der Lichtabsorption. Zudem fangen Carotinoide reaktive Sauerstoffspezies ab und reduzieren deren Bildung durch die Aufnahme überschüssiger Anregungsenergien. [Britton und Helliwell 2008; Britton 2008a; Frank und Christensen 2008; Britton *et al.* 1995]

Bei Lachsfischen sind Canthaxanthin und Astaxanthin, die für die rote Färbung verantwortlich sind, durch H-Brücken an den Actomyosin-Komplex der Muskelfasern gebunden. In Vogelfedern interagieren Carotinoide mit den Keratin-Filamenten [Britton und Helliwell 2008].

Carotinoid-Protein-Komplexe denaturieren in Anwesenheit von Säuren, Basen, hohen Salzkonzentrationen, organischen Lösungsmitteln und beim Erhitzen. Wechselwirkungen mit Proteinen können die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Carotinoide verändern. Zum Beispiel bedingt die Komplexierung in Crustacyanin beim Hummer die Verschiebung der Absorption des Astaxanthins in den blauen Spektralbereich, während bei der Denaturierung des Carotinoproteins beim Kochen das orangerote Astaxanthin frei wird.

## 2.5 Metabolismus von Carotinoiden

Entsprechend der Ernährungsgewohnheiten ist  $\beta$ -Carotin das Hauptcarotinoid in Humanplasma, da es von den ca. 50 in der Nahrungskette vorkommenden Carotinoiden am weitesten in Lebensmitteln verbreitet ist [Canene-Adams und Erdman 2009; Rodriguez-Amaya 2003; Kasper 2004; Su *et al.* 2002; Watzl und Bub 2001; Bendich und Olson 1989].

Zur Erfüllung ihrer biologischen Funktionen müssen Carotinoide aus der Nahrung freigesetzt und vom Körper resorbiert, transportiert und akkumuliert werden. Beim Huhn erfolgen die Resorption und der Lipoprotein-Transport von Carotinoiden analog zum Menschen.

Durch die mechanische Zerkleinerung im Mund, die Peristaltik des Magens sowie die Wirkung der Magensäure und der Verdauungsenzyme werden Carotinoide partiell aus der Nahrung freigesetzt. In Abhängigkeit der chemisch-physikalischen Eigenschaften und der Art der Bindung in der Lebensmittelmatrix werden die Carotinoide durch die Magenperistaltik in die mit Nahrungsfett emulgierte Phase transferiert. Im Dünndarm induziert das Fett die Sekretion von Gallensalzen und Pankreaslipasen zur Spaltung der Nahrungslipide in Glycerin, Monoacylglyceride und Fettsäuren, wobei Carotinolacylester hydrolysiert werden [Khachick 2009]. In den gebildeten gemischten Mizellen aus Gallensalzen, Fettsäuren, Monoacylglyceriden, Phospholipiden, Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen ordnen sich Carotine bevorzugt im hydrophoben Kern und Xanthophylle nahe der Mizellenoberfläche an [Kasper 2004; Parker 1996].

Neben der Fettsäurezusammensetzung und den chemisch-physikalischen Eigenschaften der Carotinoide beeinflusst besonders die Art der Bindung in der Lebensmittelmatrix die mizelläre Inkorporation der Carotinoide [Canene-Adams und Erdman 2009; Parker 1996].

Nach dem Zerfall der Mizellen am Bürstensaum der Dünndarmmukosazellen werden die lipidlöslichen Substanzen durch passiven Transport in die Enterozyten aufgenommen und zusammen mit Apolipoproteinen als Chylomikronen verpackt. Carotinoide mit Vitamin A-Aktivität wie  $\beta$ -Carotin werden in der Dünndarmmukosa in Abhängigkeit des Bedarfs zu Vitamin A metabolisiert [Parker 1996].

Beim Menschen gelangen die Chylomikronen durch Exocytose in die Lymphbahnen und anschließend ins Blut, wo sie durch Lipoproteinlipase abgebaut werden [Kasper 2004]. Aus den verbleibenden triglyceridarmen Chylomikronenresten können die Carotinoide mittels spezifischer Rezeptoren in extrahepatische Gewebe oder zusammen mit den Chylomikronenresten rezeptorvermittelt von der Leber aufgenommen werden. Aufgrund des bei Hühnern unterentwickelten Lymphsystems gelangen die Chylomikronen direkt ins Blut und werden von dort zur Leber transportiert.

Neben der Akkumulation werden Carotinoide in der Leber an Lipoproteine gebunden und in dieser wasserlöslichen Form ins Blut sezerniert [Bortolotti *et al.* 2003; Furr und Clark 1997]. Von dort erfolgt der Transport von Carotinoiden zu den Geweben meist indirekt über die Aufnahme der Lipoproteine, die basierend auf den Apoproteinstrukturen mittels spezifischer membranintegrierter Rezeptorproteine stattfindet [Clevidence und Bieri 1993]. Viele Gewebe zeigen charakteristische Carotinoid-Muster, die spezifische biologische Funktionen und selektive Absorptionsmechanismen vermuten lassen. Das beim Menschen im Hodengewebe akkumulierte Lycopin soll zur Verminderung des Prostatakrebsrisikos beitragen [Stahl *et al.* 1992]. Aufgrund ihrer photoprotektiven Eigenschaften werden Lutein und Zeaxanthin in der Retina [Canene-Adams und Erdman 2009; Schalch *et al.* 2009] durch spezifische stereochemische Wechselwirkungen mit dem membranassoziierten Makula-Rezeptorprotein Glutathion-S-Transferase akkumuliert [Köhn *et al.* 2008; Bhosale *et al.* 2004].

Durch die Magensäure und während der Stoffwechselprozesse können aus den all-E-Konfigurationen der Carotinoide Z-Isomere gebildet werden, deren systemischer Transport aufgrund der höheren Löslichkeit und geringeren Aggregationsneigung begünstigt ist. Dies erklärt die hohen Anteile von 9-Z, 13-Z und 15-Z-Lycopin von mehr als 50 % des Gesamtlycopins im Blut und mehr als 75 % im Gewebe. Dagegen enthalten tomatenbasierte Lebensmittel zu mehr als 95 % das all-E-Isomer. [Canene-Adams und Erdman 2009]

Beim Menschen und bei Geflügel werden Carotinoide hauptsächlich in Leber, Fettgewebe und Haut sowie Reproduktionsgeweben wie Prostata und Ovarien akkumuliert [Bendich und Olson 1989].

Die hohen Mengen an Carotinoiden in den LDL und HDL des Eigelbs sind durch die in der Leber stattfindende östrogenstimulierte Synthese von Vitellogenin und *Very-Low-Density* Lipoproteinen (VLDL) unter Beladung mit Lipiden und lipophilen Substanzen wie Carotinoiden und Cholesterin bedingt. Die Lipoproteine werden anschließend rezeptorvermittelt durch Endocytose aus dem Blut von der Oozyte aufgenommen [Britton 2008a; Anton 2007; Jolivet *et al.* 2006; Anderson *et al.* 1998; Kuksis 1992]. Aus den VLDL, die hauptsächlich aus den beiden Apoproteinen Apovitellenin I und Apoprotein-B bestehen, bilden sich Eigelb-LDL durch die partielle enzymatische Proteolyse von Apoprotein-B während der Endocytose [Li-Chan und Kim 2008; Anton 2007; Jolivet *et al.* 2006; Moussa *et al.* 2002; Itoh *et al.* 1986]. Das als Dimer organisierte Vitellogenin besteht aus zwei Polypeptiden unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung und fungiert als Vorläuferprotein für  $\beta$ -Livetin, HDL und Phosvitin. Die Reifung von Vitellogenin zu HDL in der Oozyte erfolgt durch hydrolytische Abspaltungen von Aminosäuresequenzen unter Bildung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -HDL und Phosvitin. Da die Dimer-Struktur und die Lipidbindung dabei unverändert bleiben [Banaszak 1991], sind Vitellogenin und HDL strukturell ähnlich [Anderson *et al.* 1998].

Da  $\beta$ -Carotin neben dem Umbau zu aktivem Vitamin A häufig zu Xanthophyllen oxidiert wird, ist dessen Transport in das Eigelb weniger effizient [Anton 2007]. Xanthophyll-Fettsäureester werden vor der Deposition im Eigelb durch eine lipasekatalysierte Hydrolyse im Darmlumen deacetyliert [Breithaupt *et al.* 2003; Lai *et al.* 1996; Philip *et al.* 1976], weshalb Lutein und Zeaxanthin im Eigelb zu 90 % unverestert vorliegen [Handelmann *et al.* 1999].

Durch die Akkumulation von Carotinoiden im Eigelb wird eine antioxidative Schutzwirkung während der embryonalen und postnatalen Entwicklung gewährleistet, wobei die maternale Carotinoid-Versorgung die Embryonensterblichkeit und Entwicklungs- und Lebensfähigkeit der Brut beeinflusst [Karadas *et al.* 2005]. Vom Eigelb aus werden Carotinoide über die Dottersackmembran mittels Lipoproteinen in den Blutkreislauf und von dort zur Akkumulation in die Leber des Embryos transportiert. Die fütterungsinduzierte Anreicherung von Carotinoiden im Eigelb verringert daher die Anfälligkeit der Eigelblipide sowie der Gewebe des Embryos und des Kükens gegenüber Lipidperoxidationen [Blount und McGraw 2008; Karadas *et al.* 2005; Surai *et al.* 2003; Surai und Speake 1998]. Aufgrund der immunmodulierenden Wirkung von Carotinoiden [Breithaupt 2008; Karadas *et al.* 2005] wird über die Futtersupplementierung mit Lutein bei gegen infektiöse Bronchitis geimpften Legehennen die sekundäre Antikörperresponse verstärkt [Bédécarrats und Leeson 2006].

## 2.6 Carotinoide in Lebensmitteln

Carotinoide werden in Pilzen, Algen, Bakterien und den Chromo- und Chloroplasten bei Pflanzen durch die enzymkontrollierte Carotinogenese *de novo* synthetisiert [Britton *et al.* 2004]. Daher weisen pflanzliche Nahrungsmittel ein breites Spektrum an Carotinoiden auf [Rodriguez-Amaya 2001]. Bei der Reifung werden Xanthophylle mit Fettsäuren verestert [Britton und Khachik 2009; Rodriguez-Amaya 2001]. Daher existieren Lutein und Zeaxanthin in *Tagetes*-Arten (Studentenblume) hauptsächlich als Mono- und Diester gesättigter Fettsäuren [Boonnoun *et al.* 2012; Khachik 2001; Delgado-Vargas und Paredes-López 1996; Gregory *et al.* 1986]. Da Lutein mit einem Anteil von 40 - 45 % das Hauptcarotinoid in Chloroplasten ist [Britton 2008a], dominiert es im Extrakt von *Tagetes-erecta* mit Anteilen von ca. 88 bis 93 %. Dagegen beträgt der Anteil an Zeaxanthin nur ca. 5 %, da es leicht zu Epoxyxanthophyllen wie Violaxanthin umgebaut wird. [Rodriguez-Amaya 2003; Khachik 2001; Hadden *et al.* 1999; Gregory *et al.* 1986].

Rotes und gelbes Gemüse enthält hauptsächlich Carotine und grünblättriges Gemüse Xanthophylle. Der Carotinoidgehalt in Gemüse ist ca. zehnfach höher als bei Früchten [Watzl und Bub 2001].

Aufgrund der fehlenden enzymatischen Ausstattung zur Biosynthese sind die Carotinoid-Mengen in tierischen Lebensmitteln meist geringer als in pflanzlichen [Rodriguez-Amaya 2003], wobei aber Eier, Milchprodukte, Fische und Meeresfrüchte wichtige Quellen sind [Britton und Khachik 2009].

### 2.6.1 Carotinoide in Eigelb

Die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Carotinoide, die Nahrungsaufnahme und Haltungsform sowie genetische und physiologische Faktoren beeinflussen den Gehalt und die Zusammensetzung der Eigelb-Carotinoide. Die natürlich vorkommenden Hauptcarotinoide des Eigelbs sind Lutein (ca. 292 µg/Eigelb) und Zeaxanthin (ca. 213 µg/Eigelb), welche die typische Färbung bedingen [Greene *et al.* 2006]. Mit ca. 65 % des Eigelb-Carotinoid-Gehalts dominiert dabei Lutein, was durch dessen ubiquitäres Vorkommen in Pflanzen bedingt ist [Hammershoj *et al.* 2010]. Aufgrund der intestinalen Metabolisierung ist  $\beta$ -Carotin mit ca. 8 % des Carotinoid-Gehalts [Hammershoj *et al.* 2010] bzw. ca. 10 µg/Eigelb [Li-Chan und Kim 2008] ein Minorcarotinoid in Eigelb.

Da die Konzentrationen an Lutein und Zeaxanthin bezogen auf den Lipidanteil in LDL und HDL weitgehend gleich sind [Ternes *et al.* 1995], findet sich im Plasma, das 93 % der Eigelb-Lipide enthält [Powrie und Nakai 1986], fast der gesamte Carotinoid-Gehalt [Anton 2007].

Die Lipid-Assoziation der Xanthophylle bedingt eine hohe Bioverfügbarkeit, weshalb Eigelb als eine gute Lutein- und Zeaxanthin-Quelle angesehen wird [Ternes 2008a; Greene *et al.* 2006; Handelman *et al.* 1999]. Da Lutein aus Eigelb eine um den Faktor drei höhere Bioverfügbarkeit zeigt als aus pflanzlichen Matrices [Ternes 2008a; Handelman *et al.* 1999], ist die Serum-Lutein-Response nach dem Verzehr luteinangereicherter Eier signifikant höher als bei Spinat [Chung *et al.* 2004].

Zur Eigelb-Pigmentierung werden bei der Boden- und Freilandhaltung Xanthophylle<sup>7</sup> in Form von Extrakten aus natürlichen Quellen oder als synthetische Supplemente [BVL 2011] und bei der ökologischen Haltung xanthophyllreiche Pflanzen wie Mais, Erbsen, Spinat und *Tagetes*-Arten (Tab. 2-1) im Futter eingesetzt. Da in den Futterpflanzen Lutein dominiert, das im gelben Spektralbereich absorbiert, ist Eigelb aus ökologischer Haltung heller als bei konventionell erzeugten Eiern [Grashorn und Grimrath 2005].

<sup>7</sup>Lutein, Zeaxanthin,  $\beta$ -Apo-8'-Carotinal,  $\beta$ -Apo-8'-Carotinsäureethylester (445 - 450 nm; gelb); Capsanthin, Canthaxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin, Citranaxanthin (465 - 480 nm; rot)

Die hohen Gehalte an Lutein und Zeaxanthin in den Futterpflanzen erklären die hohen Mengen in Eigelb bei ökologischer und Freiland-Haltung [Hamulka *et al.* 2005; Majchrzak und Elmadfa 1997]. Dabei wurde nach Schlatterer und Breithaupt (2006) eine signifikant höhere Konzentration bei ökologisch erzeugten Eiern gegenüber der Freiland-, Boden- und Käfighaltung festgestellt (Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Gehalte an Lutein und Zeaxanthin [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] in Eigelb in Abhängigkeit der Haltungsform (Klasse 0 - 3) [Schlatterer und Breithaupt 2006] sowie in den Futterpflanzen [USDA 2014; Gregory *et al.* 1986]

Haltungsform	Gehalt [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ Eigelb]		Futterpflanze	
	Lutein	Zeaxanthin		
<b>Ökologisch (0)</b>	1.764	1.021	<i>Tagetes erecta</i> *	383 - 79.109 $\mu\text{g}$ Luteinester/100 g**
<b>Freiland (1)</b>	749	325	Grüne Erbsen	2.477 $\mu\text{g}$ (Lutein + Zeaxanthin)/100 g
<b>Boden (2)</b>	541	222	Gelber Mais	1.355 $\mu\text{g}$ (Lutein + Zeaxanthin)/100 g
<b>Käfig (3)</b>	411	398	Spinat	12.198 $\mu\text{g}$ (Lutein + Zeaxanthin)/100 g

\* Ringelblume: grün-gelb bis orange-braun

\*\* Summe der Dimyristat-, Myristat-Palmitat-, Dipalmitat- und Palmitat-Stearat-Ester

## 2.6.2 Einflüsse auf den Carotinoid-Gehalt

Die Selbstassemblierung in Aggregaten und Kristallen, die Assoziation mit Membranen, Proteinen, Lipiden und Lipoproteinen sowie der Schutz durch physikalische Barrieren wie Zellmembranen und antioxidative Inhaltsstoffe und Enzyme bedingen eine höhere Stabilität der Carotinoide in natürlichen Matrices gegenüber ihrem Vorliegen in Lösung nach der Isolierung [Belitz *et al.* 2008; Watzl und Bub 2001]. Entsprechend der Matrixeigenschaften sowie der Wechselwirkung mit Matrixkomponenten ist die Stabilität der Carotinoide lebensmittelspezifisch [Aman *et al.* 2005; van het Hof *et al.* 1998].

Bei der Verarbeitung tragen Zerkleinerungs-, Erhitzungs- und Trocknungsverfahren zur Zerstörung des Gewebes und von Assoziationen zwischen Carotinoiden und Matrixkomponenten bei. Durch die Einflüsse von Temperatur, Licht, Säuren, Enzymen und aktiven Metalloberflächen werden dabei Isomerisierungen und Degradationen der Carotinoide katalysiert, wobei Degradationen zudem unter Sauerstoffeinfluss und durch Radikale initiiert werden [Shen *et al.* 2009; Belitz *et al.* 2008; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Dies verändert die Bioverfügbarkeit, den Metabolismus und die biologischen Funktionen der Carotinoide sowie die Farbe und das Aroma der Lebensmittel [Britton 2008b; Rodriguez-Amaya 2003].

Aufgrund der Radikalbildung bei der Lipidperoxidation erhöht das Vorhandensein von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Matrix die oxidative Degradation der Carotinoide [Pérez-Galvez *et al.* 2000].

Freigesetzte Pflanzensäuren induzieren die Epoxid-Furanoid-Neuanordnung von 5,6-Epoxy-Carotinoiden sowie aufgrund der pH-Absenkung die Dehydrierung von Xanthophyllen mit allylischer OH-Gruppe [Britton und Khachik 2009].

Zudem steigt mit höherem Zerkleinerungsgrad das Ausmaß der durch Enzyme und Sauerstoff katalysierten Degradationen der Carotinoide [Rodriguez-Amaya 1997]. Beim Gefrieren beeinflusst die Einfriergeschwindigkeit die Zellzerstörung und damit die Zugänglichkeit der Carotinoide für Enzyme, Radikale und Sauerstoff. Die große Oberfläche und Porosität gefriergetrockneter Lebensmittel erhöhen Aromaverluste und Oxidationen [Rodriguez-Amaya 1997]. Obwohl Carotinoide bei -20 °C unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff gut erhalten bleiben [Britton und Khachik 2009], zeigt die Lagerung gefriergetrockneten Eigelbs daher bei -18 °C keinen protektiven Effekt auf die Xanthophyllretention gegenüber 20 °C [Wenzel 2010].

In Abhängigkeit der Erhitzungsintensität kommt es zu Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Carotinoide [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008; Aman *et al.* 2005; van het Hof *et al.* 1998]. Bei der Konservenherstellung von Früchten und Gemüse kann der Z-Isomerenanteil bis zu 40 % zunehmen [Britton und Khachik 2009; Lessin *et al.* 1997]. Bedingt durch die geringe Aktivierungsenergie zur Isomerisierung der C<sub>13</sub>-Doppelbindung dominieren bei mäßiger Erhitzung dabei die 13-Z-Isomere [Britton und Khachik 2009]. Eine intensive Erhitzung induziert dagegen die Bildung stärker sterisch gehinderter Z-Isomere wie z. B. von 13,15-di-Z-β-Carotin in Karottensaft (121 °C, 30 min) aus dem zuvor bei milderer Behandlung (110/120 °C, 30 s) dominierenden 13-Z-β-Carotin [Chen *et al.* 1995]. Der gleichzeitig höhere Carotinoid-Verlust [Chen *et al.* 1995] basiert auf der zunehmenden oxidativen Degradation mit der Erhitzungsintensität. Daher sinkt die Retention an Carotinoiden mit Vitamin A-Aktivität von der Mikrowellengarung über das Dämpfen bis zum Kochen, wobei sich deutliche Verluste beim Frittieren, Backen und Braten ergeben [Rodriguez-Amaya 1997]. Bei der Zubereitung von Rührei sind nach zehn Minuten keine Carotinoide mehr analysierbar [Hesterberg 2006]. Aufgrund der geringen oxidativen Degradation bei geringer Erhitzungsintensität [Rodriguez-Amaya 1997] sind die Xanthophyll-Gehalte in pasteurisiertem Eigelb (61,5 °C, 3,5 min) gegenüber dem unbehandelten nicht signifikant verändert [Wenzel 2010].

Bei der Lebensmittelverarbeitung erhöhen der Abbau physikalischer Barrieren beim Matrixaufschluss, die Zunahme der Permeabilität pflanzlicher Zellwände, die Auflösung von Assoziationen der Carotinoide mit Matrixkomponenten und die erhitzungsbedingte Löslichkeit von Aggregaten der Carotinoide deren Bioverfügbarkeit [Britton und Khachik 2009]. Da bei der Strukturentfaltung der Eigelb-Lipoproteine Fette und assoziierte Carotinoide freigesetzt werden, sind die Gehalte der Xanthophylle bei sprüh- und gefriergetrocknetem Eigelb signifikant höher als bei unbehandeltem [Wenzel 2010].

## 2.7 Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit ist ein Maß für die im Metabolismus, zur Akkumulation und zur Nutzung in physiologischen Funktionen verfügbare Menge eines Nahrungsmittelbestandteils und umfasst dessen Freisetzung aus der Matrix, Absorption, Transport und gewebespezifische Akkumulation [Canene-Adams und Erdman 2009]. Neben der Art, der Menge und der spezifischen Bindung der Carotinoide im Lebensmittel wird die Bioverfügbarkeit durch die Eigenschaften der Matrix, Nahrungsbestandteile, genetische und wirtsspezifische physiologische Faktoren sowie die Nährstoffversorgung des Organismus beeinflusst, wobei diese **SLA-MENGGHI-Faktoren**<sup>8</sup> interdependent sind [Canene-Adams und Erdman 2009].

Bedingt durch die strukturellen und chemisch-physikalischen Eigenschaften werden je nach Carotinoid (**Species of carotenoid**) maximal 50 - 70 % der über die Nahrung zugeführten Menge vom Körper resorbiert [Watzl und Bub 2001]. Bei Hühnern werden Xanthophylle aufgrund der höheren Polarität effizienter ins Blut absorbiert und im Eigelb deponiert als Carotine [Karadas *et al.* 2005; Na *et al.* 2004; Nys 2000]. Daher ist die Depositionseffizienz von Lutein und Zeaxanthin im Eigelb mit je ca. 23 % deutlich höher als bei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin (je ca. 0,5 %) [Hammershoj *et al.* 2010]. Ihre geringere Aggregationsneigung und bessere Löslichkeit im Vergleich zu all-E-Isomeren führen dazu, dass Z-Isomere bevorzugt in Mizellen und Chylomikronen inkorporiert und leichter absorbiert und transportiert werden [Canene-Adams und Erdman 2009; Boileau *et al.* 1999]. Nach Hencken (1992) absorbieren Legehennen freies Lutein effizienter als dessen Mono- und Diester. Vermutlich aufgrund der höheren Aggregationsneigung ist aber die Absorption unveresterten Luteins geringer im Vergleich zu den hydrophoberen Luteinestern [Philip *et al.* 1976], die in den Futterpflanzen vorkommen.

In natürlichen Matrices beeinflussen Aggregierungen, Kristallisationen und Wechselwirkungen mit Matrixkomponenten (**Linkages**) die Carotinoid-Bioverfügbarkeit. Letztere ist daher im Vergleich zu Extrakten und synthetischen Formulierungen aus natürlichen Matrices meist geringer [Canene-Adams und Erdman 2009; van het Hof *et al.* 2000]. Da Carotinoide in Chloroplasten mit Chlorophyll als Pigment-Protein-Komplexe gebunden sind [Britton 1995], ist die Bioverfügbarkeit von  $\beta$ -Carotin bei grünem Blattgemüse geringer als bei Karotten, bei denen es in den Chromoplasten gelöst und kristallin vorliegt [van het Hof *et al.* 2000].

Entsprechend dem Konzentrationsgradienten zwischen den Gallensäure-Mizellen und der Enterozyten-Membran gelangen Carotinoide durch passive Diffusion in die Mukosazellen. Bei hohen Mengen (**Amount of carotenoids**) kommt es zu einem carotinoidspezifischen Sättigungseffekt der Membran. [Parker 1996]

---

<sup>8</sup>**S**pecies of carotenoid; **L**inkages at the molecular level; **A**mount of carotenoids; **M**atrix; **E**ffectors; **N**utrient status; **G**enetic; **H**ost-related factors; **I**nteractions among these variables

Daher sinkt die Lutein-Depositionsrates aus dem Futter ins Eigelb bei vierfach höherer Supplementierung von 10 % auf 2 bis 3 % [Hammershoj *et al.* 2010; Leeson und Caston 2004; Na *et al.* 2004]. Zudem beeinflussen Carotinoide einander bei der Mizellen-Inkorporation, der Absorption, dem Transport und der Akkumulation [Su *et al.* 2002; van het Hof *et al.* 2000; Furr und Clark 1997; Gärtner *et al.* 1996]. Aufgrund inhibitorischer Effekte bei der Inkorporation in Mizellen und Chylomikronen ist die humane Plasmaresponse von Canthaxanthin um fast 40 % [White *et al.* 1994] und die Lutein-Konzentration im Blut um 54 - 61 % bei gleichzeitiger Gabe einer äquivalenten Menge an  $\beta$ -Carotin verringert [Kostic *et al.* 1995].

Die Veränderung der Lebensmittelstruktur (**Matrix**) durch Reifungsprozesse, mechanische und thermische Einflüsse, die Zerkleinerung im oberen Verdauungstrakt, die Magensäure und die enzymatische Zersetzung beeinflusst die Carotinoid-Bioverfügbarkeit [Ternes 2008a; Watzl und Bub 2001]. Die verbesserte Bioverfügbarkeit aus verarbeiteten Lebensmitteln ist durch den Gewebeaufschluss, die verringerte Partikelgröße, die Oberflächenvergrößerung und die Freisetzung der Carotinoide aus intrazellulären Organellen, Bindungen und Komplezierungen mit anderen Matrixbestandteilen wie Proteinen, Lipiden und Membranen bedingt. Daher ist die Lycopin-Bioverfügbarkeit bei Tomatenpaste, Tomatensaft oder Ketchup höher als bei rohen Tomaten. [Canene-Adams und Erdman 2009]

Matrixbestandteile (**Effectors**) beeinflussen die Mizellen-Inkorporation und Absorption von Carotinoiden. Einfach ungesättigte Fettsäuren können die Absorption im Gegensatz zu mehrfach ungesättigten verbessern, und Phytosterole konkurrieren mit Carotinoiden bei der Mizellen-Inkorporation [Canene-Adams und Erdman 2009]. Ballaststoffe können die Mizellenbildung durch die Adsorption von Gallensalzen und Carotinoiden und die Bildung kolloidaler Gelphasen stören, die zudem den Kontakt der Mizellen mit der Mukosa und damit die Carotinoid-Absorption vermindern [Parker 1996]. Daher sind die Lutein-Gehalte in Eigelb bei hohen Weizenanteilen im Futter gering [Hammershoj *et al.* 2010].

Die Biokonversion von Carotinoiden mit Vitamin A-Aktivität in der Dünndarmmukosa und deren Deposition im Eigelb korrelieren neben spezies- und wirtsspezifischen Faktoren mit der Vitamin A-Versorgung (**Nutrient status**) [Hammershoj *et al.* 2010].

Aufgrund des genetisch bedingt (**Genetic**) effizienten Carotinoid-Metabolismus [Britton *et al.* 2009b] akkumulieren Hühner bei gleicher Futtergabe im Vergleich zu Enten, Gänsen und Truthähnen ca. die doppelte Menge an Carotinoiden im Eigelb und in der Leber [Surai *et al.* 1998]. Bedingt durch den speziesspezifischen Transport aus dem Dünndarm in die Ovarien [Hammershoj *et al.* 2010] akkumulieren Wildvögel  $\beta$ -Carotin in höherem Ausmaß im Eigelb (25 - 29 % des Gesamtcarotinoidgehalts) als Hühner (ca. 8 % des Gesamtcarotinoidgehalts) [Surai *et al.* 2003, 2001].

Auch wirtsspezifische Faktoren (**Host-related factors**) wie der Gesundheitszustand haben einen Einfluss auf die Carotinoid-Bioverfügbarkeit. Verursacht durch die gestörte gastrointestinale Funktion und eine Konkurrenzbeziehung verringern parasitäre Infektionen meist die Ingestion und Deposition von Carotinoiden [Canene-Adams und Erdman 2009] wie bei der durch Kokzidien<sup>9</sup> bedingten Gewebeentfärbung, dem sog. *pale-bird*-Syndrom [Blount und McGraw 2008].

## 2.8 Physiologische Wirkungen von Carotinoiden

Für die Humangesundheit sind die Vitamin A-Aktivität einiger Carotinoide und deren antioxidative Eigenschaften von Bedeutung. Die biologischen Wirkungen der Carotinoide werden nach Funktionen, Aktionen und Assoziationen unterschieden [Britton 2008a]. Funktionen sind für die Gesundheit essentielle Eigenschaften der Carotinoide wie z. B. die Vitamin A-Aktivität. Aktionen wie die antioxidative Wirkung basieren auf einer applikationsinduzierten biologischen Response [Bendich und Olson 1989]. Bei Assoziationen wie inversen Korrelationen zwischen der Carotinoid-Aufnahme und dem Risiko spezifischer Krankheiten besteht wahrscheinlich kein kausaler physiologischer Effekt [Bendich und Olson 1989].

In Säugetieren dienen ca. 50 Carotinoide als Vorläufersubstanzen für Vitamin A [Rodriguez-Amaya 1997], wobei ernährungsbedingt vor allem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin und  $\beta$ -Cryptoxanthin von Bedeutung sind [Watzl und Bub 2001]. Zur Umwandlung durch die zentrale Spaltung mittels  $\beta$ -Carotin-15,15'-Oxygenase oder die exzentrische Spaltung mittels  $\beta$ -Carotin-9,10-Oxygenase [Britton 2008b; Wyss und von Lintig 2008] müssen Carotinoide einen unsubstituierten  $\beta$ -Iononring mit einer C<sub>11</sub>-Polyenkette aufweisen, weshalb die Vitamin-A-Aktivität von  $\beta$ -Carotin mit zwei  $\beta$ -Iononringen am höchsten ist [Rodriguez-Amaya 2001]. Vitamin A und die Retinoide 11-Z-Retinal, all-E- und 9-Z-Retinolsäure sind für den Sehprozess, das Wachstum, die Zelldifferenzierung, die reproduktive Effizienz, die Embryonalentwicklung, die Regulation der Genexpression sowie die Integrität des Epithelgewebes wichtig [EFSA 2010a; Chew und Soon Park 2009; Tang und Russell 2009; Britton 2008b; EFSA 2008; Kasper 2004].

Da Carotinoide freie Radikale abfangen, angeregte Moleküle in den energetischen Grundzustand bringen und kurzwellige Strahlung absorbieren, dient die Akkumulation von Lutein und Zeaxanthin in der *Makula lutea* (Gelber Fleck) dem Schutz der Photorezeptormembranen vor Oxidationen [Schalch *et al.* 2009; Britton 2008a].

---

<sup>9</sup>Wirtsspezifische einzellige Darmparasiten

Eine reduzierte makuläre Pigmentdichte stellt daher den Hauptrisikofaktor der genetisch disponierten, altersbedingten Makuladegeneration (ARMD, *Age-Related Macula Degeneration*) dar. Eine Anreicherung an Lutein und Zeaxanthin in der Netzhaut kann die ARMD-Pathogenese positiv beeinflussen [Beatty *et al.* 2001]. Daher korrelieren hohe Plasmakonzentrationen an Lutein und Zeaxanthin signifikant mit einem geringeren Risiko einer altersbedingten Makulopathie<sup>10</sup> [POLA 2006], und die infolge der Lutein-Zufuhr erhöhte makuläre Pigmentdichte verbessert die Sehfunktion bei ARMD-Patienten signifikant [Stringham und Hammond 2008; LAST 2004; Wooten und Hammond 2002].

In den frühen Stadien der Pathogenese von Tumorerkrankungen spielen oxidative Schädigungen auf molekularer Ebene eine Rolle, die durch Reaktionen der Carotinoide mit Radikalen reduziert werden [Palozza *et al.* 2009]. Zudem wird der karzinoprotektive Effekt einiger Carotinoide mit der Erhöhung der *Gap-Junctions*-Kommunikation durch Stimulation der mRNA-Expression des Proteins Connexin 43 erklärt, das als kanalartige Verbindung zwischen den Zellen die Signalübertragung reguliert [Wang 2009; Watzl und Bub 2001; Zhang *et al.* 1991]. Studien zeigen inverse Korrelationen zwischen dem Bronchialkarzinom-Risiko und der Aufnahme von  $\beta$ -Cryptoxanthin, Lutein, Lycopin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin [Rock 2009] sowie der Lycopin-Aufnahme und der Schädigung der Leukozyten-DNA bei Prostatakarzinom-Patienten [Yeum *et al.* 2009].

Neben der antioxidativen Schutzwirkung bei Immunzellen werden immunstimulierende Wirkungen von Carotinoiden im Kontext der Proliferation und Aktivierung von Lymphozyten, der phagozytotischen Zellaktivität und der Bildung von Zytokinen<sup>11</sup> diskutiert [Chew und Soon Park 2009; Castenmiller und West 1998; Stracke *et al.* 2009]. Mit einem hohen Plasma- $\beta$ -Carotinstatus korrelieren ein erhöhter Anteil an T-Lymphozyten [Watson *et al.* 1991], eine gesteigerte Aktivität der T-Killerzellen bei älteren Männern (65 - 86 Jahre) [Santos *et al.* 1996] und eine verringerte Inzidenz akuter Atemwegsinfektionen bei älteren Menschen (60 Jahre und älter) [van der Horst-Graat *et al.* 2004].

Carotinoide können Lipoproteine vor Oxidationen schützen [Johnson und Krinsky 2009]. Dies ist hinsichtlich der LDL-Oxidation von Bedeutung, die zusammen mit Verletzungen der vasculären Endothelzellen zu arteriosklerotischen Veränderungen der Intima und einem gesteigerten Herzinfarktrisiko führt. Daher sind die Intima-Media-Verdickung<sup>12</sup> und die Plasma-Lutein-Konzentration invers assoziiert [LAAS 2001]. Zudem verringert die Supplementierung von Lycopin durch eine tomatenbasierte Diät bei Patienten der Koronaren Herzkrankheit (KHK) die Lipidperoxidationsrate [Bose und Agrawal 2007].

---

<sup>10</sup>Makulaveränderung, bei der ein fortschreitender Gewebeabbau zur Makuladegeneration führt

<sup>11</sup>Peptidbasierte Botenstoffe wie Interleukine und Interferone

<sup>12</sup>Zunahme der inneren und mittleren Schicht der Arteriengefäßwand

Durch ihre antioxidativen Eigenschaften und die verminderte Penetration kurzwelliger Strahlung schützen in der Epidermis akkumulierte Carotinoide die Haut vor Photoschäden [Goralczyk und Wertz 2009; Wingerath *et al.* 1998]. Eine ausreichende Aufnahme an  $\beta$ -Carotin und Lycopin vermindert daher die Lipidperoxidation und erhöht die minimale zur Bildung von Hautrötungen nötige UVB-Dosis [Sies und Stahl 2004; Césarini *et al.* 2003].

Die Wirkungen von Carotinoiden auf die Humangesundheit sind aufgrund inkonsistenter Ergebnisse und der unzureichenden Kausalität der meist epidemiologischen Studien von der *European Food Safety Authority* (EFSA) nicht anerkannt [EFSA 2012; EFSA 2011a,b,c,d; EFSA 2010a,b]. Die kontrollierte Supplementierung bei Interventionsstudien erlaubt eine kausale Aussage zum physiologischen Effekt einer Substanz, wobei die Ergebnisse aufgrund der meist höheren Bioverfügbarkeit und höheren Mengen der Carotinoide bei Supplementen nicht direkt auf Lebensmittel übertragbar sind [Schalch *et al.* 2009].

## **2.9 Analytik von Carotinoiden**

Die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Carotinoide bestimmen die Vorgehensweise bei der Probenaufbereitung und -analyse, was Schutzmaßnahmen zur Vermeidung von Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen wie die Verminderung von Einflüssen durch Licht und Sauerstoff, den Zusatz von Antioxidantien und säureneutralisierenden Agenzien, die Einhaltung geringer Temperaturen und die Vermeidung metallischer Materialien einschließt [Rodriguez-Amaya 2001; Hart und Scott 1995]. Grundsätzlich reduziert eine schonende Probenaufbereitung mit wenigen Arbeitsschritten Fehler- und Verlustquellen.

Um Degradationen der Carotinoide durch freigesetzte Radikale zu verringern, sollte die Homogenisierung der Matrix direkt vor der Extraktion erfolgen [Rodriguez-Amaya 2001; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Die alkalische Hydrolyse (Verseifung) dient dem Aufschluss komplexer fett- und proteinhaltiger Matrices, in denen die Penetration des Extraktionslösungsmittels vermindert ist, und der Freisetzung von Carotinoiden aus Assoziationen mit lipophilen Matrixkomponenten [Yue *et al.* 2006; Rodriguez-Amaya 2001; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Da Lutein in der Eigelb-Matrix stark gebunden ist und diese durch das Lösungsmittel nicht vollständig aufgeschlossen wird, erhöht die Verseifung die Lutein-Ausbeute bei der Extraktion [Yue *et al.* 2006]. Gleichzeitig induzieren hohe Temperaturen und Einflüsse durch Licht und Sauerstoff besonders bei Dihydroxycarotinoiden wie Lutein und Zeaxanthin Isomerisierungen und Degradationen [Khachik 2009; Britton *et al.* 2004; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Bei der Zugabe hoher Mengen an 10 %iger (w/v) Natriumhydroxid-Lösung verringert sich daher die Extraktionsausbeute von Lutein aus Eigelb [Yue *et al.* 2006].

### 2.9.1 Probenaufbereitung und Extraktion

In der Carotinoid-Analytik erfolgt die Probenaufbereitung traditionell mit Hilfe der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, *Liquid-Liquid-Extraction*), bei der die Wahl des Lösungsmittels mit den Eigenschaften der Analyten und des Probenmaterials in Zusammenhang steht. Die lipophilen Carotinoide sind gut mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar, wobei sich für Xanthophylle Ethanol, Methanol und Aceton und für schwerlösliche, kristalline Carotinoide Toluol und Dichlormethan eignen [Belitz *et al.* 2008]. Zur Extraktion unterschiedlich polarer Carotinoide dienen Lösungsmittelgemische, wobei der Einsatz wassermischbarer organischer Lösungsmittel bei wässrigen Proben die Extraktion der Carotinoide aus der Matrix erhöht [Khachick 2009; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Gemäß dem nach Nernst für ein bestimmtes Phasensystem spezifischen Verteilungsgleichgewicht des Analyten zwischen dem Extraktionslösungsmittel und der Probe ist die mehrmalige Extraktion mit geringen Lösungsmittelmengen effizient, wobei sich zur Extraktion von Carotinoiden eine dreifache Wiederholung bis zur Farblosigkeit von Extrakt und Raffinat bewährt hat [Rodriguez-Amaya 2001; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995].

Die *Matrix Solid Phase Dispersion* (MSPD) ist ein etabliertes Extraktionsverfahren in der Lebensmittel-, Naturstoff-, Rückstands- und klinischen Analytik, das sich durch eine schnelle und schonende Aufbereitung fester, hochviskoser und komplexer, schwer zugänglicher Matrices auszeichnet [Karasová *et al.* 2003]. Die MSPD eignet sich daher zur Extraktion von Lutein und Zeaxanthin aus Spinat und Retina [Glaser 2001; Dachtler 2000].

Bei der MSPD werden die Proben mit einem Sorbens ca. 30 bis 60 s homogenisiert, wobei die Matrix aufgeschlossen wird und die Matrixbestandteile in Abhängigkeit ihrer Polarität über die Sorbensoberfläche verteilt und unter Bildung einer chromatographischen Phase gebunden werden [Karasová *et al.* 2003]. Zur Isolierung lipophiler Stoffe dienen als Sorbens meist Feststoffe auf Kieselgelbasis mit gebundenen C<sub>18</sub>- oder C<sub>30</sub>-Phasen. Die zu einem homogenen Säulenbett komprimierte chromatographische Phase wird zur Entfernung polarer Verunreinigungen mit Wasser oder Puffern gewaschen. Mit geringen Mengen unterschiedlich polarer Lösungsmittel werden die Matrixkomponenten anschließend entsprechend ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften selektiv eluiert. [Barker 2000] Das Sorbens sollte eine Kohlenstoffbeladung zwischen 8 - 18 % und eine Partikelgröße zwischen 40 - 60 µm aufweisen, da Partikeldurchmesser unterhalb 20 µm die Flussrate bei der Elution verringern [Karasová *et al.* 2003].

Gegenüber der *Solid Phase Extraction* (SPE, Festphasenextraktion), die auf der Einstellung des stoffspezifischen Adsorptionsgleichgewichts des Analyten zwischen der stationären Phase und dem eluierenden Lösungsmittel basiert, zeichnet sich die MSPD durch eine höhere Extraktionseffizienz aus.

### 2.9.2 Chromatographische Trennung mittels HPLC

In der Analytik von Carotinoiden wird aufgrund der guten Trennergebnisse und der hohen Reproduzierbarkeit bevorzugt die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *High Performance/Pressure Liquid Chromatography*) eingesetzt [Pfander und Riesen 1995]. Bei der HPLC werden die Analyten basierend auf der Adsorption an der meist festen stationären Phase und der Desorption durch Wechselwirkungen mit der mobilen Phase (Eluent) entlang der Chromatographiestrecke transportiert (Elution). Die temperatur- und zeitabhängige Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts ist durch die chemisch-physikalischen Eigenschaften der stationären und mobilen Phase sowie des Analyten und dessen Konzentration und die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase beeinflusst und bedingt die Trennung der Analyten [Gottwald und Stieglitz 1996].

Da die Säulenstrecke, über die sich das Adsorptionsgleichgewicht einstellt, einer theoretischen Trennstufe entspricht, korreliert die Trennleistung mit den Säulenabmessungen.

Die Polarität, Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Kohlenstoffbeladung und der Porendurchmesser beeinflussen die Aktivität der stationären Phase bei der Adsorption der Analyten. Die Verringerung des Porendurchmessers und der Partikelgröße erhöht die Trennleistung aufgrund der größeren Oberfläche zur Einstellung der Adsorptionsgleichgewichte. Der gleichzeitige Druckanstieg und die verlängerte Retention bedingen dabei eine Peakverbreiterung, welche die Auflösung verringern kann. Die Trennleistung ist umso reproduzierbarer, je enger die Partikelgrößenverteilung ist.

In der Carotinoid-Analytik eignen sich stationäre Phasen mit 200 Å Porendurchmesser und einer Oberfläche von 200 m<sup>2</sup>/g, wobei bevorzugt Kieselgele eingesetzt werden, deren Silanol-Gruppen durch Bindung von Octyl-, Octadecyl- oder Triacetyl-Alkylresten modifiziert sind [Sander *et al.* 2000; Pfander 1995]. Die Silanisierung der polaren Kieselgeloberfläche führt zur Umkehrung der Polarität. Da unpolare Analyten stärker von den unpolaren RP-Phasen (*Reversed Phase*) retardiert werden, eluieren die Carotinoide mit abnehmender Polarität [Khachik 2009; Rodriguez-Amaya 2001; Gottwald und Stieglitz 1996]. Die chemische Inertheit von RP-Phasen vermeidet Degradationen der Carotinoide bei der chromatographischen Trennung weitgehend [Pfander 1995].

Bei den mit Monochlorsilan hergestellten monomeren RP-Phasen ist die Reproduzierbarkeit höher als bei den mittels Trichlorsilan synthetisierten polymeren RP-Phasen, die aufgrund des größeren Porendurchmessers und der daher verringerten Retention eine höhere Selektivität bei der Trennung geometrischer Isomere aufweisen [Rodriguez-Amaya 2001; Sander *et al.* 2000; Pfander 1995; Epler und Sander 1992].

Da die Modifizierung der Silanol-Gruppen aus sterischen Gründen nur an der Oberfläche möglich ist, weist die RP-Phase polare und unpolare Bereiche auf. Das Ausmaß der Alkylierung beeinflusst die Retentionsstärke der stationären Phase und damit die Auflösung bei der Trennung der Analyten und wird durch die Kohlenstoffbeladung ausgedrückt [Sander *et al.* 2000; Pfander 1995]. Die Oberflächenvergrößerung mit zunehmender Kohlenstoffbeladung erhöht die Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase und verlängert die Retention. Für polare Carotinoide sollte die Kohlenstoffbeladung mindestens 18 % betragen [Sander *et al.* 2000]. Bei der Nachbehandlung der RP-Phasen durch *Endcapping* (sekundäre Alkylierung) werden freie Silanolgruppen mittels Trimethylchlorsilan methyliert. Dies verringert polare Wechselwirkungen mit dem Analyten und beschleunigt die Elution, was die Säulenreproduzierbarkeit und Peaksymmetrie verbessert, aber die Auflösung verringern kann [Khachik 2009; Rodriguez-Amaya 2001].

Bei der Elution eines Lutein-Zeaxanthin-Standardgemischs auf einer  $C_{30}$ -Säule ohne *Endcapping* (Abb. 2-9, links) bedingen die Wechselwirkungen freier Silanolgruppen mit den Hydroxylgruppen von Lutein und Zeaxanthin mit Ausnahme der Überlagerung von 13-Z-Zeaxanthin durch all-E-Lutein eine Basislinientrennung der Stereoisomere [Glaser 2001]. Das *Endcapping* (Abb. 2-9, rechts) führt zur retardierten Elution der 13-Z-Isomere, Coelution der all-E-Isomere und hochselektiven Trennung der 13-Z- und 9-Z-Isomere [Glaser 2001].

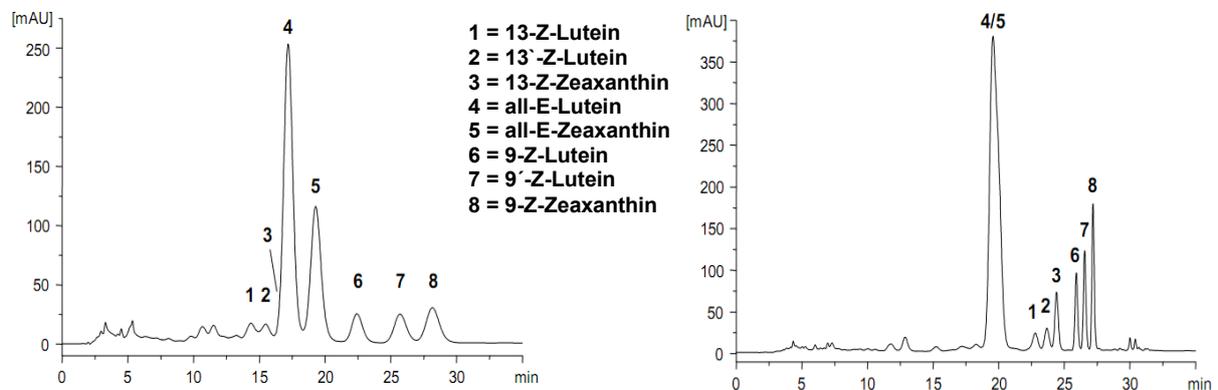


Abb. 2-9: Stereoisomerentrennung eines Lutein-Zeaxanthin-Standardgemischs auf einer  $C_{30}$ -Phase ohne (links) und mit (rechts) *Endcapping* [Glaser 2001]

Aufgrund der langen Polyenkette der Carotinoide spielt für die Selektivität bei der Trennung auf der stationären Phase die Länge der gebundenen Alkylkette eine Rolle. Im Gegensatz zu Triacetyl-Phasen ( $C_{30}$ -Phase) ist die Selektivität von Octadecylsilan-Phasen ( $C_{18}$ -Phasen), die zur Trennung verschiedenartiger Carotinoide geeignet sind, bei den strukturell ähnlichen Carotinoid-Stereoisomeren häufig nicht ausreichend [Khachik 2009; Dachtler 2000; Pfander und Riesen 1995; Sander *et al.* 1994]. Die hohe Selektivität der  $C_{30}$ -Phase basiert auf der größeren Filmdicke und den dadurch intensiveren Wechselwirkungen mit der Polyenkette der Carotinoide im Vergleich zur  $C_{18}$ -Phase (Abb. 2-10, links) [Sander *et al.* 2000].

Daher eignen sich C<sub>30</sub>-Phasen zur Trennung hydrophober, langkettiger Moleküle, die sich in ihrer räumlichen Struktur unterscheiden, wie der all-E- und Z-Isomere von Lutein, Zeaxanthin und β-Carotin bei Spinat-Extrakt (Abb. 2-10, rechts) [Glaser 2001; Dachtler 2000].

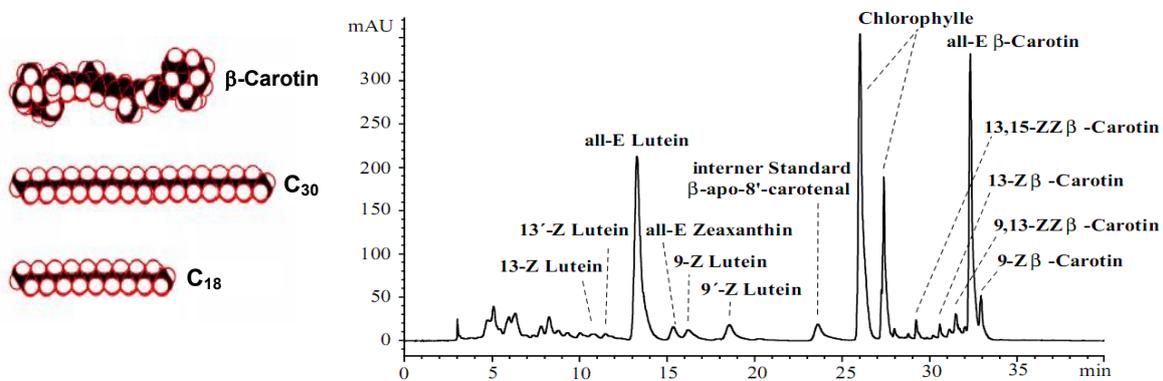


Abb. 2-10: Vergleich der Filmdicke einer C<sub>18</sub>- und einer C<sub>30</sub>-Phase mit der Moleküllänge von β-Carotin (links) [modifiziert nach YMC 2011] und Stereoisomerentrennung von Lutein, Zeaxanthin und β-Carotin mit einer C<sub>30</sub>-Phase bei Spinat-Extrakt (rechts) [Dachtler 2000]

Zur Beeinflussung des Adsorptionsgleichgewichts können die Säulentemperatur und die Zusammensetzung und Fließgeschwindigkeit des Eluenten variiert werden.

Aufgrund der höheren Beweglichkeit der Triacontylketten und der exothermen Adsorption der Analyten begünstigt eine höhere Säulentemperatur die Desorption, was die Retentionszeiten der Analyten verringert [Sander *et al.* 2000]. Da die stoffspezifischen Adsorptionsgleichgewichte in unterschiedlichem Ausmaß durch Temperaturveränderungen beeinflusst sind, kann eine Variation der Säulentemperatur die Auflösung und Selektivität beeinflussen. Aufgrund von Isomerisierungen und Degradationen der Carotinoide und der Flüchtigkeit von Komponenten der mobilen Phase dürfen die Säulentemperaturen nicht zu hoch sein.

Die Elutionskraft der mobilen Phase korreliert mit der Aktivität der stationären Phase und der Polarität des Analyten. Bei der RP-HPLC sinkt die Elutionskraft mit steigender Polarität der mobilen Phase. Daher führt ein zunehmender Wassergehalt des Eluenten zu längeren Retentionszeiten [Dachtler 2000; Gottwald und Stieglitz 1996], was bei zu früh eluierenden und schlecht getrennten Analyten von Vorteil ist. Als primäres Lösungsmittel des Eluenten eignet sich in der Carotinoid-Analytik Methanol in Kombination mit Modifiern geringerer Polarität wie Tetrahydrofuran (THF), Methyl-tert-butylether (MTBE), Hexan, Ethylacetat oder Aceton, deren Anteil zur Benetzung der C<sub>30</sub>-Phasen mindestens 20 % betragen sollte. Bei der Trennung unterschiedlich polarer Carotinoide ist der Eluent meist ein Lösungsmittelgemisch oder die Elution erfolgt gradientisch mit sich ändernder Eluentenzusammensetzung. Während sich die gradientische Elution durch eine hohe Auflösung bei der Trennung auszeichnet, resultiert aus der konstanten Eluentenkomposition bei der isokratischen Elution eine höhere Reproduzierbarkeit.

Eine verringerte Flussrate verlängert die Retention der Analyten, was das Peakprofil zu Lasten der Auflösung und Selektivität verbreitert. Aufgrund der zunehmenden strömungs- und pumpenbedingten Pulsationen ist zudem ein erhöhtes Grundrauschen bei geringen Flussraten unvermeidbar. Eine hohe Flussrate kann aufgrund der verkürzten Retention der Analyten die Peaksymmetrie verbessern und die Peakformen schmälern, was die Auflösung und Selektivität erhöhen kann. Da sich eine Veränderung der Flussrate in unterschiedlichem Ausmaß auf die spezifischen Adsorptionsgleichgewichte der Analyten auswirkt, können die Auflösung und Selektivität höher oder geringer werden.

Bei der Entwicklung einer für das Trennproblem geeigneten HPLC-Analyse-Methode wird häufig Bezug zu Vorgehensweisen ähnlicher Fragestellungen und Matrices in der Literatur genommen [Rodriguez-Amaya 2001]. Dabei zielt die Optimierung der Analyseparameter auf die Gewährleistung einer ausreichend hohen Selektivität bei der chromatographischen Trennung um Fehler bei der Identifikation und Quantifizierung zu vermeiden.

### **2.9.3 Identifizierung**

Zur Identifizierung von Carotinoiden wird die Überprüfung der Kriterien Chromatographie, UV/Vis-Spektralphotometrie und Massenspektrometrie empfohlen [Rodriguez-Amaya 2001].

#### ***Chromatographisches Verhalten***

Das chromatographische Verhalten korreliert mit den chemisch-physikalischen und strukturellen Eigenschaften der Carotinoide und der stationären Phase [Rodriguez-Amaya 2001]. Bei der Stereoisomerentrennung von Lutein und Zeaxanthin auf einer C<sub>30</sub>-Säule ohne Endcapping eluieren die 13-Z-Isomere vor der all-E-Konfiguration, gefolgt von den 9-Z-Isomeren, und die Lutein-Isomere eluieren stets vor Zeaxanthin (Abb. 2-9, links und 2-10) [Glaser 2001; Dachtler 2000]. Bei einer C<sub>30</sub>-Säule mit Endcapping eluieren die 13-Z- und 9-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nach den all-E-Isomeren (Abb. 2-9, rechts) [Glaser 2001], was sich für die all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Eigelb bei Wenzel (2010) bestätigt.

Aufgrund der Systemabhängigkeit sind in der Literatur beschriebene Elutionssequenzen mittels Standardsubstanzen zu prüfen [Khachik 2009]. Zur Erfassung von Veränderungen bei der Elution durch Wechselwirkungen mit Matrixkomponenten müssen die Retentionszeiten der Carotinoide im Probenextrakt mit denen in Standardlösungen verglichen werden. Zudem darf es bei Proben, die mit der Standardsubstanz des Analyten aufgestockt sind, nicht zur Auftrennung des Peakprofils kommen.

## UV-Vis-Spektralphotometrie

Da Carotinoide mit ähnlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften coeluiieren können, basiert die Identifizierung zusätzlich auf den UV/Vis-Absorptionsspektren, die das Chromophor<sup>13</sup> anhand der Absorptionsmaxima und der Schwingungsfeinstruktur repräsentieren und durch den Vergleich mit der Standardsubstanz zu bestätigen sind.

Das delokalisierte  $\pi$ -Elektronensystem der Polyenkette bedingt die farbgebenden Eigenschaften der Carotinoide, für die mindestens sieben konjugierte Doppelbindungen nötig sind [Rodriguez-Amaya 2001; Kohler 1995]. Durch Absorption von Lichtenergie gehen  $\pi$ -Elektronen aus dem elektronischen Grundzustand, d. h. der Elektronenstruktur geringster Energie, in die Anregungskonfiguration geringster Energie über [Frank und Christensen 2008; Britton 1995; Kohler 1995], was die Hauptabsorptionsbande im Spektrum der Carotinoide verursacht.

Da die für die Elektronenübergänge benötigte Anregungsenergie aufgrund der langen konjugierten Doppelbindungssysteme der Carotinoide gering ist, tritt die Hauptabsorptionsbande im gelben bis roten Spektralbereich zwischen 400 und 500 nm auf.

Die Hauptabsorptionsbande zeigt ein 3-Finger-Spektrum, das aus dem mittleren, der Wellenlänge maximaler Absorption ( $\lambda_{\max}$ ) entsprechenden Hauptmaximum II und den beiden Nebenmaxima (I) und (III) besteht. Die entsprechenden Wellenlängen korrelieren mit der Anzahl konjugierter Doppelbindungen [Belitz *et al.* 2008]. Die Schwingungsfeinstruktur (spektrale Feinstruktur, %III/II) beschreibt das prozentuale Verhältnis der Höhen der Absorptionsmaxima III/II (Abb. 2-11). Die Absorptionsintensität korreliert mit der Carotinoid-Konzentration und bildet die Basis für die Quantifizierung.

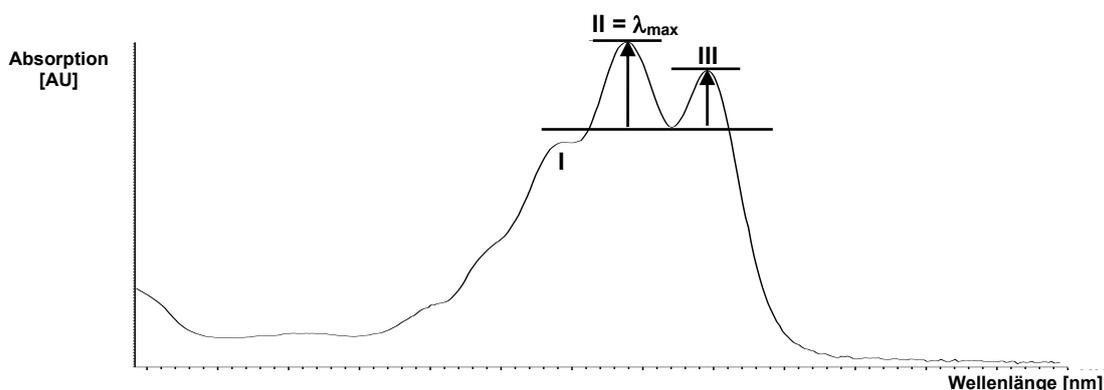


Abb. 2-11: Ermittlung der Schwingungsfeinstruktur (%III/II) bei all-E-Lutein mit Kennzeichnung der Absorptionsmaxima (I, II, III)

<sup>13</sup>Konjugierter, ungesättigter Molekülteil, der die Lichtabsorption im sichtbaren Bereich bedingt

Die lichtabsorbierenden Eigenschaften der Carotinoide werden durch Endgruppen, funktionelle Gruppen, geometrische Isomerisierungen, Lösungsmittel, die Temperatur und Bindungsmechanismen beeinflusst. Dabei kommt es zu Verschiebungen der Absorptionsmaxima zu längeren (bathochrom) oder kürzeren (hypsochrom) Wellenlängen sowie Zunahmen (hyperchrom) oder Abnahmen (hypochrom) der Absorptionsintensität.

Bei  $\beta$ -Ring-Carotinoiden ist die konjugierte endozyklische 5,6-Doppelbindung aufgrund der sterischen Hinderung zwischen dem Methylsubstituenten am C<sub>5</sub>-Atom des Ringes und dem H-Atom am C<sub>8</sub>-Atom der Kette nicht coplanar mit der Polyenkette [Britton 1995]. Daraus resultiert neben dem hypochromen Effekt und der verringerten Schwingungsfeinstruktur eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima im Vergleich zu azyklischen Carotinoiden mit gleicher Anzahl konjugierter Doppelbindungen wie am Beispiel von  $\beta$ -Carotin ( $\lambda_{\max, \text{Hexan}}$  450 nm) und Lycopin ( $\lambda_{\max, \text{Hexan}}$  470 nm) deutlich wird [Belitz *et al.* 2008; Rodriguez-Amaya 2001; Kohler 1995]. Aufgrund der isolierten Doppelbindung in  $\epsilon$ -Ringen ist  $\lambda_{\max}$  von  $\alpha$ -Carotin und Lutein gegenüber  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin in Abhängigkeit des Lösungsmittels um ca. 3 - 7 nm hypsochrom verschoben [Britton *et al.* 2004; Britton 1995]. Zudem ist die Schwingungsfeinstruktur bei Zeaxanthin (25 bzw. 26 %III/II in Leichtpetroleum bzw. Ethanol) aufgrund der symmetrischen Struktur geringer ausgeprägt als bei dem asymmetrischen Lutein-Molekül (60 %III/II). Dies gilt gleichermaßen für  $\beta$ -Carotin (25 %III/II in Hexan bzw. Leichtpetroleum) und  $\alpha$ -Carotin (55 %III/II) [Glaser 2001; Britton 1995].

Mit der Polyenkette konjugierte Carbonylgruppen verlängern das Chromophor, wobei die bathochrome Verschiebung von einer Verringerung der Schwingungsfeinstruktur begleitet sein kann [Rodriguez-Amaya 2001; Britton 1995]. Da Hydroxylgruppen das Chromophor nicht verändern, sind die Absorptionsspektren von Carotinen und deren Hydroxyderivaten wie von  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin sowie  $\alpha$ -Carotin und Lutein identisch [Britton 1995]. Die Addition einer Epoxy-Gruppe an eine konjugierte Ring-Doppelbindung verkürzt das Chromophor, weshalb 5,6-Monoepoxide 5 nm und 5,6,5',6'-Diepoxide 10 nm unterhalb des Absorptionsmaximums des Vorläufercarotinoids absorbieren [Rodriguez-Amaya 2001].

Gegenüber den all-E-Konfigurationen weisen die Absorptionsspektren der Z-Isomere aufgrund der geringeren molaren Extinktionskoeffizienten einen hypochromen Effekt und eine verringerte Schwingungsfeinstruktur auf. Zudem treten in Abhängigkeit der Chromophorlänge hypsochrome Verschiebungen des Absorptionsmaximums  $\lambda_{\max}$  auf, die bei mono-Z-Formen meist 2 - 6 nm betragen. Der Symmetrieverlust der Elektronenstruktur bei Z-Isomeren resultiert in der zusätzlichen charakteristischen Absorption als sog. Z-Bande in der Nähe des UV-Bereichs, die ca. 142 nm unterhalb des in Hexan gemessenen Absorptionsmaximums III des all-E-Isomers auftritt. [Liaaen-Jensen und Lutnøes 2008; Britton 1995]

Die relative Intensität der Z-Bande ( $\%A_B/A_{II}$ ) entspricht deren prozentuellem Anteil an der Absorptionsintensität des Hauptabsorptionsmaximums II (Abb. 2-12) und ist am größten, wenn sich die Z-Doppelbindung nahe des Molekülzentrums befindet [Rodriguez-Amaya 2001; Liaaen-Jensen 1995]. Mit zunehmender Anzahl an Z-Bindungen sinkt die Intensität der Z-Bande.

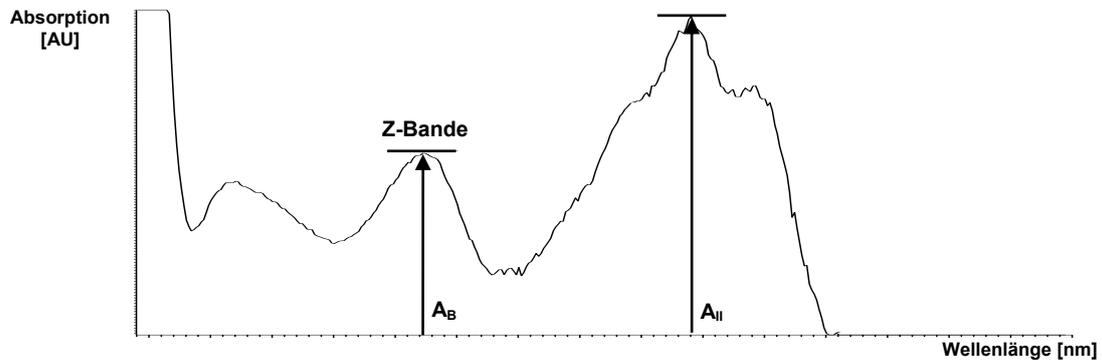


Abb. 2-12: Bestimmung der relativen Intensität ( $\%A_B/A_{II}$ ) der Z-Bande bei 13-Z-Zeaxanthin

Das Lösungsmittel beeinflusst die stoffspezifischen molaren Extinktionskoeffizienten der Carotinoide und damit die Lage der Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande. Während bei Aceton (2 - 6 nm), Chloroform und Dichlormethan (10 - 20 nm), Benzol, Toluol und Pyridin (18 - 24 nm) sowie Kohlenstoffdisulfid (30 - 40 nm) bathochrome Verschiebungen auftreten, sind die Absorptionsmaxima in Hexan, Diethylether, Ethanol, Leichtpetroleum, Methanol und Acetonitril ähnlich [Britton 1995].

Bei geringen Temperaturen können bathochrome Verschiebungen unter Zunahme der Schwingungsfeinstruktur auftreten [Britton 1995].

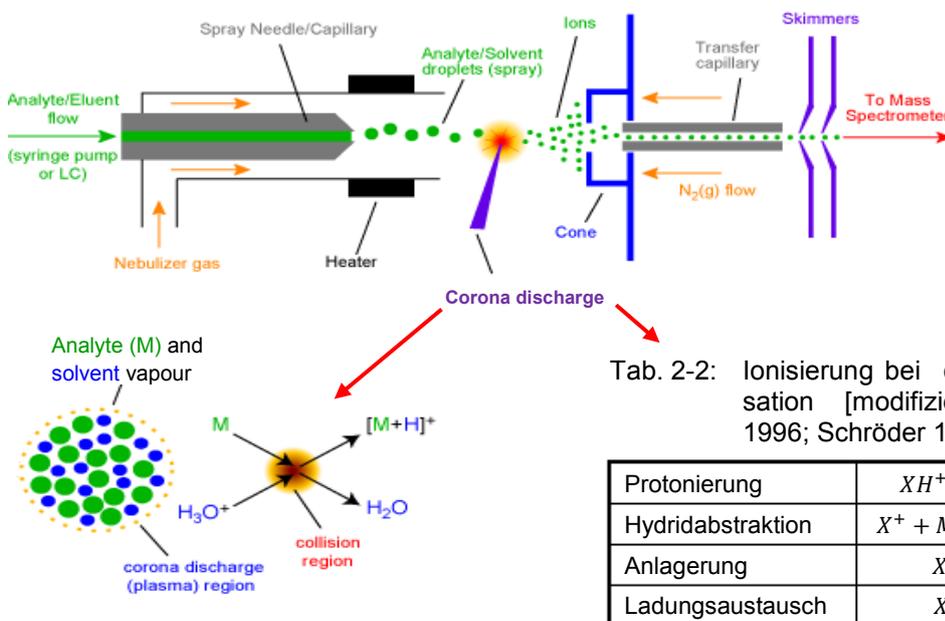
Aggregationen und Wechselwirkungen von Carotinoiden mit Proteinen und Lipiden verändern die Absorption wie z. B. bei den bathochromen Verschiebungen der blauen und violetten Carotinoproteine [Britton 1995]. Die Absorptionsspektren einer Carotinoid-Standard-Lösung und eines Probenextrakts können sich daher unterscheiden [Britton *et al.* 2009a].

### Massenspektrometrie

Aufgrund der identischen Absorptionsspektren verschiedener Carotinoide mit gleichem Chromophor [Britton 1995] kann eine massenspektrometrische Analyse die Identifizierung absichern. Bei der Massenspektrometrie (MS) werden Ionen charakteristischer Masse-Ladungs-(m/z)-Verhältnisse erzeugt und mittels eines Elektrodenpotentials aus der Ionenquelle beschleunigt. Fokussiert durch elektrische Linsen (*Skimmers*) werden die Ionen zur Trennung nach den m/z-Verhältnissen in das Hochvakuum des Massenanalysators geleitet, dessen physikalisches Prinzip den Gerätetyp bestimmt [Universität Stuttgart 2004].

Beim Quadrupol-Massenfilter werden die Ionen in hochfrequenten elektrischen Wechselfeldern der Quadrupolstäbe durch Variation der Gleich- und Wechselspannung in Abhängigkeit des m/z-Verhältnisses und der Ionengeschwindigkeit zu oszillierenden Schwingungen und sinusförmigen Trajektorien (Flugbahnen) angeregt. Bei der Massenanalyse (*Scan*) passieren je nach Wechselfeld nur Ionen bestimmter m/z-Verhältnisse, die auf stabilen Flugbahnen oszillieren, den Massenfilter und gelangen zum Detektor.

Bei der HPLC-MS-Kopplung werden zur positiven Ionisierung meist Spray-Techniken wie die Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) und die Elektrospray-Ionisierung (ESI, *Electrospray Ionization*) eingesetzt. Das HPLC-Eluat wird bei der APCI durch eine Kapillare pneumatisch in einen Stickstoffstrom zerstäubt und das entstehende Aerosol (*Spray*) verdampft und mittels einer unter Hochspannung stehenden Koronanadel in ein Plasma überführt (Abb. 2-13).



Tab. 2-2: Ionisierung bei der Chemischen Ionisation [modifiziert nach Lehmann 1996; Schröder 1991]

Protonierung	$XH^+ + M \rightarrow [M + H]^+ + X$
Hydridabstraktion	$X^+ + M \rightarrow [M - H]^+ + [X + H]$
Anlagerung	$X^+ + M \rightarrow [M + X]^+$
Ladungsaustausch	$X^+ + M \rightarrow M^{+■} + X$

Abb. 2-13: Aufbau eines Massenspektrometers (oben) und Ionisierung bei der APCI (unten links) [modifiziert nach University of Bristol 2005] basierend auf den Prinzipien nach Tab. 2.2

Bei der Koronaentladung (*corona discharge*) entstehen positive Stickstoffionen (Primärionen), die mit den verdampften Lösungsmittelmolekülen kollidieren und Sekundärreaktantgasionen ( $X^+ / XH^+$ ) wie  $H_3O^+$  bilden (Abb. 2-13). Die Ionisierung der Analytmoleküle (M) basiert auf stoßinduzierten Wechselwirkungen mit den Sekundärreaktantgasionen (Tab. 2-2), wobei hauptsächlich protonierte Molekülionen  $[M+H]^+$  entstehen [Lehmann 1996]. Da zur Ionisierung polare Eluenten mit Wasser oder Methanol ausreichen, eignet sich die APCI zur Ionisierung unpolarer Analyten wie von Carotinoiden. Die ESI, bei der die Ionisierung durch ein elektrisches Feld induziert wird, sollte bevorzugt bei Analyten mit polaren, leicht ionisierbaren Gruppen eingesetzt werden [Glaser 2001; Dachtler 2000].

Die Überschussenergie der protonierten Molekülionen  $[M+H]^+$  verursacht Fragmentierungen durch Umlagerungen und Bindungsspaltungen [Budzikiewicz 1998; Gottwald und Stieglitz 1996; Lehmann 1996]. Dabei steht das Molekülion mit dem Fragmentierungsmuster durch spezifische Massendifferenzen in Zusammenhang [Lohninger *et al.* 2003; Schröder 1991], wobei Schlüsselbruchstücke auf funktionelle Gruppen und Verbindungsklassen hinweisen [Gottwald und Stieglitz 1996]. Die Art der Fragmentierung des Molekülions wird durch die Lage der Atome im Molekül, deren Bindungsenergien, das Ionisierungspotential, die Stabilität der Fragmente und die Geschwindigkeitskonstante beeinflusst. Umlagerungen basieren auf Spaltungen und Neubildungen von Bindungen und bedingen daher eine räumliche Nähe der beteiligten Molekülbereiche. Da die Bindungsenthalpien weitgehend neutral sind, konkurrieren Umlagerungen häufig mit den endothermen Bindungsspaltungen und dominieren besonders bei niedrigen Überschussenergien [Budzikiewicz 1998].

Bei Carotinoiden entstehen infolge der Spaltung von Doppelbindungen in der Polyenkette Fragmente wie Toluol (92 u), Xylol (106 u) und Dimethylcyclodecapentaen (158 u) [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008]. Ein Massenverlust des Molekülions von 56 u ist charakteristisch für  $\epsilon$ -Ring-Carotinoide wie Lutein. Endgruppen mit 5,6-Doppelbindungen wie in  $\beta$ -Iononringen verursachen häufig Ionen hoher Massen durch Bindungsspaltungen in der Polyenkette, während in Anwesenheit einer Hydroxyl-Gruppe wie bei Lutein und Zeaxanthin typische Massenverluste von 18 und 60 u auftreten [Enzell und Back 1995].

Bei der Fragmentierung von Lutein und Zeaxanthin entstehen identische diagnostische Ionen in unterschiedlichen Intensitäten. Die Zerfallssequenzen sind durch die Skelettumlagerung gekennzeichnet, bei der neutrale Strukturteile eliminiert werden [Enzell und Back 1995]. Zu Beginn spaltet dabei das an der Hydroxylgruppe protonierte Molekülion  $[M+H]^+$   $m/z$  569,5 das  $H_2O$ -Massenäquivalent (18 u) ab. (Abb. 2-14) [Dachtler 2000].

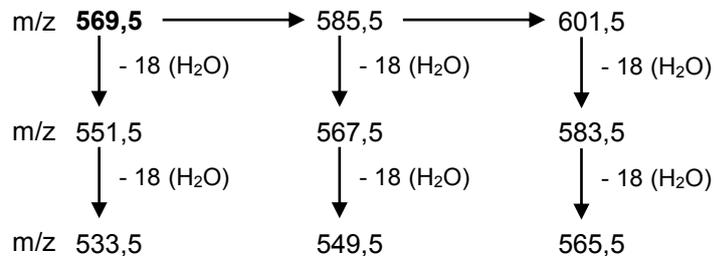


Abb. 2-14: Fragmentierungsschema von Lutein und Zeaxanthin [modifiziert nach Dachtler 2000]

Da die Hydroxyl-Gruppe im  $\epsilon$ -Iononring bei Lutein allylisch (Abb. 2-7) gebunden ist und daher mit den  $\pi$ -Orbitalen der Doppelbindung des benachbarten Kohlenstoffatoms interagiert, erhöht die Allylspannung den Energiegehalt des Moleküls. Dies bedingt, dass bei Lutein die  $H_2O$ -Eliminierung des protonierten Molekülions dominiert. Daher zeigt sich im Massenspektrum von Lutein ein charakteristischer Basispeak (100 % Intensität) mit  $m/z$  551,5  $[M+H-H_2O]^+$ . Dagegen weist das Molekülion  $[M+H]^+$   $m/z$  569,5 mit 14 % eine geringe Intensität auf [Breithaupt 2008; Schlatterer und Breithaupt 2006; Glaser 2001; Dachtler 2000].

Bei Zeaxanthin tritt das Fragmention  $m/z$  551,5 nur mit 15 %iger Intensität auf [Schlatterer und Breithaupt 2006], und die protonierte Molekülmasse  $m/z$  569,5 bildet den Basispeak [Glaser 2001; Dachtler 2000].

Das inverse Verhalten der Intensitäten des Molekülions  $m/z$  569,5 und des Fragmentions  $m/z$  551,5 und die spezifischen Intensitäten der diagnostischen Ionen bei Lutein und Zeaxanthin sind stereochemisch bedingt. Demnach sind Stereoisomere durch ihre charakteristischen Massenfragmente unterscheidbar [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008].

### 2.9.4 Quantifizierung

Die hohen, charakteristischen molaren Extinktionskoeffizienten der Carotinoide erlauben deren spektralphotometrische Bestimmung mit hoher Empfindlichkeit. Zudem absorbieren Carotinoide im Gegensatz zu den meisten anderen Matrixbestandteilen im Nah-UV bis visuellen Bereich, sodass die Detektion weitgehend unbeeinflusst ist [Glaser 2001]. Zusammen mit der hohen Selektivität und Robustheit gegenüber Temperaturschwankungen [Pfander und Riesen 1995] stellt die UV-Vis-Detektion daher eine geeignete Qualifizierungs- und Quantifizierungs-Methode dar [Belitz *et al.* 2008].

Da sich die molaren Extinktionskoeffizienten auf das lösungsmittelabhängige Absorptionsmaximum beziehen, erfolgt die Quantifizierung von Carotinoiden durch die Kalibrierung des Messsystems mit Standardlösungen. Das zugrundeliegende Lambert-Beer-Gesetz setzt eine lineare Korrelation zwischen der Absorption am Absorptionsmaximum und der Konzentration voraus. Dabei ist die Linearität auf einen bestimmten Konzentrationsbereich beschränkt. Bei niedrigen Konzentrationen ist die Signaldetektion durch das Grundrauschen limitiert, was qualitativ der Nachweisgrenze und quantitativ der Bestimmungsgrenze entspricht (Kapitel 2.10). Bei zu hohen Konzentrationen behindern sich die Moleküle bei der Absorption. Nach Schiedt und Liaaen-Jensen (1995) ist die Detektion bei Absorptionswerten im Bereich von 0,3 - 0,7 exakt.

### 2.10 Analytische Methodvalidierung

Zuverlässige Analysedaten basieren auf der Untersuchung repräsentativer Proben und der Anwendung von Bestimmungsmethoden, deren Eignung anhand von Kenngrößen nachgewiesen ist [Gottwald und Stieglitz 1996]. Dabei sind die am häufigsten untersuchten Parameter bei der Validierung von Methoden nach Kromidas (1999), dessen Literatur den folgenden Ausführungen zugrundeliegt, die Selektivität, Spezifität, Linearität, Richtigkeit und Präzision.

Die **Selektivität** beschreibt die Fähigkeit der Methode, die Analyten ohne gegenseitige Störung zu bestimmen.

Bei der **Spezifität** ist eine Erfassung der Analyten ohne Verfälschung durch andere Komponenten der Probe gewährleistet.

Die **Linearität/Kalibrierung** beschreibt die Korrelation zwischen Messgröße/Signal  $y$  (Absorption) und Bestimmungsgröße  $x$  (Konzentration/Menge), die meist auf einem linearen Regressionsmodell ( $y = m \cdot x + b$ ) basiert. Eine Methode ist umso leistungsfähiger und empfindlicher, je größer die Steigung  $m$  und je kleiner der Verfahrensvariationskoeffizient  $V_{x0}$  der Regression sind [Gottwald und Stieglitz 1996]. Bei der Linearitätsüberprüfung werden zwischen drei und zehn Konzentrationsniveaus untersucht.

Der Korrelationskoeffizient  $r$  beschreibt den Anpassungsgrad der Regression und die Interdependenz von Mess- und Bestimmungsgröße. Bei einer linearen Regression sollte der Korrelationskoeffizient größer 0,999 sein.

Die **Nachweisgrenze** (LOD, *Limit of Detection*) entspricht der Analyt-Konzentration, die mit einer 50 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit vom Untergrundsignal unterschieden werden kann. Die **Bestimmungsgrenze** (LOQ, *Limit of Quantification*) ist die geringste Analyt-Konzentration, die mit einer definierten Richtigkeit und Präzision quantifizierbar ist. In der Chromatographie werden LOD und LOQ meist über das Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt, wobei LOD der drei- bis fünffachen und LOQ der neun- bis zehnfachen Signalthöhe des maximalen Rauschpeaks entspricht [Meyer 1999].

Anhand der Linearität und der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wird der **Kalibrierbereich** (Arbeitsbereich der Messmethode) definiert.

Die **Robustheit** beschreibt die Störanfälligkeit der Methode durch variierende Bedingungen wie verschiedene Messgeräte, Zeitpunkte, Bearbeiter, Reagenzien oder Raumtemperaturen.

Die durch die systematische Messunsicherheit (z. B. fehlerhafte Kalibrierung) beeinflusste **Richtigkeit** entspricht der Übereinstimmung des Messwertes mit einem als fehlerfrei geltenden Wert (z. B. zertifiziertes Referenzmaterial). Da für carotinoidhaltige Lebensmittel häufig kein Referenzmaterial verfügbar ist, wird die Richtigkeit anhand der Wiederfindungsrate  $WR$  untersucht, indem die Proben vor der Aufbereitung und Analyse mit einer definierten Menge an Standardsubstanz aufgestockt/dotiert werden [Rodriguez-Amaya 2001; Gottwald und Stieglitz 1996]. Die Wiederfindungsrate entspricht dem Verhältnis der gemessenen Analyt-Konzentration zum theoretisch richtigen Wert (s. Formel).

$$WR = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100 \%$$

$WR$	=	Wiederfindungsrate [%]
$\bar{x}$	=	Mittelwert der gemessenen Analyt-Konzentration
$x_R$	=	theoretisch richtige Analyt-Konzentration

Bei hohen Wiederfindungsraten sind Verluste der dotierten Carotinoide durch Isomerisierungen und Degradationen während der Probenaufbereitung und -analyse gering. Unter Berücksichtigung möglicher Wechselwirkungen mit Komponenten der Lebensmittelmatrix sind bei Analyt-Konzentrationen unterhalb von 1 % Wiederfindungsraten zwischen 95 und 105 % akzeptabel. Die Richtigkeit der Methode gewährleistet gleichzeitig deren Selektivität und Robustheit [Gottwald und Stieglitz 1996].

Die **Präzision** beschreibt die zufällige Streuung der Messergebnisse bei Mehrfachbestimmungen und gewährleistet gleichzeitig die Robustheit der Methode [Gottwald und Stieglitz 1996]. Die Methodenpräzision umfasst die Aufbereitung und Analyse der Proben und schließt damit die Messpräzision des Analysesystems ein. Die anhand des Variationskoeffizienten  $V_K$  (s. Formel) bewertete Wiederholpräzision, bei der die Probe von derselben Person am selben Gerät mit identischen Reagenzien in kurzen Zeitabständen analysiert wird, basiert auf einer Sechsfachbestimmung [Gottwald und Stieglitz 1996].

$$V_K = \frac{s_x}{\bar{X}} \cdot 100 \%$$

$V_K$	=	Variationskoeffizient (%)
$s_x$	=	abgeschätzte Standardabweichung der normalverteilten Messwerte
$\bar{X}$	=	abgeschätzter Mittelwert der normalverteilten Messwerte

Da sich die **Genauigkeit** einer Methode aus der Richtigkeit, Präzision und Robustheit ergibt, beschreibt sie die gesamte Messabweichung des bestimmten Ergebnisses vom wahren Wert [Rodriguez-Amaya 2001; Gottwald und Stieglitz 1996].

### 3. Material und Methoden

Bei den Versuchsreihen zum Einfluss der Erhitzung und der Gefriertrocknung auf die Massenkonzentrationen der Eigelb-Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin im Kontext der Strukturveränderungen der Lipoproteine wurden je zwei Chargen von Bio-Eiern (Güteklasse A, Gewichtsklasse L) untersucht. Dies sollte die Ergebnisse absichern und den Einfluss der Biodiversität hinsichtlich der Matrixkomposition berücksichtigen. Da die Eier der jeweiligen Chargen aufgrund identischer Erzeugercodes aus demselben Legebetrieb stammten, wurde eine einheitliche Futterzusammensetzung der Hühner-Kohorte angenommen [Wenzel 2010]. Die Untersuchung der aus Eigelb separierten Fraktionen Plasma und Granula sollte Interdependenzen zwischen den extrahierbaren Xanthophyll-Gehalten und den jeweiligen dominierenden Lipoproteinen aufzeigen. Abbildung 3-1 veranschaulicht die Vorgehensweise bei der Vorbereitung, Behandlung und Analyse der Proben, die in den folgenden Kapiteln beschrieben ist.

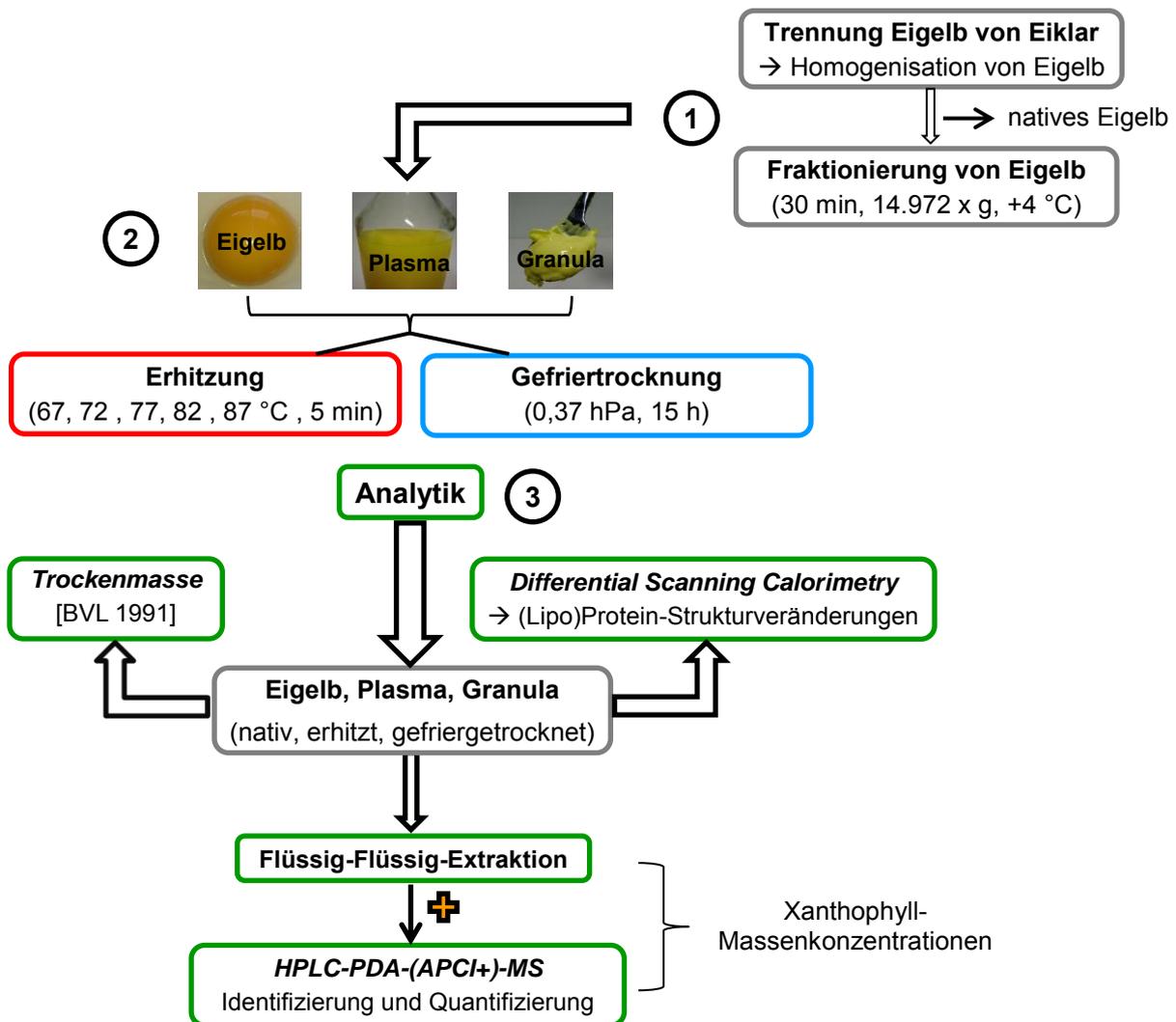


Abb. 3-1: Vorbereitung (1), Behandlung (2) und Analytik (3) von Eigelb, Plasma und Granula

Mittels *Differential Scanning Calorimetry* (DSC; Kapitel 3.4) wurden die erhitzungs- und gefrier-trocknungsinduzierten Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine in Doppelbestimmungen untersucht. Die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin der Proben wurden ebenfalls in Doppelbestimmungen mittels eines Flüssig-Flüssig-Extraktionsverfahrens und anschließender HPLC-PDA-(APCI)-MS-Analyse, bei der die Prüflösungen jeweils zweimal injiziert wurden, ermittelt (Kapitel 3.5).

Eine Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien und der eingesetzten Software ist in Anhang 1 zu finden.

Unbehandeltes Eigelb sowie die ebenfalls unbehandelten aus Eigelb abzentrifugierten Fraktionen Granula und Plasma werden im Folgenden als *native* Proben oder *Nativzustände* bezeichnet. Da das Eigelb vor der Fraktionierung im Verhältnis 1:1 mit destilliertem Wasser versetzt wurde, war die Plasma-Fraktion ebenfalls im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Die Probenaufbereitung sollte das qualitative und quantitative Profil der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin der nativen sowie der erhitzten und gefriergetrockneten Proben nicht beeinflussen. Da bereits bei Raumtemperatur Z-Isomerisierungen und bei höherer Erhitzung zusätzlich oxidative Degradationen der Xanthophylle auftreten [Aman *et al.* 2005; van het Hof *et al.* 1998], erfolgten die Zentrifugationsschritte bei 4 °C, und auf einen Matrixaufschluss durch Verseifung wurde verzichtet. Zur Vermeidung lichtinduzierter Z-Isomerisierungen und oxidativer Degradationen der Xanthophylle wurden die Proben mit Alufolie abgedeckt sowie bei +5 bis +7 °C in Braunglasbehältnissen gelagert. Zudem wurde möglichst unter Lichtausschluß gearbeitet. Zur Vermeidung von durch Metalloberflächen katalysierten Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle wurden weitgehend Glasmaterialien verwendet. Da Carotinoide in Lösung leicht isomerisieren und degradieren [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008; Britton 1995], wurden die Probenextrakte direkt mittels der HPLC-PDA-(APCI)-MS-Methode analysiert.

Zur Überprüfung des Unterschieds zwischen den unbehandelten und behandelten Proben hinsichtlich der Protein- und Lipoproteinstrukturen sowie der Xanthophyll-Massenkonzentrationen nach der ersten Hypothese (Kapitel 1) erfolgte die statistische Auswertung der erhaltenen Daten mittels der einfaktoriellen univariaten Varianzanalyse (ANOVA, *Analysis of Variance*) basierend auf einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 [Rudolf und Kuhlisch 2008].

### 3.1 Vorbereitung des Eigelbs

Für eine optimale Trennung von Eiklar und Eigelb sollten Eier ca. zwei Tage bei +15 °C gelagert werden [Ros 1994]. Bei je 110 Eiern der Chargen der Versuchsreihe zum Erhitzungseffekt und je 170 Eiern der Chargen der Versuchsreihe zum Gefriertrocknungseffekt (Tab. 3-1) wurden Eiklar und Eigelb mit einem löffelförmigen Dotterfänger aus Kunststoff getrennt.

Tab. 3-1: Bio-Eier-Chargen für die Versuchsreihen zur Ermittlung des Erhitzungs- und Gefriertrocknungseffekts – Angabe von Erzeugercode, Packstellen-Nummer (PN) und Mindest-Haltbarkeits-Datum (MHD)

Versuchsreihe		Erzeugercode	PN	MHD
Erhitzung	Charge 1	0-NL-4235301	DE-051528	01.04.2012
	Charge 2	0-NL-4044501	DE-051528	18.04.2012
Gefriertrocknung	Charge 3	0-NL-4207104	DE-051528	05.08.2012
	Charge 4	0-NL-4369601	DE-051528	17.08.2012

Nach dem Abziehen der Chalazen wurde die Dotterkugel auf Filterpapier abgerollt um an der Vitellin-Membran haftende Eiklarreste zu entfernen [Hammershoj *et al.* 2010; Moussa *et al.* 2002]. Das Eigelb wurde manuell unter Zerstörung der Vitellin-Membran durch Rühren homogenisiert. Bei der Versuchsreihe zum Erhitzungseinfluss wurden 90 g und bei der Versuchsreihe zum Gefriertrocknungseinfluss 150 g des nativen Eigelbs separiert.

### 3.2 Fraktionierung von Eigelb in Plasma und Granula

Gemäß der Ergebnisse aus Vorversuchen und in Anlehnung an das Verfahren nach Ternes *et al.* (1995)<sup>14</sup> erfolgte die Fraktionierung des zuvor zur Erleichterung der Granula-Sedimentation im Verhältnis 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnten Eigelbs bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 14.972 x g über 30 min bei +4 °C. Die klaren, gelben Plasma-Überstände wurden dekantiert und vereinigt. Die dichtgepackten, hochmolekularen, blassgelben Granula-Sedimente wurden zur Entfernung von Plasma-Resten zweimal mit je 5 mL destilliertem Wasser versetzt und erneut je 5 min bei den angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Nach der Entfernung des wässrigen Überstands wurden die Granula-Fractionen vereinigt.

### 3.3 Bestimmung der Trockenmasse (TM)

Die Wassergehalte in Eigelb schwanken natürlicherweise. Zudem veränderten die Erhitzung und die Gefriertrocknung die Wasseranteile in Granula, Plasma und Eigelb. Eine zweifache Trockenmassebestimmung nach BVL (1991) diente der Normierung der Xanthophyll-Massenkonzentrationen auf den Trockenmassegehalt.

<sup>14</sup>Zweimalige Zentrifugation von Eigelb (1:1 destilliertes Wasser; 15.000 U/min / 14.310 x g, 3 min)

### 3.4 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Zur Bestimmung der erhitzungs- und gefrieretrocknungsinduzierten Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine wurde eine DSC-Methode in Bezug auf die Proteinkonzentration, Einwaage und Heizrate für natives Eigelb optimiert. Dabei wurden getrocknete Luft als Trockengas (50 mL/min) und Spülgas (200 mL /min) und ein Aluminium-Tiegel (40  $\mu$ L) als Referenz verwendet.

Entscheidende Faktoren für die Festlegung des Messbereichs auf 15 bis 110  $^{\circ}$ C waren anfängliche Messschwankungen, die ab ca. 60  $^{\circ}$ C beginnende Denaturierung der Livetine [Le Denmat *et al.* 1999] und die HDL-Strukturentfaltung bei 84,3  $^{\circ}$ C [Bircan und Barringer 2002]. Die Ausprägung des endothermen Messkurvenverlaufs wurde bei unverdünntem Eigelb, einer Probeneinwaage von  $30 \pm 2$  mg und einer Heizrate von 8  $^{\circ}$ C/min als optimal angesehen. [Thierau *et al.* 2014; Keil 2013]

Die Auswertung der DSC-Thermogramme erfolgte anhand des Temperaturbereichs, des Onsets (Schnittpunkt der Tangente des Peaks mit der Basislinie) und des Maximums (Peak-Temperatur  $T_d$ ) sowie der normierten Gesamtenthalpie  $\Delta H$  des Peaks.

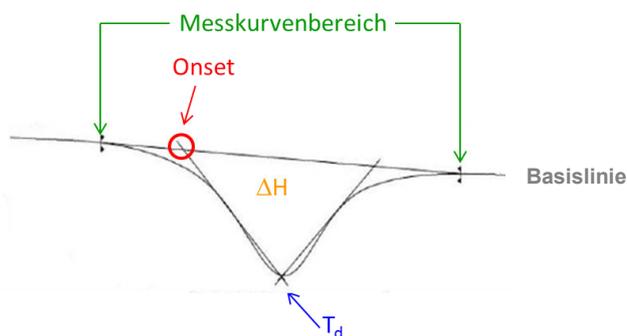


Abb. 3-2: Auswertung der DSC-Thermogramme

Zur Untersuchung der möglichen Wiederherstellung der Protein- und Lipoproteinstrukturen durch Rehydratation wurden die gefrieretrockneten Proben vor der DSC-Analyse auf die nativen Trockenmassen von Granula (46,08 % TM), Plasma (26,05 % TM) und Eigelb (51,18 % TM) rekonstituiert.

### 3.5 Bestimmung von Lutein und Zeaxanthin

Zur Bestimmung der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin wurden in Anlehnung an Publikationen mit ähnlicher Fragestellung eine HPLC-PDA-Analyse-Methode sowie die Probenaufbereitung hinsichtlich des Extraktionsverfahrens optimiert und anschließend validiert. Dies erfolgte mit nativem Eigelb aufgrund der repräsentativen Komposition aus 78 % Plasma und 22 % Granula [Powrie und Nakai 1986]. Die Bestimmungsmethode umfasste demnach die Probenaufbereitung bei der Extraktion und die HPLC-PDA-Analyse.

Die Identifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin erfolgte anhand der charakteristischen Retentionszeiten bei der chromatographischen Elution sowie der spezifischen UV-Vis-Absorptionsspektren und der Massenspektren. Die Quantifizierung basierte auf der charakteristischen Absorption von Lutein und Zeaxanthin bei 450 nm.

#### 3.5.1 HPLC-PDA-Analyse

Die HPLC-PDA-Analyse wurde in Anlehnung an die für ähnliche chromatographische Trennprobleme beschriebenen Methoden nach YMC (2011), Hammershoj *et al.* (2010), Wenzel (2010), Schlatterer und Breithaupt (2006), Breithaupt *et al.* (2003), Glaser (2001) sowie Dachtler (2000) optimiert. Als stationäre Phase wurde eine polymere C<sub>30</sub>-Säule (250 x 4,6 mm) mit Endcapping verwendet. Eine C<sub>30</sub>-Vorsäule (10 x 4,0 mm) diente der Entfernung von Verunreinigungen der Probenextrakte. Die Optimierung der Analyseparameter basierte auf Messungen einer äquimolaren Standard-Stammlösung aus je 0,5 mg Lutein, Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin in 5 mL eines Ethanol-Methanol-THF-Lösungsmittelgemischs (750:200:50, v/v/v), das die Polaritätsunterschiede abdeckte und damit die Löslichkeit der Carotinoide gewährleistete. Bei jeder Versuchsdurchführung wurde ein definierter Analyseparameter variiert und dessen Einfluss auf die Trenneffizienz interpretiert. Neben verschiedenen isokratischen und gradientischen Eluentenzusammensetzungen wurden die Säulentemperatur (20 bis 40 °C) und die Flussrate (0,4 bis 1,1 mL/min) verändert.

Mit den optimierten Analyseparametern erfolgte die Validierung der HPLC-PDA-Methode, die eine Linearitätsüberprüfung, Korrelationsanalyse und die Ermittlung der xanthophyllspezifischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen umfasste. Auf diese Weise konnte der Kalibrierbereich zur Quantifizierung der Xanthophylle festgelegt werden.

Bei Konzentrationen unterhalb 0,02 µg/mL zeigten die Chromatogramme ein hohes Untergrundrauschen. Zur Festlegung des Konzentrationsbereichs der all-E-Isomere von Lutein und Zeaxanthin, der einen proportionalen und linearen Kontext zur Absorption am Absorptionsmaximum bei 450 nm gewährleistet, wurden daher zehn äquidistante Standardlösungen im Bereich von 0,02 bis 20 µg/mL (Anhang 2, Tab. 1b-1) je dreimal analysiert und die Werte gemittelt. Als Kenngrößen der xanthophyllspezifischen, linearen Regressionsgeraden wurden die Steigung  $m$ , der Korrelationskoeffizient  $r$  und der Verfahrensvariationskoeffizient  $V_{x0}$  ermittelt. Anhand dieser Kenngrößen wurde die Eignung der Auswertung über die Peakfläche oder die Peakhöhe beurteilt.

Für Eigelb existiert kein Referenzmaterial ohne Carotinoide. Daher wurde zur Ermittlung der Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) das Ethanol-Methanol-THF-Lösungsmittelgemisch, das zudem der Probenextraktion diente, als *Blank* (Leerprobe) sechsmal injiziert und das auf zufälligen Systemschwankungen basierende Grundrauschen des Analysesystems detektiert. Im Elutionsbereich der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin (5 - 10 min) wurden die drei höchsten Rauschpeakhöhen der Basislinie gemittelt und LOD als dreifache sowie LOQ als zehnfache Signalhöhe dieses Wertes festgelegt [Kromidas 1999; Meyer 1999]. Die damit korrelierenden Konzentrationen der all-E-Isomere von Lutein und Zeaxanthin wurden anhand der spezifischen Linearitäts-Regressionsgeraden der Peakhöhen (0,2 - 0,02 µg/mL) berechnet.

### 3.5.2 Extraktion

Die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Lutein und Zeaxanthin berücksichtigend erfolgte die Optimierung des Extraktionsverfahrens in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Methoden der *Matrix Solid Phase Dispersion* (MSPD) sowie der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, *Liquid Liquid Extraction*). Da kein Referenzmaterial für Eigelb verfügbar war, basierte die Optimierung des Extraktionsverfahrens auf der Ermittlung der Wiederfindungsrate (Kapitel 2.10) durch Dotierung nativen Eigelbs mit der Standard-Stammlösung von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin (je 100 µg/mL). Bezogen auf das jeweilige Probenendvolumen lagen die Konzentrationen der Aufstockung bei der MSPD (0,3 µg/mL) und bei der LLE (0,5 µg/mL) im mittleren Kalibrierbereich. Zur Absicherung der Ergebnisse erfolgte eine Doppelbestimmung der dotierten und undotierten Proben bei Anwendung des jeweiligen Extraktionsverfahrens und der optimierten HPLC-PDA-Analyse-Methode. Die Wiederfindungsrate der Bestimmungsmethode sollte zwischen 95 und 105 % liegen [Kromidas 1999]. Zur Einschränkung aufbereitungsbedingter Fehler- und Verlustquellen sowie von Z-Isomerisierungen und Degradationen der Xanthophylle sollte sich das optimierte Extraktionsverfahren durch wenige Arbeitsschritte und eine schonende Vorgehensweise auszeichnen.

Für die MSPD-Extraktion von Lutein und Zeaxanthin wurde die Methode nach Glaser (2001) modifiziert. Als Sorbens dienten 1,5 g einer C<sub>18</sub>-Phase, die mit 0,5 g des nativen Eigelbs [Glaser 2001] in einer Spritzenkartusche ca. 1 min zu einer chromatographischen Phase homogenisiert wurden. Zur Erhöhung der Extraktionseffizienz durch mehrmalige Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts wurden die Xanthophylle in 1 mL-Schritten mit insgesamt 6 mL eines CHCl<sub>3</sub>-THF-Gemisches (70:30, v/v) eluiert. Nach der Filtration (0,45 µm RC-Membran) wurde das gelbe Eluat mit der HPLC-PDA-Methode analysiert. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte eine Aufstockung mit 0,02 mL der Stammlösung der Lutein- und Zeaxanthin-Standards direkt nach der Einwaage von Eigelb und Sorbens.

Die LLE-Extraktion von Lutein und Zeaxanthin wurde in Anlehnung an das Extraktionsverfahren von Wenzel (2010) unter Variation des Lösungsmittelgemischs und der Ultraschallbehandlungszeit optimiert. Die mit dem Extraktionslösungsmittel (15 mL) versetzte Probe wurde zum Matrixaufschluss eine Minute im Ultraschallbad behandelt und anschließend mit einem Ultra-Turrax (9500 U/min, 1 min) homogenisiert, wobei das Probenmaterial mit 5 mL des Extraktionslösungsmittels quantitativ überführt wurde. Nach 20 minütiger Extraktion unter Schütteln (Mini-Kreisschüttler Orbital) wurde zur Abtrennung von Zellbestandteilen und denaturierten Proteinen zentrifugiert (4500 U/min, 5 min, 4 °C) und der klare, gelbe Extrakt nach einer Filtration (0,45 µm RC-Membran) mit der HPLC-PDA-Methode analysiert. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Proben mit 0,1 mL der Standard-Stammlösung von Lutein und Zeaxanthin nach Zugabe des Lösungsmittelgemischs aufgestockt.

### **3.5.3 Richtigkeit und Wiederholpräzision der Bestimmungsmethode**

Die Validierung der hinsichtlich des Extraktionsverfahrens und der HPLC-PDA-Analyse optimierten Bestimmungsmethode erfolgte anhand einer Überprüfung der Richtigkeit und der Wiederholpräzision. In einer Sechsfachbestimmung wurden die Massenkonzentrationen an all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin in nativem Eigelb vom selben Anwender mit identischen Chemikalien und mit demselben Gerät bestimmt, sodass aus den Messergebnissen der Variationskoeffizient zur Beurteilung der Wiederholpräzision ermittelt werden konnte. Anschließend wurde natives Eigelb mit der Stammlösung (je 100 µg/mL) der Standards von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin nach der Zugabe des Extraktionslösungsmittels dotiert und erneut der Gehalt der all-E-Isomere bestimmt. Zur Gewährleistung gleicher Volumina wurden die undotierten Proben mit einer dem dotierten Stammlösungsvolumen äquivalenten Menge des Ethanol-Methanol-THF-Gemischs versetzt. Unter Berücksichtigung der nativen Massenkonzentrationen und der dotierten Menge der Standards konnten die Wiederfindungsraten anhand der bestimmten Massenkonzentrationen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin errechnet und so die Richtigkeit der Bestimmungsmethode bewertet werden.

#### **3.5.4 Identifizierung von Lutein und Zeaxanthin**

Die Identifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin basierte auf dem chromatographischen, spektralphotometrischen und massenspektrometrischen Verhalten [Rodriguez-Amaya 2001].

Die Elutionsreihenfolge wurde mittels der Standards und anhand des Vergleichs mit Literaturmethoden bestimmt. Zur Erfassung möglicher Veränderungen bei der Elution durch Matrixeinflüsse wurden die Retentionszeiten der all-E-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in den Probenextrakten mit denen der Standards verglichen und die Proben zudem mit den Standards von Lutein und Zeaxanthin dotiert.

Die UV-Vis-Absorptionsspektren der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin konnten hinsichtlich der Absorptionsmaxima und der Schwingungsfineinstruktur der Hauptabsorptionsbande basierend auf Literaturangaben interpretiert werden, wobei die Identifizierung der Xanthophylle in den Probenextrakten durch den Vergleich mit den Absorptionsspektren der Standards von Lutein und Zeaxanthin abgesichert wurde.

Anhand der charakteristischen Intensitäten der Molekül- und Fragmentionen-Peaks in den Massenspektren wurden die Stereoisomerenansätze von Lutein und Zeaxanthin unterschieden. Die Optimierung der massenspektrometrischen Analyse-Methode erfolgte in Anlehnung an Wenzel (2010) und Schlatterer und Breithaupt (2006). Dabei wurden unter Variation der cone- und corona-Spannungen Standardlösungen von Lutein und Zeaxanthin zur Identifizierung der charakteristischen Molekülionen- und Fragmentionen-Peaks gemessen. Um die geeigneten cone- und corona-Spannungen zur massenspektrometrischen Identifizierung von Lutein und Zeaxanthin unter Matrixeinfluss zu bestätigen wurden Probenextrakte analysiert.

### **3.6 Erhitzung**

Entsprechend der temperaturabhängigen Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine des Eigelbs (Kapitel 2.2.1) wurden Granula (30 g), Plasma (45 g) und Eigelb (15 g) bei fünf Temperaturniveaus (67, 72, 77, 82, 87 °C) in Probenbeuteln in einem Schüttelwasserbad zur gleichmäßigen Temperaturverteilung erhitzt. Die Probenmengen ergaben sich über die notwendigen Einwaagen für die Analytik (DSC, HPLC-PDA, Trockenmasse). Nach Erreichen des jeweiligen Temperaturniveaus bei einer zusätzlichen Probe zur Temperaturkontrolle wurde über fünf Minuten erhitzt. Die Erhitzungszeit basierte auf Literaturangaben zu temperaturabhängigen Pasteurisationszeiten im Bereich von zwei bis zehn Minuten [Wenzel 2010; Jaekel *et al.* 2008; Ternes 2008b; Kulozik und Daimer 2007; Le Denmat *et al.* 1999]. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt.

### 3.7 Gefriertrocknung

Zur Minimierung der gefrierinduzierten Strukturentfaltung der LDL wurden Granula (60 g), Plasma (240 g) und Eigelb (30 g) in Anlehnung an Wenzel (2010) und Jaekel *et al.* (2008) in dünnen Schichten (ca. 3 mm) bei -40 °C auf vorgefrosten Edelstahlschalen (-30 °C) schnell eingefroren und für ein bis zwei Stunden bei -40 °C temperiert. Die Probenmengen ergaben sich über die notwendigen Einwaagen für die Analytik (DSC, HPLC-PDA, Trockenmasse), wobei die Abtrocknung der Proben berücksichtigt wurde. Entsprechend der Korrelation von Temperatur und Sublimationsdruck<sup>15</sup> und bei Annahme einer initialen Probentemperatur von ca. -30 °C erfolgte die separate Gefriertrocknung von Granula, Plasma und Eigelb in Anlehnung an Wenzel (2010) bei 0,37 hPa und 5 °C Stellflächentemperatur zur Erreichung einer maximalen Trockenmasse über 15 Stunden. Im Anschluss wurden die Proben in Probenbeuteln vakuumiert um Einflüsse durch Sauerstoff zu minimieren. Zur Gewährleistung reproduzierbarer umgebungsbedingter Einflüsse auf die Trocknungskinetik wurde die Behausung des Probentrays auf 5 °C temperiert.

### 3.8 Statistische Auswertung der Messergebnisse

Aus den homogenen Grundgesamtheiten von Granula, Plasma und Eigelb wurden die Stichproben zur Untersuchung des Einflusses der Faktoren Erhitzung sowie Gefriertrocknung (unabhängige qualitative Variable) auf die normierte Gesamtenthalpie  $\Delta H$  des DSC-Peaks sowie die Xanthophyll-Massenkonzentrationen als Merkmalsausprägungen (abhängige quantitative Variable) zufällig ohne gegenseitige Beeinflussung genommen.

Da es sich demnach um unabhängige Stichproben handelte und der Einfluss eines Faktors auf eine Merkmalsausprägung betrachtet wurde, eignete sich die einfaktorielle univariate Varianzanalyse (ANOVA) zur Überprüfung der Unterschiedshypothese (Hypothese 1; Kapitel 1). Dabei werden die Gruppenmittelwerte der Merkmalsausprägung einzelner Faktorstufen hinsichtlich signifikanter Unterschiede bei den Varianzen verglichen. Aus dem Verhältnis der zufälligen Varianz der Einzelwerte innerhalb der Gruppen und der systematischen, durch den Faktor induzierten Varianz der Gruppenmittelwerte ergibt sich der F-Wert.

Überschreitet dieser den kritischen Wert  $F_{critical}$ , wird anstelle der Nullhypothese ( $H_0$ ), die von identischen Gruppenmittelwerten ausgeht, die Alternativhypothese ( $H_1$ ), gleichbedeutend mit verschiedenen Gruppenmittelwerten, akzeptiert.

---

<sup>15</sup> Wasserdampfdruck über Eis (-40 °C/0,13 hPa, -30 °C/0,38 hPa, -20 °C/1,03 hPa)

Die Ermittlung des F-Wertes und des kritischen F-Wertes (SPSS bzw. Excel®) erfolgte basierend auf dem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  [Rudolf und Kuhlisch 2008] zur Limitierung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens des Fehlers 1. Art (falsches Akzeptieren der Alternativhypothese bzw. falsche Ablehnung der Nullhypothese).

Der für die Anzahl der Vergleiche der Gruppenmittelwerte geeignete Tukey-B-Test (SPSS) diente der Identifizierung der signifikant differierenden Faktorstufen.

Voraussetzungen zur Anwendung der einfaktoriellen ANOVA sind neben der Unabhängigkeit der Stichproben die Normalverteilung der Messdaten, die mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests (SPSS) geprüft wurde, sowie die Varianzhomogenität der Gruppen, die durch den Zweistichproben-F-Test (Excel®) untersucht wurde.

Die statistische Auswertung der  $\Delta H$ -Werte und Xanthophyll-Massenkonzentrationen erfolgte basierend auf den Parametern in Tabelle 3-2.

Tab. 3-2: Parameter der statistischen Auswertung der Daten

Testmodell	<i>p-Wert</i>	
	$p > \alpha$ : Akzeptanz von $H_0$	$p < \alpha$ : Ablehnung von $H_0$
<b>Einfaktorielle univariate ANOVA* und Tukey-B-Test</b>	identische Gruppenmittelwerte	verschiedene Gruppenmittelwerte
<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	Normalverteilung	keine Normalverteilung
<b>Zweistichproben-F-Test</b>	Varianzhomogenität	keine Varianzhomogenität

\* oder:  $F < F_{\text{critical}}$ : Akzeptanz von  $H_0$ ;  $F > F_{\text{critical}}$ : Ablehnung von  $H_0$

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Fraktionierung von Eigelb in Plasma und Granula

Zur Untersuchung der Abtrennung der hochmolekularen Granula (Abb. 4-1, rechts) wurde der 1:1 verdünnte Plasma-Überstand (Abb. 4-1, links) in einer Sechsfachbestimmung zentrifugiert (14.972 x g, 45 min, 4 °C). Da der über Differenzwägung ermittelte Anteil an Granula-Sediment nur 2,6 % betrug, gewährleistete die Zentrifugation von Eigelb (14.972 x g, 30 min, 4 °C) eine sorgfältige Trennung von Granula und Plasma.



Abb. 4-1: Verdünnte Plasmafraktion (1:1 destilliertes Wasser; links) und hochmolekulares Granula-Sediment (rechts)

### 4.2 Bestimmung der Trockenmasse (TM)

Neben biodiversitätsbasierten Schwankungen des Wasseranteils in nativem Eigelb verändern Wasserverluste bei der Probenbehandlung die Trockenmasse, wie z. B. bei der geringfügig höheren Trockenmasse von Eigelb nach der Pasteurisation bei Wenzel (2010). Bei der Erhitzung und Gefriertrocknung vermindern Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine das Wasserbindevermögen, was infolge der LDL-Entfaltung bei den ab 77 °C erhitzten Plasma-Proben anhand der separierten Flüssigkeit deutlich wurde. Zudem waren die Wassergehalte durch die Gefriertrocknung verringert. Aufgrund der natürlicherweise und behandlungsbedingt variierenden Wassergehalte der Proben wurden die Xanthophyll-Massenkonzentrationen auf den Trockenmassegehalt normiert.

Mit einem Variationskoeffizienten von 0,4 % zeichnete sich das Trockenmassebestimmungsverfahren [BVL 1991] durch eine hohe Präzision aus. Da der Feststoffanteil von Granula (ca. 44 %) [Anton 2007; Le Denmat *et al.* 1999; Dyer-Hurdon und Nnanna 1993] und Eigelb (ca. 50 %) ähnlich ist, wurden bei der Trockenmassebestimmung der Granula wie bei Eigelb 2 g Probe eingewogen. Die 1:1-Verdünnung, die für die zentrifugale Trennung des Eigelbs notwendig war, wirkte sich auf die Plasmafraktion und damit die Einwaage bei der Trockenmassebestimmung aus. Um Messungenauigkeiten mit zunehmender Probeneinwaage zu minimieren wurden 8 g des wässrig verdünnten Plasmas eingewogen.

Bei den Bio-Eiern wurden für eine Charge Trockenmassen von 46,24 % bei Granula und 26,01 % bei Plasma sowie 51,11 % bei Eigelb ermittelt (Tab. 4-2). Entsprechend der Anteile von Granula (22 %) und Plasma (78 %) in Eigelb [Powrie und Nakai 1986] errechnete sich über das gewichtete Mittel eine Trockenmasse des Plasmas von 52,48 %. Bei einer theoretischen Trockenmasse von 26,24 % des verdünnten Plasmas ergab sich eine gute Übereinstimmung mit dem ermittelten Wert (26,01 % TM), was die Eignung der Einwaagen zur Trockenmassebestimmung bestätigte.

Die Trockenmassen der erhitzten Proben differierten geringfügig in einem Bereich von 0,2 - 1,6 % (Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Trockenmassen [%] nativer und erhitzter Proben von Granula, Plasma und Eigelb

Erhitzung		Trockenmasse [%]					
		Nativ	67 °C	72 °C	77 °C	82 °C	87 °C
Granula	Charge 1	45,44	46,27	46,28	46,07	46,72	47,04
	Charge 2	44,60	45,42	45,75	45,01	45,14	45,52
Plasma	Charge 1	24,27	24,25	24,35	24,34	24,12	24,29
	Charge 2	23,90	23,82	23,89	23,88	24,14	25,30
Eigelb	Charge 1	51,85	51,99	51,47	51,53	52,77	52,53
	Charge 2	51,42	51,23	51,46	51,61	51,78	51,85

Bei den gefriergetrockneten Proben waren die Trockenmassen der beiden untersuchten Chargen nahezu identisch ( $\Delta_{\text{Granula}} = 0,32 \%$ ,  $\Delta_{\text{Plasma}} = 0,21 \%$ ,  $\Delta_{\text{Eigelb}} = 0,58 \%$ ) und lagen im Bereich von 98,57 bis 100,11 % (Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Trockenmassen [%] nativer und gefriergetrockneter Proben von Granula, Plasma und Eigelb

Gefrier-trocknung	Trockenmasse [%]					
	Granula		Plasma		Eigelb	
	Nativ	Gefriergetrocknet	Nativ	Gefriergetrocknet	Nativ	Gefriergetrocknet
Charge 3	45,92	100,11	26,08	99,28	51,24	99,15
Charge 4	46,24	99,79	26,01	99,07	51,11	98,57

Da der Haupttrocknungsabschnitt bei der Gefriertrocknung durch die Sublimation des gefrorenen Wassers charakterisiert ist, korrelieren mit den nicht ausfrierbaren Wasseranteilen, die den Glasübergang widerspiegeln, die maximalen Trockenmassen während dieser Trocknungsphase von 71 % bei Granula, 85 % bei Plasma und 84 % bei Eigelb (Kapitel 2.2.2) [Wakamatu *et al.* 1982]. Höhere Trockenmassen basieren auf der anschließenden Desorption des nicht ausgefrorenen, gebundenen Wasseranteils infolge eines Temperaturanstiegs. Dabei wurden aufgrund der erschwerten Diffusion der Wassermoleküle mit zunehmender Abtrocknung [Roy und Gupta 2004] die Trockenmassen oberhalb von 98 % (Tab. 4-2) erst nach 15 Stunden Gefriertrocknung erreicht.

## 4.3 Bestimmung von Lutein und Zeaxanthin

### 4.3.1 HPLC-PDA-Analyse

#### **Optimierung**

Die selektive Trennung der strukturell ähnlichen all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin war das Effizienzkriterium bei der Optimierung der chromatographischen Trennmethode.

Aufgrund intensiver Wechselwirkungen zwischen den Triacetyl-Resten der stationären Phase und den Polyketten gelingt die Trennung von Carotinoid-Stereoisomeren mit gebundenen C<sub>30</sub>-Phasen, deren Herstellung durch polymere Synthese eine höhere Selektivität als monomere stationäre Phasen gewährleistet [Rodriguez-Amaya 2001; Sander *et al.* 2000]. Da meist Methanol als primäres Lösungsmittel des Eluenten dient und sich in Kombination mit polymeren Phasen hohe Wiederfindungsraten bei Carotinoiden ergeben [Epler und Sander 1992], wurden eine polymere C<sub>30</sub>-Phase und ein methanolbasierter Eluent verwendet. Zur Erhöhung der Elutionsstärke diente in Anlehnung an Wenzel (2010) als Modifier MTBE. Da sich der Modifier neben einer verbesserten Peaksymmetrie auf die Auflösung und Selektivität auswirken kann, war der MTBE-Anteil bei der Elution von Lutein und Zeaxanthin mit 6,5 % gering, wobei zur Verbesserung der Trenneffizienz ein Wasseranteil von 0,5 % diente [Wenzel 2010]. Der Zusatz von 0,1 % Methansäure erhöhte die Protonierung der Xanthophylle in der APCI-Ionenquelle zur Bildung von Molekülonen [M+H]<sup>+</sup> und damit die Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Detektion. Aufgrund der anfänglich isokratischen Zusammensetzung der mobilen Phase war die Elution der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere durch eine hohe Reproduzierbarkeit gekennzeichnet. Entsprechend der Mischbarkeitszahlen [Waters 2004] konnten Entmischungen zwischen dem Extraktionslösungsmittel (Ethanol-Methanol-THF) und dem Eluenten (Methanol-MTBE-H<sub>2</sub>O-CHOOH) ausgeschlossen werden.

Während geringe Flussraten (0,4 und 0,5 mL/min) zu einer nicht ausreichenden Trennung führten, erwies sich eine hohe Flussrate (1,1 mL/min) aufgrund der kürzeren Verweilzeit der Analyten im chromatographischen System und der resultierenden schmalen Peakform und verbesserten Peaksymmetrie für die Trenneffizienz als optimal. Zudem war sie in Bezug auf strömungs- und pumpenbedingte Schwankungen bei der Förderung des Eluenten von Vorteil, was sich im geringen Grundrauschen der Basislinie zeigte. Die Trennung der Isomere von Lutein und Zeaxanthin war bei einer Säulentemperatur von 30 °C optimal. Bei höheren und niedrigeren Temperaturen sank die Auflösung deutlich, und bei 40 °C coeluierten die all-E-Isomere.

Da Carotinoide in organischen Lösungsmitteln für Isomerisierungen und Degradationen, die bereits bei Raumtemperatur auftreten können, anfälliger sind als in der Lebensmittelmatrix [Aman *et al.* 2005; van het Hof *et al.* 1998], wurden die Probenlösungen im Autosampler bei 15 °C temperiert. Tabelle 4-3 zeigt die Analyseparameter der HPLC-Methode.

Tab. 4-3: Analyseparameter der optimierten HPLC-Trennmethode

<b>Stationäre Phase</b>	polymere C <sub>30</sub> -Phase (5 µm, 250 x 4,6 mm, endcapped) mit Vorsäule (10 x 4,0 mm)		
<b>Eluent</b>	A = MeOH/H <sub>2</sub> O/CHOOH; 994:5:1 (v/v/v); B = MTBE/MeOH/CHOOH; 930:69:1 (v/v/v)		
<b>Gradient</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>A:B (v/v)</b>	<b>Flussgeschwindigkeit [mL/min]</b>
	0	93:7	1,1
	15	93:7	0,5
	15 - 20	50:50 (linear)	0,5
	20 -30	50:50	0,5
30 -40	93:7 (linear)	0,5	
<b>Injektionsvolumen</b>	40 µL		
<b>Säulentemperatur</b>	30 °C		

Mit den optimierten Analyseparametern ergab sich die am Beispiel von nativem Eigelb dargestellte Elutionsreihenfolge der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere (Abb. 4-2). Da das Endcapping polare Wechselwirkungen zwischen Silanolgruppen und den Xanthophyllen verringert und dies neben einer verbesserten Peaksymmetrie und Säulenreproduzierbarkeit mit einer verringerten Auflösung einhergehen kann [Khachik 2009], coeluierten all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin zugunsten einer erhöhten Selektivität bei den Z-Isomeren [Glaser 2001]. Daher wurde keine Basislinientrennung bei der Elution der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin erreicht. Die analytische Berücksichtigung des nach ca. 33 min ähnlich wie bei Breithaupt *et al.* (2003) (27 min, Methanol-MTBE-H<sub>2</sub>O-Eluent) eluierenden β-Carotins (Anhang 2, Abb. 1a) gewährleistete die Elution unpolarer Probenbestandteile und die Säulenconditionierung und Reequilibrierung vor der nächsten Probeninjektion.

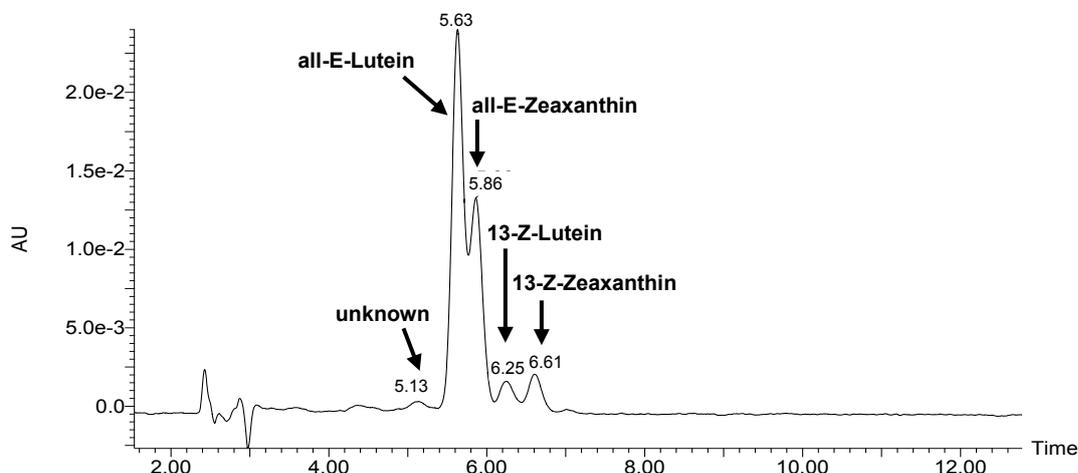


Abb. 4-2: Elution der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bei nativem Eigelb  
60

Die auf dem Lambert-Beer-Gesetz basierende Quantifizierung setzt eine lineare, proportionale Korrelation zwischen der Absorption am Absorptionsmaximum und der Konzentration voraus. Die Linearitätsüberprüfung der HPLC-PDA-Analyse-Methode zur Festlegung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und des Kalibrierbereichs war daher die Basis für die Quantifizierung der Xanthophylle. Aufgrund des ähnlichen, leicht hypsochrom verschobenen Chromophors von Lutein konnte am selben Absorptionsmaximum wie bei Zeaxanthin gemessen werden. Entsprechend der lösungsmittelabhängigen Absorptionsmaxima und der bei 450 nm bestimmten Reinheit der Standards von all-Lutein und all-E-Zeaxanthin [ChromaDex 2011] erfolgte die quantitative Bestimmung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin anhand der Absorption bei 450 nm. Nach Herstellerangaben des PDA-Detektors sind bei Absorptionen unterhalb 1 AU wie bei den vorliegenden Messungen geringfügige Abweichungen zur Linearität des Lambert-Beer-Gesetzes zu erwarten [Waters 2011].

### **Linearität**

Mit zunehmender Konzentration von Lutein und Zeaxanthin stieg die anhand der Peakfläche und Peakhöhe erkennbare Absorptionsintensität bei 450 nm. Die gute Interdependenz zeigte sich durch die für die Peakfläche und die Peakhöhe vergleichbar hohen Korrelationskoeffizienten ( $r > 0,999$ ). Das positive Steigungsmaß der linearen Regression war bei den Peakhöhen bei beiden all-E-Isomeren höher als bei den Peakflächen, weshalb die Auswertung über die Peakhöhen eine höhere Empfindlichkeit der Analyse-Methode gewährleistete. Die geringen Verfahrensvariationskoeffizienten belegten eine hohe Güte und Robustheit der linearen Regression, wobei sich die Auswertung über die Peakhöhe, besonders für all-E-Lutein, erneut als günstiger erwies. (Tab. 4-4)

Tab. 4-4: Steigung, Verfahrensvariationskoeffizient und Geradengleichung der linearen Regression von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin bei Auswertung von Peakfläche und Peakhöhe

Linearität (0,02 - 20,00 µg/mL )						
	Peakfläche			Peakhöhe		
	<i>m</i>	<i>V<sub>xo</sub></i> [%]	Lineare Regression	<i>m</i>	<i>V<sub>xo</sub></i> [%]	Lineare Regression
<b>Lutein</b>	5.992,3	1,60	$y = 5.992,3 \cdot x + 374,3$	28.780,9	0,56	$y = 28.780,9 \cdot x - 1.361,7$
<b>Zeaxanthin</b>	9.432,6	1,77	$y = 9.432,6 \cdot x - 586,2$	40.954,3	1,60	$y = 40.954,3 \cdot x - 1.357,4$

Innerhalb des Konzentrationsbereichs von 0,02 - 20,00 µg/mL war die Linearität der Absorption von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin bei 450 nm mit hoher Empfindlichkeit, Güte und Robustheit und damit die Eignung der HPLC-PDA-Analyse-Methode zur Quantifizierung der Xanthophylle gewährleistet. Aufgrund des höheren Steigungsmaßes und der geringeren Verfahrensvariationskoeffizienten sowie unter Berücksichtigung der partiellen Überlappung der chromatographischen Profile der Isomere von Lutein und Zeaxanthin (Abb. 4-2) erwies sich die Auswertung über die Peakhöhen wie bei Wenzel (2010) als günstiger.

### Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD, LOQ)

Anhand der gemittelten drei höchsten Peakhöhen des Grundrauschens im Elutionsbereich der Xanthophylle (134 counts) wurden LOD (402 counts) und LOQ (1340 counts) ermittelt. Die mit der Regressionsgeraden der Peakhöhen berechneten Konzentrationen für all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin zeigten eine hohe Übereinstimmung mit LOD und LOQ von Wenzel *et al.* (2010) (Tab. 4-5), der LOD und LOQ mit dem gleichen Gerät bei ähnlichen Analyseparametern ebenfalls über das Signal-Rauschverhältnis ermittelte. Das von Breithaupt *et al.* (2003) bei ähnlichen Analysebedingungen für Lutein und Zeaxanthin nach dem Eichkurvenverfahren [DFG 1991] ermittelte LOD ( $11,4 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/mL}$ ) war ebenfalls vergleichbar.

Tab. 4-5: LOD und LOQ von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin im Vergleich zu Wenzel *et al.* (2010)

	LOD [ $\mu\text{g/mL}$ ]		LOQ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	
	HPLC-PDA-Analyse	Wenzel <i>et al.</i> (2010)	HPLC-PDA-Analyse	Wenzel <i>et al.</i> (2010)
Lutein	$15,3 \cdot 10^{-3}$	$13,9 \cdot 10^{-3}$	$52,8 \cdot 10^{-3}$	$46,4 \cdot 10^{-3}$
Zeaxanthin	$10,3 \cdot 10^{-3}$	$10,1 \cdot 10^{-3}$	$39,7 \cdot 10^{-3}$	$33,7 \cdot 10^{-3}$

### Kalibrierung

Da eine Quantifizierung nur oberhalb der Bestimmungsgrenze möglich ist, wurde die untere Grenze des Kalibrierbereichs basierend auf dem LOQ von Lutein (Tab. 4-5) auf  $0,10 \mu\text{g/mL}$  festgelegt. Vorversuche ergaben Konzentrationen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin im Bereich von  $0,57 - 1,65 \mu\text{g/mL}$  in nativem Eigelb. Zur Absicherung höherer Konzentrationen wurde die höchste Kalibrierkonzentration bei erhitzten Proben auf  $2,50 \mu\text{g/mL}$  und bei gefriergetrockneten aufgrund der höheren Trockenmassen auf  $5,00 \mu\text{g/mL}$  festgelegt. Die 5-Punkt-Kalibrierung zur Bestimmung der Xanthophyll-Gehalte in den erhitzten Proben umfasste daher den Konzentrationsbereich zwischen  $0,10 - 2,50 \mu\text{g/mL}$  (Abb. 4-3), während für die gefriergetrockneten Proben eine 6-Punkt-Kalibrierung ( $0,10 - 5,00 \mu\text{g/mL}$ ) vorgenommen wurde (Anhang 2, Tab. 1b-2).

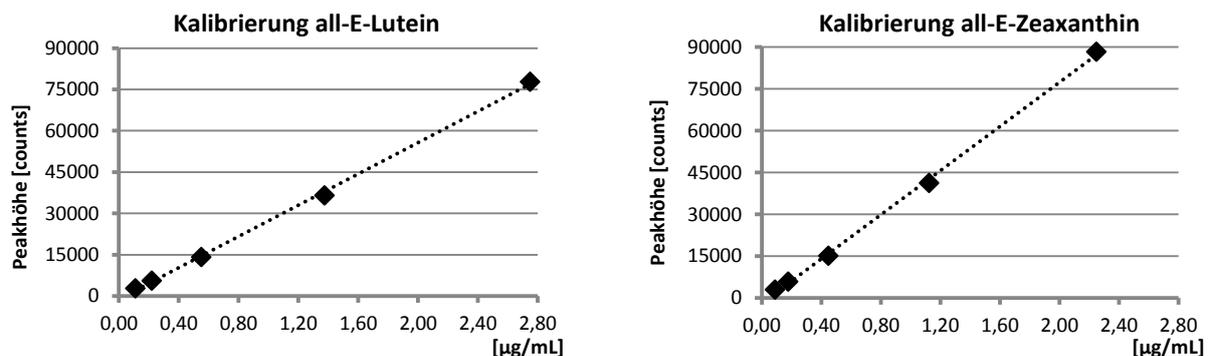


Abb. 4-3: 5-Punkt-Kalibrierung ( $0,10 - 2,50 \mu\text{g/mL}$ ) der all-E-Isomere von Lutein und Zeaxanthin

Da die mittleren und damit am häufigsten erwarteten Konzentrationen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin des in Vorversuchen untersuchten nativen Eigelbs ( $\bar{X}_{\text{all-E-Lutein}}$ : 1,05  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\bar{X}_{\text{all-E-Zeaxanthin}}$ : 0,78  $\mu\text{g/mL}$ ) im mittleren Kalibrierbereich (0,50 bis 1,25  $\mu\text{g/mL}$ ) lagen, war von einer hohen Präzision der Messergebnisse auszugehen [Gottwald und Stieglitz 1996].

Da für geometrische Isomere die Extinktionskoeffizienten häufig unbekannt sind, erfolgte die Quantifizierung der 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin wie bei Wenzel (2010) über die Kalibriergerade des jeweiligen all-E-Isomers, wobei eine systematische Über- oder Unterschätzung in Kauf genommen wird.

#### 4.3.2 Extraktion

Bei der *Solid Phase Extraction* (SPE) ist die Retention von Lutein mit einer  $C_{18}$ -Phase stärker als bei einer  $C_{30}$ -Phase, die hydrophobere Eigenschaften aufweist [Shen *et al.* 2009]. Auch Glaser (2001) verwendet zur Extraktion von Lutein und Zeaxanthin aus Spinat und Retina bei der MSPD eine  $C_{18}$ -Phase als Sorbens. Die Probenaufbereitung zur Extraktion der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere aus Eigelb mittels MSPD erfolgte daher unter Verwendung einer  $C_{18}$ -Phase. Die SPE-Methode wurde nicht getestet, da sie bei der Extraktion von Lutein aus Humanserum und Muttermilch nach Shen *et al.* (2009) keine Vorteile gegenüber der Flüssig-Flüssig-Extraktion bieten soll. Die geringen Wiederfindungsraten von all-E-Lutein (WR = 77,55 %) und all-E-Zeaxanthin (WR = 52,39 %), die verschobenen Retentionszeiten bei der HPLC-PDA-Analyse sowie das hochpreisige Sorbensmaterial bedingten, dass die MSPD-Extraktionsmethode nicht weiter optimiert wurde.

Die Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Wenzel (2010) erfolgte zunächst durch Variation des Lösungsmittelgemischs unter Ultraschallbehandlung (1 min). Letztere verbessert den Matrixaufschluss, die Vermischung von Extraktionslösungsmittel und Probe und damit die Extraktionseffizienz. Bei der Extraktion von Lutein aus Eigelb mittels Hexan ist die Extraktionseffizienz bei Ultraschallanwendung daher um den Faktor 3,6 höher [Yue *et al.* 2006]. Ebenso führt die Ultraschallanwendung (1 min) bei der Extraktion von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin aus Eigelb mittels Methanol zu einer höheren Ausbeute als eine einmalige oder zweimalige Extraktion ohne Ultraschallbehandlung [Wenzel 2010]. Im Vergleich zum Matrixaufschluss durch Verseifung unter dem Einfluss von Erhitzung und alkalischen Chemikalien ist das Ausmaß aufbereitungsinduzierter Isomerisierungen und Degradationen der Carotinoide bei der Ultraschallbehandlung geringer. Bei der Extraktion von Lutein aus Eigelb mittels Hexan ist die Ausbeute bei Ultraschallanwendung daher um den Faktor 3,6 und bei Verseifung nur 2,6-mal höher [Yue *et al.* 2006].

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Kapitel 3.5.2) erfolgte mit fünf, nach Literaturangaben zur Extraktion von Lutein und Zeaxanthin [Hammershoj *et al.* 2010; Wenzel 2010; Schlatterer und Breithaupt 2006; Breithaupt *et al.* 2003; Handelmann *et al.* 1999; Majchrzak und Elmadfa 1997; Ternes *et al.* 1995] modifizierten Lösungsmittelgemischen (Tab. 4-6). Aufgrund des ca. 50 %igen Wasseranteils von Eigelb enthielten die Lösungsmittelgemische zur Verbesserung der Extraktionseffizienz mindestens ein wassermischbares organisches Lösungsmittel [Khachick 2009; Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]. Entsprechend der Mischbarkeitszahlen [Waters 2004] konnten Entmischungen dabei ausgeschlossen werden.

Die höchsten, innerhalb des Sollbereichs (95 - 105 %) [Kromidas 1999] liegenden Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin ergaben sich bei Einsatz des Methanol-MTBE-Gemischs. Bei Verwendung des Ethanol-Methanol-THF-Gemischs war die Wiederfindungsrate von all-E-Zeaxanthin (92,8 %) im Gegensatz zu all-E-Lutein (97,3 %) zu gering. Neben der Kompatibilität mit dem HPLC-Eluenten gewährleisteten die beiden Lösungsmittelgemische bei der chromatographischen Trennung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin eine hohe Selektivität. Die anderen Lösungsmittelgemische eigneten sich aufgrund deutlich geringerer Wiederfindungsraten nicht zur quantitativen Extraktion der dotierten Standards von all-E-Lutein- und all-E-Zeaxanthin. Im Falle des n-Hexan/THF-Gemischs könnte dies auf die Unmischbarkeit mit dem Eluenten zurückzuführen sein. Bei den Methanol-Ethylacetat-Leichtpetroleumether- und  $\text{CHCl}_3$ /Methanol-Gemischen war die Selektivität bei der chromatographischen Elution der Xanthophylle geringer als bei den Methanol-MTBE- und Ethanol-Methanol-THF-Gemischen. (Tab. 4-6)

Tab. 4-6: Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion durch Variation des Extraktionslösungsmittels und der Ultraschallbehandlungszeit unter Bestimmung der Wiederfindungsraten von Lutein und Zeaxanthin

Ultraschall-behandlungszeit	Extraktionslösungsmittel	Wiederfindungsrate [%]	
		Lutein	Zeaxanthin
1 min	MeOH/MTBE (80:20, v/v)	98,8	96,9
	$\text{CHCl}_3$ /MeOH (60:40, v/v)	64,6	50,2
	n-Hexan/THF (90:10, v/v)	17,3	17,2
	MeOH/Ethylacetat/Leichtpetroleumether (1:1:1, v/v/v)	47,9	41,1
	EtOH/MeOH/THF (75:20:5, v/v/v)	97,3	92,8
2 min	MeOH/MTBE (80:20, v/v)	101,9	99,4
	EtOH/MeOH/THF (75:20:5, v/v/v)	97,3	95,3
3 min	EtOH/MeOH/THF (75:20:5, v/v/v)	99,4	99,6

Neben einer erhöhten Extraktionseffizienz sind mit Zunahme der Intensität der Ultraschallbehandlung mögliche Isomerisierungen und Degradationen der Xanthophylle zu berücksichtigen [Zhao *et al.* 2006]. Zur Erhaltung des nativen bzw. durch Erhitzung und Gefriertrocknung veränderten qualitativen und quantitativen Xanthophyll-Musters in den Proben wurde daher die Ultraschallbehandlungszeit optimiert.

Die Extraktion nativen Eigelbs mit den Methanol-MTBE- und Ethanol-Methanol-THF-Gemischen unter Verdoppelung der Ultraschallbehandlungszeit (2 min) resultierte erneut in höheren Wiederfindungsraten bei Verwendung des Methanol-MTBE-Gemischs. Dabei waren die Wiederfindungsraten bei beiden Lösungsmittelgemischen im Sollbereich und für all-E-Zeaxanthin um gemittelt 2,5 % höher im Vergleich zur Ultraschallbehandlung für eine Minute. Für all-E-Lutein ergab sich eine identische Wiederfindungsrate beim Ethanol-Methanol-THF-Gemisch und eine um 3,1 % höhere Wiederfindungsrate beim Methanol-MTBE-Gemisch. Demnach schien die längere Ultraschallbehandlung die Extraktionseffizienz der Xanthophylle zu verbessern. (Tab. 4-6)

Daher und aufgrund der besseren Löslichkeit von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin wurde eine Probenaufbereitung mit dem Ethanol-Methanol-THF-Gemisch mit einer Ultraschallbehandlung von drei Minuten durchgeführt. Dies erhöhte erneut die Extraktionseffizienz, denn die Wiederfindungsraten waren gegenüber der Ultraschallbehandlung von zwei Minuten um 2,1 % bei all-E-Lutein und 4,3 % bei all-E-Zeaxanthin höher (Tab. 4-6). Es ist also davon auszugehen, dass ultraschallinduzierte Isomerisierungen und Degradationen der Xanthophylle unter diesen Bedingungen vernachlässigbar sind. Mit Wiederfindungsraten oberhalb von 99 % erwies sich die nach Wenzel (2010) modifizierte Bestimmungsmethode, welche die Extraktion und die HPLC-PDA-Analytik umfasste (Abb. 4-4), als optimal.

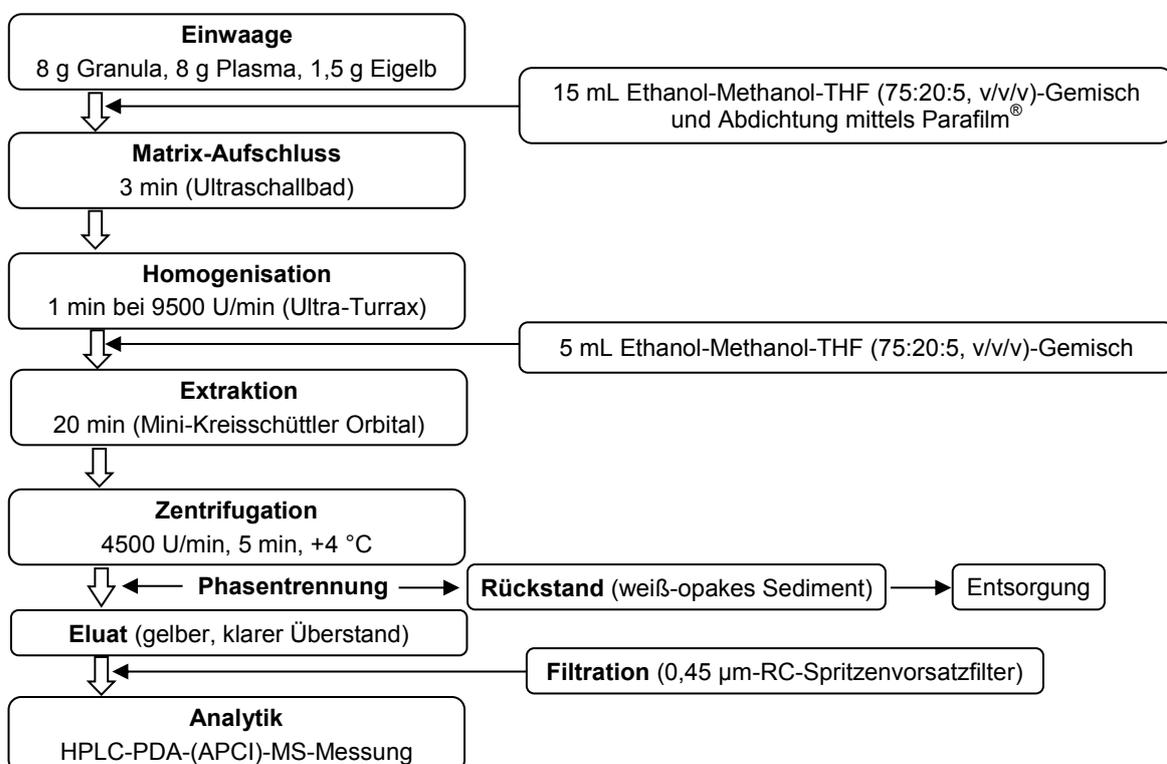


Abb. 4-4: Probenaufbereitung und -analyse zur Bestimmung der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Granula, Plasma und Eigelb

Im Vergleich zu den mit Methanol bei Ultraschallbehandlung für eine Minute erreichten Wiederfindungsraten bei all-E-Lutein (95,3 %) und all-E-Zeaxanthin (95,0 %) von Wenzel (2010) ergaben sich durch die Extraktion mit dem Ethanol-Methanol-THF-Gemisch und die längere Ultraschallbehandlungszeit von drei Minuten um 4,1 % bei all-E-Lutein und um 4,6 % bei all-E-Zeaxanthin höhere Wiederfindungsraten.

Mit den Probeneinwaagen von Granula (8 g), Plasma (8 g) und Eigelb (1,5 g; Abb. 4-4) korrelierten Konzentrationen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin, deren UV-Vis-Absorptionen im mittleren Kalibrierbereich (0,50 bis 1,25 µg/mL) liegende Signalhöhen [counts] ergaben, was eine hohe Präzision der Messergebnisse bedeutet [Gottwald und Stieglitz 1996].

Das nach der Extraktion nativen Eigelbs abzentrifugierte weiß-opake Sediment aus Zellbestandteilen und denaturierten Proteinen wies auf eine quantitative Extraktion der dotierten Standards und des matrixassoziierten Luteins und Zeaxanthins hin. Die gelben Sedimente nativer Plasma- und Granula-Proben sowie einiger erhitzter und gefriergetrockneter Proben zeigten, dass eine Reextraktion notwendig war (Abb. 4-4). Dies beeinträchtigte jedoch die anhand der Linearität (Kapitel 4.3.1) sowie der Wiederfindung und Präzision (Kapitel 4.3.3) nachgewiesene Eignung der Bestimmungsmethode nicht, da vor allem matrixspezifische Eigenschaften und deren erhitzungs- und gefriertrocknungsinduzierte Modifikationen die Xanthophyll-Extrahierbarkeit beeinflussen. Die Extraktionseffizienz korreliert mit dem Wasseranteil der Proben. Deshalb war bei Eigelb und Granula mit ähnlichen nativen Trockenmassen eine zweimalige Extraktion bis zur Entfärbung der Sedimente ausreichend, während bei Plasma, das nativ aufgrund der methodisch bedingten Verdünnung eine ca. um den Faktor zwei geringere Trockenmasse aufweist, eine dreimalige Extraktion nötig war.

Mit den Xanthophyll-Massenkonzentrationen von Plasma und Granula wurden diejenigen nativen Eigelbs über das gewichtete Mittel berechnet und mit den ermittelten Werten verglichen. Dabei ergab sich eine maximale Differenz von ca. 10 % (Anhang 2, Tab. 2-1). Die Messergebnisse schwankten gemäß der Methodenpräzision um ca. 2 % (Kapitel 4.3.3). Zudem beeinflussen die Matrixeigenschaften (Viskosität, Wassergehalt) von Granula, Plasma und Eigelb die Extraktionseffizienz. Die entsprechend der in der Umweltanalytik erlaubten Variationskoeffizienten (10 - 15 %) [Kromidas 1999] daher vertretbare Abweichung der berechneten und ermittelten Xanthophyll-Gehalte bestätigte die Eignung der mit nativem Eigelb optimierten Bestimmungsmethode für Plasma und Granula.

### 4.3.3 Richtigkeit und Wiederholpräzision der Bestimmungsmethode

Die Untersuchung der Probenextrakte aus dotiertem nativem Eigelb diente der Erfassung von Matrix- sowie Aufbereitungs- und Analyse-Einflüssen auf die Richtigkeit der Bestimmungsmethode bei der Ermittlung der Massenkonzentrationen der Xanthophylle.

Da im Handel kein Eigelb-Referenzmaterial verfügbar war und sich die dotierten Standards von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin gegenüber ihrem matrixassoziierten Pendant bei der Extraktion anders verhalten, war die Wiederfindungsrate kein Maß für die Extrahierbarkeit der nativen Eigelb-Xanthophylle.

Unter der Maßgabe, dass die Wiederfindungsrate mit der Konzentration des Analyten korreliert [Kromidas 1999], wurde natives Eigelb in je einer Dreifachbestimmung mit 0,1 und 0,25 mL der Stammlösung (100 µg/mL) von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin nach der Zugabe des Extraktionslösungsmittels zur Einwaage aufgestockt. Unter Berücksichtigung des Probenvolumens von 20 mL ergaben sich die dotierten Konzentrationen von 0,50 und 1,25 µg/mL, was den mittleren Kalibrierbereich abdeckte. Die Soll-Konzentrationen [µg/mL] an all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin in der aufgestockten Probe errechneten sich aus den bestimmten Konzentrationen der unaufgestockten Proben, zu denen die jeweilige Dotierkonzentration addiert wurde. Die berechneten Soll-Massenkonzentrationen [µg/100 g] an all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin (Kapitel 4.3.5) wurden zur Bestimmung der Wiederfindungsrate mit den in den aufgestockten Proben analysierten Xanthophyll-Gehalten prozentual in Relation gesetzt.

Das Extraktionsverfahren (Abb. 4-4) und die HPLC-PDA-Analyse-Methode zeichneten sich durch hohe Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin oberhalb von 99 und unterhalb von 102 % aus. Bezogen auf die jeweilige Aufstockungskonzentration waren die Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin identisch. Bei höherer Dotierung (1,25 µg/mL) waren die Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin gemittelt um 1,9 % geringer als bei der Dotierung mit 0,50 µg/mL. (Tab. 4-7)

Tab. 4-7: Konzentrationsabhängige Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin

Aufstockung	Wiederfindungsrate WR [%]	
	<i>all-E-Lutein</i>	<i>all-E-Zeaxanthin</i>
0,50 µg/mL	101,2	101,3
1,25 µg/mL	99,5	99,3

Die innerhalb des Sollbereichs (95 bis 105 %) liegenden Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin waren ein Nachweis für die Richtigkeit, Robustheit und Selektivität der Bestimmungsmethode [Kromidas 1999].

Das Extraktionsverfahren und die HPLC-PDA-Analyse sowie mögliche Matrixeinflüsse gewährleisten damit ein geringes Ausmaß an Verlusten der dotierten Standards von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin durch die Probenaufbereitung sowie Isomerisierungen und Degradationen der Xanthophylle.

Da die Richtigkeit nicht gleichzeitig präzise Messergebnisse gewährleistet [Kromidas 1999; Gottwald und Stieglitz 1996], wurde die Bestimmungsmethode hinsichtlich ihrer Präzision validiert, die ebenfalls mit der Analytkonzentration korreliert. Daher wurden zur Bestimmung der Messpräzision des Analyse-Systems die den mittleren Kalibrierbereich umfassenden beiden Konzentrationen an all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin (0,50 und 1,25 µg/mL) je sechsmal analysiert und die Variationskoeffizienten der Peakhöhen [counts] berechnet. Anhand der bei der Überprüfung der Richtigkeit sechsfach bestimmten Massenkonzentrationen an all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin [µg/100 g] in nativem Eigelb wurden die Variationskoeffizienten der Methodenpräzision des Extraktionsverfahrens und der HPLC-PDA-Analyse ermittelt. Dabei waren die Peakhöhen und Massenkonzentrationen bei  $\alpha = 0,05$  normalverteilt (David-Test) und ausreißerfrei (Dixon-Test). (Tab. 4-8)

Tab. 4-8: Variationskoeffizienten [%] der Mess- und Methodenpräzision (Wiederholbarkeit) von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin (Sechsfachbestimmung)

	Variationskoeffizient $V_k$ [%]		
	Messpräzision		Methodenpräzision
	0,50 µg/mL	1,25 µg/mL	
<b><i>all-E-Lutein</i></b>	1,4	1,5	2,3
<b><i>all-E-Zeaxanthin</i></b>	1,5	1,6	2,0

Die bei beiden Konzentrationen und bei beiden all-E-Isomeren ähnlichen Variationskoeffizienten der Messpräzision basierten auf zufälligen Schwankungen der HPLC-PDA-Analyse. Aufgrund der zusätzlichen Einflüsse durch die Eigelbmatrix und das Extraktionsverfahren waren die erneut bei beiden all-E-Isomeren ähnlichen Variationskoeffizienten der Methodenpräzision höher. (Tab. 4-8)

Nach den in der Pharma-Qualitätskontrolle (1 - 2 %) und der Umweltanalytik (10 - 15 %) erlaubten Variationskoeffizienten der Methodenpräzision [Kromidas 1999] war die zufällige Streuung der Messwerte bei all-E-Lutein (2,3 %) und bei all-E-Zeaxanthin (2,0 %; Tab. 4-8) und damit die Störanfälligkeit der Bestimmungsmethode gering. Dies gewährleistet eine präzise und robuste Ermittlung der Xanthophyll-Massenkonzentrationen.

#### 4.3.4 Identifizierung von Lutein und Zeaxanthin

Carotinoide mit ähnlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften wie Stereoisomere können gleichzeitig eluieren. Die UV-Vis-Absorptionsspektren repräsentieren ausschließlich das bei Lutein und Zeaxanthin ähnliche Chromophor des Moleküls [Britton 1995]. Coeluierende Matrixbestandteile können die Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Analyse von Analyten, die in geringen Konzentrationen enthalten sind, vermindern [Dachtler 2000]. Aus diesen Gründen basierte die Identifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin auf der Überprüfung des chromatographischen, spektralphotometrischen und massenspektrometrischen Verhaltens [Rodriguez-Amaya 2001].

#### Chromatographisches Verhalten

Aufgrund der identischen gerätetechnischen Ausstattung und chromatographischen Bedingungen hinsichtlich der verwendeten  $C_{30}$ -Säule mit Endcapping und der Eluentenzusammensetzung stimmten die Elutionsreihenfolge und die korrelierenden Retentionszeiten der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin (Abb. 4-5) mit Wenzel (2010) überein (Abb. 4-6, links). Dabei eluierte all-E-Lutein vor all-E-Zeaxanthin, was gleichermaßen für die anschließend detektierten 13-Z-Isomere galt (Abb. 4-5).

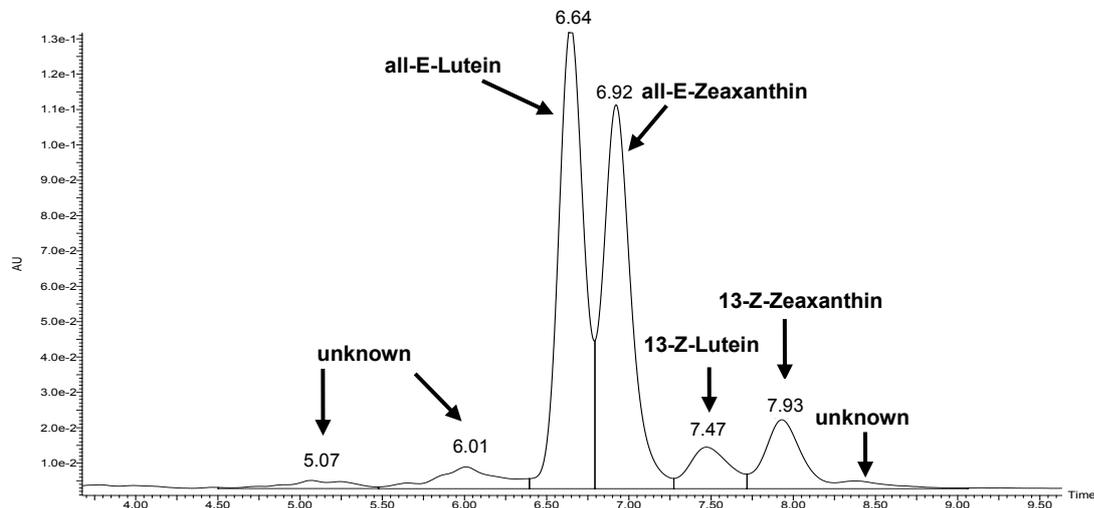


Abb. 4-5: Elutionsreihenfolge der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin am Beispiel von gefriergetrocknetem Plasma

Zusätzlich bestätigte sich die Elutionsreihenfolge bei einem Vergleich mit Glaser (2001). Bei dieser Trennung eines Lutein-Zeaxanthin-Standardgemischs auf einer  $C_{30}$ -Säule mit Endcapping eluieren die Z-Isomere nach den all-E-Isomeren, die 13-Z-Isomere vor den 9-Z-Isomeren und das jeweilige Lutein-Isomer vor dem Zeaxanthin-Isomer (Abb. 4-6, rechts).

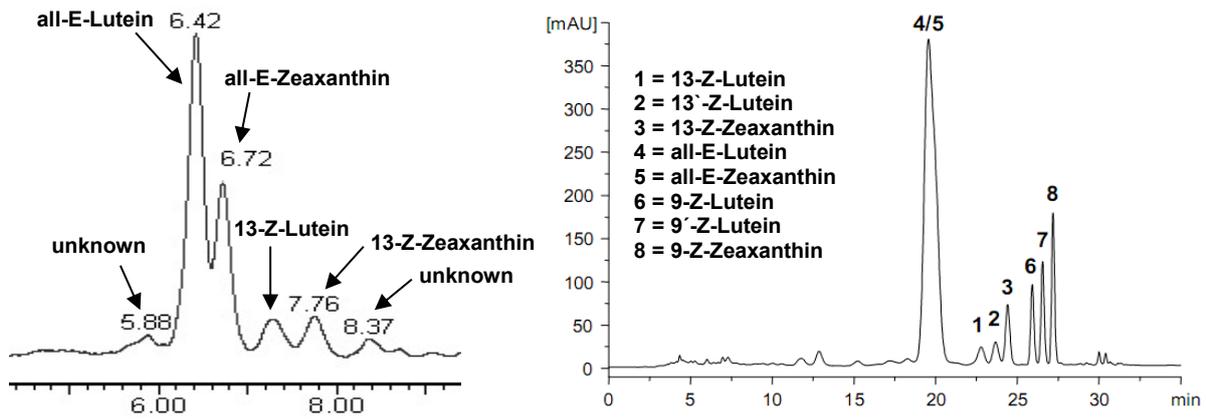


Abb. 4-6: Elution der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere auf einer C<sub>30</sub>-Phase mit Endcapping – Chromatogrammausschnitt einer sprühgetrockneten Eigelbprobe (links) [Wenzel 2010]; Standardgemisch von Lutein und Zeaxanthin (rechts) [Glaser 2001]

Zur Erfassung von Matrixeinflüssen auf die chromatographische Trennung der Xanthophylle wurden die Retentionszeiten der beiden all-E-Isomere von Lutein und Zeaxanthin unter Einfluss von Eigelbmatrix (Probenextrakte) mit denen der Standards (Kalibrierlösung) verglichen. Weder im Rahmen der Spannweiten ( $R_{T,min}$  bis  $R_{T,max}$ ) noch bei den gemittelten Retentionszeiten der beiden all-E-Isomere ergab sich ein Unterschied zwischen den Kalibrierlösungen und den Probenextrakten (Tab. 4-9).

Tab. 4-9: Vergleich der Retentionszeiten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin in einer Kalibrierlösung und unter Einfluss von Eigelbmatrix (Probenextrakt)

all-E-Isomer	Retentionszeit $R_T$ [min]	
	Kalibrierlösung	Eigelbmatrix (Probenextrakt)
Lutein	$\bar{X} = 5.81$ $R_{T,min} = 5.66 / R_{T,max} = 5.84$	$\bar{X} = 5.77$ $R_{T,min} = 5.60 / R_{T,max} = 5.92$
Zeaxanthin	$\bar{X} = 6.06$ $R_{T,min} = 5.89 / R_{T,max} = 6.09$	$\bar{X} = 6.01$ $R_{T,min} = 5.84 / R_{T,max} = 6.17$

Zudem wurde natives Eigelb mit den Standards von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin aufgestockt. Bei der chromatographischen Trennung nahmen die Peakhöhen im Verhältnis zur Aufstockung ohne Auftrennung zu, und die Retentionszeiten korrelierten mit denen der Standards.

Die Chromatogramme separater Standardlösungen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin (Anhang 2, Abb. 3a) bestätigten die Elutionsreihenfolge und die Identifizierung der Xanthophylle anhand der Retentionszeiten.

Da die Eigelbmatrix keinen Einfluss auf die Elution der Xanthophylle hatte, eignen sich die charakteristischen Retentionszeiten der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bei den beschriebenen chromatographischen Bedingungen zur Identifizierung.

Unterschiedliche Partikelgrößenverteilungen und Porendurchmesser und damit für den Adsorptionsprozess bei der chromatographischen Trennung verfügbare Oberflächen der stationären Phase beeinflussen die Anzahl theoretischer Trennstufen. Letztere ist daher selbst bei gleicher Säulenart desselben Herstellers säulenspezifisch. Geringe Unterschiede in den Retentionszeiten der Xanthophylle können daher durch einen Säulenwechsel bedingt sein.

Aufgrund der spezifischen Eigenschaften chromatographischer Systeme sind von anderen Autoren beschriebene Elutionssequenzen zu überprüfen [Khachik 2009]. Trotz der Übereinstimmung der Elutionsreihenfolge mit der bei Wenzel (2010) und Glaser (2001) und der Bestätigung anhand des Retentionszeitenvergleichs mit den Standards, wurden zur Absicherung der Identifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin die UV-Vis-Absorptions- und APCI-Massenspektren interpretiert.

### UV-Vis-Spektralphotometrie

Die Interpretation der am Peakmaximum betrachteten Absorptionsspektren der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin basierte auf einem Vergleich der Absorptionsmaxima I, II und III der Hauptabsorptionsbande, der Schwingungsfeinstruktur und bei den 13-Z-Isomeren der Z-Bande mit Literaturwerten. Gemäß den Absorptionsspektren der Standards von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin (Abb. 4-7) waren die Absorptionsmaxima bei all-E-Lutein aufgrund der isolierten Doppelbindung des  $\epsilon$ -Rings und der damit verringerten Chromophorlänge um 8 nm (I), 7 nm (II) und 4 nm (III) gegenüber all-E-Zeaxanthin hypsochrom verschoben.

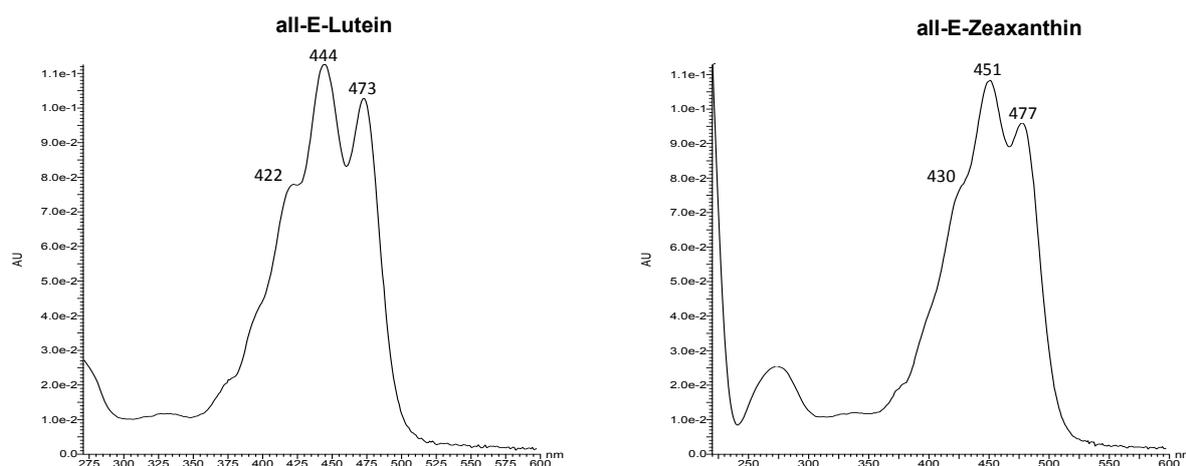


Abb. 4-7: Standardsubstanzen – Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (422/444/473) mit Schwingungsfinstruktur (64 %III/II) von all-E-Lutein (links) und Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (430/451/477) mit Schwingungsfinstruktur (38 %III/II) von all-E-Zeaxanthin (rechts)

Da die Eluentenzusammensetzung an Wenzel (2010), Schlatterer und Breithaupt (2006) sowie Breithaupt *et al.* (2003) angelehnt war, sind die Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande der all-E-Isomere von Lutein und Zeaxanthin vergleichbar (Tab. 4-10). Die Angaben von Glaser (2001) basieren auf Messungen in Aceton-Wasser-Gemischen, die zu bathochromen Verschiebungen der Absorptionsmaxima um 2 bis 6 nm führen [Britton 1995]. Daher ergaben sich gegenüber Glaser (2001) hypsochrome Wellenlängenverschiebungen der Absorptionsmaxima von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin zwischen 0 und 4 nm.

Tab. 4-10: Literaturwerte der Absorptionsmaxima I/II/III der Hauptabsorptionsbande sowie der Schwingungsfeinstruktur (%III/II) der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin

Isomer	Absorptionsmaxima I/II/III der Hauptabsorptionsbande [nm]				Schwingungsfeinstruktur [%III/II]	
	Wenzel (2010)	Schlatterer und Breithaupt (2006)	Breithaupt <i>et al.</i> (2003)	Glaser (2001)	Wenzel (2010)	Glaser (2001)
all-E-Lutein	420/443/474	420/446/472	420/446/474	426/447/476	61	61
13-Z-Lutein	417/441/472	/	/	422/441/468	30	30
all-E-Zeaxanthin	420/446/475	426/452/478	428/452/480	430/454/481	23	24
13-Z-Zeaxanthin	416/442/473	/	/	426/447/474	11	12

Mit 64 %III/II war die Schwingungsfeinstruktur des asymmetrischen all-E-Luteinmoleküls ausgeprägter als bei all-E-Zeaxanthin (38 %III/II; Abb. 4-7), was auf der symmetrischen Grundstruktur von Zeaxanthin und der damit beidseitigen sterischen Hinderung zwischen dem Methylsubstituenten am C<sub>5</sub>-Atom des  $\beta$ -Rings und dem H-Atom am C<sub>8</sub>-Atom der Kette basiert. Auch bei Wenzel (2010) und Glaser (2001) ist das Höhenverhältnis des dritten und zweiten Absorptionsmaximums bei all-E-Zeaxanthin mit 23 und 24 % geringer als bei all-E-Lutein mit 61 % (Tab. 4-10), wobei die ermittelte Schwingungsfeinstruktur von all-E-Lutein (64 %III/II) mit diesen Literaturwerten übereinstimmte.

Zur Identifizierung der 13-Z-Isomere wurden separate Stammlösungen (100  $\mu$ g/mL) der Standards von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin gemessen, wobei es konzentrationsbedingt zur retardierten Elution der Isomere kam (Abb. 4-8). Wie bei den all-E-Isomeren waren die Absorptionsmaxima bei 13-Z-Lutein gegenüber 13-Z-Zeaxanthin hypsochrom um 9 nm (I), 5 nm (II) und 1 nm (III) verschoben, und die Schwingungsfeinstruktur von 13-Z-Lutein (36 %III/II) war ausgeprägter als die von 13-Z-Zeaxanthin (16 %III/II; Abb. 4-8). Im Vergleich zu ihren all-E-Konfigurationen ergaben sich hypsochrome Verschiebungen von 10 nm (I), 4 nm (II) und 3 nm (III) bei 13-Z-Lutein und 9 nm (I), 6 nm (II) und 6 nm (III) bei 13-Z-Zeaxanthin (Abb. 4-7 und 4-8). In Bezug auf das Absorptionsmaximum II ( $\lambda_{\max}$ ) stimmte dies mit der Literaturangabe zu dessen hypsochromer Verschiebung bei den mono-Z-Isomeren zwischen 2 und 6 nm überein [Britton 1995].

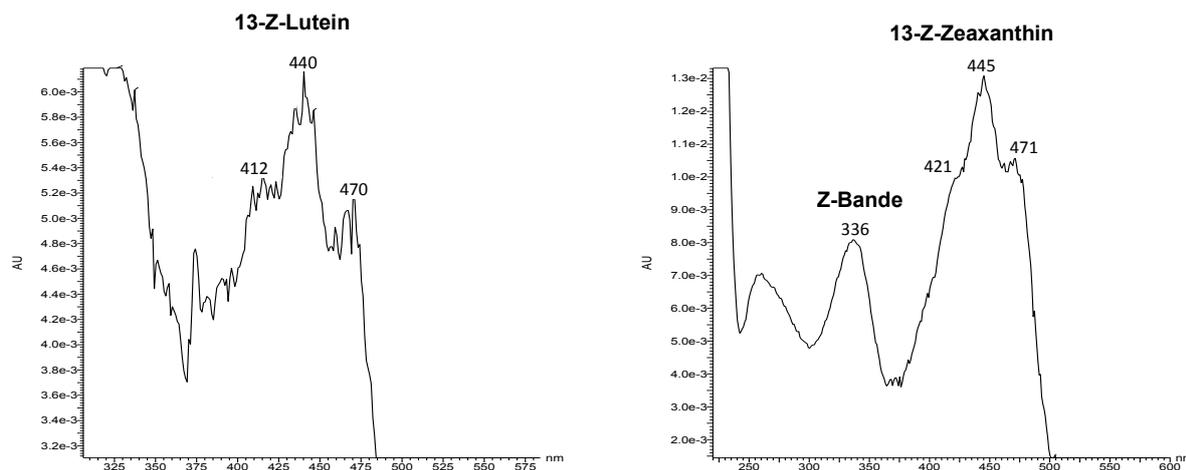


Abb. 4-8: Standardstammlösung (100 µg/mL) – Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (412/440/470) mit Schwingungsfeinstruktur (36 %III/II) von 13-Z-Lutein (links) und Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (421/445/471) mit Schwingungsfeinstruktur (16 %III/II) und Z-Bande (336 nm, 57 % $A_B/A_{II}$ ) von 13-Z-Zeaxanthin (rechts)

Im Absorptionsspektrum von 13-Z-Zeaxanthin trat in Einklang mit der Literatur [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008] 141 nm unterhalb des Absorptionsmaximums III von all-E-Zeaxanthin eine mit 57 % $A_B/A_{II}$  ausgeprägte Z-Bande bei 336 nm auf.

Aufgrund der geringeren molaren Extinktionskoeffizienten der 13-Z-Isomere [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008] waren, zusammen mit dem hypochromen Effekt, die Schwingungsfeinstrukturen bei 13-Z-Lutein (1,8-fach) und 13-Z-Zeaxanthin (2,4-fach) geringer ausgeprägt als bei deren all-E-Konfigurationen. Auch nach Wenzel (2010) und Glaser (2001) sind die Schwingungsfeinstrukturen der 13-Z-Isomere um den Faktor zwei geringer, während diejenigen der 9-Z-Isomere im Vergleich zum jeweiligen all-E-Isomer stärker ausgeprägt sind [Glaser 2001]. Dies bestätigte die Identifizierung der 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin, deren Schwingungsfeinstrukturen und Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande auch mit den Literaturwerten vergleichbar waren. (Abb. 4-8, Tab. 4-10)

Die Absorptionsmaxima I/II/III (412/432/459 nm) des direkt vor all-E-Lutein eluierenden Analyten (*unknown*; Anhang 2, Abb. 3a) waren im Vergleich zu all-E-Lutein um 10 nm (I), 12 nm (II) und 14 nm (III) hypochrom verschoben. Dies war deutlich höher als die Verschiebung des Absorptionsmaximums  $\lambda_{max}$  bei mono-Z-Isomeren um 2 bis 6 nm [Britton 1995]. Aufgrund der geringen Schwingungsfeinstruktur (22 %III/II) und der um 9 nm (I), 11 nm (II) und 12 nm (III) hypochrom verschobenen Absorptionsmaxima konnte es sich bei dem Analyten auch nicht um 9-Z-Lutein (65 %III/II) handeln [Glaser 2001]. Möglicherweise war der unbekannte Analyt ein Poly-Z-Isomer, das sich gegenüber der all-E-Konfiguration durch eine stark hypochrome Verschiebung der Hauptabsorptionsbande und verringerte Schwingungsfeinstruktur auszeichnen kann [Britton 1995]. Der vor all-E-Lutein eluierende Analyt war demnach nicht identifizierbar und blieb bei der Spektrenauswertung unberücksichtigt.

Zur Untersuchung von Matrixeffekten auf die Absorption der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin wurden die Spektren der Xanthophyll-Isomere des Probenextrakts nativen Eigelbs mit denen der Standardlösungen verglichen (Tab. 4-11).

Tab. 4-11: Vergleich der Absorptionsmaxima (I/II/III) und der Schwingungsfeinstruktur (%III/II) der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin unter Matrixeffekt und in Standardlösung

		Xanthophyll-Isomer			
		all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
Absorptionsmaxima I/II/III [nm]	Standard	422/444/473	430/451/477	412/440/470	421/445/471
	Eigelb	421/444/471	431/448/476	n. b.*/440/470	n.b.*/447/476
Schwingungsfeinstruktur %III/II	Standard	64	38	36	16
	Eigelb	62	43	n. b.*	n. b.*

\*Aufgrund der geringen Intensität der Hauptabsorptionsbande nicht bestimmbar

Neben identischen Wellenlängen bei 13-Z-Lutein waren die Absorptionsmaxima von all-E-Lutein, all-E-Zeaxanthin und 13-Z-Zeaxanthin um maximal 2, 3 und 5 nm im Vergleich zur Standardlösung verschoben (Tab. 4-11).

Die Schwingungsfeinstrukturen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin waren unter Matrixeffekt und in Standardlösung ähnlich. Aufgrund der geringen Intensität der Hauptabsorptionsbande konnten das Absorptionsmaximum I und die Schwingungsfeinstruktur der 13-Z-Isomere bei nativem Eigelb nicht ermittelt werden, was aber infolge der höheren Massenkonzentrationen bei gefriergetrocknetem Plasma möglich war (Abb. 4-9).

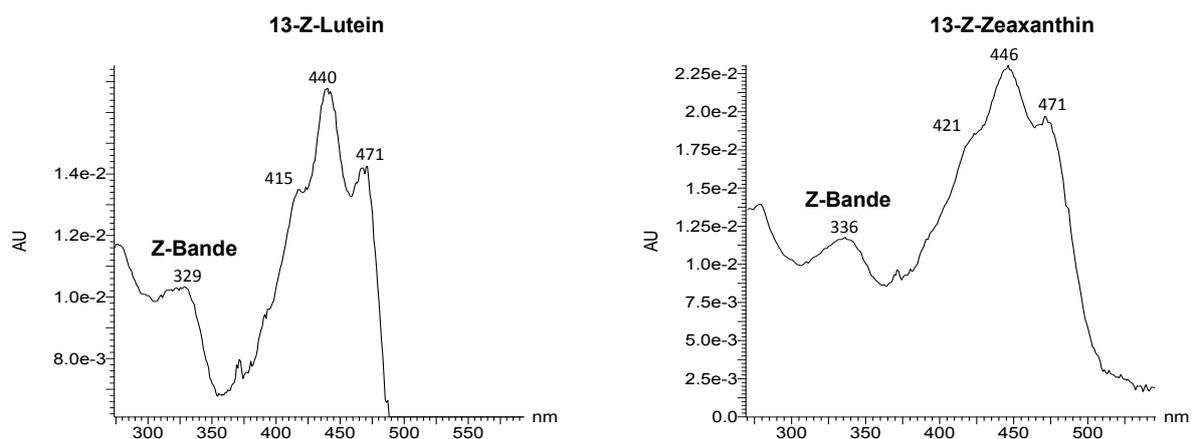


Abb. 4-9: Gefriergetrocknetes Plasma – Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (415/440/471) mit Schwingungsfeinstruktur (28 %III/II) und Z-Bande bei 329 nm (40 % $A_B/A_{II}$ ) von 13-Z-Lutein (links) und Absorptionsmaxima der Hauptabsorptionsbande (421/446/471) mit Schwingungsfeinstruktur (19 %III/II) und Z-Bande bei 336 nm (52 % $A_B/A_{II}$ ) von 13-Z-Zeaxanthin (rechts)

Dabei waren die Absorptionsmaxima I und die Schwingungsfeinstrukturen von 13-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin denen der Standardlösung ähnlich. Zudem wies die Z-Bande von 13-Z-Lutein (329 nm) mit 40 % $A_B/A_{II}$  eine geringere Intensität als die von 13-Z-Zeaxanthin (336 nm) auf<sup>16</sup> (52 % $A_B/A_{II}$ ), deren Intensität in der Standardlösung ähnlich war (57 % $A_B/A_{II}$ ). (Abb. 4-9, Tab. 4-11)

Im Vergleich zur Standardlösung und zu den Literaturangaben [Wenzel 2010; Glaser 2001] waren die Absorptionsmaxima und die Schwingungsfeinstrukturen der Xanthophyll-Isomere in den Probenextrakten ähnlich. Da keine bathochrom oder hypsochrom verschobenen sowie hyperchrom oder hypochrom beeinflussten Absorptionsmaxima und keine Veränderungen der Schwingungsfeinstruktur auftraten, war die Identifizierung der Xanthophylle anhand der Absorptionsspektren unter Matrixeinfluss gewährleistet.

Coeluiierende Matrixbestandteile vermindern die Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Analyse [Dachtler 2000] der ohnehin mit maximal 8,2 % der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration in geringen Mengen enthaltenen 13-Z-Isomere (Anhang 3). Da die Absorptionsspektren selektiv die Absorption der Xanthophylle bei 450 nm unter weitgehendem Ausschluss von Matrixbestandteilen darstellen, dienten sie besonders der Identifizierung der 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin.

Zur Identifizierung ist das Absorptionsspektrum allein nicht ausreichend, da es nur Informationen über das Chromophor enthält [Britton 1995]. Da Letzteres durch Hydroxylgruppen nicht verändert wird, weisen  $\alpha$ -Carotin und dessen Hydroxyderivat Lutein mit jeweils 10 konjugierten Doppelbindungen sowie Zeaxanthin und dessen Vorläufercarotinoid  $\beta$ -Carotin mit jeweils 11 konjugierten Doppelbindungen dieselben Chromophore und damit Absorptionsspektren auf [Britton 1995]. Die Identifizierung der Xanthophylle wurde daher zusätzlich zu den chromatographischen Retentionszeiten und Absorptionsspektren durch die massenspektrometrische Analyse abgesichert.

---

<sup>16</sup>144 nm bzw. 141 nm unterhalb des Absorptionsmaximums III von all-E-Lutein bzw. all-E-Zeaxanthin

## **Massenspektrometrie**

Die all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein können von denen des strukturell ähnlichen Zeaxanthins anhand der in spezifischem Ausmaß gebildeten charakteristischen Molekül- und Fragmentationen bei der massenspektrometrischen Analyse unterschieden werden. Dazu wurde das HPLC-System neben dem PDA-Detektor an ein Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt. Zur Ionisierung wurde das APCI(+)-Sprayverfahren eingesetzt, wobei die Anteile an Methanol (92,9 %), Wasser (0,5 %) und Methansäure (0,1 %) im Eluenten zum Elutionszeitpunkt der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin eine gute Ionisierung gewährleisten.

Bei der massenspektrometrischen Identifizierung der Isomere von Lutein und Zeaxanthin wurden am Peakmaximum im Chromatogramm, d. h. bei der charakteristischen Retentionszeit des Xanthophyll-Isomers, die Totalionenströme (TIC<sup>17</sup>) interpretiert, die neben dem Molekülionenpeak das Fragmentierungsmuster darstellen. Zudem wurden über den Elutionsbereich von all-E- und 13-Z-Lutein (5.00 bis 6.50 min) die charakteristischen Massenladungsverhältnisse m/z 551 und 569 und für die Zeaxanthin-Isomere zwischen 5.00 und 7.00 min die Massenspur m/z 569 selektiv betrachtet.

Bei der Optimierung der Analyseparameter wurden separate Standardlösungen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin unter Variation der cone-Spannung (30, 35, 40 V) und der corona-Spannung (2,9 kV bis 3,3 kV in 0,1 kV-Schritten) in Anlehnung an Wenzel (2010)<sup>18</sup> sowie Schlatterer und Breithaupt (2006)<sup>19</sup> gemessen. Einstellungen mit 20 V cone-Spannung und 3,1 kV corona-Spannung sowie mit cone-Spannungen von 30 V bzw. 35 V und 2,8 kV corona-Spannung erwiesen sich in Vortests als ungeeignet. Neben dem TIC am Peakmaximum und der Selektion der Massenspuren über den Elutionsbereich des all-E-Isomers basierte die Auswahl der geeigneten cone- und corona-Spannungen auf der Betrachtung der Ionensignale bei der TIC-Messung.

Aufgrund der hohen Flussrate und der kurzen Kapillarverbindung zwischen dem PDA-Detektor und dem Massenspektrometer war ein der Retentionszeit im Chromatogramm entsprechendes Signal im Massenspektrum zu erwarten. Der zeitliche Vergleich der massenspektrometrischen Signale mit der Retentionszeit wurde daher ebenfalls bei der Auswahl der geeigneten cone- und corona-Spannungen berücksichtigt.

---

<sup>17</sup>Total Ion Current = Summe aller pro Zeiteinheit gebildeten Ionen

<sup>18</sup>cone = 35 V; corona = 3,1 kV

<sup>19</sup>cone = 30 V; corona = 3,2 kV

Zur Identifizierung von Lutein erwiesen sich eine corona-Spannung von 3,0 kV und eine cone-Spannung von 35 V als am besten geeignet. Während im Elutionsbereich von all-E-Lutein kein Signal detektiert wurde, zeigte der TIC am Peakmaximum von all-E-Lutein ( $R_T = 5.76$  min) neben dem Basispeak  $m/z$  551  $[M+H-H_2O]^+$  mit gleicher Intensität das Fragmentation  $m/z$  449, das aus der sukzessiven Eliminierung zweier Masseneinheiten von 60 u, ausgehend vom protonierten Molekülion, resultieren könnte (Abb. 4-10). Der Massenverlust des protonierten Molekülions  $m/z$  569 von 60 u kann dabei durch die Hydroxyl-Gruppe im  $\beta$ -Ring des Luteinmoleküls induziert werden [Enzell und Back 1995]. Daher war im Massenspektrum auch ein Signal  $m/z$  509 (ca. 25 %) detektierbar. Ein diagnostisches Ion mit ca. 17 % Intensität zeigte sich bei  $m/z$  565 [Dachtler 2000]. Das Fragment  $m/z$  410 (ca. 10 %) könnte durch die Abspaltung einer Dimethylcyclodecapentaen-Einheit von 158 u des Molekülions bedingt sein [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008].

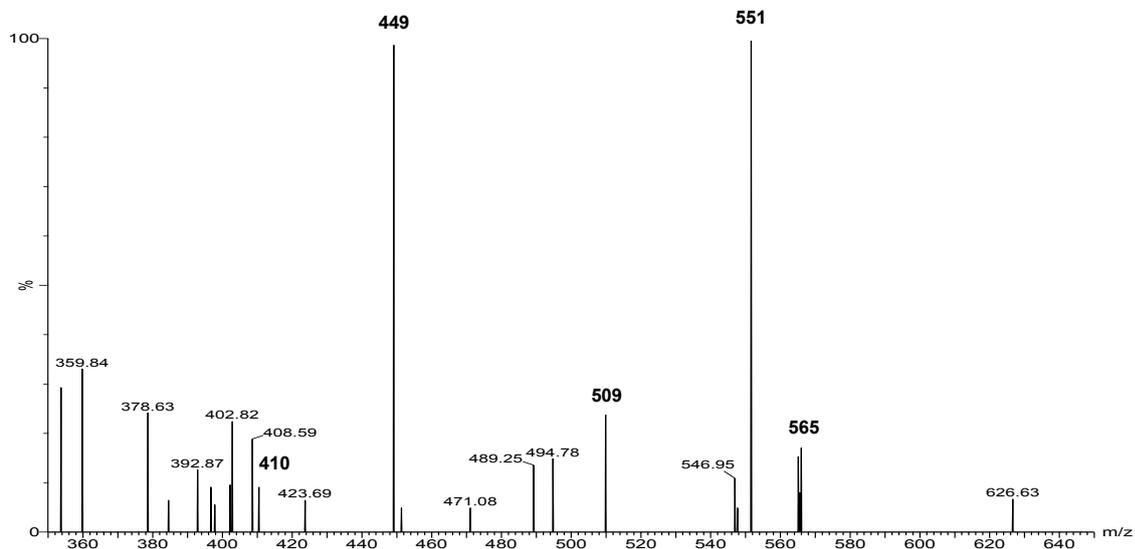


Abb. 4-10: TIC am Peakmaximum von all-E-Lutein

Die Selektion der für Lutein typischen  $m/z$ -Verhältnisse 551 und 569 im Elutionsbereich (5.00 bis 6.50 min) und die zeitliche Verschiebung zum Peakmaximum ( $R_T = 5.76$  min) von all-E-Lutein bestätigten die Eignung der gewählten cone- und corona-Spannungen. Der  $m/z$ -Basispeak 551 trat nach 5.74 min und damit geringfügig vor dem Peakmaximum aber innerhalb des Elutionsprofils von all-E-Lutein auf (Anhang 2, Abb. 3b-1). Gleiches galt für das Molekülion  $m/z$  569, das mit ca. 41 % Intensität nach 5.84 min mit leichter Verzögerung zum Peakmaximum detektiert wurde. Unterschiede im Gerätetyp, in den Messparametern<sup>20</sup> und der Eluentenzusammensetzung bedingten die geringere Intensität des Lutein-Molekülions  $[M+H]^+$  (14 %) bei Schlatterer und Breithaupt (2006).

<sup>20</sup>Schlatterer und Breithaupt (2006): corona = 3,2 kV / cone = 30 V / High Voltage lens = 0,5 kV / scan range =  $m/z$  300 - 700 / scan time = 2,0 s

Bei den Zeaxanthin-Isomeren war der TIC am Peakmaximum bei allen cone- und corona-Spannungen durch Fragmentationen als Basispeaks gekennzeichnet. Dabei wurden mit hoher oder 100 % Intensität die diagnostischen Massenspuren  $m/z$  583 und  $m/z$  565 identifiziert [Dachtler 2000]. Im Gegensatz zu Schlatterer und Breithaupt (2006) trat das typische durch die Eliminierung von Wasser bedingte Fragmentation  $m/z$  551  $[M+H-H_2O]^+$  nicht auf. Unter Berücksichtigung der Intensität des Grundrauschens und des Signals bei der TIC-Messung war eine corona-Spannung von 2,9 kV in Kombination mit cone-Spannungen von 40 oder 30 V zur Identifizierung der Zeaxanthin-Isomere geeignet. Bei 30 V cone-Spannung waren das Ionensignal bei der TIC-Messung (5,91 min; Abb. 4-11) und der  $m/z$  569 Basispeak im Elutionsbereich (5,93 min; Anhang 2, Abb. 3b-2) fast identisch mit der Retentionszeit am Peakmaximum ( $R_T = 5.92$  min).

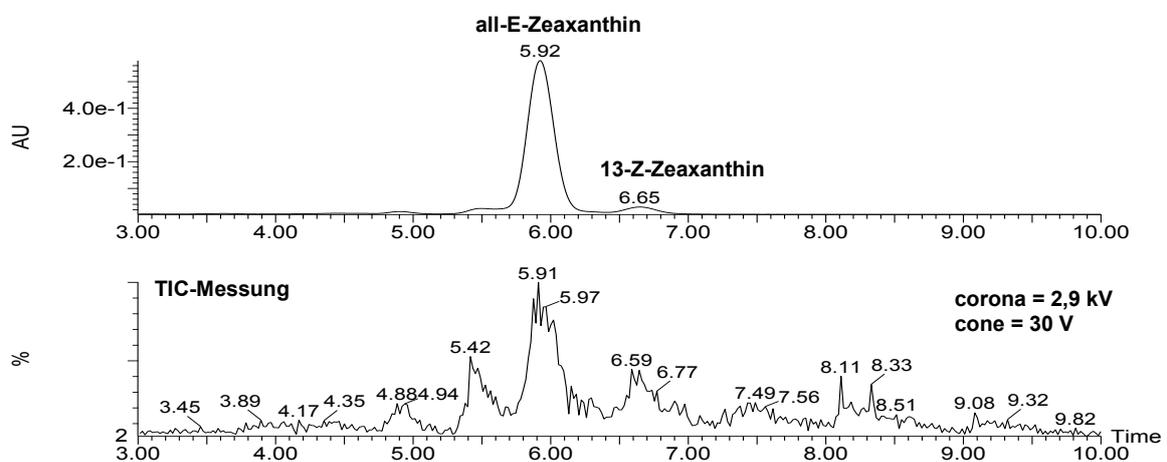


Abb. 4-11: Parameteroptimierung (corona 2,9 kV, cone 30 V) bei Zeaxanthin – Chromatogramm (oben) und TIC-Messung von Zeaxanthin (unten)

Bei höherer cone-Spannung (40 V) war das Signal bei der TIC-Messung (5,94 min) ebenfalls fast identisch mit dem Peakmaximum ( $R_T = 5,93$  min), während der stärker verschobene Basispeak des selektierten Molekülions  $m/z$  569 (6,03 min) anhand des Elutionsprofils zugeordnet werden konnte. Aufgrund des fast zeitgleichen Signalauftritts in Chromatogramm und Massenspektrum wurden die corona- und cone-Spannungen bei der massenspektrometrischen Identifizierung der Zeaxanthin-Isomere mit 2,9 kV und 30 V eingestellt.

Tabelle 4-12 zeigt die mit Standardlösungen optimierten Analyseparameter für die massenspektrometrische Identifizierung der Isomere von Lutein und Zeaxanthin. Der gegenüber Schlatterer und Breithaupt (2006) ( $m/z$  300 - 700) eingeschränkte Massenscanbereich ( $m/z$  350 - 650) diente der Empfindlichkeitssteigerung bei der Detektion sowie der Erleichterung der Spektren-Interpretation und ähnelte dem von Wenzel (2010) ( $m/z$  400 – 600).

Tab. 4-12: Optimierte Analyseparameter der Massenspektrometrie

Parameter	Einstellung
Modus	APCI(+)
Temperatur APCI-Quelle ( <i>Source Block</i> ) und APCI-Probe	+150 °C und +450 °C
Spannung der Coronanadel	<i>Lutein</i> : 3,0 kV / <i>Zeaxanthin</i> : 2,9 kV
Spannung der Rangefinder-Linse	0,1 kV
Zerstäubungsgas N <sub>2</sub> ( <i>Nebulizer</i> )	150 L/h
Trocknungsgas N <sub>2</sub> ( <i>Desolvation</i> )	800 L/h
Massenbereich (TIC)	350 - 650 m/z
cone-Spannung	<i>Lutein</i> : 35 V / <i>Zeaxanthin</i> : 30 V
Extractor	3 V
Scanzeit	1,00 s
Zeitversatz der Scans	0,10 s

Infolge der Messung gefriergetrockneten Eigelbs (corona 3,0 kV, cone 35 V) konnte nach der Selektion des charakteristischen m/z-Bereichs am Peakmaximum von all-E-Lutein das diagnostische Ion m/z 551 als Basispeak detektiert werden (Anhang 2, Abb. 3b-3). Bei 13-Z-Lutein war dieses charakteristische Massenverhältnis um eine Masseneinheit verschoben und trat bei m/z 552 auf (Anhang 2, Abb. 3b-3). Bei der massenspektrometrischen Identifizierung von Zeaxanthin (corona 2,9 kV, cone 30 V) zeigte die Selektion der Massenspuren an den Peakmaxima von all-E- und 13-Z-Zeaxanthin neben dem Molekülion m/z 569 (Basispeak) weitere Fragmente mit höherer Masse (Anhang 2, Abb. 3b-4). Bei beiden Zeaxanthin-Isomeren trat außerdem mit geringer Intensität das diagnostische Ion m/z 565 und bei all-E-Zeaxanthin zusätzlich m/z 567 auf [Dachtler 2000] (Anhang 2, Abb. 3b-4).

Aufgrund der matrixbedingten Untergrundsignale war der TIC an den Peakmaxima der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere bei den Probenextrakten komplex (Anhang 2, Abb. 3b-5). Zudem erlaubten matrixbedingte Verschiebungen und Überlagerungen der Signale bei der TIC-Messung keine eindeutige Zuweisung zu den Retentionszeiten der Isomere von Lutein und Zeaxanthin (Anhang 2, Abb. 3b-6). Im TIC an den jeweiligen Peakmaxima der Xanthophylle wurde als Basispeak meist m/z 588 detektiert, bei dem es sich um das diagnostische Ion m/z 585 [Dachtler 2000] handeln könnte. Die bei den Lutein-Isomeren detektierte Massenspur m/z 561 sowie das bei 13-Z-Lutein auftretende Fragmention m/z 554 könnten mit m/z 565 sowie m/z 551 zusammenhängen. Bei all-E-Zeaxanthin erschien m/z 530, welches das diagnostische Ion m/z 533,5 darstellen könnte [Dachtler 2000]. Das Fragmention m/z 437 bei 13-Z-Zeaxanthin könnte durch Massenverluste von zweimal 60 u, die von der Hydroxyl-Gruppe der  $\beta$ -Ringe induziert wurden, und die Eliminierung eines H<sub>2</sub>O-Massenäquivalents (18 u) [Enzell und Back 1995] bedingt sein. Ausgehend vom Molekülion m/z 569 würde dabei ein Fragmention mit m/z 431 entstehen. (Anhang 2, Abb. 3b-5)

Die mit Standardlösungen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin optimierten massenspektrometrischen Analyseparameter erlaubten bei den Probenextrakten trotz Matrixeinflüssen durch Selektion der charakteristischen m/z-Verhältnisse im jeweiligen Elutionsbereich von Lutein und Zeaxanthin eine Unterscheidung der Xanthophylle von Matrixbestandteilen sowie der Lutein-Isomere von den Zeaxanthin-Isomeren.

#### 4.3.5 Berechnung der Massenkonzentrationen von Lutein und Zeaxanthin

Mit Hilfe der Kalibriergeraden von all-E-Lutein wurden aus den Peakhöhen von all-E- und 13-Z-Lutein die Konzentrationen ( $\beta$ ) bestimmt und diese anhand des Probenvolumens nach der Extraktion (20 mL), der Einwaage (E) und der Trockenmasse (TM) als normierte Massenkonzentrationen (w) berechnet (s. Formel). Gleiches gilt für die beiden Zeaxanthin-Isomere.

$$w[\mu\text{g}/100\text{ g}] = \frac{\beta[\mu\text{g}/\text{mL}] \cdot 20\text{ mL} \cdot 10.000}{E[\text{g}] \cdot \text{TM}}$$

$\beta$	=	Konzentration Xanthophyll [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
E	=	Einwaage [g]
TM	=	Trockenmasse [%]
w	=	Massenkonzentration Xanthophyll [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ]

#### 4.3.6 Zusammenfassung zur Optimierung der Bestimmungsmethode

Die HPLC-PDA-Analyse wurde hinsichtlich der Selektivität bei der chromatographischen Trennung der Xanthophyll-Isomere mittels einer C<sub>30</sub>-Säule mit Endcapping durch Variation der Eluentenzusammensetzung, der Flussrate und der Säulentemperatur optimiert. Die anschließende Linearitätsüberprüfung bestätigte die Eignung der HPLC-PDA-Methode zur Quantifizierung der Xanthophylle über deren Absorption mittels der gemessenen Peakhöhen. Dabei wurde anhand der ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Kalibrierbereich festgelegt. Basierend auf der nachgewiesenen Linearität war die Selektivität bei der chromatographischen Trennung der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere trotz der Peakinterferenz ausreichend.

Basierend auf der Wiederfindungsrate wurde die Probenaufbereitung optimiert. Die hinsichtlich des Extraktionslösungsmittels und der Ultraschallbehandlungszeit modifizierte Flüssig-Flüssig-Extraktion gewährleistete hohe Wiederfindungsraten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin zwischen ca. 99 und 102 % und bedurfte keiner weiteren Optimierung.

Die mittels Eigelb optimierte Bestimmungsmethode eignete sich auch für Plasma und Granula, da die anhand der Ergebnisse bei Plasma und Granula nach dem gewichteten Mittel berechneten mit den ermittelten Xanthophyll-Gehalten bei nativem Eigelb übereinstimmten.

Die hohen Wiederfindungsraten und geringen Variationskoeffizienten von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin belegten einen geringen systematischen und zufälligen Fehler der Bestimmungsmethode und somit deren Richtigkeit, Präzision, Robustheit und Selektivität bei der Bestimmung der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin. Da sie als Summe aus systematischer und zufälliger Messunsicherheit die gesamte Messabweichung beschreibt [Rodriguez-Amaya 2001; Kromidas 1999, Gottwald und Stieglitz 1996], wurde daher gleichzeitig die Genauigkeit der Bestimmungsmethode nachgewiesen. Die Zuverlässigkeit der Messergebnisse war damit gewährleistet.

Die charakteristischen Retentionszeiten bei der chromatographischen Elution erlaubten zusammen mit den Absorptionsspektren und Massenspektren eine eindeutige Identifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin auch unter Matrixeinfluss.

Neben der Übereinstimmung der Elutionsreihenfolge mit der Literatur [Wenzel 2010; Glaser 2001] bestätigten sich die Retentionszeiten bei Vergleich mit den Standards von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin. Da die Elution der Xanthophylle unter Matrixeinfluss nicht verändert war, eigneten sich die charakteristischen Retentionszeiten der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin zur Identifizierung.

Auch die gegenüber den Literaturangaben sowie den Standards unveränderten Absorptionsspektren bei den Probenextrakten gewährleisteten eine eindeutige Identifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin unter Matrixeinfluss. Da die Absorptionsspektren selektiv die Absorption der Xanthophylle bei 450 nm unter weitgehendem Ausschluss möglicher Absorptionen von Matrixbestandteilen darstellen, dienten sie besonders zur Identifizierung der geringanteiligen 13-Z-Isomere.

Die hinsichtlich der cone- und corona-Spannungen optimierte massenspektrometrische Analyse erlaubte die Unterscheidung der Xanthophylle von Matrixbestandteilen und der Lutein-Isomere von den Zeaxanthin-Isomeren anhand der charakteristischen Molekül- und Fragmentationen sowie des Totalionenstroms an den Peakmaxima.

Die spektralphotometrische Bestimmung von Carotinoiden ist spezifisch, da die Absorption von anderen Matrixbestandteilen weitgehend unbeeinflusst ist [Glaser 2001]. Aufgrund der zudem empfindlichen UV-Vis-Detektion von Carotinoiden erfolgte die Quantifizierung der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere über deren Absorption bei 450 nm. Basierend auf der Mehrpunktkalibrierung nach der Methode des externen Standards korrelierten dabei die gemessenen Peakhöhen linear mit der Konzentration.

Die Xanthophyll-Massenkonzentrationen wurden anhand der spezifischen Kalibriergeradenfunktionen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin berechnet, wobei die systematische Über- oder Unterschätzung bei den 13-Z-Isomeren aufgrund der Betrachtung relativer Veränderungen der Massenkonzentrationen toleriert werden konnte.

#### **4.4 Erhitzung und Gefriertrocknung**

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuchsreihen zum Einfluss von Erhitzung und Gefriertrocknung dargestellt. Dabei wurden zunächst die Fraktionen Granula und Plasma und anschließend Eigelb beschrieben um den logischen Kontext der Ergebnisse zu verifizieren.

Die DSC-Messkurven zeigten endotherme Strukturentfaltungen nativer Proteine und Lipoproteine. Bei den Versuchsreihen zur Erhitzung und Gefriertrocknung kam es infolge der Behandlung von Granula, Plasma und Eigelb zu Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine. Daher unterschieden sich die DSC-Peaks der nativen Proben von denen der erhitzten und gefriergetrockneten Proben. Als Messgrößen des DSC-Peaks wurden der Onset, die Peak-Temperatur und die normierte Gesamtenthalpie betrachtet. Zudem wurden die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in den nativen, erhitzten und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb bestimmt. Bei den Messgrößen des DSC-Peaks und den Xanthophyll-Massenkonzentrationen wurde der Mittelwert der Doppelbestimmung zusammen mit der Standardabweichung ( $\pm$  SD) angegeben.

Bei der Erhitzung wurden die behandelten Proben mit dem Nativzustand und untereinander hinsichtlich signifikanter Unterschiede der normierten Gesamtenthalpie des DSC-Peaks sowie der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin verglichen. Bei der Gefriertrocknung wurden die DSC-Peaks der nativen und rehydrierten Proben verglichen, da im gefriergetrockneten Probenzustand lediglich der DSC-Peak der Lipide messbar war. Außerdem wurden die Xanthophyll-Massenkonzentrationen der gefriergetrockneten Proben mit dem Nativzustand verglichen. Demnach waren bei der Gefriertrocknung zwei Faktorstufen auswertbar. Gleiches galt für den die LDL-Strukturentfaltung repräsentierenden DSC-Peak bei Plasma, der nur nativ und bis zur Erhitzung bei 67 °C messbar war. Die ANOVA-Methode eignet sich auch für den Vergleich von nur zwei Gruppenmittelwerten, da sie eine Erweiterung von Zweistichprobentests darstellt.

Die normierte Gesamtenthalpie wird bei der folgenden Darstellung und Diskussion der Ergebnisse mit  $\Delta H$  und die Peak-Temperatur mit  $T_d$  abgekürzt. Die Angaben zu den Veränderungen der Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H$  in den behandelten Proben beziehen sich auf die für beide Chargen gemittelten Werte gemäß den Tabellen 4-14 bis 4-17 und 4-24 bis 4-26.

Bei der in Anhang 4 zusammengefassten statistischen Auswertung gemäß Tabelle 3-2 wurde die Normalverteilung der  $\Delta H$ -Werte und der Xanthophyll-Massenkonzentrationen nachgewiesen. Die zwischen einzelnen Faktorstufen nicht bestehende Varianzhomogenität war aufgrund der Robustheit der ANOVA-Methode bei gleichen Stichprobenumfängen und normalverteilten Messwerten vertretbar [Motulsky 2007].

#### 4.4.1 Nativzustand

Das Thermogramm nativer Granula zeigte einen symmetrischen Peak zwischen ca. 68 und 97 °C. Bei Plasma ging der bei ca. 69/70 °C beginnende Peak 1, der die LDL-Strukturentfaltung repräsentierte, bei ca. 81 °C in einen stärker ausgeprägten Peak 2 der HDL-Entfaltung über, der bei ca. 95/96 °C endete. Basierend auf der Zusammensetzung aus 22 % Granula und 78 % Plasma [Powrie und Nakai 1986] stand der DSC-Peak nativen Eigelbs (ca. 60 bis 98 °C) in Einklang mit den Thermogrammen von Granula und Plasma. (Abb. 4-12)

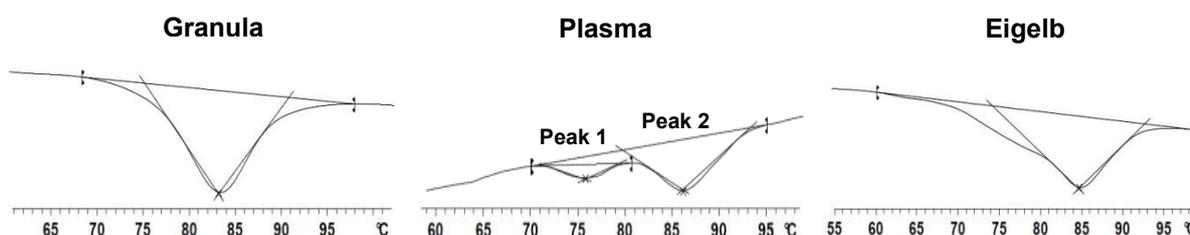


Abb. 4-12: DSC-Thermogramme der nativen Proben von Granula (links), Plasma (Mitte) und Eigelb (rechts)

In Tabelle 4-13 sind die aus den vier untersuchten Chargen im Nativzustand gemittelten Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H$  der DSC-Peaks von Granula, Plasma und Eigelb dargestellt.

Tab. 4-13: Mittelwerte des Onsets, der  $T_d$  und von  $\Delta H \pm SD$  der DSC-Peaks der nativen Proben von Granula, Plasma und Eigelb (berechnet aus Tab. 4-14 bis 4-17 und 4-24 bis 4-26)

		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
<b>Granula</b>		75,2 ± 0,2	83,5 ± 0,1	-2,93 ± 0,09
<b>Plasma</b>	LDL (Peak 1)	71,3 ± 0,1	75,8 ± 0,1	-0,05 ± 0,00
	HDL (Peak 2)	79,1 ± 0,1	86,0 ± 0,2	-0,32 ± 0,01
<b>Eigelb</b>		73,1 ± 0,4	84,1 ± 0,1	-1,49 ± 0,02

## 4.4.2 Erhitzung

### Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine

#### Granula

Die symmetrischen Peaks (ca. 68 bis 97 °C) und die Onsets (*Nativ*: 74,9 °C / 67 °C: 75,5 °C) und  $T_d$  (*Nativ*: 83,5 °C / 67 °C: 83,6 °C) der nativen und der bei 67 °C erhitzten Granula waren identisch. Auch  $\Delta H$  des Peaks zeigte sich infolge der Erhitzung bei 67 °C nicht signifikant verändert. (Abb. 4-13, Tab. 4-14)

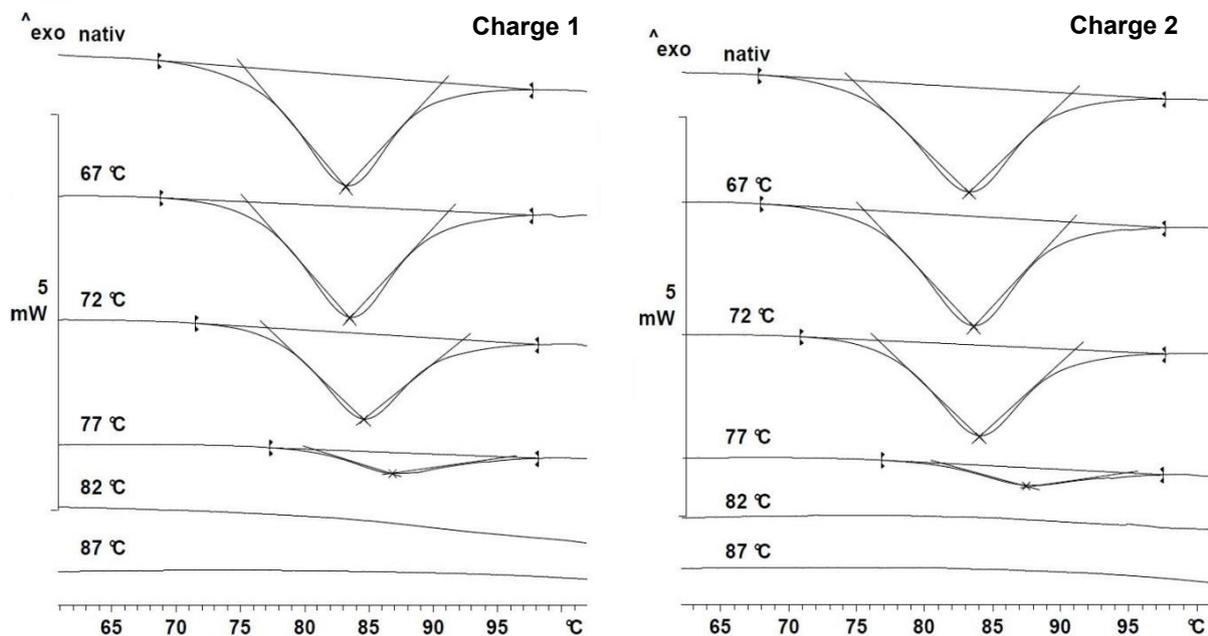


Abb. 4-13: DSC-Thermogramme nativer und erhitzter Granula der Chargen 1 und 2

Infolge der Erhitzung bei 72 °C lag der Onset (76,9 °C) des DSC-Peaks (ca. 71 bis 98 °C) gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C höher ( $\Delta$  ca. 1,6 °C), während  $T_d$  (83,7 °C) identisch war. Die im Vergleich zum Nativzustand und zur Erhitzung bei 67 °C nach einer Erhitzung bei 72 °C signifikant geringere  $\Delta H$  (-2,43 J/g;  $\Delta$  ca. 0,7 J/g) des Peaks wird durch dessen geringere Ausprägung deutlich. (Abb. 4-13, Tab. 4-14)

Tab. 4-14: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  des DSC-Peaks nativer und erhitzter Granula der Chargen 1 und 2

Granula		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
Charge 1	Nativ	75,2 ± 0,2	83,7 ± 0,1	-3,18 ± 0,01 <sup>a</sup>
	67 °C	75,5 ± 0,0	83,6 ± 0,4	-3,09 ± 0,05 <sup>a</sup>
	72 °C	77,1 ± 0,1	83,3 ± 0,2	-2,43 ± 0,15 <sup>b</sup>
	77 °C	79,9 ± 0,2	87,1 ± 0,3	-0,67 ± 0,04 <sup>c</sup>
Charge 2	Nativ	74,7 ± 0,1	83,3 ± 0,1	-3,16 ± 0,09 <sup>a</sup>
	67 °C	75,5 ± 0,0	83,6 ± 0,1	-3,05 ± 0,06 <sup>a</sup>
	72 °C	76,6 ± 0,1	84,2 ± 0,2	-2,42 ± 0,01 <sup>b</sup>
	77 °C	80,6 ± 0,0	87,6 ± 0,3	-0,50 ± 0,03 <sup>c</sup>

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede von  $\Delta H$  ( $\alpha = 0,05$ )

Im Vergleich zu den anderen Proben war der Peak der bei **77 °C** erhitzten Granula (ca. 77 bis 97 °C) deutlich geringer ausgeprägt, weshalb auch eine signifikant geringere  $\Delta H$  (-0,59 J/g;  $\Delta$  ca. 1,8 - 2,7 J/g) bestimmt wurde. Der Onset des Peaks war mit 80,2 °C zu höherer Temperatur verschoben ( $\Delta$  ca. 2,8 - 5,9 °C). Gegenüber der gemittelten  $T_d$  (83,6 °C) der anderen Proben war  $T_d$  des Peaks der bei 77 °C erhitzten Granula (87,4 °C) um 3,8 °C höher. (Abb. 4-13, Tab. 4-14)

### Plasma

Wie bei den Granula war der Temperaturbereich des DSC-Peaks des bei **67 °C** erhitzten Plasmas (ca. 69/70 bis 95/96 °C) dem Nativzustand nahezu identisch, was auch für den Onset (*Nativ*: 71,2 °C / 67 °C: 71,4 °C) und  $T_d$  (*Nativ*: 75,6 °C / 67 °C: 75,4 °C) von Peak 1 (ca. 69/70 bis 81 °C) galt. Auch bei Peak 2 (ca. 81 bis 95/96 °C) ergaben sich für das bei 67 °C erhitzte Plasma und im Nativzustand identische Onsets (*Nativ*: 79,3 °C / 67 °C: 79,2 °C) und  $T_d$ -Werte (*Nativ*: 85,7 °C / 67 °C: 86,1 °C). Die  $\Delta H$  von Peak 1 (LDL-Strukturentfaltung) war bei 67 °C (-0,03 J/g) gegenüber dem Nativzustand (-0,05 J/g) signifikant verringert. Bei Peak 2 war  $\Delta H$  identisch mit dem Nativzustand (je -0,30 J/g). (Abb. 4-14, Tab. 4-15 und 4-16)

Tab. 4-15: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  von Peak 1 nativen und erhitzten Plasmas der Chargen 1 und 2

Plasma		Peak 1 (LDL)		
		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
Charge 1	Nativ	71,1 ± 0,0	75,7 ± 0,1	-0,05 ± 0,00 <sup>a</sup>
	67 °C	71,5 ± 0,3	75,7 ± 0,6	-0,03 ± 0,00 <sup>b</sup>
Charge 2	Nativ	71,2 ± 0,1	75,4 ± 0,1	-0,04 ± 0,00 <sup>a</sup>
	67 °C	71,2 ± 0,1	75,1 ± 0,2	-0,03 ± 0,00 <sup>b</sup>

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede von  $\Delta H$  ( $\alpha = 0,05$ )

Nach der Erhitzung bei **72 °C** war nur noch ein Peak (ca. 75 bis 95/96 °C) mit einem höheren Onset (79,9 °C;  $\Delta$  ca. 0,6 °C) und einer höheren  $T_d$  (87,2 °C;  $\Delta$  ca. 1,3 °C) messbar. Während  $\Delta H$  des Peaks im Vergleich zum Nativzustand marginal differierte und dies auch für Charge 1 bezüglich des Vergleichs mit der Erhitzung bei 67 °C galt, ergab sich bei Charge 2 eine signifikant geringere  $\Delta H$  des Peaks infolge der Erhitzung bei 72 °C gegenüber 67 °C ( $\Delta$  = 0,09 J/g). (Abb. 4-14, Tab. 4-16)

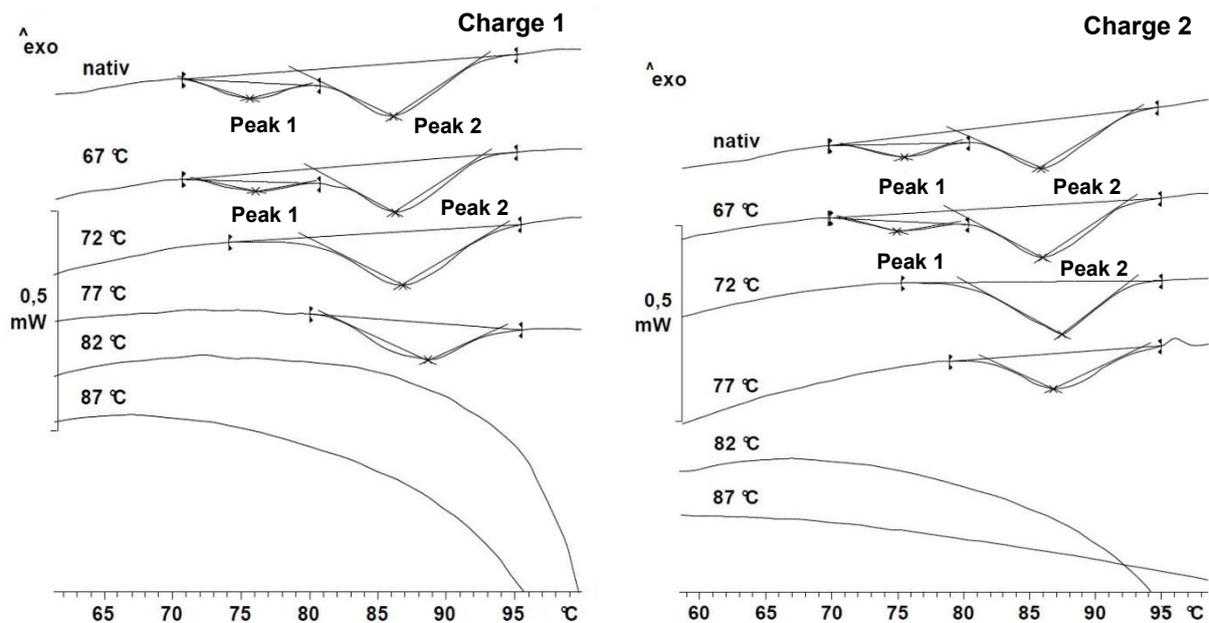


Abb. 4-14: DSC-Thermogramme nativen und erhitzten Plasmas der Chargen 1 und 2

Auch der Peak des bei **77 °C** erhitzten Plasmas (ca. 79/80 bis 95/96 °C) wies einen höheren Onset (81,3 °C;  $\Delta$  ca. 1,9 °C) und eine höhere  $T_d$  (88,3 °C;  $\Delta$  ca. 0,9 - 3,0 °C) auf. In Einklang mit der geringeren Ausprägung des Peaks war  $\Delta H$  gegenüber dem Nativzustand und den bei 67 und 72 °C erhitzten Proben ca. um 0,12 J/g signifikant geringer. (Abb. 4-14, Tab. 4-16)

Tab. 4-16: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  von Peak 2 nativen und erhitzten Plasmas der Chargen 1 und 2

Plasma		Peak 2 (HDL)		
		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
Charge 1	Nativ	79,1 $\pm$ 0,3	85,5 $\pm$ 0,5	-0,30 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	67 °C	79,6 $\pm$ 0,5	86,1 $\pm$ 0,2	-0,27 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	72 °C	79,6 $\pm$ 0,0	87,2 $\pm$ 0,5	-0,29 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
	77 °C	81,1 $\pm$ 0,1	88,5 $\pm$ 0,4	-0,18 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Charge 2	Nativ	79,4 $\pm$ 0,1	85,9 $\pm$ 0,0	-0,29 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>
	67 °C	78,8 $\pm$ 0,2	86,0 $\pm$ 0,0	-0,33 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	72 °C	80,1 $\pm$ 0,1	87,2 $\pm$ 0,4	-0,24 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	77 °C	81,5 $\pm$ 0,3	88,1 $\pm$ 1,5	-0,16 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede von  $\Delta H$  ( $\alpha$  = 0,05)

## Eigelb

Der Beginn des DSC-Peaks des bei **67 °C** erhitzten Eigelbs war im Vergleich zum Nativzustand (60 °C) auf ca. 67/68 °C verschoben. Das Ende des Peaks (ca. 98 °C) zeigte sich unverändert. Auch der Onset und  $T_d$  (73,5 und 84,0 °C) des Peaks waren mit dem Nativzustand (73,3 und 84,1 °C) identisch. Dagegen wies der Peak zwischen 68 und 79/80 °C eine geringere Ausprägung auf, wobei  $\Delta H$  gegenüber dem Nativzustand nur bei Charge 2 signifikant vermindert war ( $\Delta = 0,18 \text{ J/g}$ ). (Abb. 4-15, Tab. 4-17)

Der Peak des bei **72 °C** erhitzten Eigelbs (ca. 72/73 °C bis 98 °C) wies einen deutlich höheren Onset (77,6 °C;  $\Delta$  ca. 4,3 °C) und eine marginal höhere  $T_d$  (84,8 °C,  $\Delta$  ca. 0,7 °C) auf. Zudem war der die LDL-Entfaltung repräsentierende Peak-Bereich zwischen ca. 72/73 und 79/80 °C gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C deutlich geringer ausgeprägt, weshalb  $\Delta H$  (-0,84 J/g) des Peaks signifikant geringer war ( $\Delta$  ca. 0,56 J/g). (Abb. 4-15, Tab. 4-17)

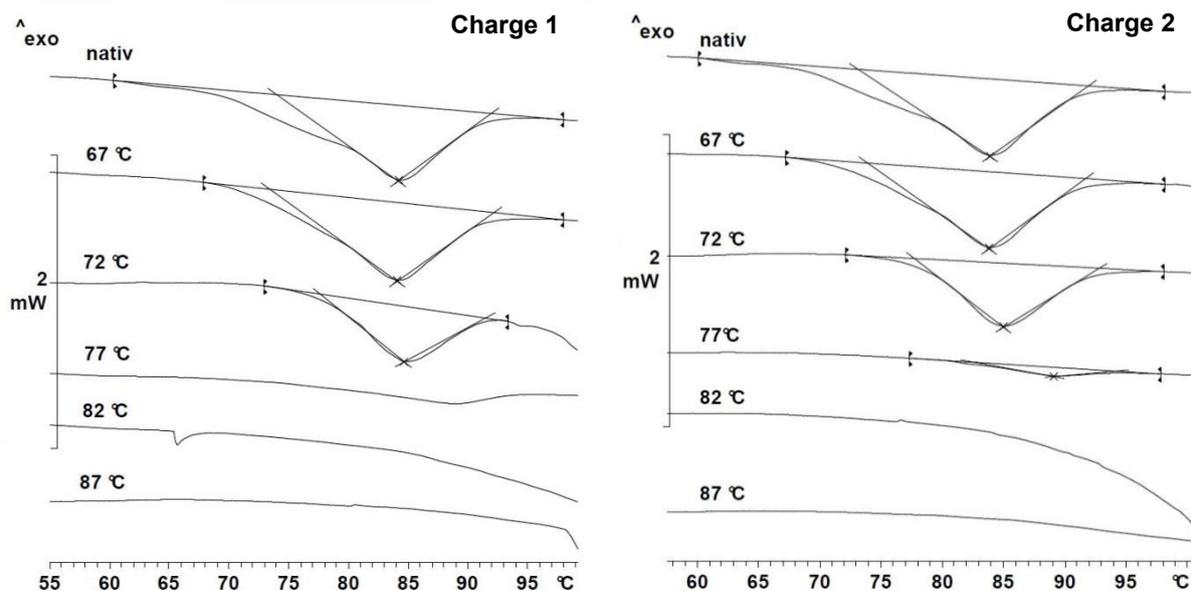


Abb. 4-15: DSC-Thermogramme nativen und erhitzten Eigelbs der Chargen 1 und 2

Aufgrund der im Vergleich zu den anderen Proben geringen Ausprägung war der Peak des bei **77 °C** erhitzten Eigelbs (ca. 77 bis 98 °C) nur bei Charge 2 auswertbar. Entsprechend war  $\Delta H$  des Peaks signifikant verringert ( $\Delta$  ca. 0,76 - 1,40 J/g). Mit 81,3 °C war der Onset gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C um ca. 7,8 °C sowie im Vergleich zur Erhitzung bei 72 °C um 3,8 °C höher. Die  $T_d$  (89,0 °C) war um ca. 4,8 °C höher.

Tab. 4-17: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  des DSC-Peaks nativen und erhitzten Eigelbs der Chargen 1 und 2

Eigelb		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
Charge 1	Nativ	73,3 ± 0,6	84,4 ± 0,2	-1,35 ± 0,01 <sup>a</sup>
	67 °C	73,2 ± 0,0	84,1 ± 0,0	-1,30 ± 0,00 <sup>a</sup>
	72 °C	77,8 ± 0,4	84,8 ± 0,2	-0,75 ± 0,08 <sup>b</sup>
	77 °C	n. b.	n. b.	n. b.
Charge 2	Nativ	73,3 ± 0,1	83,9 ± 0,1	-1,56 ± 0,01 <sup>a</sup>
	67 °C	73,7 ± 0,2	83,9 ± 0,1	-1,38 ± 0,06 <sup>b</sup>
	72 °C	77,5 ± 0,3	84,8 ± 0,3	-0,92 ± 0,02 <sup>c</sup>
	77 °C	81,3 ± 0,2	89,0 ± 0,1	-0,16 ± 0,03 <sup>d</sup>

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede von  $\Delta H$  ( $\alpha = 0,05$ )

n. b. = nicht bestimmbar

Nach der Erhitzung bei **82** und **87 °C** war in den Thermogrammen kein Peak messbar (Abb. 4-13 bis 4-15). Die erhitzungsbedingte Ausdehnung der Proben führt zur Verringerung der Dichte und damit der Wärmeleitfähigkeit. Die daher zur Erhaltung der konstanten Heizrate (8 °C/min) benötigte höhere Wärmeleistung erklärt die endotherme Drift der Basislinie mit Zunahme der Messtemperatur der bei 82 und 87 °C erhitzten Proben. In Abhängigkeit des messbaren Wärmestroms war die bei den Granula (5 mW) angedeutete Kurvendrift bei Eigelb (2 mW) geringer ausgeprägt als bei Plasma (0,5 mW).

### ***Xanthophyll-Massenkonzentrationen***

Bei der Versuchsreihe zur Erhitzung wurden die bei beiden Chargen signifikant veränderten Xanthophyll-Massenkonzentrationen betrachtet. Für 13-Z-Zeaxanthin konnten keine signifikanten Differenzen in den Massenkonzentrationen infolge der Erhitzung bestimmt werden.

### **Granula**

Tabelle 4-18 zeigt die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativer und erhitzter Granula und die signifikanten Veränderungen beim Vergleich der Temperaturniveaus untereinander und mit dem Nativzustand.

Tab. 4-18: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativer und erhitzter Granula – Charge 1 (oben) und Charge 2 (unten)

Granula	Massenkonzentrationen [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ]							
	all-E-Lutein		all-E-Zeaxanthin		13-Z-Lutein		13-Z-Zeaxanthin	
<b>Nativ</b>	2495,3 $\pm$ 98,7	<b>a</b>	2098,4 $\pm$ 84,5	<b>a</b>	296,5 $\pm$ 10,3	<b>a</b>	393,0 $\pm$ 11,7	<b>a</b>
	1706,4 $\pm$ 45,9		999,3 $\pm$ 34,6		192,3 $\pm$ 6,3		195,7 $\pm$ 6,4	
<b>67 °C</b>	2464,4 $\pm$ 28,3	<b>a</b>	2071,0 $\pm$ 27,3	<b>a</b>	304,9 $\pm$ 2,1	<b>ab</b>	405,9 $\pm$ 2,6	<b>a</b>
	1701,3 $\pm$ 42,0		999,3 $\pm$ 21,8		198,6 $\pm$ 2,6		201,7 $\pm$ 1,7	
<b>72 °C</b>	2430,9 $\pm$ 31,0	<b>ab</b>	2040,3 $\pm$ 28,3	<b>ab</b>	316,3 $\pm$ 5,8	<b>abc</b>	413,1 $\pm$ 5,2	<b>a</b>
	1668,2 $\pm$ 6,4		980,3 $\pm$ 4,2		204,3 $\pm$ 4,8		203,6 $\pm$ 4,2	
<b>77 °C</b>	2477,5 $\pm$ 8,6	<b>ab</b>	2091,9 $\pm$ 8,3	<b>ab</b>	325,6 $\pm$ 4,5	<b>b</b>	426,7 $\pm$ 4,3	<b>a</b>
	1667,1 $\pm$ 27,4		983,3 $\pm$ 10,9		209,1 $\pm$ 2,5		206,2 $\pm$ 2,0	
<b>82 °C</b>	2399,5 $\pm$ 38,9	<b>ab</b>	2027,7 $\pm$ 33,0	<b>ab</b>	318,8 $\pm$ 6,8	<b>c</b>	401,7 $\pm$ 11,5	<b>a</b>
	1684,3 $\pm$ 65,1		995,6 $\pm$ 37,1		218,8 $\pm$ 8,5		210,4 $\pm$ 8,6	
<b>87 °C</b>	2343,2 $\pm$ 17,7	<b>b</b>	1990,1 $\pm$ 12,9	<b>b</b>	333,4 $\pm$ 4,5	<b>d</b>	399,6 $\pm$ 6,4	<b>a</b>
	1569,5 $\pm$ 8,2		932,4 $\pm$ 4,6		217,7 $\pm$ 1,8		201,7 $\pm$ 1,5	

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

Für die sich signifikant unterscheidenden Proben nach Tabelle 4-18 wurden die prozentualen Massenkonzentrationsänderungen der Xanthophylle berechnet (Tab. 4-19).

Tab. 4-19: Massenkonzentrationsänderungen [%] von all-E-Lutein, all-E-Zeaxanthin und 13-Z-Lutein erhitzter Granula – Charge 1 (links) und Charge 2 (rechts)

Granula	Massenkonzentrationsänderungen [%]					
	all-E-Lutein		all-E-Zeaxanthin		13-Z-Lutein	
Nativ vs. 77 °C	n. d.		n. d.		+9,8	+8,7
Nativ vs. 82 °C	n. d.		n. d.		+7,5	+13,8
Nativ vs. 87 °C	-6,1	-8,0	-5,2	-6,7	+12,5	+13,2
67 °C vs. 82 °C	n. d.		n. d.		+4,5	+10,2
67 °C vs. 87 °C	-4,9	-7,8	-3,9	-6,7	+9,3	+9,7
72 °C vs. 87 °C	n. d.		n. d.		+5,4	+6,6

n. d. = nicht detektiert

Nach einer Erhitzung bei **67** und **72 °C** waren die Xanthophyll-Gehalte nicht signifikant verändert. Auch infolge der Erhitzung bei **77 °C** waren die Massenkonzentrationen der all-E-Isomere marginal unterschiedlich, während sich für 13-Z-Lutein im Vergleich zum Nativzustand bei beiden Chargen eine ähnlich ausgeprägte signifikante Zunahme ergab. Infolge der Erhitzung bei **82 °C** war die 13-Z-Lutein-Konzentration signifikant gegenüber dem Nativzustand sowie im Vergleich zu 67 °C erhöht, wobei die Zunahme bei Charge 2 deutlicher war als bei Charge 1 ( $\Delta$  ca. 6,0 %). (Tab. 4-18 und 4-19)

Infolge der Behandlung bei **87 °C** kam es zu signifikant reduzierten Massenkonzentrationen der all-E-Isomere gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C. Dies zeigte sich bei Charge 2 stärker ausgeprägt als bei Charge 1 ( $\Delta$  ca. 1,5 - 2,9 %). (Tab. 4-18 und 4-19)

Die Verluste an all-E-Lutein bei 87 °C gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C wurden von signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein begleitet, die bei beiden Chargen ähnlich ausgeprägt waren. Zudem ergaben sich bei 87 °C bei beiden Chargen signifikant höhere Werte für 13-Z-Lutein in ähnlicher Ausprägung gegenüber der Erhitzung bei 72 °C. (Tab. 4-18 und 4-19)

Jeweils in Bezug zum Nativzustand sowie zur Erhitzung bei 67 °C waren bei Charge 1 die 13-Z-Lutein-Zunahmen infolge der Erhitzung bei 87 °C höher als nach Erhitzung bei 82 °C ( $\Delta$  ca. 4,9 %). Dagegen war bei Charge 2 die prozentuale Steigerung an 13-Z-Lutein bei 87 °C marginal geringer als bei den bei 82 °C erhitzten Proben ( $\Delta$  ca. 0,6 %). (Tab. 4-19)

Für native und erhitzte Granula sind die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin (Tab. 4-18) in Abbildung 4-16 graphisch dargestellt.

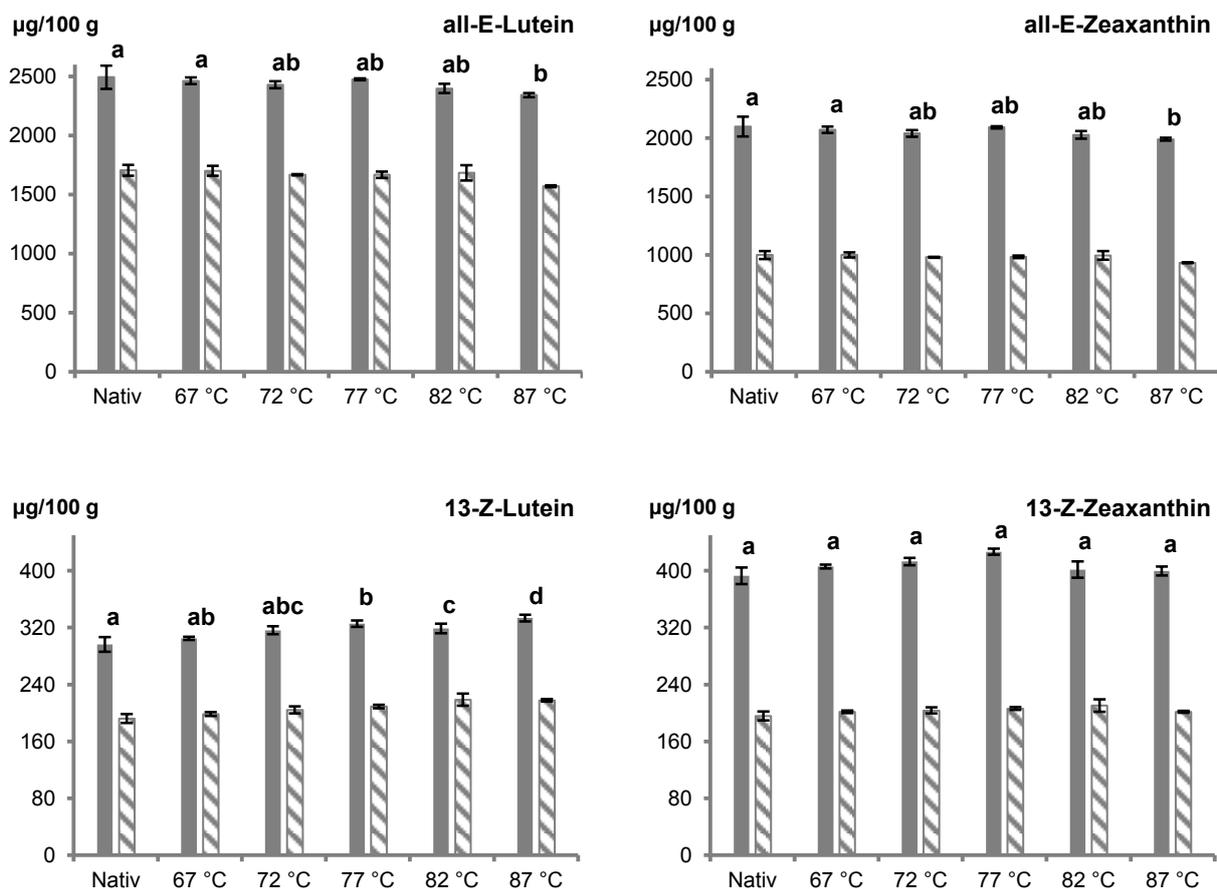


Abb. 4-16: Xanthophyll-Massenkonzentrationen + SD [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ] nativer und erhitzter Granula von Charge 1 (grau) und Charge 2 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

**Plasma**

Tabelle 4-20 zeigt die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und erhitzten Plasmas und die signifikanten Veränderungen im Vergleich der Temperaturniveaus untereinander und mit dem Nativzustand.

Tab. 4-20: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und erhitzten Plasmas – Charge 1 (oben) und Charge 2 (unten)

Plasma	Massenkonzentrationen [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ]			
	all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
<b>Nativ</b>	4177,1 $\pm$ 84,4 <b>a</b> 2707,4 $\pm$ 27,0	3747,8 $\pm$ 78,8 <b>a</b> 1711,3 $\pm$ 19,4	410,1 $\pm$ 6,6 <b>a</b> 308,2 $\pm$ 6,9	709,8 $\pm$ 8,5 <b>a</b> 323,6 $\pm$ 9,1
<b>67 °C</b>	4189,5 $\pm$ 45,0 <b>a</b> 2721,4 $\pm$ 72,0	3742,5 $\pm$ 15,7 <b>a</b> 1711,0 $\pm$ 36,4	425,2 $\pm$ 8,9 <b>ac</b> 320,8 $\pm$ 2,5	734,0 $\pm$ 15,7 <b>a</b> 336,4 $\pm$ 2,8
<b>72 °C</b>	4084,5 $\pm$ 129,9 <b>a</b> 2738,0 $\pm$ 84,5	3665,5 $\pm$ 126,2 <b>a</b> 1731,6 $\pm$ 58,6	491,7 $\pm$ 13,3 <b>ac</b> 319,6 $\pm$ 7,5	734,0 $\pm$ 17,3 <b>a</b> 333,2 $\pm$ 9,1
<b>77 °C</b>	4068,5 $\pm$ 347,2 <b>a</b> 2664,6 $\pm$ 108,3	3653,9 $\pm$ 329,8 <b>a</b> 1681,9 $\pm$ 56,1	435,7 $\pm$ 21,6 <b>abc</b> 328,0 $\pm$ 7,4	727,7 $\pm$ 33,6 <b>a</b> 336,8 $\pm$ 8,5
<b>82 °C</b>	4211,9 $\pm$ 43,4 <b>a</b> 2726,8 $\pm$ 46,7	3784,8 $\pm$ 28,0 <b>a</b> 1717,9 $\pm$ 27,3	516,4 $\pm$ 3,7 <b>b</b> 342,7 $\pm$ 7,1	754,9 $\pm$ 8,4 <b>a</b> 339,9 $\pm$ 1,7
<b>87 °C</b>	4119,0 $\pm$ 113,2 <b>a</b> 2646,9 $\pm$ 129,6	3720,6 $\pm$ 81,5 <b>a</b> 1666,9 $\pm$ 75,7	533,2 $\pm$ 10,5 <b>bc</b> 337,7 $\pm$ 4,9	743,4 $\pm$ 19,1 <b>a</b> 330,9 $\pm$ 5,4

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

Infolge der Erhitzung des Plasmas bei **67**, **72** und **77 °C** waren die Xanthophyll-Massenkonzentrationen nicht signifikant verändert. Auch bei **82** und **87 °C** ergaben sich für die all-E-Isomere nur marginal veränderte Werte. (Tab. 4-20)

Entsprechend Tabelle 4-20 wurden die prozentualen Veränderungen der Massenkonzentrationen von 13-Z-Lutein der sich signifikant unterscheidenden Proben berechnet (Tab. 4-21).

Tab. 4-21: Massenkonzentrationsänderungen [%] von 13-Z-Lutein erhitzten Plasmas – Charge 1 (links) und Charge 2 (rechts)

Plasma	Massenkonzentrationsänderungen [%] von 13-Z-Lutein	
Nativ vs. 82 °C	+25,9	+11,2
Nativ vs. 87 °C	+30,0	+9,6
67 °C vs. 82 °C	+21,5	+6,8
72 °C vs. 82 °C	+5,0	+7,2

Die signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein bei **82 °C** gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C waren bei Charge 1 höher als bei Charge 2 ( $\Delta = 14,7 \%$ ), während die signifikante 13-Z-Lutein-Zunahme bei 82 °C gegenüber dem bei 72 °C erhitzten Plasma bei beiden Chargen ähnlich war. (Tab. 4-20 und 4-21)

Auch bei **87 °C** war die signifikante Erhöhung an 13-Z-Lutein im Vergleich zum Nativzustand bei Charge 1 deutlicher als bei Charge 2, wobei die Differenz von 20,4 % ausgeprägter war als infolge der Erhitzung bei 82 °C. (Tab. 4-20 und 4-21)

In Bezug zum Nativzustand war bei Charge 1 die 13-Z-Lutein-Steigerung bei 87 °C um 4,1 % höher als infolge der Erhitzung bei 82 °C. Bei Charge 2 wurde, verglichen mit dem Nativzustand, ein inverses Ergebnis mit einer etwas geringeren 13-Z-Lutein-Zunahme bei 87 °C als nach Erhitzung bei 82 °C ( $\Delta = 1,6 \%$ ) beobachtet. (Tab. 4-21)

Abbildung 4-17 veranschaulicht die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin (Tab. 4-20) nativen und erhitzten Plasmas.

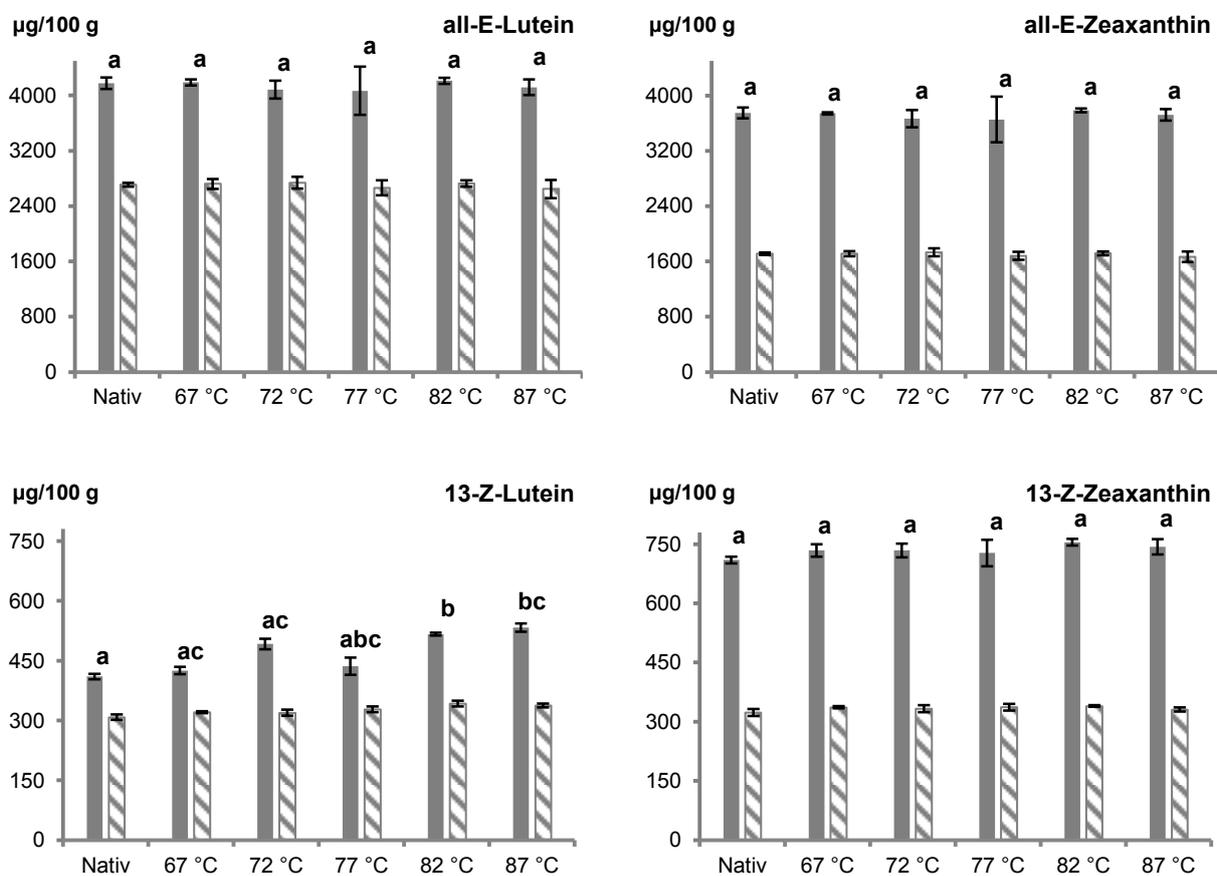


Abb. 4-17: Xanthophyll-Massenkonzentrationen + SD [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ] nativen und erhitzten Plasmas von Charge 1 (grau) und Charge 2 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

**Eigelb**

Tabelle 4-22 zeigt die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und erhitzten Eigelbs und die signifikanten Veränderungen im Vergleich der Temperaturniveaus untereinander und mit dem Nativzustand.

Tab. 4-22: Massenkonzentrationen + SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und erhitzten Eigelbs – Charge 1 (oben) und Charge 2 (unten)

Eigelb	Massenkonzentrationen [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ]							
	all-E-Lutein		all-E-Zeaxanthin		13-Z-Lutein		13-Z-Zeaxanthin	
<b>Nativ</b>	3928,4 ± 39,1	<b>a</b>	3591,3 ± 33,7	<b>a</b>	374,0 ± 2,2	<b>a</b>	579,7 ± 1,8	<b>a</b>
	2557,5 ± 28,2		1668,4 ± 27,6		311,4 ± 2,8		318,4 ± 7,8	
<b>67 °C</b>	3919,6 ± 35,6	<b>a</b>	3585,4 ± 43,9	<b>a</b>	389,1 ± 1,1	<b>a</b>	598,0 ± 1,5	<b>a</b>
	2571,4 ± 38,0		1674,7 ± 28,7		324,2 ± 9,5		329,1 ± 10,6	
<b>72 °C</b>	3808,4 ± 80,2	<b>ab</b>	3493,2 ± 76,3	<b>ab</b>	378,3 ± 8,2	<b>a</b>	577,8 ± 4,2	<b>a</b>
	2547,3 ± 84,4		1662,0 ± 58,2		323,3 ± 7,9		318,4 ± 5,5	
<b>77 °C</b>	3861,9 ± 37,6	<b>a</b>	3540,6 ± 32,1	<b>ab</b>	388,4 ± 6,6	<b>a</b>	586,7 ± 9,1	<b>a</b>
	2475,4 ± 17,1		1614,4 ± 18,6		318,2 ± 1,4		317,2 ± 0,6	
<b>82 °C</b>	3702,6 ± 259,2	<b>ab</b>	3423,5 ± 240,5	<b>ab</b>	381,5 ± 24,7	<b>a</b>	550,7 ± 25,6	<b>a</b>
	2453,7 ± 102,4		1603,7 ± 74,2		323,5 ± 12,0		307,2 ± 10,8	
<b>87 °C</b>	3698,3 ± 54,7	<b>b</b>	3435,0 ± 52,0	<b>b</b>	421,8 ± 6,9	<b>a</b>	576,2 ± 10,2	<b>a</b>
	2353,9 ± 56,6		1550,2 ± 35,4		320,3 ± 12,1		300,9 ± 7,9	

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

Die Hitzebehandlungen bei **67**, **72**, **77** und **82 °C** führten zu keinen signifikant veränderten Xanthophyll-Massenkonzentrationen. Gleiches gilt für 13-Z-Lutein bei **87 °C**. (Tab. 4-22)

In Tabelle 4-23 wurden die prozentualen Veränderungen der Massenkonzentrationen der all-E-Isomere der sich signifikant unterscheidenden Proben berechnet (Tab. 4-22).

Tab. 4-23: Massenkonzentrationsänderungen [%] von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin erhitzten Eigelbs – Charge 1 (links) und Charge 2 (rechts)

Eigelb	Massenkonzentrationsänderungen [%]			
	all-E-Lutein		all-E-Zeaxanthin	
Nativ vs. 87 °C	-5,9	-8,0	-4,4	-7,1
67 °C vs. 87 °C	-5,7	-8,5	-4,2	-7,4
77 °C vs. 87 °C	-4,2	-4,9	n. d.	

n. d. = nicht detektiert

Bei den all-E-Isomeren ergaben sich infolge der Erhitzung bei **87 °C**, wie schon bei den Granula, signifikante Verringerungen gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C. Diese waren bei Charge 2 stärker ausgeprägt als bei Charge 1 ( $\Delta$  ca. 2,1 - 3,2 %). Der signifikante Verlust von all-E-Lutein nach Erhitzung bei 87 °C im Vergleich zu 77 °C war bei beiden Chargen ähnlich. (Tab. 4-22 und 4-23)

Abbildung 4-18 zeigt die Xanthophyll-Massenkonzentrationen (Tab. 4-22) nativen und erhitzten Eigelbs.

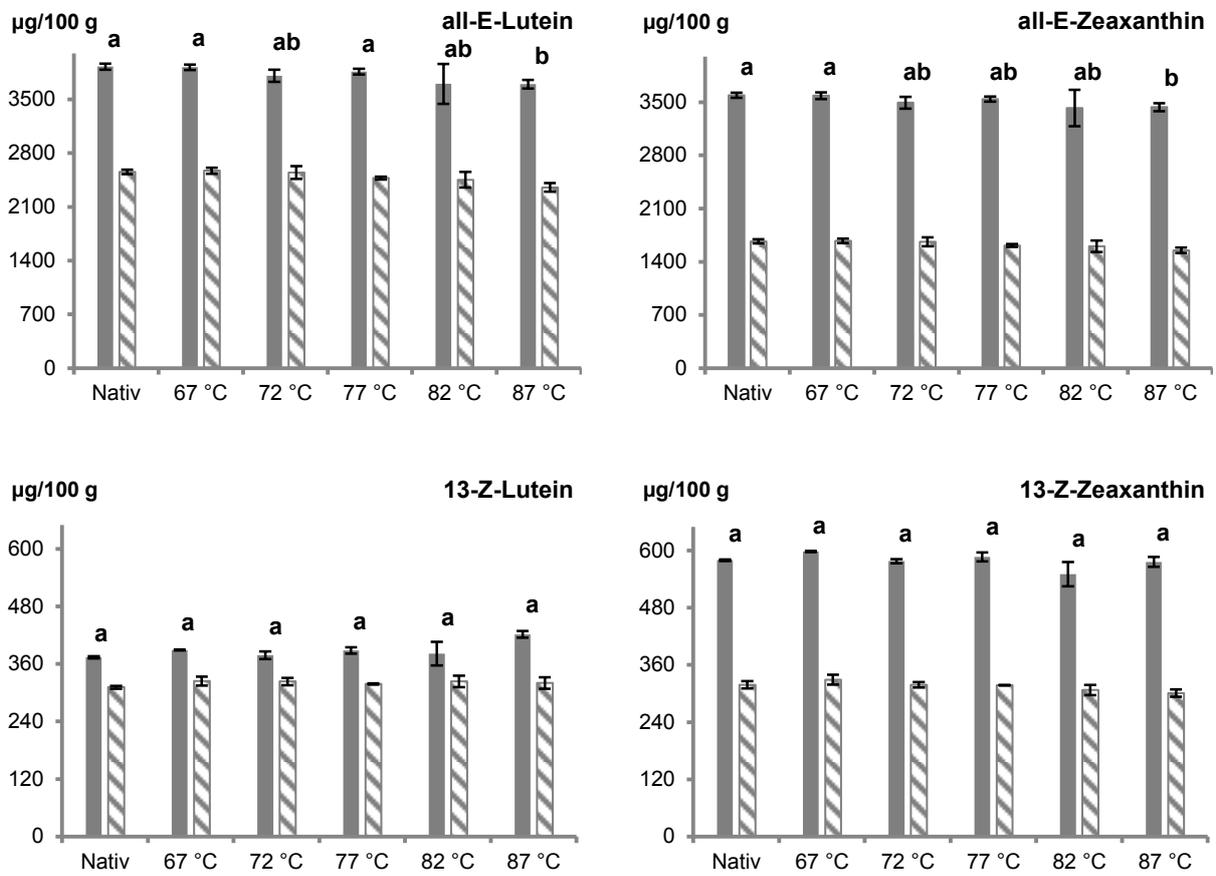


Abb. 4-18: Xanthophyll-Massenkonzentrationen + SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] nativen und erhitzten Eigelbs von Charge 1 (grau) und Charge 2 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

### 4.4.3 Gefriertrocknung

#### Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine

##### Granula

Die DSC-Peaks der Proben von nativen und **rehydrierten** Granula waren hinsichtlich des Temperaturbereichs (ca. 68 bis 97 °C), der Onsets und  $T_d$  (*Nativ*: 75,4 und 83,5 °C, *Rehydriert*: 75,2 und 83,4 °C) sowie  $\Delta H$  (*Nativ*: -2,68 J/g, *Rehydriert*: -2,69 J/g) identisch (Abb. 4-19, Tab. 4-24).

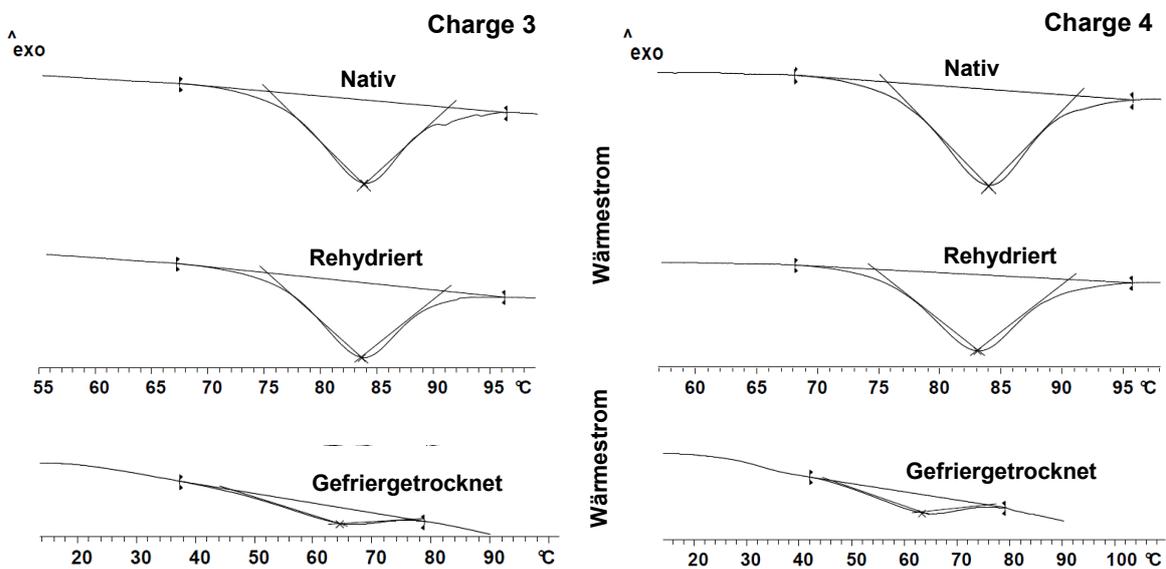


Abb. 4-19: DSC-Thermogramme nativer, rehydrierter und gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4

Der DSC-Peak der **gefriergetrockneten** Granula wies deutlich geringere Werte für den Temperaturbereich (ca. 38/42 bis 79 °C), den Onset und die  $T_d$  (44,3 und 64,0 °C) als im Nativzustand auf, was ebenso für den  $\Delta H$ -Wert (-1,11 J/g) und die Ausprägung des Peaks galt (Abb. 4-19, Tab. 4-24).

Tab. 4-24: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  des DSC-Peaks nativer, rehydrierter und gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4

Granula		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
Charge 3	<i>Nativ</i>	75,5 ± 0,2	83,7 ± 0,1	-2,61 ± 0,11 <sup>a</sup>
	<i>Rehydriert</i>	75,6 ± 0,1	83,6 ± 0,1	-2,54 ± 0,07 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	43,7 ± 0,4	64,8 ± 0,5	-1,20 ± 0,00
Charge 4	<i>Nativ</i>	75,3 ± 0,3	83,4 ± 0,1	-2,75 ± 0,13 <sup>a</sup>
	<i>Rehydriert</i>	74,7 ± 0,0	83,1 ± 0,1	-2,84 ± 0,08 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	44,9 ± 0,1	63,2 ± 0,2	-1,02 ± 0,04

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede von  $\Delta H$  ( $\alpha = 0,05$ )

## Plasma

Wie bei den Granula zeichnete sich der DSC-Peak des **gefriergetrockneten** Plasmas durch deutlich geringere Werte beim Temperaturbereich (ca. 40/42 bis 72 °C), beim Onset und der  $T_d$  (42,6 und 56,1 °C) als im Nativzustand aus (Abb. 4-20, Tab. 4-25).

Bei den nativen und **rehydrierten** Plasma-Proben wurden die Peaks der Strukturentfaltung der LDL (Peak 1: ca. 69/70 bis 81 °C) und der HDL der Granula-Reste (Peak 2: ca. 81 °C bis 95/96 °C) detektiert. Der Onset (*Nativ*: 71,4 °C, *Rehydriert*: 71,1 °C) und  $T_d$  (*Nativ*: 76,0 °C, *Rehydriert*: 75,9 °C) von Peak 1 waren bei nativem und rehydriertem Plasma identisch. Gleiches gilt für Peak 2 (Onset = *Nativ*: 78,9 °C, *Rehydriert*: 77,6 °C /  $T_d$  = *Nativ*: 86,3 °C, *Rehydriert*: 86,7 °C). Zudem war  $\Delta H$  von Peak 2 bei nativem und rehydriertem Plasma identisch (je -0,34 J/g). (Abb. 4-20, Tab. 4-25)

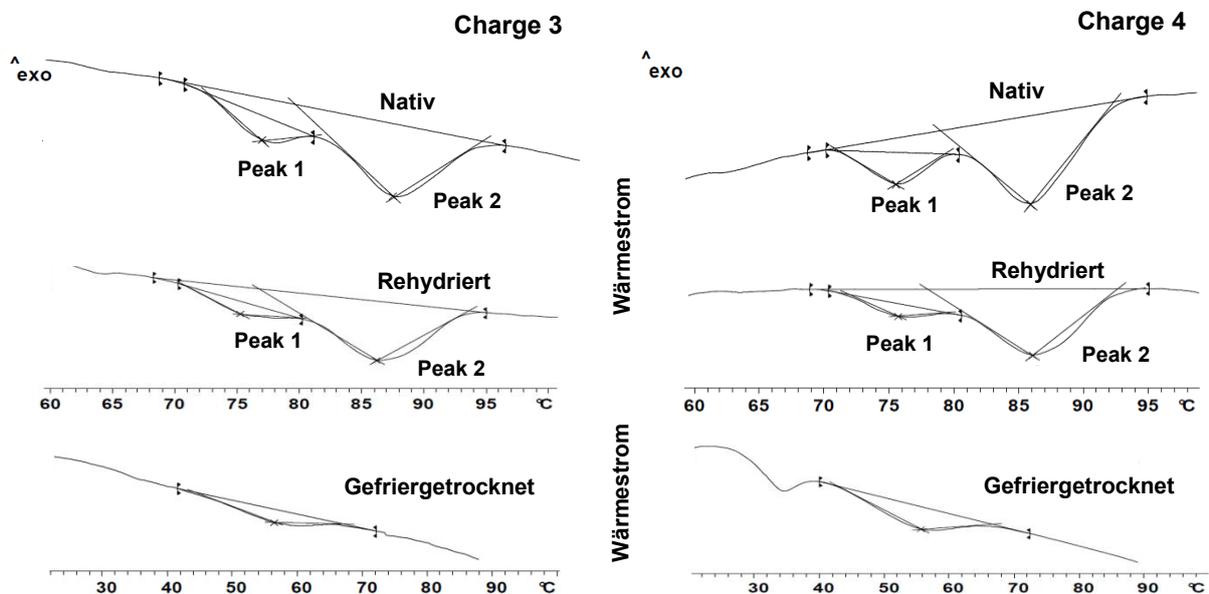


Abb. 4-20: DSC-Thermogramme nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4

Bei rehydriertem Plasma war Peak 1 geringer ausgeprägt als im Nativzustand, wobei  $\Delta H$  von Peak 1 bei Charge 3 signifikant ( $\Delta = 0,02$  J/g) und bei Charge 4 nur marginal geringer war. (Abb. 4-20, Tab. 4-25)

Tab. 4-25: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  des DSC-Peaks nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4

Plasma		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
Charge 3	<b>Nativ</b>			
	Peak 1	$71,6 \pm 0,1$	$76,2 \pm 0,1$	$-0,05 \pm 0,00^a$
	Peak 2	$78,6 \pm 0,1$	$86,5 \pm 0,2$	$-0,35 \pm 0,01^a$
	<b>Rehydriert</b>			
	Peak 1	$70,8 \pm 0,3$	$75,5 \pm 0,3$	$-0,03 \pm 0,00^b$
	Peak 2	$77,6 \pm 0,0$	$86,4 \pm 0,4$	$-0,32 \pm 0,04^a$
	<b>Gefriergetrocknet</b>	$42,6 \pm 2,1$	$57,1 \pm 0,9$	$-0,42 \pm 0,07$
Charge 4	<b>Nativ</b>			
	Peak 1	$71,3 \pm 0,1$	$75,7 \pm 0,0$	$-0,05 \pm 0,00^a$
	Peak 2	$79,2 \pm 0,1$	$86,1 \pm 0,0$	$-0,32 \pm 0,01^a$
	<b>Rehydriert</b>			
	Peak 1	$71,4 \pm 0,0$	$76,3 \pm 0,8$	$-0,04 \pm 0,02^a$
	Peak 2	$77,6 \pm 0,2$	$86,9 \pm 1,1$	$-0,35 \pm 0,05^a$
	<b>Gefriergetrocknet</b>	$42,6 \pm 0,0$	$55,2 \pm 0,5$	$-0,44 \pm 0,12$

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede von  $\Delta H$  ( $\alpha = 0,05$ )

### Eigelb

Wie bei Granula und Plasma unterschied sich der DSC-Peak des **gefriergetrockneten** Eigelbs mit einem geringeren Temperaturbereich (ca. 38/39 bis 70/81 °C), Onset (42,6 °C) und geringerer  $T_d$  (58,0 °C) sowie einer verminderten  $\Delta H$  (-0,76 J/g) deutlich vom Nativzustand. (Abb. 4-21, Tab. 4-26)

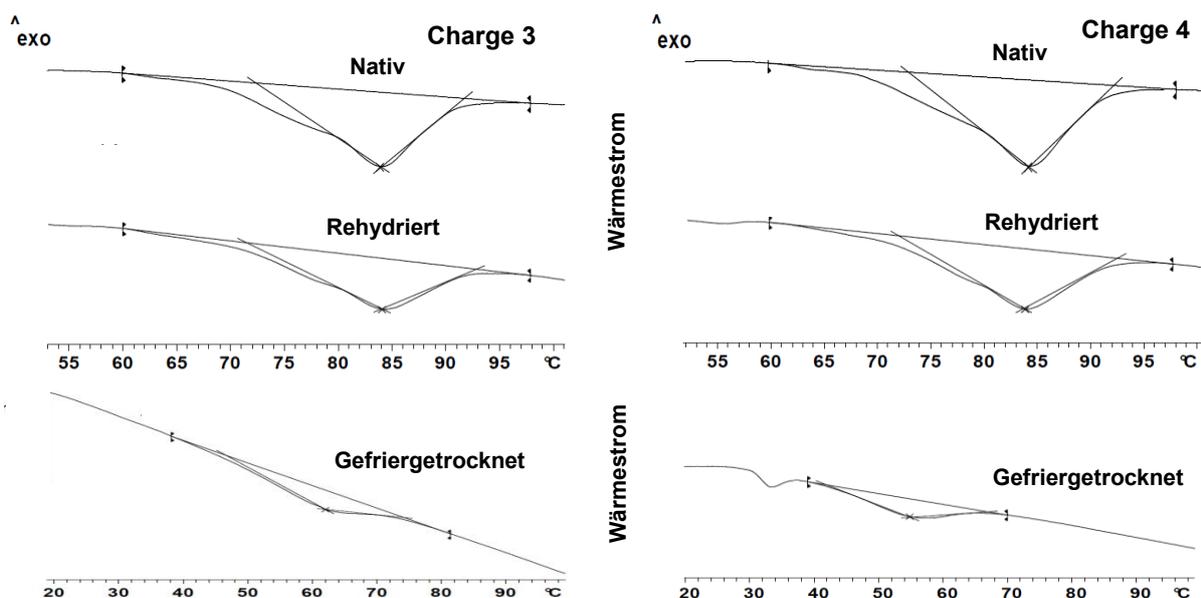


Abb. 4-21: DSC-Thermogramme nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4

Bei **rehydriertem** Eigelb wurde wie bei der nativen Probe der typische, die Strukturentfaltung der Livetine, LDL und HDL repräsentierende Peak (ca. 60 bis 98 °C) detektiert. Die Onsets und  $T_d$  des Peaks rehydrierten (71,1 und 83,9 °C) und nativen Eigelbs (72,8 und 84,1 °C) waren ähnlich. Im Vergleich zum Nativzustand war  $\Delta H$  des Peaks rehydrierten Eigelbs ( $\Delta$  ca. 0,07 J/g) nicht signifikant vermindert. In Einklang mit Plasma war die Ausprägung des Peaks rehydrierten Eigelbs im Bereich der LDL-Entfaltung (68 bis 79/80 °C) geringer als im Nativzustand. (Abb. 4-21, Tab. 4-26)

Tab. 4-26: Onsets,  $T_d$  und  $\Delta H \pm SD$  des DSC-Peaks nativen, rehydrierten und gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4

Eigelb		Onset [°C]	$T_d$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
Charge 3	<i>Nativ</i>	72,6 ± 0,8	84,0 ± 0,0	-1,55 ± 0,04 <sup>a</sup>
	<i>Rehydriert</i>	71,0 ± 0,3	83,9 ± 0,3	-1,45 ± 0,06 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	43,4 ± 0,4	61,3 ± 0,9	-0,89 ± 0,03
Charge 4	<i>Nativ</i>	73,0 ± 0,1	84,3 ± 0,2	-1,49 ± 0,01 <sup>a</sup>
	<i>Rehydriert</i>	71,3 ± 0,0	83,9 ± 0,0	-1,46 ± 0,02 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	41,7 ± 0,1	54,8 ± 0,0	-0,63 ± 0,01

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede von  $\Delta H$  ( $\alpha = 0,05$ )

## ***Xanthophyll-Massenkonzentrationen***

### **Granula**

Tabelle 4-27 zeigt die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativer und gefriergetrockneter Granula und die signifikanten Veränderungen beim Vergleich mit dem Nativzustand.

Tab. 4-27: Massenkonzentrationen  $\pm SD$  [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativer und gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4

Granula		Massenkonzentrationen [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ]			
		all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
Charge 3	<i>Nativ</i>	2808,6 ± 88,3 <sup>a</sup>	1769,8 ± 45,8 <sup>a</sup>	264,8 ± 6,3 <sup>a</sup>	341,6 ± 12,8 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	3158,6 ± 42,6 <sup>b</sup>	2065,3 ± 48,8 <sup>b</sup>	308,5 ± 6,0 <sup>b</sup>	376,2 ± 5,5 <sup>b</sup>
Charge 4	<i>Nativ</i>	1626,7 ± 75,1 <sup>a</sup>	1285,7 ± 52,0 <sup>a</sup>	157,2 ± 5,3 <sup>a</sup>	272,1 ± 9,3 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	1830,8 ± 41,4 <sup>b</sup>	1487,6 ± 30,2 <sup>b</sup>	180,6 ± 6,2 <sup>b</sup>	293,2 ± 7,7 <sup>b</sup>

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

Die bei gefriergetrockneten Granula signifikanten Zunahmen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin (Tab. 4-27) sind als prozentuale Massenkonzentrationssteigerung in Tabelle 4-28 dargestellt. Zusammen mit den identischen Zunahmen an all-E-Lutein waren die Steigerungen der 13-Z-Isomere und von all-E-Zeaxanthin bei Charge 3 um 1,0 - 2,3 % und damit nur marginal höher als bei Charge 4 (Tab. 4-28).

Tab. 4-28: Massenkonzentrationsänderungen [%] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin gefriergetrockneter Granula der Chargen 3 und 4

Granula	Massenkonzentrationsänderungen [%]			
	all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
Charge 3	+12,5	+16,7	+16,5	+10,1
Charge 4	+12,6	+15,7	+14,9	+7,8

Gegenüber all-E-Lutein waren die prozentualen Zunahmen an all-E-Zeaxanthin um ca. 3,7 % höher, und die 13-Z-Lutein-Zunahme war um ca. 6,8 % höher als die von 13-Z-Zeaxanthin (Tab. 4-28).

Abbildung 4-22 veranschaulicht die Änderungen der Xanthophyll-Massenkonzentrationen (Tab. 4-27 und 4-28) im Vergleich nativer und gefriergetrockneter Granula.

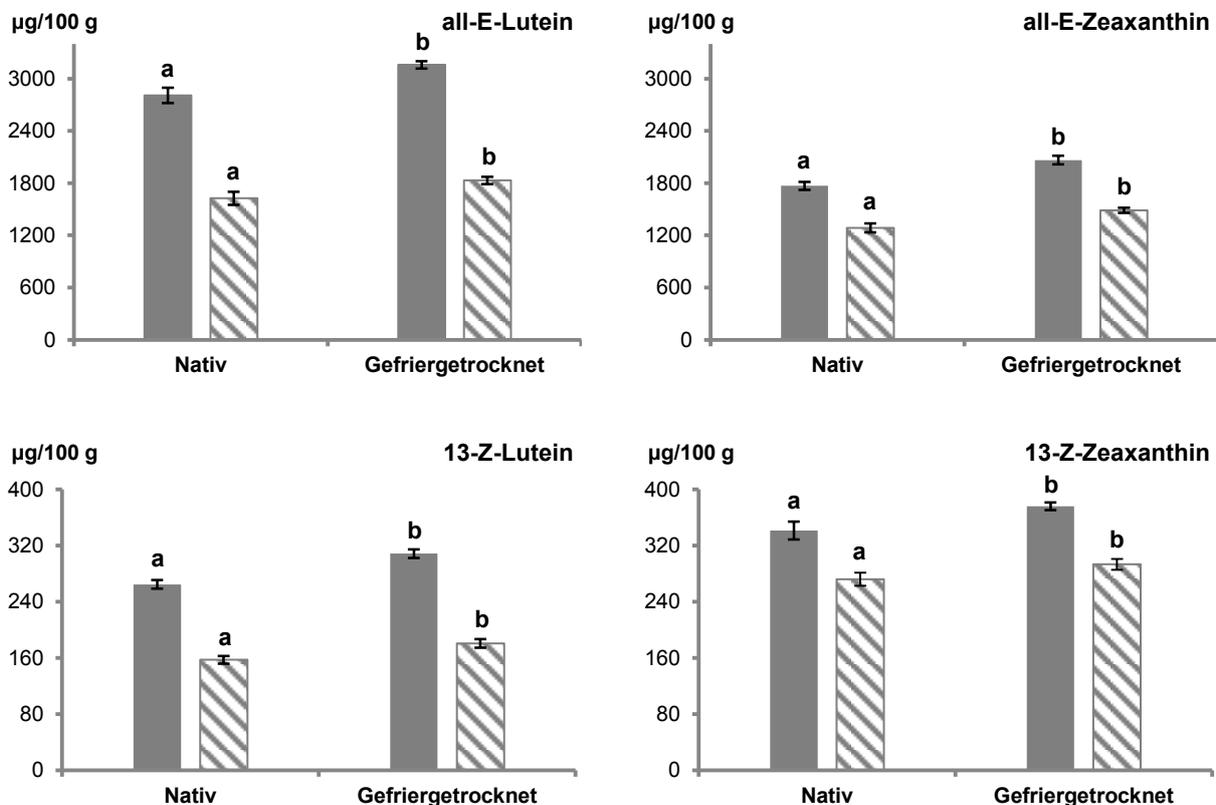


Abb. 4-22: Xanthophyll-Massenkonzentrationen ± SD [µg/100 g] nativer und gefriergetrockneter Granula von Charge 3 (grau) und Charge 4 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

## Plasma

Den Einfluss der Gefriertrocknung auf die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Plasma zeigen Tabelle 4-29 und Tabelle 4-30.

Tab. 4-29: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4

Plasma		Massenkonzentrationen [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ]			
		all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
Charge 3	<i>Nativ</i>	4468,6 $\pm$ 143,4 <sup>a</sup>	3014,2 $\pm$ 83,5 <sup>a</sup>	386,4 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>	635,3 $\pm$ 20,0 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	5238,2 $\pm$ 208,5 <sup>b</sup>	3618,7 $\pm$ 60,0 <sup>b</sup>	506,5 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>	658,2 $\pm$ 14,9 <sup>a</sup>
Charge 4	<i>Nativ</i>	2537,5 $\pm$ 21,5 <sup>a</sup>	2155,0 $\pm$ 32,8 <sup>a</sup>	236,2 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	440,3 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>
	<i>Gefriergetrocknet</i>	3050,2 $\pm$ 70,8 <sup>b</sup>	2676,1 $\pm$ 49,1 <sup>b</sup>	305,1 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>	525,3 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

Wie bei den Granula wurden signifikant höhere Massenkonzentrationen an all-E-Lutein, all-E-Zeaxanthin und 13-Z-Lutein in gefriergetrocknetem Plasma beobachtet. Für all-E-Lutein ( $\Delta = 3,0 \%$ ) und all-E-Zeaxanthin ( $\Delta = 4,1 \%$ ) waren die Zunahmen bei Charge 4 deutlicher. Dagegen war die Steigerung an 13-Z-Lutein bei Charge 3 etwas ausgeprägter ( $\Delta = 1,9 \%$ ). Ein deutlicher Unterschied zwischen den Chargen zeigte sich bei 13-Z-Zeaxanthin, da die Zunahme bei Charge 4 mit  $+19,3 \%$  signifikant und bei Charge 3 mit  $+3,6 \%$  nur marginal ausgeprägt war. (Tab. 4-29 und 4-30)

Tab. 4-30: Massenkonzentrationsänderungen [%] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin gefriergetrockneten Plasmas der Chargen 3 und 4

Plasma	Massenkonzentrationsänderungen [%]			
	all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
Charge 3	+17,2	+20,1	+31,1	+3,6
Charge 4	+20,2	+24,2	+29,2	+19,3

Wie bei den Granula schon beobachtet, waren die Zunahmen an all-E-Zeaxanthin gegenüber all-E-Lutein etwas höher ( $\Delta$  ca.  $3,5 \%$ ), während die Steigerungen an 13-Z-Lutein höher als die von 13-Z-Zeaxanthin waren (*Charge 3*:  $\Delta = 27,5 \%$ ; *Charge 4*:  $\Delta = 9,9 \%$ ; Tab. 4-30).

Abbildung 4-23 veranschaulicht die Xanthophyll-Gehalte (Tab. 4-29) nativen und gefriergetrockneten Plasmas.

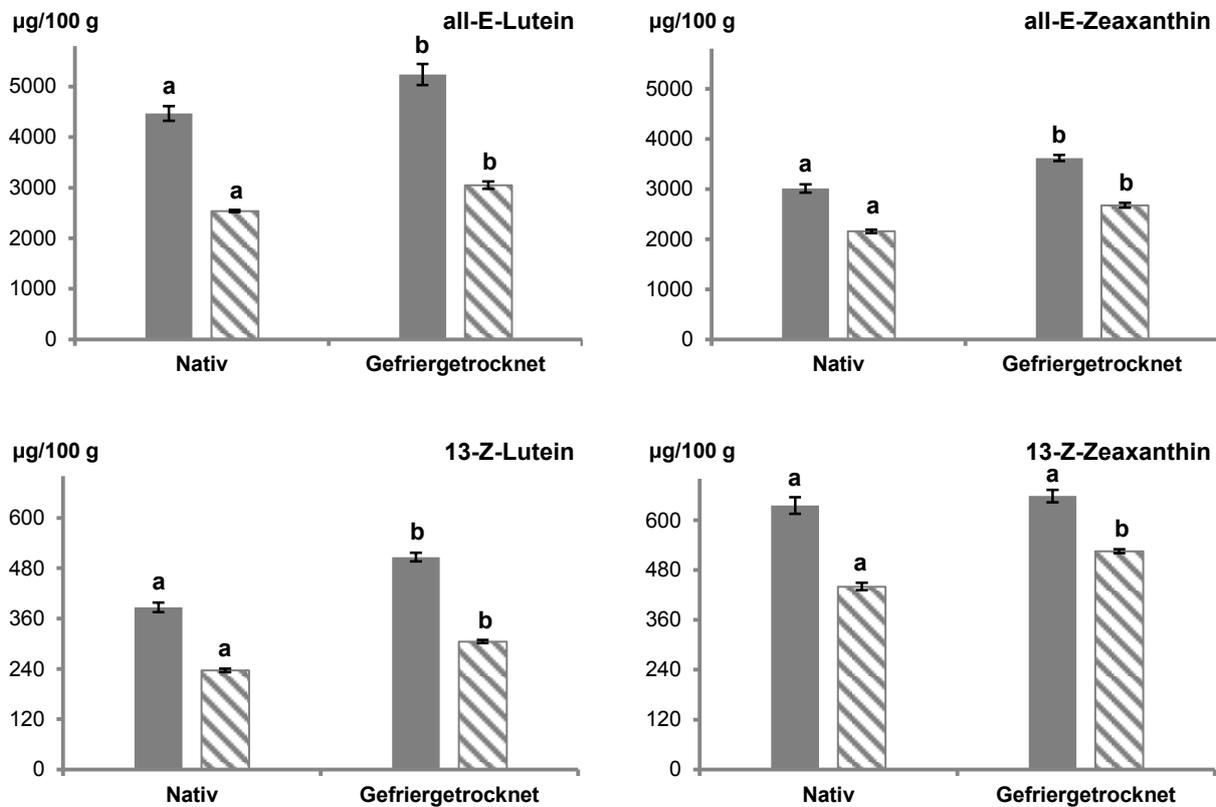


Abb. 4-23: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] nativen und gefriergetrockneten Plasmas von Charge 3 (grau) und Charge 4 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

### Eigelb

Die Xanthophyll-Gehalte gefriergetrockneten Eigelbs differierten im Vergleich zum Nativzustand bei Charge 3 marginal, was ebenso für 13-Z-Lutein bei Charge 4 galt (Tab. 4-31).

Tab. 4-31: Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin nativen und gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4

Eigelb		Massenkonzentrationen [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ]			
		all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
Charge 3	Nativ	4112,3 $\pm$ 105,4 <sup>a</sup>	2842,3 $\pm$ 79,8 <sup>a</sup>	372,0 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	532,5 $\pm$ 23,7 <sup>a</sup>
	Gefriergetrocknet	3936,7 $\pm$ 128,8 <sup>a</sup>	2736,8 $\pm$ 73,7 <sup>a</sup>	365,7 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>	476,3 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>
Charge 4	Nativ	2429,1 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	2146,8 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>	235,1 $\pm$ 13,1 <sup>a</sup>	424,2 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>
	Gefriergetrocknet	2320,6 $\pm$ 14,9 <sup>b</sup>	2049,2 $\pm$ 22,3 <sup>b</sup>	221,3 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	375,5 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>

Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

Die all-E-Isomere und 13-Z-Zeaxanthin waren bei Charge 4 infolge der Gefriertrocknung signifikant verringert, wobei die Verminderungen gemäß den prozentualen Veränderungen bei Charge 4 nur marginal höher waren als bei Charge 3 ( $\Delta$  ca. 0,2 - 0,9 %). Der Verlust an 13-Z-Lutein war bei Charge 4 um 4,2 % höher als bei Charge 3. (Tab. 4-31 und 4-32)

Tab. 4-32: Massenkonzentrationsänderungen [%] der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin gefriergetrockneten Eigelbs der Chargen 3 und 4

Eigelb	Massenkonzentrationsänderungen [%]			
	all-E-Lutein	all-E-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
Charge 3	-4,3	-3,7	-1,7	-10,6
Charge 4	-4,5	-4,6	-5,9	-11,5

Bei gefriergetrocknetem Eigelb waren die Massenkonzentrationen von all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin gemittelt um 4,3 % geringer als im Nativzustand. Gegenüber dem maximalen Verlust an 13-Z-Lutein bei Charge 4 (-5,9 %) waren die Konzentrationen an 13-Z-Zeaxanthin nach der Gefriertrocknung deutlich stärker verringert (-11,1 %). (Tab. 4-32)

Anhand von Abbildung 4-24 sind die Änderungen der Xanthophyll-Gehalte (Tab. 4-31 und 4-32) bei gefriergetrocknetem Eigelb im Vergleich zum Nativzustand erkennbar.

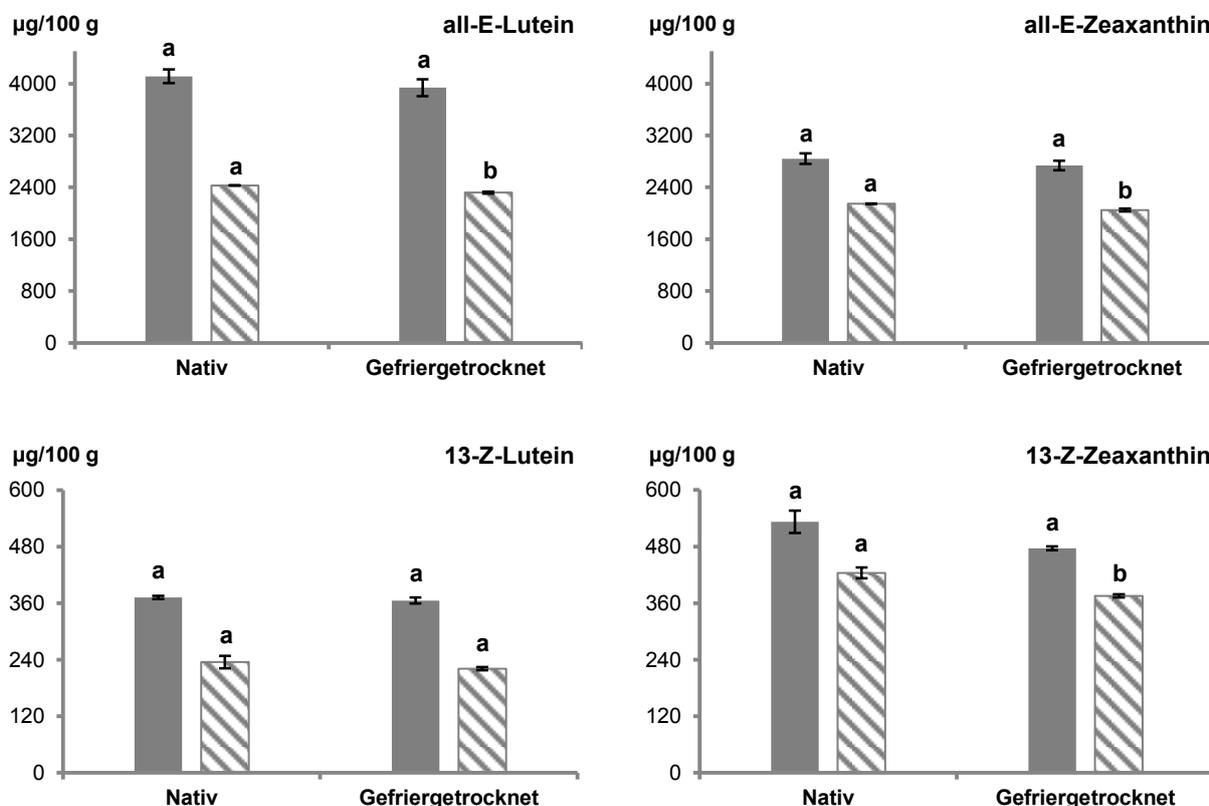


Abb. 4-24: Xanthophyll-Massenkonzentrationen  $\pm$  SD [ $\mu$ g/100 g] nativen und gefriergetrockneten Eigelbs von Charge 3 (grau) und Charge 4 (schraffiert) – Abweichende Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ )

## 5. Diskussion

Einleitend zur Diskussion sind grundlegende Aspekte zur Interpretation der DSC-Thermogramme und der Xanthophyll-Massenkonzentrationen darzustellen.

Die DSC-Thermogramme der nativen, erhitzten und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb wurden ausgewertet basierend auf den temperaturabhängigen Strukturentfaltungen der Livetine, LDL und HDL, die aus den Literaturangaben (Kapitel 2.2.1) nach Abbildung 5-1 abgeleitet wurden.

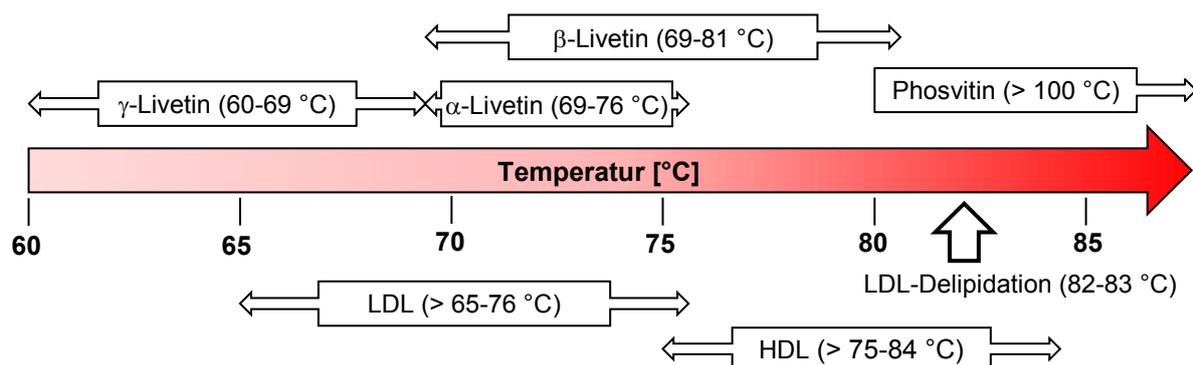


Abb. 5-1: Thermoinduzierte Strukturveränderungen der Livetine, LDL, HDL und von Phosvitin in Eigelb [nach Jaekel und Ternes 2009; Li-Chan und Kim 2008; Ternes 2008b; Bircan und Barringer 2002; Le Denmat *et al.* 1999; Acker und Ternes 1994; Ternes und Acker 1994a und 1994c; Mohr und Simon 1992]

Bei **Plasma** wurde der Einfluss der nur zu 2,6 % enthaltenen Granula-Reste auf die Xanthophyll-Massenkonzentrationen aufgrund der Geringfügigkeit nicht berücksichtigt.

### 5.1 Nativzustand

#### **Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine**

Den symmetrischen Peak des DSC-Thermogramms nativer **Granula** (ca. 68 bis 97 °C; Abb. 4-12, Tab. 4-13) dominierte die Strukturentfaltung der zu 70 % enthaltenen HDL gegenüber derjenigen der LDL, da deren Anteil mit 12 % deutlich geringer ist [Anton 2007]. Aufgrund der Entfaltung der LDL, die hauptsächlich zwischen 70 und 75 °C stattfindet, und der oberhalb 75 °C beginnenden Strukturentfaltung der HDL zeigte sich der Onset des Peaks bei 75,2 °C, und die  $T_d$  bei 83,5 °C stimmte mit Literaturangaben zur vollständigen HDL-Struktur-entfaltung bei 84,3 °C [Bircan und Barringer 2002] überein.

Eine verminderte Intensität der elektrophoretischen  $\alpha$ -HDL-Bande zwischen 72 und 76 °C bei gleichbleibender Intensität der  $\beta$ -HDL-Bande [Le Denmat *et al.* 1999] und ein um den Faktor 1,5 höherer Anteil an  $\beta$ -HDL in den Granula [Anton 2007] weisen darauf hin, dass das detektierte Peakmaximum überwiegend auf der Entfaltung der  $\beta$ -HDL-Struktur basierte. Der Peak-Bereich zwischen 68 °C und 77 °C lässt sich mit partiellen Strukturentfaltungen von  $\alpha$ -HDL und hauptsächlich der LDL, die oberhalb 65 °C beginnen und bei 76 °C abgeschlossen sind, erklären.

Bei nativem, verdünntem **Plasma** waren zwischen ca. 69/70 bis 95/96 °C (Abb. 4-12, Tab. 4-13) zwei Peaks identifizierbar. Peak 1 (ca. 69/70 °C bis 81 °C) wies einen Onset von 71,3 °C und  $T_d$  bei 75,8 °C auf. Neben der Denaturierung von  $\alpha$ -Livetin (69 bis 76 °C) und von  $\beta$ -Livetin (69 bis 81 °C) repräsentiert Peak 1 daher überwiegend die zwischen 70 und 76 °C konstatierte Strukturentfaltung der LDL, die in Plasma dominieren. Der stärker ausgeprägte Peak 2 zwischen 81 und 95/96 °C mit einem Onset von 79,1 °C und  $T_d$  von 86,0 °C ist auf die oberhalb von 75 °C beginnende und bei ca. 84 °C abgeschlossene HDL-Strukturentfaltung der zentrifugationsbedingten Granula-Reste (2,6 %) zurückzuführen. Hierbei basiert das Peakmaximum wie bei den Granula hauptsächlich auf der Strukturentfaltung von  $\beta$ -HDL. Gegenüber Peak 1 war  $\Delta H$  von Peak 2 um den Faktor 6,6 höher. Dies könnte auf die mit Phosvitin über Phosphocalciumbrücken komplexierte HDL-Dimer-Struktur der Granula zurückzuführen sein.

Da sich die Messkurve mit Zunahme der Heizrate zu höheren Temperaturen verschob [Keil 2013], basieren der im Vergleich zu den Granula höhere Onset und die höhere  $T_d$  von Peak 2 des Plasmas (Tab. 4-13) vermutlich auf dem ca. um den Faktor zwei höheren Wasseranteil des Plasmas, der eine höhere Wärmeleitfähigkeit bedingt. Aufgrund der geringen Granula-Reste und der 1:1-Verdünnung des Plasmas war  $\Delta H$  des die HDL-Entfaltung repräsentierenden Peaks 2 (-0,32 J/g) deutlich geringer als bei den Granula (-2,93 J/g).

In Vorversuchen zeigte das DSC-Thermogramm nativen, unverdünnten Plasmas zwischen ca. 60 und 68 °C die Denaturierung von  $\gamma$ -Livetin. Diese war bei einer Verdünnung des Plasmas von 3,5:1 schwächer ausgeprägt und bei der 1:1-Verdünnung daher nicht mehr detektierbar. [Keil 2013]

Bei **Eigelb** zeigte sich ein Peak, der als Denaturierung der Livetine und Strukturentfaltung der Lipoproteine interpretiert wird (ca. 60 bis 98 °C; Abb. 4-12, Tab. 4-13). Die geringe Ausprägung des Peaks zwischen 60 und 68 °C weist auf die ab 60 °C beginnende Denaturierung der zu 10 % enthaltenen Livetine hin [Powrie und Nakai 1986]. Dabei spielt besonders die bei 62 °C fortgeschrittene und bei 69 °C vollständige Denaturierung von  $\gamma$ -Livetin eine Rolle, da  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetin bis ca. 69 °C stabil sind.

Der Peak-Bereich ab ca. 68 bis 79/80 °C könnte wie Peak 1 des Plasmas auf Denaturierungen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetine und überwiegend der Entfaltung der zu 68 % enthaltenen LDL [Powrie und Nakai 1986] basieren. Der hier ermittelte Onset des DSC-Peaks bei Eigelb von 73,1 °C stimmte mit dem Onset von Peak 1 des Plasmas (71,3 °C) und des Peaks der Granula (75,2 °C; Tab. 4-13) sowie mit dem über das gewichtete Mittel entsprechend der Eigelb-Komposition (78 % Plasma, 22 % Granula) [Powrie und Nakai 1986] errechneten Onset (72,2 °C) überein. Die zwischen ca. 79/80 bis 98 °C starke Ausprägung des Peaks bei Eigelb stand in Einklang mit Peak 2 des Plasmas (ca. 81 °C bis 95/96 °C; Abb. 4-12). Auch die  $T_d$  (84,1 °C) des Peaks bei Eigelb stimmte mit derjenigen bei Peak 2 des Plasmas (86,0 °C) und des Peaks der Granula (83,5 °C; Tab. 4-13) sowie dem errechneten gewichteten Mittel von 85,5 °C überein. Wie bei Plasma wird der Peak-Bereich zwischen ca. 79/80 bis 98 °C bei Eigelb daher auf die Strukturentfaltung der HDL zurückgeführt, wobei diejenige von  $\beta$ -HDL am Peakmaximum dominierte.

In Eigelb ist der Anteil an HDL (16 %) deutlich geringer als der LDL-Anteil (68 %) [Powrie und Nakai 1986]. Dennoch dominiert die Strukturentfaltung der thermostabilen HDL die Lage und Form des DSC-Peaks von Eigelb, was vermutlich in der höheren benötigten normierten Gesamtenthalpie gegenüber den LDL begründet liegt. Dabei war  $\Delta H$  (-1,49 J/g) des Peaks bei Eigelb geringer als  $\Delta H$  des Granula-Peaks (-2,93 J/g) und höher als  $\Delta H$  von Peak 1 der LDL-Strukturentfaltung (-0,05 J/g) bei Plasma (Tab. 4-13). Der ermittelte Messwert stimmte nicht mit dem anhand der Eigelb-Komposition unter Berücksichtigung der Verdünnung bei Plasma berechneten gewichteten Mittel (-0,72 J/g) überein. Neben Messunsicherheiten infolge des geringen  $\Delta H$ -Wertes von Peak 1 bei Plasma könnte dies in den spezifischen Matrixeigenschaften von Granula, Plasma und Eigelb, besonders hinsichtlich der durch die Trockenmasse beeinflussten Wärmeleitfähigkeit, begründet liegen.

### ***Xanthophyll-Massenkonzentrationen***

Der geringe sterische Hinderungseffekt bei trisubstituierten Doppelbindungen bedingt eine hohe Stabilität der Z-Isomere und eine geringe Aktivierungsenergie der Z-Isomerisierung der all-E-Isomere [Britton und Khachik 2009]. Daher wurden in den nativen, erhitzten und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb wie auch bei Wenzel (2010) die 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin detektiert.

Basierend auf der Futteraufnahme schwankten die Konzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin der aus unterschiedlichen Legebetrieben und damit Hühner-Kohorten stammenden vier untersuchten Chargen von Bio-Eiern im Nativzustand bei Granula, Plasma und Eigelb um Faktoren im Bereich von 1,6 - 2,2 (Anhang 2, Tab. 2-1).

Der hohe Lipidgehalt von Plasma (73 %) ist durch den Anteil an LDL von 85 % und wiederum deren hohen Lipidgehalt von 88 % bedingt, während Granula (31 % Lipide) neben 12 % an LDL zu 70 % HDL mit einem relativ geringen Lipidanteil von 25 % enthalten [Anton 2007; Powrie und Nakai 1986]. Damit ist der Lipidgehalt des Plasmas ca. 2,4-mal höher als der von Granula. Die Konzentrationen an Lutein und Zeaxanthin sind bezogen auf den Lipidanteil in den Lipoproteinen gleich [Ternes *et al.* 1995]. Daher sollten die Xanthophyll-Gehalte in Plasma ungefähr doppelt so hoch sein wie in den Granula, was Testmessungen in Vorversuchen bestätigten. In nativem, 1:1-verdünntem Plasma mit einem theoretischen Lipidgehalt von ca. 37 % waren die Xanthophyll-Konzentrationen ca. 1,4- bis 1,9-fach höher als bei den Granula (Anhang 2, Tab. 2-1).

Die ökologische Haltung von Hühnern verbietet den Einsatz synthetisierter Supplemente oder mittels organischer Lösungsmittel gewonnener Pflanzenextrakte der bei der Bodenhaltung für die Geflügelfütterung in der EU zugelassenen Xanthophylle [BVL 2011]. In den Futterpflanzen wie Mais, Erbsen, Spinat und *Tagetes*-Arten sind Lutein und Zeaxanthin in hohen Mengen enthalten und fast ausschließlich mit Fettsäuren verestert, was die Fettlöslichkeit und Absorptionseffizienz erhöht [Boonnoun *et al.* 2012; Khachik 2001; Delgado-Vargas und Paredes-López 1996; Gregory *et al.* 1986; Philip *et al.* 1976]. Daher dominieren in Eiern aus ökologischer Haltung Lutein und Zeaxanthin im Vergleich zu anderen Haltungsformen [Schlatterer und Breithaupt 2006]. Zudem neigen unveresterte Xanthophylle in Supplementen zur Aggregation [Köhn *et al.* 2008], was deren Bioverfügbarkeit verringern kann [Britton *et al.* 2008]. Im Eigelb sind Lutein und Zeaxanthin hauptsächlich unverestert [Handelman *et al.* 1999; Lai *et al.* 1996; Philip *et al.* 1976], da Xanthophyll-Ester durch eine lipasekatalysierte Hydrolyse im Darmlumen deacetyliert werden [Breithaupt *et al.* 2003].

Die genannten Gründe erklären die deutlich höheren Xanthophyll-Gehalte in nativem Eigelb aus ökologischer Haltung im Vergleich zu Eiern aus Bodenhaltung (all-E-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin: 5,1-fach; all-E-Zeaxanthin: 5,7-fach; 13-Z-Lutein: 13,5-fach; Tab. 5-1). Dabei scheint besonders 13-Z-Lutein in den Futterpflanzen in hohen Mengen vorzukommen.

Tab. 5-1: Vergleich der Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in nativem Eigelb mit Literaturangaben nach Wenzel (2010) und Schlatterer und Breithaupt (2006)

Massenkonzentrationen [µg/100 g]	Ökologische Haltung		Bodenhaltung
	HPLC-PDA-Analyse*	Schlatterer und Breithaupt (2006)	Wenzel (2010)*
all-E-Lutein	3256,8 ± 43,5	1764,1 ± 430,0	639,1 ± 25,3
all-E-Zeaxanthin	2562,2 ± 36,5	1021,4 ± 199,5	450,0 ± 23,7
13-Z-Lutein	323,1 ± 5,4	Keine Angaben	23,9 ± 5,3
13-Z-Zeaxanthin	463,7 ± 11,2		90,4 ± 4,8

\* Mittelwerte der untersuchten Chargen

Die gegenüber Schlatterer und Breithaupt (2006) festgestellten höheren Gehalte an all-E-Lutein (Faktor 1,8) und all-E-Zeaxanthin (Faktor 2,5; Tab. 5-1) sind vermutlich durch Schwankungen der Futterzusammensetzung bei der ökologischen Haltung bedingt.

Wie bei Wenzel (2010) und Schlatterer und Breithaupt (2006) dominierte all-E-Lutein gegenüber all-E-Zeaxanthin (Tab. 5-1). Dies liegt vermutlich darin begründet, dass Lutein als Hauptcarotinoid in den Chloroplasten [Britton 2008a] vorkommt und Zeaxanthin aufgrund des leichten Umbaus zu Epoxyxanthophyllen häufig ein Minorcarotinoid in den Futterpflanzen ist [Rodriguez-Amaya 2003; Khachik 2001; Hadden *et al.* 1999; Gregory *et al.* 1986].

Die Anteile an 13-Z-Isomeren an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration im Nativzustand waren sowohl bei beiden Chargen als auch bei Granula, Plasma und Eigelb ähnlich, wobei der Anteil von 13-Z-Zeaxanthin, vergleichbar mit Wenzel (2010), höher als der von 13-Z-Lutein lag (Tab. 5-2; Anhang 3). Im Vergleich zu Wenzel (2010) waren die 13-Z-Isomeren-Anteile bei Eigelb aus ökologischer Haltung höher (Tab. 5-2), was in der unterschiedlichen Futterzusammensetzung im Vergleich zur Bodenhaltung begründet liegen könnte. Vermutlich sind die 13-Z-Isomere in den Futterpflanzen, die besonders in der ökologischen Haltung eingesetzt werden, in hohen Mengen enthalten, wobei deren Bioverfügbarkeit zudem aufgrund der Veresterung verbessert ist.

Tab. 5-2: Prozentuale Anteile an 13-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration in Eigelb, Plasma und Granula im Nativzustand im Vergleich zu Wenzel (2010)

	[%] an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration			
	HPLC-PDA-Analyse		Wenzel (2010)	
	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
<b>Eigelb</b>	4,4 - 6,4	6,6 - 8,1	0,6 - 1,0	2,8 - 3,4
<b>Plasma</b>	4,4 - 6,1	6,4 - 8,2	Nicht untersucht	
<b>Granula</b>	4,7 - 6,2	6,3 - 8,1		

## 5.2 Diskussion zum Einfluss der Erhitzung

Die fünf Erhitzungstemperaturen wurden entsprechend der temperaturabhängigen Struktur-entfaltungen der Livetine, LDL und HDL nach Abbildung 5-1 gewählt.

Die industrielle Pasteurisation von Eigelb findet zwischen 61 und 68 °C statt [Ternes 2008b]. Dabei beginnt die Denaturierung der Livetine bei 60 °C, und partielle Strukturentfaltungen sowie Aggregationen der LDL treten oberhalb 65 °C auf. Eine Erhitzung bei **67 °C** wurde demnach gewählt um den Einfluss hoher Pasteurisationstemperaturen auf die Strukturen der Proteine und Lipoproteine und die Xanthophyll-Massenkonzentrationen zu untersuchen. Die nativen und die bei 67 °C erhitzten Proben wiesen keine erkennbaren Unterschiede in der Konsistenz auf.

Die Hitzebehandlung bei **72 °C** wurde gewählt, da die LDL-Entfaltung größtenteils zwischen 70 und 75 °C stattfindet. Zudem berichten Le Denmat *et al.* (1999) von einer Intensitätsverringerng der  $\alpha$ -Livetin-Bande bei 72 °C, und  $\beta$ -Livetin denaturiert zwischen 69 und 81 °C. Die auf hydrophoben Wechselwirkungen basierende dreidimensionale Vernetzung der entfaltenen LDL- und Livetin-Strukturen führt zur Gelbildung, was sich anhand der haptisch höheren Viskosität des bei 72 °C erhitzten **Plasmas** und **Eigelbs** zeigte.

Dies gilt ebenso für die bei **77 °C** erhitzten Proben von **Eigelb** und **Plasma**, wobei die Vernetzung der bei 76 °C vollständig entfaltenen  $\alpha$ -Livetine und LDL sowie Thermoaggregationen der LDL die Entstehung des ersten Viskositätsmaximums zwischen 75 und 80 °C bedingen [Jaekel und Ternes 2009; Jaekel *et al.* 2008; Ternes 2008b]. Aufgrund der Strukturentfaltung und Aggregation der LDL und Livetine war das Wasserbindevermögen von **Plasma** infolge der Erhitzung bei 77 °C vermindert. Zudem beginnt oberhalb 75 °C die Entfaltung der HDL in Eigelb und Granula [Ternes und Acker 1994c; Mohr und Simon 1992]. Nach der Erhitzung bei 72 und 77 °C wiesen die **Granula** eine haptisch feste und wenig kohäsive Konsistenz auf. Dies lag vermutlich darin begründet, dass Granula nur 12 % LDL und keine Livetine enthalten, deren thermoinduzierte Entfaltungen bei der Ausbildung des dreidimensionalen Gernetzes eine Rolle spielen [Powrie und Nakai 1986].

Neben der Denaturierung von  $\beta$ -Livetin bei 81 °C [Ternes und Acker 1994c] kommt es unter Freisetzung von Neutrallipiden zwischen 82 und 83 °C zur durch das Viskositätsminimum gekennzeichneten LDL-Delipidation und Aggregation der Plasma-Proteine [Jaekel und Ternes 2009; Ternes 2008b; Ternes und Acker 1994a]. Bedingt durch den hohen LDL-Anteil dieser Proben betraf dies besonders das bei **82 °C** erhitzte **Eigelb** und **Plasma**, die eine haptisch weiche Konsistenz aufwiesen. Durch die oben schon beschriebene fortschreitende Aggregation der LDL war das Wasserbindevermögen des bei 82 und 87 °C erhitzten **Plasmas** gegenüber der Erhitzung bei 77 °C geringer.

Die Erhitzung bei **87 °C** sollte der Darstellung der vollständigen Strukturentfaltung der Proteine und Lipoproteine dienen. Die Auflösung der Granula und Entfaltung der HDL bedingen zusammen mit fortschreitenden irreversiblen Aggregationen der Lipoproteine, die auf kovalenten Disulfidbrücken basieren, den zweiten Viskositätsanstieg oberhalb von 85 °C. Dies ist verbunden mit der Ausbildung eines kompakten, dreidimensional vernetzten, schnittfesten Gels, in dem Wasser und Ionen gebunden sind [Jaekel und Ternes 2009; Jaekel *et al.* 2008]. Die bei 82 und 87 °C erhitzten **Granula** zeigten erneut eine haptisch feste und wenig kohäsive Konsistenz. Dies ist bedingt durch die Aggregation denaturierter Lipoproteine, welche die konsistenzvermindernde Delipidation der nur zu 12 % enthaltenen LDL überlagerte. Auch die beobachtete hohe Festigkeit des bei 87 °C erhitzten **Eigelbs** basierte auf der Aggregation der Lipoproteine [Jaekel und Ternes 2009; Jaekel *et al.* 2008].

Die Massenkonzentrationen der Xanthophylle waren bei der Erhitzung multifaktoriell beeinflusst. Durch hitzeinduzierte Entfaltungen der LDL- und HDL-Strukturen erhöhte sich die Extrahierbarkeit der Xanthophylle. Aufgrund des Verlusts der schützenden Lipoproteinstruktur kam es dabei in Abhängigkeit der Temperatur zu Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle, die auch durch Reaktanten katalysiert sind. Dabei könnte das Ausmaß oxidativer Degradationen durch den Gehalt an ungesättigten Fettsäuren beeinflusst sein. Parallel dazu verringerten thermoinduzierte dreidimensionale Vernetzungen und Aggregationen entfalteter Proteine und Lipoproteine durch die Einbettung der Xanthophylle deren Extrahierbarkeit. Zudem war durch die Gelbildung die Diffusion von Reaktanten verzögert, was das Ausmaß an 13-Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle verminderte. (Abb. 5-2)

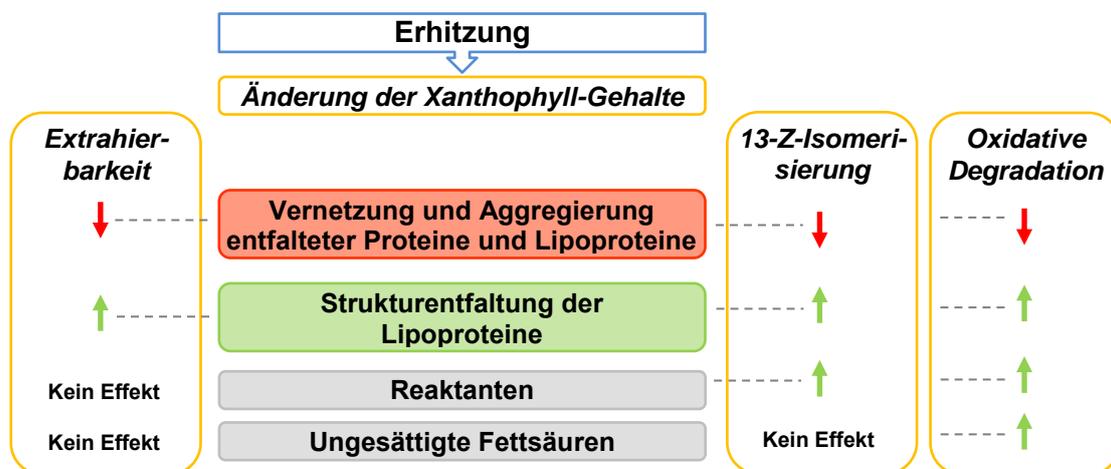


Abb. 5-2: Einflüsse der Erhitzung auf die Massenkonzentrationen der Xanthophylle – Kennzeichnung von Erhöhung (grüner Pfeil) oder Verminderung (roter Pfeil) der Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierung und oxidativen Degradation der Xanthophylle

Die Komplexierung zwei- und dreiwertiger Metallkationen durch die Phosphatgruppe des Phosvitins ist über 100 °C hitzestabil [Li-Chan und Kim 2008; Le Denmat *et al.* 1999]. Dabei ist die hohe Bindungskapazität von Phosvitin für Eisenionen von Bedeutung [Ternes 2008a], die bei einem Massenverhältnis größer 8:1 (Fe(II):Xanthophylle) die 13-Z-Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin signifikant induzieren [Li und Han 2008]. Zudem katalysieren Metallkationen durch die Bildung von Radikalen oxidative Degradationen der Xanthophylle. Erhitzungsbedingt erhöhte Metallkationenkonzentrationen als Ursache für 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle scheinen aufgrund der hitzestabilen Bindung durch Phosvitin vernachlässigbar.

Granula, Plasma und Eigelb sind durch ihre Gehalte an Proteinen und Lipoproteinen charakterisiert (Abb. 2-3). Diese beeinflussen die Matrixeigenschaften, da die hitzeinduzierte Gelbildung auf dreidimensionalen Vernetzungen und Aggregationen der entfalteten Proteine und Lipoproteine basiert. Bei Plasma erhöhte zudem der durch die Zentrifugation bedingte höhere Wasseranteil die Wärmeleitfähigkeit. Daher könnten das Ausmaß der Entfaltung der Lipoproteine und damit die Extrahierbarkeit sowie 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle bei Plasma höher sein.

Infolge der Hitzebehandlung waren die Massenkonzentrationen an 13-Z-Zeaxanthin im Gegensatz zu den signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein nur marginal verändert. Dies lag vermutlich neben der Kompensation der multifaktoriellen Einflüsse bei der Erhitzung in der geringeren 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Zeaxanthin gegenüber all-E-Lutein begründet. Die höhere Reaktionsfreudigkeit von all-E-Lutein ist stereochemisch mit der allylisch gebundenen Hydroxyl-Gruppe im  $\epsilon$ -Iononring erklärbar, da die resultierende Allylspannung einen höheren Energiegehalt gegenüber dem sich durch zwei hydroxylierte  $\beta$ -Iononringe auszeichnenden Zeaxanthin bedingt (Abb. 2-7).

### **67 °C – Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine**

Im Vergleich zum Nativzustand waren der Temperaturbereich, der Onset und  $T_d$  des symmetrischen DSC-Peaks der bei 67 °C erhitzten **Granula** identisch. Die  $\Delta H$  war nach der Erhitzung marginal geringer. Dies deutet auf eine weitgehende Erhaltung der HDL-Phosvitin-Komplexstruktur der Granula und deren Lipoproteinkomponente hin und steht in Einklang mit der erst oberhalb 75 °C beginnenden HDL-Entfaltung. Die kleineren  $\Delta H$ -Werte waren vermutlich durch geringfügige Strukturveränderungen der Granula-LDL (12 %), die oberhalb 65 °C auftreten können, bedingt. Dies liegt nach Anton *et al.* (2000) darin begründet, dass die LDL durch eine Einbindung in die HDL-Phosvitin-Komplex-Struktur bei der hitzeinduzierten Entfaltung nicht stabilisiert werden. (Abb. 4-13, Tab. 4-14)

Da  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetin bis ca. 69 °C stabil sind und die LDL-Strukturentfaltung hauptsächlich zwischen 70 und 75 °C stattfindet, waren der Onset und  $T_d$  von Peak 1 des nativen und des bei 67 °C erhitzten **Plasmas** identisch. Die signifikant geringere  $\Delta H$  ( $\Delta = 0,02$  J/g) von Peak 1 und dessen geringere Ausprägung bei der erhitzten Probe basierten auf partiellen Entfaltungen der LDL. Da das Ergebnis vermutlich zudem durch Messunsicherheiten aufgrund der geringen  $\Delta H$ -Werte beeinflusst war, wurde eine weitgehende Erhaltung der LDL-Strukturen bei 67 °C angenommen. In Einklang mit den Ergebnissen der Granula waren die Messkurven, der Onset,  $T_d$  und  $\Delta H$  von Peak 2 des nativen und des bei 67 °C erhitzten Plasmas identisch. Im Nativzustand war  $\Delta H$  von Peak 2 um den Faktor 6,6 höher als  $\Delta H$  von Peak 1. Die partielle LDL-Strukturentfaltung infolge der Erhitzung bei 67 °C bedingte die um den Faktor zehn höhere  $\Delta H$  von Peak 2 als von Peak 1 bei der hitzebehandelten Probe. (Abb. 4-14, Tab. 4-15 und 4-16)

Aufgrund der fortgeschrittenen Denaturierung von  $\gamma$ -Livetin war eine entsprechende endotherme Reaktion (60 bis 68 °C) nach der Erhitzung von **Eigelb** bei 67 °C nicht mehr messbar. Daher begann der DSC-Peak im Thermogramm dieser Probe erst bei ca. 67/68 °C. Wie im Nativzustand waren aber die Strukturentfaltungen der LDL und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetine (68 bis 79/80 °C) und der HDL (79/80 °C bis 98 °C) zu erkennen. Infolge des dominanten Einflusses der LDL (68 %) und HDL (16 %) waren der Onset und  $T_d$  des DSC-Peaks des bei 67 °C erhitzten Eigelbs mit dem Nativzustand identisch. Die bei Charge 2 signifikant verringerte  $\Delta H$  ( $\Delta = 0,18$  J/g) und die bei beiden Chargen geringere Ausprägung des Peaks zwischen 68 und 79/80 °C deuteten auf eine partielle Entfaltung der LDL hin. Dies stand in Einklang mit einem entsprechenden Ergebnis für Peak 1 bei Plasma. Bei Charge 1 der Eigelb-Proben war  $\Delta H$  des Peaks bei 67 °C dagegen nahezu identisch mit dem Nativzustand. In Einklang mit Granula und Plasma bestätigten der identische Onset und die identische  $T_d$  des Peaks verglichen mit dem Nativzustand bei Eigelb die vermutete Erhaltung der Strukturen der Granula und HDL bei 67 °C. Demnach sind bei hohen Pasteurisationstemperaturen partielle Strukturveränderungen der Livetine und LDL zu erwarten. (Abb. 4-15, Tab. 4-17)

### **67 °C – Xanthophyll-Massenkonzentrationen**

Aufgrund der weitgehenden Erhaltung der Lipoproteine mit Ausnahme partieller LDL-Strukturentfaltungen und der geringen Hitzebelastung bei 67 °C differierten die Xanthophyll-Massenkonzentrationen im Vergleich zum Nativzustand marginal. Um die Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte infolge der Hitzebehandlung bei 67 °C zu verdeutlichen, müssen höhere Erhitzungen betrachtet werden.

Bei **Plasma** und **Granula** führte die Erhitzung bei 82 °C im Vergleich zu 67 °C zu geringeren 13-Z-Lutein-Zunahmen als im Vergleich zum Nativzustand ( $\bar{\Delta} = 3,9 \%$ ). Ebenso war die 13-Z-Lutein-Zunahme der bei 87 °C erhitzten **Granula** verglichen mit 67 °C geringer als im Vergleich zum Nativzustand ( $\Delta = 3,4 \%$ ). Neben einer besseren Extrahierbarkeit von 13-Z-Lutein aus der Matrix durch partielle LDL-Strukturveränderungen deutet dies auf die 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein bei 67 °C hin. Dabei sind die Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte in Granula, Plasma und Eigelb durch Pasteurisation nicht quantitativ bedeutend. (Tab. 4-18 bis 4-22)

### **72 °C – Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine**

Bei 72 °C Erhitzungstemperatur wiesen der höhere Onset ( $\Delta$  ca. 1,6 °C) und die signifikant geringere  $\Delta H$  des DSC-Peaks der **Granula** ( $\Delta$  ca. 0,7 J/g) auf Strukturveränderungen der Lipoproteine, vor allem der LDL, hin. Bei elektrophoretischen Untersuchungen von Eigelb, Plasma und Granula beobachteten Le Denmat *et al.* (1999) zwischen 72 und 76 °C eine verringerte Intensität der  $\alpha$ -HDL-Bande. Daher war auch von partiellen  $\alpha$ -HDL-Strukturentfaltungen auszugehen. Dies erklärt die geringere Ausprägung des Peaks im Bereich der LDL- (ca. 71 bis 77 °C) und HDL-Strukturentfaltung (ca. 77 bis 97 °C). Gemäß den Anteilen von LDL (12 %) und HDL (70 %) in den Granula [Anton 2007] überlagerte die Strukturentfaltung der HDL, die zudem aufgrund der höheren Thermostabilität einer höheren normierten Gesamtenthalpie bedarf, diejenige der LDL. Daher war der Onset des Peaks im Vergleich zum Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C nur geringfügig höher. Wie beim Nativzustand bereits erklärt wurde, basierte das Peakmaximum überwiegend auf der Entfaltung der  $\beta$ -HDL-Struktur, die im Vergleich zu  $\alpha$ -HDL thermostabiler ist [Le Denmat *et al.* 1999]. Daher war  $T_d$  des Peaks der erhitzten Probe nicht verändert. (Abb. 4-13, Tab. 4-14)

Nach der Erhitzung des **Plasmas** bei 72 °C war ein hohes Ausmaß der LDL-Strukturentfaltung, die hauptsächlich zwischen 70 und 75 °C stattfindet, zu erkennen. Dabei wurde bei diesen Proben nur ein Peak detektiert. Da die LDL-Struktur erst bei 76 °C vollständig entfaltet ist, deutet die geringe Ausprägung des Peaks ab ca. 75 °C auf eine geringe Menge nativer LDL-Strukturen des bei 72 °C erhitzten Plasmas hin. Zudem war infolge der Hitzebehandlung bei 72 °C von Denaturierungen der bis 69 °C stabilen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetine auszugehen. Die dreidimensionale Vernetzung der entfalteten LDL- und Livetin-Strukturen unter Gelbildung bedingte vermutlich eine verzögerte Wärmeleitfähigkeit. Daher war  $T_d$  (87,2 °C) gegenüber dem Nativzustand und der Erhitzung bei 67 °C höher ( $\Delta$  ca. 1,3 °C).

Die normierte Gesamtenthalpie der anhand von Peak 2 repräsentierten HDL-Strukturentfaltung ist deutlich höher als diejenige der LDL-Strukturentfaltung. Daher beeinflussten die nach der Erhitzung bei 72 °C nativen Strukturen der LDL und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetine den Onset des Peaks nur marginal ( $\Delta$  ca. 0,6 °C). Trotz der zudem partiellen  $\alpha$ -HDL-Strukturentfaltung war die  $\Delta H$  des Peaks des bei 72 °C erhitzten Plasmas gegenüber dem Nativzustand nahezu identisch. Diese im Widerspruch zu dem Ergebnis bei den Granula stehende Beobachtung könnte darin begründet liegen, dass durch die Zentrifugation nur ein geringer Anteil an HDL in der Plasmafraktion enthalten war. Auch im Vergleich mit der Erhitzung bei 67 °C war  $\Delta H$  des Peaks des bei 72 °C erhitzten Plasmas bei Charge 1 nahezu identisch. Die dagegen bei Charge 2 um 0,09 J/g signifikant geringere  $\Delta H$  war vermutlich durch geringfügig variierende Anteile an Granula-Resten in den Plasmaproben bedingt. (Abb. 4-14, Tab. 4-16)

Bei 72 °C erhitztes **Eigelb** zeigte zusätzlich zur geringen Ausprägung des Peaks im Bereich der LDL-Strukturentfaltung (ca. 72/73 bis 79/80 °C) höhere Temperaturen für den Beginn (ca. 72/73 °C) und den Onset ( $\Delta$  ca. 4,3 °C) des DSC-Peaks. Wie bei Plasma war dies vermutlich durch Strukturentfaltungen der LDL und der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetine bedingt. Zudem haben wahrscheinlich partielle Entfaltungen der  $\alpha$ -HDL die verminderte Ausprägung zwischen 79/80 und 98 °C und die signifikant verringerte  $\Delta H$  des Peaks ( $\Delta$  ca. 0,56 J/g) verursacht. Dies wurde schon bei Plasma und Granula beobachtet. Aufgrund der weitgehenden Erhaltung der HDL-Strukturen bei 72 °C war  $T_d$  (84,8 °C) nur marginal höher als bei der nativen und der bei 67 °C erhitzten Eigelbprobe ( $\Delta$  ca. 0,7 °C), was mit der verzögerten Wärmeleitfähigkeit infolge der beobachteten Viskositätssteigerung erklärbar ist. (Abb. 4-15, Tab. 4-17)

Bei verdünntem **Plasma** war die LDL-Strukturentfaltung infolge der Erhitzung bei 72 °C am deutlichsten erkennbar, da der die Entfaltung der LDL repräsentierende Peak 1 nicht mehr messbar war. Entsprechend der LDL-Anteile war die Messkurve bei **Eigelb** (68 % LDL) und **Granula** (12 %) [Powrie und Nakai 1986] im Bereich der LDL-Entfaltung geringer ausgeprägt, und die Onsets waren höher (*Eigelb*: ca. 4 °C, *Granula*: ca. 2 °C).

### **72 °C – Xanthophyll-Massenkonzentrationen**

Die partiellen Entfaltungen der  $\alpha$ -HDL und signifikanten LDL-Strukturentfaltungen bei 72 °C erhöhten die Extrahierbarkeit sowie 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle, die durch die Erhitzung und das Vorhandensein von Reaktanten katalysiert wurden. Dagegen verminderten dreidimensionale Vernetzungen und Aggregationen entfalteter Proteine und Lipoproteine die Extrahierbarkeit der Xanthophylle sowie deren 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen. (Abb. 5-2)

Die marginalen Veränderungen der Xanthophyll-Massenkonzentrationen (Tab. 4-18, 4-20 und 4-22) könnten in der gegenseitigen Kompensation dieser multifaktoriellen Einflüsse und der moderaten Erhitzung bei 72 °C begründet liegen.

Die Betrachtung höherer Erhitzungen verdeutlicht erneut Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte infolge der Hitzebehandlung bei 72 °C. Die signifikante 13-Z-Lutein-Zunahme der bei 87 °C erhitzten **Granula** ist im Vergleich zur Erhitzung bei 72 °C geringer als verglichen mit dem Nativzustand ( $\Delta = 6,9 \%$ ; Tab. 4-19). Auch bei dem bei 82 °C erhitzten **Plasma** sind die signifikanten 13-Z-Lutein-Zunahmen im Vergleich zum Nativzustand um 20,9 % (Charge 1) und 4,0 % (Charge 2; Tab. 4-21) höher als verglichen mit der Erhitzung bei 72 °C. Dies bestätigte die mit einer erhöhten Extrahierbarkeit der Xanthophylle einhergehenden Strukturveränderungen der LDL und  $\alpha$ -HDL infolge der Erhitzung bei 72 °C. Zudem war das Ausmaß der thermoinduzierten 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein bei 72 °C Erhitzung höher als im Nativzustand.

#### **77 °C – Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine**

Aufgrund der bei LDL vollständigen und bei HDL, besonders bei  $\alpha$ -HDL, fortgeschrittenen Strukturentfaltung waren der Beginn (ca. 77 °C) und der Onset ( $\Delta$  ca. 2,8 - 5,9 °C) des Peaks der bei 77 °C erhitzten **Granula** zu höheren Temperaturen verschoben. Zudem war  $\Delta H$  signifikant geringer ( $\Delta$  ca. 1,8 - 2,7 J/g). (Abb. 4-13, Tab. 4-14)

Bei einer Erhitzung bei 77 °C sind die Strukturen von LDL und  $\alpha$ -Livetin vollständig entfaltet, und die Denaturierung von  $\beta$ -Livetin ist fortgeschritten. Daher entsprach der bei ca. 80 °C beginnende DSC-Peak des bei 77 °C erhitzten **Plasmas** Peak 2, der auf der HDL-Strukturentfaltung der zentrifugationsbedingten Granula-Reste basierte. Im Vergleich zu den anderen Proben bedingte das höhere Ausmaß der HDL-Entfaltung infolge der Erhitzung bei 77 °C wie bei den Granula eine verminderte Ausprägung und signifikant geringere  $\Delta H$  ( $\Delta$  ca. 0,12 J/g) und einen höheren Onset ( $\Delta$  ca. 1,9 °C) von Peak 2. (Abb. 4-14, Tab. 4-16)

Die signifikant verringerte  $\Delta H$  ( $\Delta$  ca. 0,76 - 1,40 J/g), die verminderte Ausprägung und der höhere Onset ( $\Delta$  ca. 3,8 - 8,0 °C) des erst bei ca. 77 °C beginnenden und nur bei Charge 2 auswertbaren Peaks des bei 77 °C erhitzten **Eigelbs** waren durch die Denaturierung von  $\beta$ -Livetin und die vollständige Strukturentfaltung der LDL und von  $\alpha$ -Livetin bedingt. Dies stand in Einklang zu den Ergebnissen bei Granula und Plasma. Zudem erklären der geringe Anteil an HDL (16 %) und deren Strukturentfaltung infolge der Erhitzung bei 77 °C die geringe Ausprägung des Peaks. (Abb. 4-15, Tab. 4-17)

Nach der Hitzebehandlung bei 77 °C ist von einer weitgehenden Erhaltung der  $\beta$ -HDL-Struktur auszugehen, deren Entfaltung am Maximum des DSC-Peaks überwiegt [Le Denmat *et al.* 1999]. Die gegenüber den anderen Proben höhere  $T_d$  der bei 77 °C erhitzten Proben von Granula (87,4 °C; Tab. 4-14), Plasma (88,3 °C; Tab. 4-16) und Eigelb (89,0 °C; Tab. 4-17) basierte daher vermutlich neben HDL-Strukturentfaltungen auf einer verzögerten Wärmeleitung durch die haptisch ermittelte höhere Viskosität und Festigkeit der Proben.

### **77 °C – Xanthophyll-Massenkonzentrationen**

Mit einer vollständigen Strukturentfaltung der LDL und der fortgeschrittenen sowie partiellen Entfaltung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -HDL bei 77 °C korrelierte eine verbesserte Extrahierbarkeit der Xanthophylle. Aufgrund des stärkeren Temperatureinflusses im Vergleich zu den vorher beschriebenen Proben war gleichzeitig ein höheres Ausmaß an 13-Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle zu erwarten. Die auf hydrophoben Wechselwirkungen basierende dreidimensionale Vernetzung entfalteter Livetine und LDL bei Eigelb und Plasma verringerte sowohl die Extrahierbarkeit als auch 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle. Ähnliches gilt für Granula, deren haptisch festgestellter Viskositätsanstieg aufgrund des Fehlens von Livetinen auf Thermoaggregationen entfalteter Lipoproteinstrukturen, die über kovalente Disulfidbrücken stabilisiert sind, basiert. Die Lipoproteinstrukturveränderungen und erkennbaren Viskositätserhöhungen, welche die Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle gleichzeitig erhöhten und verminderten, sollten infolge der Erhitzung bei 77 °C stärker ausgeprägt sein als bei 72 °C. (Abb. 5-2)

Dennoch bedingte die Kompensation der multifaktoriellen Einflüsse bei **Plasma** und **Eigelb**, dass nur marginale Veränderungen der Xanthophylle zu beobachten waren (Tab. 4-20 und 4-22).

Bei den **Granula** wurde nach der Erhitzung bei 77 °C eine signifikant höhere 13-Z-Luteinkonzentration im Vergleich zum Nativzustand beobachtet (Tab. 4-19). Dies war bei Eigelb und Plasma nicht der Fall. Vermutlich waren die Xanthophylle bei den Granula, basierend auf der oben beschriebenen Art der Gelbildung, in geringerem Ausmaß in die Matrix eingebettet und die Diffusion an Reaktanten weniger verzögert als bei Plasma und Eigelb. Daher war die Extrahierbarkeit der Xanthophylle verbessert und gleichzeitig die 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein bei den Granula bei 77 °C stärker ausgeprägt als bei Plasma und Eigelb.

### **82 °C – Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine**

Aufgrund der bei den LDL und Livetinen vollständigen und bei den HDL, besonders bei  $\alpha$ -HDL, fortgeschrittenen Strukturentfaltung war nach der Erhitzung der Proben bei 82 °C kein DSC-Peak messbar (Abb. 4-13 bis 4-15). Die Ergebnisse der DSC-Messung basierten auf der Gegenläufigkeit endothermer Strukturentfaltungen nativer Proteine und Lipoproteine und der Auswirkung exothermer Aggregationen der entfalteten Strukturen. Die Entfaltung der nach der Erhitzung bei 82 °C nativ vorhandenen HDL wurde also vermutlich von Thermoaggregationen entfalteter Lipoproteine überlagert. Aufgrund der wahrscheinlich für die Sensorempfindlichkeit zu geringen  $\Delta H$  war daher infolge der Hitzebehandlung bei 82 °C keine HDL-Strukturentfaltung mehr messbar.

### **82 °C – Xanthophyll-Massenkonzentrationen**

Nach der Hitzebehandlung bei 82 °C war die Extrahierbarkeit der Xanthophylle infolge der bei LDL vollständigen und bei HDL fortgeschrittenen Strukturentfaltung sowie aufgrund der Abspaltung des Lipidanteils der LDL (Delipidation) zwischen 82 und 83 °C [Jaekel und Ternes 2009; Ternes 2008b] verbessert. Durch den Verlust der schützenden Lipoproteinstruktur ist ein katalysierender Effekt der hohen Erhitzung und von Reaktanten auf 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle zu erwarten. Vernetzungen und Aggregationen entfalteter Proteine und Lipoproteine verminderten die Extrahierbarkeit der Xanthophylle sowie deren 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen. (Abb. 5-2)

Infolge der Kompensation dieser Einflüsse waren die Massenkonzentrationen der beiden all-E-Isomere bei 82 °C bei Granula, Plasma und Eigelb nur marginal verändert.

Die überwiegende verbesserte Extrahierbarkeit der Xanthophylle und eine 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein erklären die signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein der bei 82 °C erhitzten Proben von **Granula** und **Plasma** im Vergleich zum Nativzustand und verglichen mit der Erhitzung bei 67 °C. Gleiches gilt für die signifikante Steigerung der 13-Z-Lutein-Konzentration des bei 82 °C erhitzten **Plasmas** im Vergleich zur Erhitzung bei 72 °C. Diese trat bei den Granula nicht auf, was vermutlich in der Verdünnung und der daraus resultierenden höheren Wärmeleitfähigkeit des Plasmas begründet liegt. Zudem könnten die mit den Protein- und Lipoprotein-Anteilen zusammenhängenden unterschiedlichen Gelbseigenschaften eine Rolle gespielt haben. Aus denselben Gründen kompensierten die multifaktoriellen Einflüsse einander bei **Eigelb** vermutlich, was die nur marginal veränderten 13-Z-Lutein-Gehalte im Gegensatz zu Granula und Plasma erklärt. (Tab. 4-18 bis 4-22)

Die Fettsäurezusammensetzung des Futters beeinflusst das Fettsäuremuster der Eigelblipide, was besonders hinsichtlich der Anteile an mehrfach ungesättigten Fettsäuren gilt [Ternes 2008a]. Letztere können durch die Bildung von Radikalen bei der Lipidperoxidation das Ausmaß oxidativer Degradationen der Xanthophylle erhöhen [Pérez-Galvez *et al.* 2000]. Die in unterschiedlichem Ausmaß ausgeprägten signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein zwischen Charge 1 und 2 könnten daher in unterschiedlichen Gehalten an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren der Lipide begründet liegen.

Bezogen auf den Nativzustand und die Erhitzung bei 67 °C war bei **Plasma** die prozentuale Zunahme an 13-Z-Lutein nach Erhitzung bei 82 °C bei Charge 1 um 14,7 % und damit deutlich höher als bei Charge 2 (Tab. 4-21). Nach Pérez-Galvez *et al.* (2000) sollte demnach der Anteil ungesättigter Fettsäuren bei Charge 2 höher sein. Dies würde ein höheres Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle und somit eine gegenüber Charge 1 geringer ausgeprägte Zunahme an 13-Z-Lutein bedingen. Dagegen war die 13-Z-Lutein-Zunahme in den **Granula** bei Charge 2 um ca. 6,0 % höher als bei Charge 1 (Tab. 4-19). Diese widersprüchliche Beobachtung kann nicht mit dem Fettsäuremuster der LDL und HDL erklärt werden. Unverdünntes Plasma weist einen LDL-Anteil von 85 % auf, während Granula nur 12 % an LDL und 70 % HDL enthalten [Anton 2007]. Der mit 88 % hohe Lipidanteil der LDL zeigt im Vergleich zu dem mit 25 % niedrigen Lipidanteil der HDL nur einen um ca. 6 % höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (*LDL*: ca. 63,5 %, *HDL*: ca. 57,3 %) [Anton 2007; Acker und Ternes 1994; Powrie und Nakai 1986; Evans *et al.* 1977]. Errechnet entsprechend der Lipoprotein-Zusammensetzung zeichnet sich auch Plasma nur durch einen um ca. 6 % höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (ca. 54,0 %) gegenüber den Granula (ca. 47,7 %) aus. Durch die methodisch bedingte 1:1-Verdünnung der Plasmafraktion ist der Anteil ungesättigter Fettsäuren sogar ca. zweifach geringer im Vergleich zu den Granula. Für die bei Plasma bei Charge 1 und bei den Granula bei Charge 2 stärker ausgeprägte Zunahme an 13-Z-Lutein infolge der Erhitzung bei 82 °C kann daher keine schlüssige Erklärung gefunden werden.

Im Vergleich zur Hitzebehandlung bei 72 °C war die 13-Z-Lutein-Zunahme des bei 82 °C erhitzten **Plasmas** bei Charge 1 und 2 ähnlich ausgeprägt (Tab. 4-21), was vermutlich in den schon beschriebenen Kompensationseffekten der multifaktoriellen Einflüsse auf die Xanthophylle begründet liegt.

### **87 °C – Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine**

In Einklang mit den temperaturabhängigen Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine in Eigelb und dessen Fraktionen Plasma und Granula nach Abbildung 5-1 war bei den bei 87 °C erhitzten Proben aufgrund der vollständigen Strukturentfaltung der Livetine, LDL und HDL kein DSC-Peak mehr messbar (Abb. 4-13 bis 4-15).

### **87 °C – Xanthophyll-Massenkonzentrationen**

Die vollständige Entfaltung der Lipoproteinstrukturen bei 87 °C erhöhte und die parallel dazu erfolgende Aggregation entfalteter Proteine und Lipoproteine verminderte die Extrahierbarkeit, die 13-Z-Isomerisierung und die oxidative Degradation der Xanthophylle (Abb. 5-2).

Wie bei der Erhitzung bei 82 °C erklären die erhöhte Extrahierbarkeit der Xanthophylle und die 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein die signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein der bei 87 °C erhitzten Proben von **Granula** und **Plasma** im Vergleich zum Nativzustand (Tab. 4-19 und 4-21). Zudem ergaben sich bei den **Granula** signifikant höhere Massenkonzentrationen an 13-Z-Lutein im Vergleich zur Erhitzung bei 67 und 72 °C (Tab. 4-19). Dies war bei Plasma vermutlich aufgrund der methodisch bedingten Verdünnung und der damit einhergehenden höheren Wärmeleitfähigkeit nicht der Fall. Außerdem sind die Anteile an Proteinen und Lipoproteinen und die resultierenden Gelbildungseigenschaften bei Plasma und Granula unterschiedlich. In dem aus Plasma und Granula bestehenden **Eigelb** waren die Gehalte an 13-Z-Lutein dagegen nur marginal verändert (Tab. 4-22). Dies wurde bereits nach der Erhitzung bei 82 °C beobachtet und kann ebenfalls mit der Kompensationswirkung der multifaktoriellen Einflüsse auf die Xanthophylle im Zusammenhang mit unterschiedlichen Gelbildungseigenschaften bei Granula, Plasma und Eigelb erklärt werden.

Die vollständige Strukturentfaltung der Lipoproteine infolge der Erhitzung bei 87 °C begünstigte die Extrahierbarkeit der Xanthophylle verglichen mit 82 °C. Unter dem Einfluss der höheren Hitzebehandlung bei 87 °C war aber neben der 13-Z-Isomerisierung das Ausmaß der Lipidperoxidation, der Radikalbildung und damit der oxidativen Degradation der Xanthophylle wahrscheinlich höher. Daher ergaben sich bei Charge 2, jeweils in Bezug zum Nativzustand, für **Plasma** und **Granula** etwas geringer ausgeprägte Zunahmen an 13-Z-Lutein nach der Erhitzung bei 87 °C als infolge derjenigen bei 82 °C. Dagegen war bei Charge 1 die 13-Z-Lutein-Zunahme, verglichen mit dem Nativzustand, nach der Erhitzung bei 87 °C bei **Granula** (12,5 %) und **Plasma** (30,0 %) höher als bei 82 °C (Granula: 7,5 %, Plasma: 25,9 %). (Tab. 4-19 und 4-21)

Vermutlich basierte die zwischen den beiden Chargen widersprüchliche Beobachtung hinsichtlich der 13-Z-Lutein-Zunahme nach den Erhitzungen bei 82 und 87 °C auf unterschiedlichen Gehalten an ungesättigten Fettsäuren. Nach Pérez-Galvez *et al.* (2000) sollte dabei, wie schon bei der Erhitzung bei 82 °C vermutet, basierend auf den Ergebnissen der Anteil ungesättigter Fettsäuren und damit das Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle bei Charge 2 höher sein. Dafür spricht auch, dass bei Charge 2 des **Plasmas** die prozentuale Steigerung an 13-Z-Lutein infolge der Erhitzung bei 87 °C im Vergleich zum Nativzustand um 20,4 % geringer war als bei Charge 1. Bei den **Granula** waren die im Vergleich zum Nativzustand beobachteten Zunahmen an 13-Z-Lutein infolge der Erhitzung bei 87 °C bei beiden Chargen ähnlich. (Tab. 4-19 und 4-21)

Bei den bei 87 °C erhitzten Proben von **Granula** und **Eigelb** waren die Massenkonzentrationen der all-E-Isomere im Vergleich zum Nativzustand und zur Erhitzung bei 67 °C signifikant verringert. Dies war vermutlich durch 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen sowie die aufgrund der Gelbildung beeinträchtigte Extrahierbarkeit der Xanthophylle bedingt. Da keine signifikanten Zunahmen an 13-Z-Zeaxanthin auftraten, mussten überwiegend oxidative Degradationen für die Verluste an all-E-Zeaxanthin verantwortlich sein. Gleiches galt für die Verluste an all-E-Lutein bei **Eigelb**, da bei diesen Proben keine signifikant höheren 13-Z-Lutein-Konzentrationen analysiert wurden. Die Reduzierung der all-E-Lutein-Gehalte bei den **Granula** könnte neben oxidativen Degradationen auf 13-Z-Isomerisierungen von all-E-Lutein basiert haben, da begleitend signifikante 13-Z-Lutein-Zunahmen auftraten. (Tab. 4-18, 4-19, 4-22 und 4-23)

Die Verluste an all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin waren bei Charge 2 der bei 87 °C erhitzten Proben von **Granula** und **Eigelb** um ca. 1,5 - 3,2 % höher als bei Charge 1. Dies basierte wahrscheinlich erneut auf dem höheren Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle, das durch den vorher schon als Begründung herangezogenen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren bei Charge 2 bedingt sein könnte. (Tab. 4-19 und 4-23)

Im Gegensatz zu Granula und Eigelb waren die Konzentrationen der all-E-Isomere des bei 87 °C erhitzten **Plasmas** nur geringfügig verändert (Tab. 4-20). Die offensichtliche Kompensation der unterschiedlichen Einflüsse auf die Xanthophyll-Gehalte könnte in der methodisch bedingten Verdünnung und der damit höheren Wärmeleitfähigkeit sowie der spezifischen Protein- und Lipoprotein-Zusammensetzung bei Plasma begründet liegen.

Nach einer Hitzebehandlung von **Eigelb** bei 87 °C war die Massenkonzentration an all-E-Lutein im Vergleich zur Erhitzung bei 77 °C signifikant verringert (Tab. 4-23). Hierfür war aufgrund der vollständigen Entfaltung der schützenden Lipoproteinstrukturen vermutlich hauptsächlich der bei 87 °C hohe Temperatureinfluss verantwortlich, der 13-Z-Isomerisierungen und besonders oxidative Degradationen der Xanthophylle katalysiert. Zudem könnte die unterschiedliche Art der Gelbildung bei den beiden Viskositätsmaxima von Eigelb eine Rolle gespielt haben.

Das erste Viskositätsmaximum (77 °C) ist bedingt durch dreidimensionale Vernetzungen entfalteter Livetin- und LDL-Strukturen, die auf hydrophoben Wechselwirkungen basieren, und Aggregationen der LDL [Jaekel und Ternes 2009; Jaekel *et al.* 2008]. Das zweite Viskositätsmaximum entsteht durch die Auflösung der Granula, die Entfaltung der HDL sowie Thermoaggregationen entfalteter Lipoproteine, die auf kovalenten Disulfidbrücken basieren [Jaekel und Ternes 2009; Jaekel *et al.* 2008]. Beide Viskositätsmaxima führen zu einer Verminderung der Extrahierbarkeit der Xanthophylle sowie deren 13-Z-Isomerisierung und oxidativen Degradation. Dies steht zum einen mit der Einbettung der Xanthophylle im Gelnetz und zum anderen mit der durch die Gelbildung verzögerten Diffusion von Reaktanten in Zusammenhang. Eine schwächere Matrixeinbettung der Xanthophylle im Gelnetz des bei 87 °C erhitzten Eigelbs könnte deren Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen, die aufgrund der stärkeren Temperaturbelastung bei 87 °C vermutlich in hohem Ausmaß stattfanden, gegenüber dem bei 77 °C erhitzten Eigelb begünstigt haben. Dies könnte die signifikanten Verluste an all-E-Lutein gegenüber den bei 77 °C erhitzten Proben erklären.

Bei den **Granula** ist die hitzeinduzierte Gelbildung allein durch Thermoaggregationen entfalteter Lipoproteine bedingt. Zudem beeinflussen der im Vergleich zu Eigelb (68 %) geringere Anteil an LDL (12 %) und der fehlende Livetin-Gehalt die Gelbildung bei den Granula. Daher führte die Erhitzung bei 87 °C gegenüber derjenigen bei 77 °C nur zu geringen Unterschieden der all-E-Lutein-Gehalte bei den Granula (Tab. 4-18). Gleiches gilt aus den oben genannten Gründen auch für Plasma (Tab. 4-20).

**Zusammenfassung der Diskussion zum Einfluss der Erhitzung**

Die aus den DSC-Ergebnissen in Einklang mit der Literatur abgeleiteten thermoinduzierten Strukturveränderungen der Livetine, LDL und HDL sind in Abbildung 5-3 zusammengefasst.

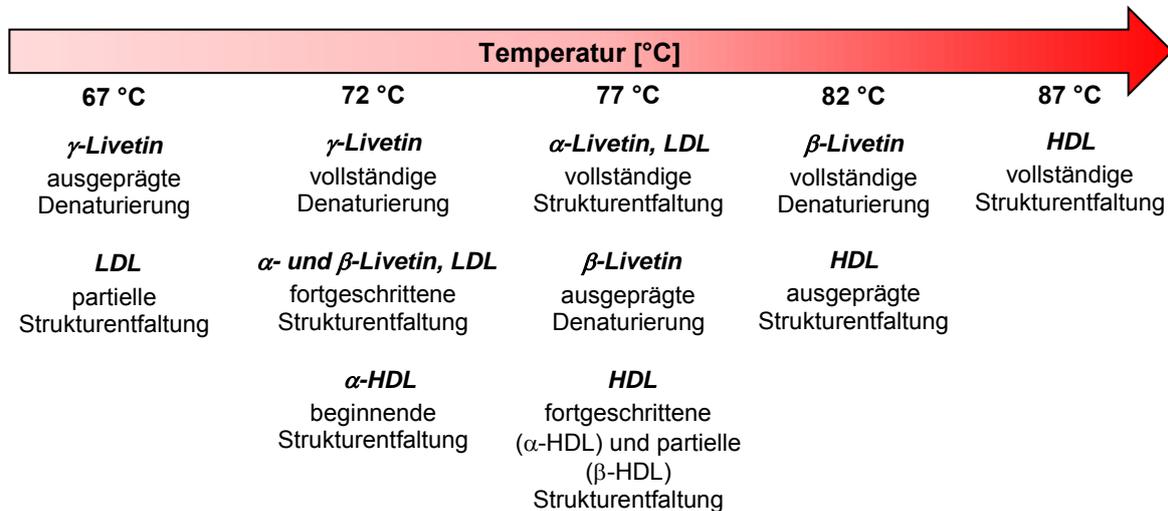


Abb. 5-3: Hitzeinduzierte Strukturveränderungen der Livetine, LDL und HDL [in Einklang mit Jaekel und Ternes 2009; Ternes 2008b, Bircan und Barringer 2002, Le Denmat *et al.* 1999; Acker und Ternes 1994; Ternes und Acker 1994a und 1994c; Mohr und Simon 1992]

Die Entfaltung der *core-shell*-Struktur der LDL und der HDL-Dimer-Struktur erhöhte die Extrahierbarkeit der Xanthophylle, was in Abhängigkeit des Temperatureinflusses 13-Z-Isomerisierungen der all-E-Isomere und oxidative Degradationen der Xanthophylle induzierte. Vernetzungen und Thermoaggregationen der entfalteten Proteine und Lipoproteine führten zur Gelbildung und Einbettung der Xanthophylle in die Matrix, was deren Extrahierbarkeit verminderte. Dabei waren auch 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle verringert, da die Gelbildung die Diffusion möglicher isomerisierungs- und oxidationsfördernder Reaktanten verzögerte. Die in Abbildung 5-4 zusammengefassten hitzeinduzierten signifikanten Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte in Granula, Plasma und Eigelb waren daher von multifaktoriellen Einflüssen (Abb. 5-2) geprägt.

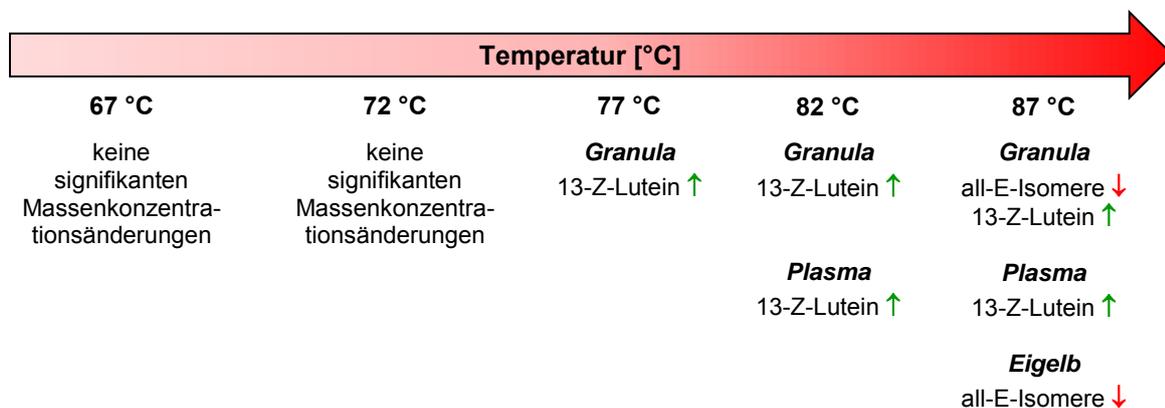


Abb. 5-4: Hitzeinduzierte Massen Konzentrationsänderungen der Xanthophylle

Metallkationen können Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle katalysieren. Da der Chelatbildner Phosvitin eine über die Erhitzung bei 87 °C hinausgehende Thermostabilität aufweist [Li-Chan und Kim 2008; Le Denmat *et al.* 1999; Acker und Ternes 1994], war die Komplexbildung der Metallkationen von den hier angewendeten Temperatureinflüssen weitgehend unbeeinflusst. Die aufgrund der sterischen Hinderung zwischen Methylgruppen und H-Atomen endotherme Z-Isomerisierung der all-E-Isomere sowie die oxidative Degradation der Xanthophylle waren daher hauptsächlich vom Temperatureinfluss geprägt.

Die bei trisubstituierten Doppelbindungen geringe sterische Hinderung bedingt neben der hohen Stabilität der Z-Isomere eine geringe Aktivierungsenergie bei der Z-Isomerisierung der all-E-Isomere [Britton und Khachik 2009]. Aufgrund der stereochemisch und thermodynamisch begünstigten 13-Z-Isomerisierung wurden daher, vergleichbar mit den Ergebnissen von Wenzel (2010), in den nativen und erhitzten Proben die 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin detektiert.

Die Erhitzung bei **67 °C** verursachte eine Denaturierung von  $\gamma$ -Livetin, partielle Strukturentfaltungen der LDL und nicht signifikante Unterschiede in den Xanthophyll-Gehalten. Hohe Pasteurisationstemperaturen bis zu 68 °C [Ternes 2008b] führen demnach nur zu geringen Veränderungen der Proteine und Lipoproteine sowie der Xanthophyll-Konzentrationen.

Neben partiellen HDL-Entfaltungen, besonders von  $\alpha$ -HDL, kam es infolge der Erhitzung bei **72 °C** zu signifikanten LDL-Strukturentfaltungen. Dies verbesserte die Extrahierbarkeit der Xanthophylle. Dabei war aufgrund der moderaten Erhitzung von einem geringen Ausmaß an 13-Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle auszugehen. Gleichzeitig waren die Extrahierbarkeit sowie 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen aufgrund der Einbettung der Xanthophylle in die Gelmatrix sowie der durch die Gelbildung verzögerten Diffusion von Reaktanten verringert. Diese verschiedenen Einflussfaktoren müssen einander kompensiert haben, was die marginal veränderten Xanthophyll-Massenkonzentrationen der bei 72 °C erhitzten Proben erklärt.

Trotz der bei LDL vollständigen und bei HDL fortgeschrittenen Strukturentfaltung infolge der Erhitzung bei **77 °C** kam es bei **Eigelb** und **Plasma** erneut nur zu unwesentlichen Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte, die sich ebenfalls durch den beschriebenen Kompensationseffekt erklären lassen. Dagegen war bei den bei 77 °C erhitzten **Granula** die 13-Z-Lutein-Konzentration im Vergleich zum Nativzustand signifikant höher, was mit der erhöhten Extrahierbarkeit der Xanthophylle infolge der Lipoprotein-Strukturentfaltung und der 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein sowie unterschiedlichen Gelbildungseigenschaften bei Granula, Plasma und Eigelb erklärbar ist.

Aufgrund der Strukturentfaltungen der Livetine, LDL und HDL (Abb. 5-3) wurde nach der Erhitzung bei **82 °C** ein geringer Anteil nativer HDL vermutet, während die Proteine und Lipoproteine bei **87 °C** vollständig entfaltet sein sollten. Daher war bei den Proben mit einer Hitzebehandlung bei 82 und 87 °C kein DSC-Peak mehr detektierbar. Bei dem bei 82 °C erhitzten **Eigelb** waren die Xanthophyll-Gehalte nicht signifikant verändert. Dies basierte vermutlich auf den oben beschriebenen Kompensationswirkungen der verschiedenen Einflussfaktoren. Gleiches gilt für die nur marginal veränderten Massenkonzentrationen der all-E-Isomere des bei 82 und 87 °C erhitzten **Plasmas** sowie der bei 82 °C erhitzten **Granula**. Eine Erhitzung bei 87 °C führte dagegen zu signifikanten Verlusten der all-E-Isomere bei **Eigelb** und **Granula**. Dies war durch die vollständige HDL-Strukturentfaltung und das hohe Ausmaß an 13-Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle unter der starken Hitzebelastung bedingt. Im Gegensatz zu Eigelb ergaben sich signifikante 13-Z-Lutein-Zunahmen bei den bei 82 und 87 °C erhitzten Proben von **Granula** und **Plasma**, die neben der verbesserten Extrahierbarkeit der Xanthophylle aufgrund der Entfaltung der Lipoproteine durch die 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein bedingt waren.

(Abb. 5-3 und 5-4, Tab. 5-3)

Tab. 5-3: Signifikante Veränderungen der Xanthophyll-Massenkonzentrationen bei Granula, Plasma und Eigelb bei der Erhitzung

	<b>Granula</b>	<b>Plasma</b>	<b>Eigelb</b>
<b>Nativ vs. 77 °C</b>	13-Z-Lutein ↑	Keine Signifikanz	Keine Signifikanz
<b>Nativ vs. 82 °C</b>	13-Z-Lutein ↑	13-Z-Lutein ↑	Keine Signifikanz
<b>Nativ vs. 87 °C</b>	13-Z-Lutein ↑ all-E-Isomere ↓	13-Z-Lutein ↑	all-E-Isomere ↓
<b>67 °C vs. 82 °C</b>	13-Z-Lutein ↑	13-Z-Lutein ↑	Keine Signifikanz
<b>67 °C vs. 87 °C</b>	13-Z-Lutein ↑ all-E-Isomere ↓	Keine Signifikanz	all-E-Isomere ↓
<b>72 °C vs. 82 °C</b>	Keine Signifikanz	13-Z-Lutein ↑	Keine Signifikanz
<b>72 °C vs. 87 °C</b>	13-Z-Lutein ↑	Keine Signifikanz	Keine Signifikanz
<b>77 °C vs. 87 °C</b>	Keine Signifikanz	Keine Signifikanz	all-E-Lutein ↓

Die im Vergleich von Granula, Plasma und Eigelb unterschiedlichen signifikanten Veränderungen der Xanthophyll-Massenkonzentrationen (Abb. 5-4, Tab. 5-3) basierten auf den spezifischen Matriceigenschaften. Diese resultierten aus den unterschiedlichen Anteilen an Proteinen und Lipoproteinen und deren Strukturveränderungen und Gelbildungseigenschaften. Bei Plasma spielte zusätzlich die methodisch bedingte Verdünnung und die damit höhere Wärmeleitfähigkeit eine Rolle, da hierdurch das Ausmaß der Entfaltung der Lipoproteine und damit die Extrahierbarkeit sowie 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle höher gewesen sein könnten.

Da die Gelbildung ausschließlich auf Aggregationen der Lipoproteine basiert, war die Einbettung der Xanthophylle in die Matrix bei den Granula vermutlich schwächer und die Diffusion von möglichen Reaktanten weniger verzögert als bei Eigelb und Plasma. Dies kann die nur bei **Granula** beobachtete signifikante 13-Z-Lutein-Zunahme bei 77 °C im Vergleich zum Nativzustand erklären. Bei **Eigelb** wurde infolge der Erhitzung bei 87 °C ein signifikanter Verlust an all-E-Lutein im Vergleich zu 77 °C beobachtet, da die Gelbildung bei 77 °C zusätzlich zu Aggregationen auf Vernetzungen entfalteter Livetine und LDL basiert. Dabei können eine schwächere Matrixeinbettung, die vollständige Entfaltung der Lipoproteine sowie die stärkere Hitzebelastung am zweiten Viskositätsmaximum bei 87 °C im Vergleich zum ersten Viskositätsmaximum bei 77 °C als Begründung dienen.

Die geringfügigen hitzeinduzierten Veränderungen der 13-Z-Zeaxanthin-Massenkonzentrationen und die signifikanten 13-Z-Lutein-Zunahmen bis zur Erhitzung bei 87 °C waren ein Indiz für eine stärkere 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein im Vergleich zu all-E-Zeaxanthin. Dies könnte in dem die Reaktionsfreudigkeit steigernden Einfluss der allylisch gebundenen Hydroxylgruppe bei all-E-Lutein begründet liegen.

Da der Onset, die  $T_d$  und die  $\Delta H$ -Werte der DSC-Peaks bei beiden untersuchten Chargen ähnlich waren, sollten unterschiedliche Matrixkompositionen einen vernachlässigbaren Einfluss auf die hitzeinduzierte Strukturentfaltung der Proteine und Lipoproteine haben.

Aufgrund der matrixunabhängigen und charakteristischen Entfaltung der Lipoproteine waren die bei gleicher Hitzebehandlung unterschiedlich ausgeprägten Änderungen der Xanthophyll-Konzentrationen der beiden untersuchten Chargen wahrscheinlich durch verschiedene Fettsäuremuster der Matrices bedingt. Dabei erhöht ein bspw. fütterungsbedingt höherer Anteil an ungesättigten Fettsäuren das Ausmaß der Lipidperoxidation und Radikalbildung, was die oxidative Degradation der Xanthophylle begünstigt.

Auf einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren bei Charge 2 deuten die gegenüber Charge 1 höheren Verluste der all-E-Isomere der bei 87 °C erhitzten Proben von **Granula** und **Eigelb** hin. Dagegen war das Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle bei Charge 1 offensichtlich aufgrund eines günstigeren Fettsäureprofils geringer. Daher war bei Charge 1 die Zunahme an 13-Z-Lutein, jeweils bezogen auf den Nativzustand, infolge der Erhitzung bei 87 °C bei **Granula** und **Plasma** höher als diejenige nach Erhitzung bei 82 °C. Bei Charge 2 bewirkten der vermutete höhere Anteil an ungesättigten Fettsäuren und das resultierende höhere Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle dagegen, dass die Zunahme an 13-Z-Lutein bei dem höheren Temperaturniveau (87 °C) etwas geringer ausgeprägt war als bei 82 °C. In Einklang hierzu waren bei Charge 2 des **Plasmas** die prozentualen Steigerungen an 13-Z-Lutein, jeweils in Bezug zum Nativzustand, infolge der Erhitzungen bei 82 und 87 °C deutlich geringer als bei Charge 1. (Tab. 4-19, 4-21 und 4-23)

### 5.3 Diskussion zum Einfluss der Gefriertrocknung

#### **Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine**

Beim Einfrieren wurde der kritische Restfeuchtebereich (0,11 bis 0,16 g/g TM), der für eine LDL-Strukturstabilisierung notwendig ist, unterschritten. Dies führt zu einer Entfaltung und Aggregation der LDL, die als Gelbildung erkennbar wird [Wakamatu *et al.* 1983, 1982]. Mit der Vorfrostung der Edelstahlschalen bei -30 °C und der geringen Probenschichtdicke von ca. 3 mm gewährleistete der Einfrierprozess bei -40 °C ein zügiges Durchschreiten des für die LDL-Gelierung kritischen Temperaturbereichs (-7 bis -18 °C) [Belitz *et al.* 2008; Ternes 2008a; Telis und Kieckbusch 1998; Powrie *et al.* 1963]. Dabei könnte auch die mit einer guten Wärmeleitfähigkeit einhergehende Verdünnung des Plasmas von Vorteil gewesen sein. Darüber hinaus könnten gefrierinduzierte LDL-Strukturentfaltungen bei dem verdünnten Plasma in geringerem Ausmaß aufgetreten sein. Dies könnte in der sinkenden LDL-Gelbildungsrate bei verminderter Konzentration an LDL und Salzen [Chang *et al.* 1977b] begründet liegen.

Aufgrund der durch den hohen Anteil nicht ausfrierbaren Wassers (0,29 g/g TM) bedingten restfeuchteunabhängigen Löslichkeit [Wakamatu *et al.* 1982] und der HDL-Phosvitin-Komplexstruktur wurden nur marginale gefrierinduzierte Strukturveränderungen der Granula und damit der HDL vermutet.

Da die Proben im Nativzustand eingefroren wurden, waren die pH-Bedingungen (6,0) optimal zur Proteinstabilisierung [Arakawa *et al.* 2001].

Die gefrierbedingte Erhöhung der Konzentration gelöster Stoffe kann eine kryoprotektive Wirkung auf die Proteine haben [Timasheff 2002]. Dagegen vermindern einwertige Metallkationen die Stabilität der HDL-Phosvitin-Komplexe der Granula [Anton 2007].

Nach Strambini und Gabellieri (1996) sind gefrierinduzierte Strukturverluste globulärer Proteine in wässriger Lösung beim Auftauen größtenteils reversibel.

Bei Eigelb sind 87 % des Wassergehalts bei -20/-30 °C ausgefroren [Riedel 1972], was dem sog. Glasübergang entspricht [Wakamatu *et al.* 1982].

Aus diesen Gründen sollten gefrierinduzierte Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine unwesentlich sein.

Da Livetine keine Xanthophylle assoziieren und aufgrund der restfeuchteunabhängigen Löslichkeit, die durch den hohen Anteil nicht ausfrierbaren Wassers (0,38 g/g TM) bedingt ist [Wakamatu *et al.* 1982], waren Denaturierungen der Livetine beim Einfrieren und bei der Abtrocknung vernachlässigbar.

In den gefriergetrockneten Proben waren die Proteine und Lipoproteine bei Trockenmassen oberhalb von 98 % (Tab. 4-2) und damit Restwassergehalten unterhalb von 4 % nach Ternes (2008b) im Glaszustand stabilisiert. Gemäß den nicht ausfrierbaren Wasseranteilen von Granula (0,29 g/g TM), Plasma (0,15 g/g TM) und Eigelb (0,16 g/g TM) [Wakamatu *et al.* 1982] waren die Trockenmassen durch eine intensive Desorptionstrocknung erreichbar, die sich der Sublimation des gefrorenen Wassers anschloss.

Basierend auf der monolamellaren Hydrathülle der LDL (0,04 g/g TM) wiesen die Proteine und Lipoproteine bei Restwassergehalten von maximal  $1,43 \cdot 10^{-2}$  g/g TM einzelne Hydrationsstellen auf [Rupley *et al.* 1983; Wakamatu *et al.* 1982]. Die Hydrathülle kompensiert intra- und intermolekulare Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten, die zu Strukturveränderungen führen können. Der Wasseranteil stellt daher einen integralen, stabilisierenden Strukturbestandteil von Proteinen dar [Roy und Gupta 2004; Finney und Poole 1985; Rupley *et al.* 1983]. Das aus der geringen Hydratation resultierende hohe Ausmaß intra- und intermolekularer Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten erklärt die Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine in den gefriergetrockneten Proben.

Bei der HDL-Dimer-Struktur stabilisiert die Hydrathülle die Orientierung des Lipidanteils zur Lipidkavität im Molekülinneren. Nach Lea und Hawke (1952) ist der Anteil extrahierbarer Lipide bei gefriergetrockneten HDL-Proben aus Eigelb daher aufgrund des Strukturverlusts deutlich höher (24,5 %) als bei unbehandelten Proben (ca. 6 %).

Die durch Dehydrierung induzierte Strukturentfaltung der Granula und Lipoproteine war daher von der Abspaltung des Lipidanteils begleitet. Dies zeigte sich anhand der DSC-Peaks der gefriergetrockneten Proben, die gegenüber dem Nativzustand in einem geringeren Temperaturbereich detektiert wurden (*Granula*: ca. 38/42 bis 79 °C, *Plasma*: ca. 40/42 bis 72 °C, *Eigelb*: ca. 38/39 bis 70/81 °C). Zudem zeichneten sich die Peaks durch deutlich verminderte Onsets (*Granula*: 44,3 °C, *Plasma*: 42,6 °C, *Eigelb*: 42,6 °C) und Peak-Temperaturen  $T_d$  (*Granula*: 64,0 °C, *Plasma*: 56,1 °C, *Eigelb*: 58,0 °C) aus. In den **Granula** ist der Anteil an Lipiden um den Faktor zwei geringer als derjenige an Proteinen (Abb. 2-3) [Powrie und Nakai 1986]. Trotz der trocknungsbedingten Aufkonzentrierung der Matrixkomponenten war  $\Delta H$  des Peaks bei gefriergetrockneten Granula ungefähr um den Faktor zwei geringer als im Nativzustand, was ebenso bei gefriergetrocknetem **Eigelb** beobachtet wurde. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass der im Vergleich zum Nativzustand in allen Messparametern abweichende DSC-Peak durch eine Abspaltung der Lipide aus den Lipoproteinen bedingt war. Bei gefriergetrocknetem Plasma war  $\Delta H$  des Peaks (0,43 J/g) marginal höher als die summierte  $\Delta H$  von Peak 1 und Peak 2 des verdünnten Nativzustands (0,39 J/g), was vermutlich in der trocknungsbedingten Aufkonzentrierung der Matrixkomponenten begründet liegt. (Abb. 4-19 bis 4-21, Tab. 4-24 bis 4-26)

Mit zunehmenden Anteilen an Wasser und ungesättigten Fettsäuren verschiebt sich der DSC-Peak hin zu geringeren Temperaturen [Smith und Back 1975]. Gegenüber den Granula waren der Onset, die  $T_d$  sowie das Ende des DSC-Peaks bei gefriergetrocknetem **Plasma** geringer. In Einklang hierzu war auch  $\Delta H$  des Peaks bei Plasma geringer als bei den Granula (Faktor 2,6). Aufgrund der fast identischen Trockenmassen der gefriergetrockneten Proben von Granula und Plasma ( $\Delta = 0,78 \%$ ) sollte dies in dem höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren, besonders an zweifach ungesättigter Linolsäure, von Plasma gegenüber den Granula begründet liegen. Dies wiederum kann mit dem Fettsäuremuster der LDL und HDL erklärt werden. Der mit 88 % hohe Lipidanteil der LDL zeichnet sich durch einen geringfügig ( $\Delta$  ca. 6 %) höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren gegenüber dem mit 25 % niedrigen Lipidanteil der HDL aus [Anton 2007; Acker und Ternes 1994; Powrie und Nakai 1986; Evans *et al.* 1977]. Dabei ist der Anteil der zweifach ungesättigten Linolsäure mit 13,4 % in den LDL ungefähr um den Faktor zwei höher als in den HDL (6,0 %) [Acker und Ternes 1994; Evans *et al.* 1977]. Errechnet entsprechend der Lipoprotein-Zusammensetzung (Abb. 2-3) [Anton 2007] zeichnet sich auch Plasma durch einen um ca. 6 % und damit geringfügig höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren und einen ungefähr zweifach höheren Anteil an Linolsäure (11,4 %) gegenüber den Granula (5,8 % Linolsäure) aus. Besonders der höhere Anteil an Linolsäure erklärt die zu geringeren Werten verschobenen Messparameter bei gefriergetrocknetem Plasma gegenüber den Granula. (Abb. 4-19 und 4-20, Tab. 4-24 und 4-25)

Der Peak im Thermogramm gefriergetrockneten **Eigelbs** stimmt mit denen von Plasma und Granula hinsichtlich des Temperaturbereichs und der ermittelten (*Onset*: 42,6 °C,  $T_d$ : 58,0 °C,  $\Delta H$ : 0,76 J/g) und nach dem gewichteten Mittel berechneten (*Onset*: 43,0 °C,  $T_d$ : 57,8 °C,  $\Delta H$ : 0,58 J/g) Messparameter überein. Bei rehydriertem Eigelb differierten die Thermogramme beider Chargen nicht. Im gefriergetrockneten Probenzustand ergaben sich bei Charge 3 neben dem um 11 °C zu höherer Temperatur verschobenen Ende des Peaks auch höhere Werte beim Onset ( $\Delta = 1,7$  °C), der  $T_d$  ( $\Delta = 6,5$  °C) und von  $\Delta H$  ( $\Delta = 0,26$  J/g) gegenüber Charge 4 (Abb 4-21, Tab. 4-26). Dies könnte auf Messschwankungen zurückgeführt werden.

Die bei Charge 4 in den gefriergetrockneten Proben beobachtete endotherme Reaktion (Abb. 4-19 bis 4-21) mit  $T_d$  bei 35,9 °C (Granula), 34,0 °C (Plasma) und 33,2 °C (Eigelb) ist wahrscheinlich durch Lecithine bedingt. Deren DSC-Peak tritt bei 97 % Trockenmasse zwischen ca. 20 und 35 °C auf [Smith und Back 1975]. Bei Charge 3 war der Peak vermutlich aufgrund eines geringeren Lecithin-Anteils nicht messbar.

Die auf identischen Trockenmassen (Tab. 4-2) beruhenden ähnlichen DSC-Peaks der abgespaltenen Lipide der beiden Chargen deuten auf eine matrixunabhängige, gefriertrocknungsinduzierte Entfaltung der Lipoproteinstrukturen hin.

Das Thermogramm der rehydrierten Probe war dem des Nativzustands hinsichtlich des Temperaturbereichs, des Onsets und  $T_d$  ähnlich (Abb. 4-19 bis 4-21, Tab. 4-24 bis 4-26). Zusammen mit der geringfügig veränderten  $\Delta H$  des Peaks bei **Granula** und **Eigelb** sowie von **Peak 2** bei **Plasma** deutet dies auf die Wiederherstellung der Strukturen der Proteine, Lipoproteine und Granula durch Rehydratation hin. Dies steht in Einklang mit Jaekel *et al.* (2008), die beschreiben, dass bis in den Glaszustand unterhalb von 6 % Restfeuchte gefriergetrocknetes, rehydriertes Eigelb keine signifikanten Unterschiede bei den funktionellen Eigenschaften gegenüber dem Nativzustand aufweist. Zudem ist die HDL-Struktur nach Lea und Hawke (1952), basierend auf dem marginal höheren Anteil an extrahierbaren Lipiden (2 - 3 %) und einer ähnlichen Löslichkeit im Vergleich zu unbehandelten HDL-Suspensionen aus Eigelb, durch Rehydrierung nach der Gefriertrocknung fast vollständig rekonstituierbar. Die Reversibilität der dehydrierungsinduzierten Strukturveränderungen der Proteine, Lipoproteine und Granula durch Rehydratation ist durch die stabilisierende Funktion der strukturalen Hydrathülle bedingt, die Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten kompensieren kann [Roy und Gupta 2004; Finney und Poole 1985; Rupley *et al.* 1983].

Trotz identischer Onsets und  $T_d$  war die Ausprägung von **Peak 1** des rehydrierten **Plasmas** gegenüber dem Nativzustand geringer. Bei Charge 3 ging damit eine signifikant geringere  $\Delta H$  von Peak 1 ( $\Delta = 0,02$  J/g) einher. Bei Charge 4 war  $\Delta H$  nicht signifikant verringert, was vermutlich in den geringen Messwerten von  $\Delta H$  begründet lag. Da auch der DSC-Peak rehydrierten **Eigelbs** eine marginal geringere  $\Delta H$  und eine verminderte Ausprägung im Temperaturbereich der LDL-Strukturentfaltung (68 bis 79/80 °C) zeigte, wurden irreversible LDL-Strukturveränderungen während der Abtrocknung der strukturstabilisierenden Hydrathülle angenommen. Mögliche LDL-Entfaltungen beim Einfrieren sollten wie anfänglich beschrieben eine geringe Bedeutung gehabt haben. Bei rehydrierten Granula waren die irreversiblen gefriertrocknungsinduzierten Strukturentfaltungen der LDL anhand des DSC-Peaks nicht erkennbar. Dies liegt darin begründet, dass die Entfaltung der mit 70 % dominierenden HDL-Struktur, die aufgrund der höheren Thermostabilität einer höheren normierten Gesamtenthalpie bedarf, diejenige der LDL (12 %) überlagerte [Anton 2007]. Dies begründet auch die bei rehydriertem **Eigelb** mit einem HDL-Anteil von 16 % nur marginal verringerte  $\Delta H$  des Peaks [Powrie und Nakai 1986]. (Abb. 4-19 bis 4-21, Tab. 4-24 bis 4-26)

Demnach war die gefriertrocknungsinduzierte Entfaltung der LDL-Struktur durch Rehydratation im Gegensatz zur HDL-Dimer- und Granula-Struktur nicht vollständig reversibel. Auch die rehydrierungsinduzierte Wiederherstellung der biologischen Aktivität von Lysozym aus Hühnereiweiß [Finney und Poole 1985] im Gegensatz zu dem Aktivitätsverlust bei Actin [Strambini und Gabellieri 1996] belegt spezifische irreversible gefriertrocknungsinduzierte Strukturveränderungen von Proteinen.

### Xanthophyll-Massenkonzentrationen

Wie schon beschrieben, führte die Entfernung der strukturstabilisierenden Hydrathülle bis auf einzelne Hydrierungsstellen während der Gefriertrocknung zu einem hohen Ausmaß an intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten und damit zur Strukturentfaltung der Lipoproteine unter Abspaltung des Lipidanteils. Dies verbesserte die Extrahierbarkeit der Xanthophylle. Gleiches gilt für die abtrocknungsbedingte Oberflächenvergrößerung, die zudem in den Proben die Oxidationsanfälligkeit steigert [Rodriguez-Amaya 1997]. Aufgrund des Verlusts der schützenden Lipoproteinstruktur kam es zu 13-Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle, die durch Reaktanten katalysiert sind. Dabei könnte das Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle durch den Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in der Matrix beeinflusst sein. Die hohe Trockenmasse und damit geringe Restfeuchte erhöhte vermutlich die Aggregationsneigung der Xanthophylle, was deren Extrahierbarkeit sowie Z-Isomerisierung [Britton und Khachik 2009; Aman *et al.* 2005] und oxidative Degradation [El-Agamey und McGarvey 2008] verringerte. Die Xanthophylle unterlagen daher den in Abbildung 5-5 veranschaulichten multifaktoriellen Einflüssen.

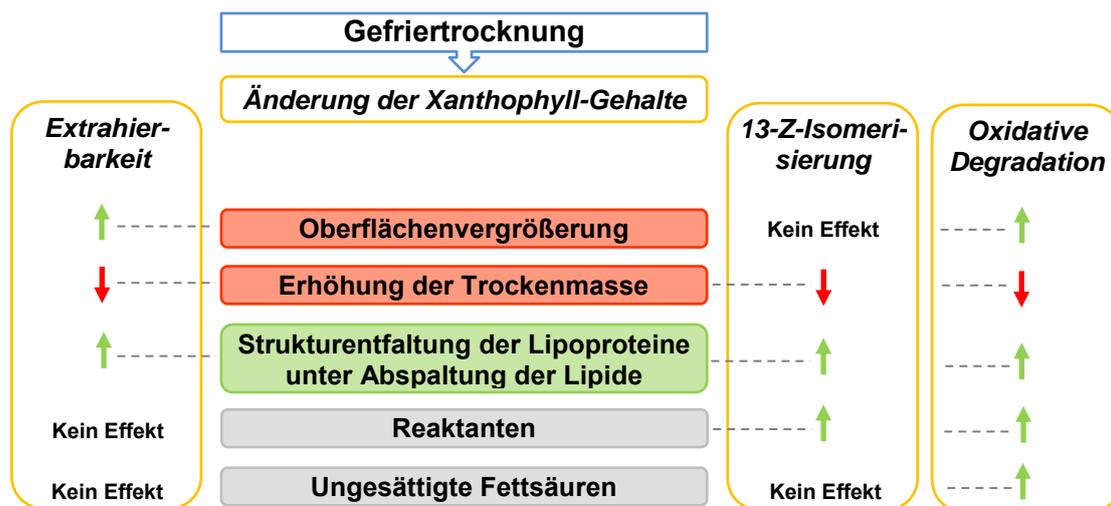


Abb. 5-5: Einflüsse der Gefriertrocknung auf die Massenkonzentrationen der Xanthophylle – Kennzeichnung von Erhöhung (grüner Pfeil) oder Verminderung (roter Pfeil) der Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierung und oxidativen Degradation der Xanthophylle

Bei -20 °C und unter Ausschluss von Licht und Sauerstoff ist die Retention der Carotinoide besonders gut [Britton und Khachik 2009]. Der Gefrierprozess erfolgte bei den vorliegenden Untersuchungen bei -40 °C unter Lichtausschluss. Darüber hinaus wurden die gefriertrockneten Proben vakuumiert um den Sauerstoffeinfluss möglichst gering zu halten.

Aufgrund der abtrocknungsbedingten Aufkonzentrierung an Matrixkomponenten waren Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle in den gefriergetrockneten Proben vermutlich durch endogene Reaktanten begünstigt. Bei Eigelb und Granula könnte zudem die gefriertrocknungsinduzierte Strukturentfaltung von Phosvitin isomerisierungsfördernde und prooxidative Metallkationen aus der Komplexbildung mit der Phosphatgruppe freigesetzt haben. Aufgrund der hohen Bindungskapazität von Phosvitin für Eisenionen [Ternes 2008a] spielt hierbei vor allem die bei einem Massenverhältnis oberhalb von 8:1 (Fe(II):Xanthophylle) signifikante, durch zweiwertige Eisenionen induzierte 13-Z-Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin eine Rolle [Li und Han 2008]. Dagegen war die Diffusion von Reaktanten aufgrund der Immobilisierung der Matrix der bis in den Glaszustand gefriergetrockneten Proben eingeschränkt [Arakawa *et al.* 2001]. Insgesamt wurde daher ein geringes Ausmaß an endogen induzierten Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle erwartet.

Infolge der stereochemisch und thermodynamisch begünstigten 13-Z-Isomerisierung [Britton und Khachik 2009] wurden, wie bei Wenzel (2010) und den vorliegenden Untersuchungen zum Einfluss der Erhitzung, die 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in den nativen und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb detektiert.

Bei gefriergetrockneten **Granula** waren die Xanthophyll-Konzentrationen, bezogen auf den Trockenmassegehalt, gegenüber dem Nativzustand signifikant erhöht (Tab. 4-27 und 4-28). Auch bei gefriergetrocknetem **Plasma** kam es zu signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein, der all-E-Isomere und bei Charge 4 von 13-Z-Zeaxanthin (Tab. 4-29 und 4-30). Dies kann damit begründet werden, dass die Entfaltung der LDL- und HDL-Strukturen unter Abspaltung des Lipidanteils und die Oberflächenvergrößerung bei den gefriergetrockneten Proben die Extrahierbarkeit der Xanthophylle erhöhten. Oxidative Degradationen und die möglicherweise verringerte Extrahierbarkeit der Xanthophylle aufgrund deren Aggregation infolge der geringen Restfeuchte hatten demnach nur einen geringen Einfluss auf die Xanthophyll-Gehalte. Die signifikanten Erhöhungen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bei **Plasma** und **Granula** standen in Einklang mit denen bei gefriergetrocknetem Eigelb bei Wenzel (2010).

Aufgrund der identischen Trockenmassen (Tab. 4-2) und einer matrixunabhängigen, gefriertrocknungsinduzierten Entfaltung der Lipoproteinstrukturen differierten die Zunahmen der Xanthophylle beider Chargen bei den **Granula** nur unwesentlich um maximal 2,3 % (Tab. 4-28). In Einklang hierzu war bei **Plasma** die signifikante Zunahme an 13-Z-Lutein bei Charge 3 nur geringfügig höher als bei Charge 4 ( $\Delta = 1,9 \%$ ; Tab. 4-30).

Dagegen war die 13-Z-Zeaxanthin-Zunahme bei gefriergetrocknetem **Plasma** nur bei Charge 4 signifikant und deutlich höher als bei Charge 3 ( $\Delta = 15,7 \%$ ), und die signifikanten Zunahmen an all-E-Lutein ( $\Delta = 3,0 \%$ ) und all-E-Zeaxanthin ( $\Delta = 4,1 \%$ ; Tab. 4-30) waren ebenfalls bei Charge 4 höher als bei Charge 3. Diese Ergebnisse könnten in einem niedrigeren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und einem damit geringeren Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle bei Charge 4 begründet liegen.

Die Ergebnisse lassen auch vermuten, dass Unterschiede im Fettsäuremuster der beiden untersuchten Chargen bei Plasma einen höheren Einfluss auf das Ausmaß oxidativer Degradationen der Xanthophylle als bei den Granula hatten. Dies könnte darin begründet liegen, dass in Einklang mit Yamamoto und Omori (1994) der um den Faktor zwei höhere Anteil an Linolsäure der LDL eine geringere oxidative Stabilität gegenüber HDL bedingt [Anton 2007; Acker und Ternes 1994; Powrie und Nakai 1986; Evans *et al.* 1977]. Entsprechend der Lipoprotein-Zusammensetzung gilt dies gleichermaßen für Plasma gegenüber den Granula. Zudem zeichnen sich Granula durch ihre antioxidativen Eigenschaften aus, die in der Anwesenheit von Phosvitin, das Chelatkomplexe mit prooxidativen bi- und trivalenten Kationen wie  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  bildet, begründet liegen [Ternes 2008a]. Aus diesen Gründen könnte Plasma eine höhere Oxidationsanfälligkeit als Granula aufweisen. Dies erklärt, warum die Zunahmen der Xanthophyll-Gehalte der beiden untersuchten Chargen bei Plasma stärker differierten als bei den Granula. (Tab. 4-28 und 4-30)

Bei den gefriergetrockneten Proben von **Granula** und **Plasma** waren die Zunahmen an all-E-Lutein geringer im Vergleich zu all-E-Zeaxanthin ( $\bar{\Delta} = 3,6 \%$ ). In Einklang hierzu und wie bei Wenzel (2010) auch beschrieben waren die Zunahmen an 13-Z-Lutein deutlich höher als die von 13-Z-Zeaxanthin ( $\Delta$  ca. 6,4 - 9,9 %) <sup>21</sup>. Dies deutet auf die stereochemisch basierte höhere 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein gegenüber all-E-Zeaxanthin hin. (Tab. 4-28 und 4-30)

Anders als bei Plasma und Granula dominierten bei gefriergetrocknetem **Eigelb** vermutlich oxidative Degradationen sowie Aggregationen der Xanthophylle, welche die Extrahierbarkeit vermindern. Der Einfluss von Entfaltungen der LDL- und HDL-Strukturen unter Delipidation und der Oberflächenvergrößerung, welche die Extrahierbarkeit der Xanthophylle erhöhen, schien geringer zu sein. Dies erklärt die im Vergleich zum Nativzustand verminderten Konzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin. (Tab. 4-31 und 4-32)

---

<sup>21</sup>Bezogen auf signifikante Änderungen der Konzentrationen an 13-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin

Die Verluste waren bei Charge 3 nicht signifikant ausgeprägt, da die verschiedenen Einflüsse einander vermutlich kompensierten. Bei Charge 4 waren die Massenkonzentrationen von all-E-Lutein, all-E- und 13-Z-Zeaxanthin signifikant geringer als im Nativzustand, obwohl die Verluste nur geringfügig höher waren als bei Charge 3 ( $\Delta$  ca. 0,2 - 0,9 %). Dagegen war der gegenüber Charge 3 um 4,2 % höhere Verlust an 13-Z-Lutein bei Charge 4 nicht signifikant. (Tab. 4-31 und 4-32)

Für 13-Z-Lutein ergab sich vermutlich aufgrund der höheren 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein gegenüber all-E-Zeaxanthin ein deutlich geringerer Verlust als bei 13-Z-Zeaxanthin ( $\Delta = 7,3$  %; Tab. 4-32).

Die durch die Gefriertrocknung induzierten Verluste der Xanthophylle bei **Eigelb** stehen in Widerspruch zu den Zunahmen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bei **Plasma** und **Granula**, die in Bezug auf gefriergetrocknetes Eigelb auch von Wenzel (2010) beobachtet wurden. Veränderungen der Lipoproteinstrukturen während der Zentrifugation zur Fraktionierung des Eigelbs, die eine erhöhte Extrahierbarkeit der Xanthophylle und damit deren signifikante Zunahmen bei Plasma und Granula im Gegensatz zu Eigelb bedingen könnten, sind vermutlich nicht aufgetreten. Dies liegt darin begründet, dass die LDL-Mizellen des Plasmas und die Granula-Partikel nach Ternes (2008a) bei der Ultrazentrifugation erhalten bleiben. Dafür spricht auch die Übereinstimmung der über die Konzentrationen in Plasma und Granula errechneten und der analysierten Massenkonzentrationen der Xanthophylle in nativem Eigelb (Anhang 2, Tab. 2-1). Für die differierende Beobachtung hinsichtlich der Xanthophyll-Verluste bei gefriergetrocknetem Eigelb im Gegensatz zu Plasma und Granula kann daher keine schlüssige Erklärung gefunden werden.

### **Zusammenfassung der Diskussion zum Einfluss der Gefriertrocknung**

Mit einem Restfeuchtegehalt von maximal  $1,43 \cdot 10^{-2}$  g/g TM (Tab. 4-2) zeichneten sich die im Glaszustand stabilisierten gefriergetrockneten Proben durch einen Hydratationszustand der Proteine und Lipoproteine aus, der auf einzelnen Hydrierungsstellen basierte [Wakamatu *et al.* 1982; Rupley *et al.* 1983]. Dies resultiert in einem hohen Ausmaß an intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten, die nativ durch die strukturintegrale Hydrathülle kompensiert werden. Neben marginalen gefrierinduzierten Strukturveränderungen, besonders der LDL, spielten daher vor allem die Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine eine Rolle, die auf der Entfernung der strukturstabilisierenden Hydrathülle bei der Abtrocknung basieren.

Nach der Gefriertrocknung zeigte sich die Abspaltung des Lipidanteils infolge der Entfaltung der Lipoproteine im Thermogramm durch einen zu deutlich niedrigeren Temperaturen verschobenen DSC-Peak bei Granula, Plasma und Eigelb. Aufgrund gleicher Trockenmassen (Tab. 4-2) waren die Temperaturbereiche, Onsets,  $T_d$  sowie  $\Delta H$  der Peaks bei den beiden untersuchten Chargen ähnlich. Gleiches gilt in Bezug auf die DSC-Peaks der rehydrierten Proben. Dies ist ein Indiz für matrixunabhängige, gefriertrocknungsinduzierte Entfaltungen der Proteine und Lipoproteine und deren Reversibilität.

Bezogen auf die Trockenmasse war die Konzentration der Lipide in den gefriergetrockneten Proben höher. Zudem liegen die Lipide nativ größtenteils als Lipoprotein-Aggregate vor [Anton 2007]. Dies wird daran deutlich, dass die Phasenübergänge der Lipide in den Thermogrammen der nativen und rehydrierten Proben im Gegensatz zu den gefriergetrockneten Proben nicht sichtbar werden.

Da die Thermostabilität von Proteinen mit Abnahme des Wassergehaltes aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Polypeptidketten steigt [Westphal *et al.* 2003], könnten Denaturierungen der Apoproteine der LDL und HDL außerhalb des festgelegten Messbereichs gelegen haben.

Die DSC-Peaks der rehydrierten und nativen Proben von **Granula** und **Eigelb** waren hinsichtlich des Temperaturbereichs, des Onsets, der  $T_d$  und  $\Delta H$  ähnlich. Gleiches gilt für **Peak 2** bei **Plasma**. In Einklang mit der Literatur [Jaekel *et al.* 2008; Lea und Hawke 1952] ließ dies eine Rekonstitution der HDL-Dimer- und Granula-Struktur durch Rehydratation der gefriergetrockneten Proben auf die native Trockenmasse vermuten. Demnach führten weder das Gefrieren und Auftauen noch die Sublimations- und Desorptionstrocknung während der Gefriertrocknung zu irreversiblen Strukturveränderungen der HDL und der Granula.

Dagegen waren bei rehydriertem **Plasma** sowohl die Ausprägung als auch  $\Delta H$  von **Peak 1** gegenüber dem Nativzustand geringer, wobei  $\Delta H$  bei Charge 3 signifikant vermindert war. Dies deutet auf partiell irreversible gefriertrocknungsinduzierte Entfaltungen der LDL-Struktur hin. Auch bei rehydriertem **Eigelb** zeigten sich die irreversiblen LDL-Strukturentfaltungen infolge der Gefriertrocknung durch eine geringere Ausprägung des Peaks im Temperaturbereich der LDL-Strukturentfaltung. Dabei war  $\Delta H$  des DSC-Peaks nur marginal verringert, was durch die Anteile an Plasma und Granula in Eigelb bedingt ist. (Abb. 4-19 bis 4-21, Tab. 4-24 bis 4-26)

Bereits bei den Untersuchungen zum Einfluss der Erhitzung wurde eine geringere Stabilität der *core-shell*-Struktur der LDL gegenüber dem HDL-Dimer sowie des Plasmas gegenüber der HDL-Phosvitin-Struktur der Granula festgestellt. Dies bestätigt sich hinsichtlich der Gefriertrocknung, da die Strukturveränderungen der LDL infolge der Entfernung der strukturstabilisierenden Hydrathülle partiell irreversibel zu sein schienen.

Die gefriertrocknungsinduzierte Strukturentfaltung der Lipoproteine unter Abspaltung des Lipidanteils und die Oberflächenvergrößerung verbesserten die Extrahierbarkeit der Xanthophylle. Daher waren die Xanthophyll-Gehalte der gefriergetrockneten Proben von **Plasma** und **Granula** gegenüber dem Nativzustand signifikant höher (Tab. 4-27 bis 4-30). Bei gefriergetrocknetem **Eigelb** waren die Massenkonzentrationen der Xanthophylle im Vergleich zum Nativzustand dagegen vermindert (Tab. 4-31 und 4-32). Dies basiert vermutlich auf gleichzeitig induzierten oxidativen Degradationen der Xanthophylle infolge der abtrocknungsbedingten Oberflächenvergrößerung. Zudem könnten mögliche Aggregationen der Xanthophylle, die durch die geringe Restfeuchte bedingt waren, die Extrahierbarkeit verringert haben. Die Verluste der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bei gefriergetrocknetem Eigelb waren nicht bei beiden untersuchten Chargen signifikant.

Gegenüber den Ergebnissen bei Plasma und Granula sowie den Untersuchungen von Wenzel (2010) war das Resultat bei gefriergetrocknetem Eigelb widersprüchlich. Bei der Erklärung dieser Beobachtung ist zu berücksichtigen, dass Veränderungen der LDL und HDL bei der Zentrifugation, welche die Extrahierbarkeit erhöhen und damit die Zunahmen der Xanthophylle bei Plasma und Granula erklären können, vermutlich entsprechend der Literatur [Ternes 2008a] auszuschließen sind. Dafür spricht auch, dass die für natives Eigelb analysierten Xanthophyll-Gehalte mit den anhand von Plasma und Granula errechneten Werten übereinstimmen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen in Anlehnung an die Literatur [siehe Causeret *et al.* 1991; Chang *et al.* 1977a; Chang *et al.* 1977b] könnten die Intaktheit der LDL- und HDL-Strukturen in Plasma und Granula nach der Zentrifugation absichern.

Für das differierende Resultat bei gefriergetrocknetem Eigelb gegenüber den Ergebnissen bei Plasma und Granula sowie von Wenzel (2010) kann daher keine schlüssige Erklärung gefunden werden.

Aufgrund der matrixunabhängigen, gefriertrocknungsinduzierten Entfaltungen der Lipoproteine und der identischen Trockenmassen waren die Massenkonzentrationsänderungen der Xanthophylle in den beiden untersuchten Chargen bei den gefriergetrockneten Proben von **Granula** und **Eigelb** ähnlich ausgeprägt (Tab. 4-28 und 4-32).

Entsprechend der Literaturangaben [Anton 2007; Acker und Ternes 1994; Yamamoto und Omori 1994; Powrie und Nakai 1986; Evans *et al.* 1977] wurde aufgrund des um den Faktor zwei höheren Anteils an Linolsäure eine geringere Oxidationsstabilität von Plasma gegenüber den Granula vermutet. Die Granula weisen zudem, bedingt durch die Anwesenheit von Phosvitin, antioxidative Eigenschaften auf [Ternes 2008a]. Biodiversitätsbedingte Unterschiede im Fettsäuremuster der beiden untersuchten Chargen, die bspw. mit der Futterzusammensetzung zusammenhängen können [Ternes 2008a], hatten bei Plasma demnach wahrscheinlich einen höheren Einfluss auf das Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle als bei den Granula. Daher waren die Unterschiede zwischen den Chargen hinsichtlich der signifikanten Zunahmen der Xanthophylle bei gefriergetrocknetem Plasma deutlicher ausgeprägt als bei den Granula. (Tab. 4-28 und 4-30)

Bei Charge 4 des gefriergetrockneten **Plasmas** waren die Zunahmen der all-E-Isomere höher, und die Steigerung an 13-Z-Zeaxanthin war im Gegensatz zu Charge 3 signifikant ausgeprägt. Hierfür war vermutlich ein höherer Anteil an ungesättigten Fettsäuren und damit ein höheres Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle bei Charge 3 verantwortlich. (Tab. 4-30)

Bei den gefriergetrockneten Proben von **Plasma** und **Granula** waren die Zunahmen an all-E-Lutein im Vergleich zu all-E-Zeaxanthin geringer und die Steigerungen an 13-Z-Lutein deutlich höher als die von 13-Z-Zeaxanthin (Tab. 4-28 und 4-30). In Einklang hierzu war bei gefriergetrocknetem **Eigelb** der Verlust an 13-Z-Zeaxanthin deutlich höher als der von 13-Z-Lutein (Tab. 4-32). Diese Ergebnisse resultieren vermutlich aus der höheren 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein gegenüber all-E-Zeaxanthin. Diese liegt in der höheren Reaktionsfreudigkeit des Luteinmoleküls begründet, die durch die allylisch gebundene Hydroxyl-Gruppe im  $\epsilon$ -Iononring bedingt ist.

## 5.4 Zusammenfassende Diskussion

Bei der Erhitzung und Gefriertrocknung unterlagen die Xanthophyll-Gehalte multifaktoriellen Einflüssen, die anhand der Abbildungen 5-2 und 5-5 dargestellt sind. Darauf basierend widmet sich dieses Kapitel zunächst der Beschreibung eines Modells, das diese verschiedenen Einflüsse strukturiert. Danach werden die Ergebnisse im Kontext der in Kapitel 1 formulierten Hypothesen evaluiert. Abschließend werden Aspekte der angewandten Methoden, die Einfluss auf die Ergebnisse haben könnten, diskutiert.

### 5.4.1 Modell zur Beeinflussung der Xanthophyll-Massenkonzentrationen

Strukturentfaltungen der Lipoproteine bei der Erhitzung und Gefriertrocknung erhöhten die Extrahierbarkeit sowie 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle. Dabei spielen vermutlich isomerisierungs- und oxidationsfördernde Reaktanten und das Fettsäureprofil der Matrix eine Rolle. Das Ausmaß an 13-Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen sowie die Extrahierbarkeit der Xanthophylle waren zudem durch die Beschaffenheit der Matrix beeinflusst. Demnach unterliegen die Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Granula, Plasma und Eigelb bei der Erhitzung und Gefriertrocknung multifaktoriellen Einflüssen, die modellhaft in eine Makro-, Meta- und Mikroebene gegliedert werden können (Abb. 5-6).

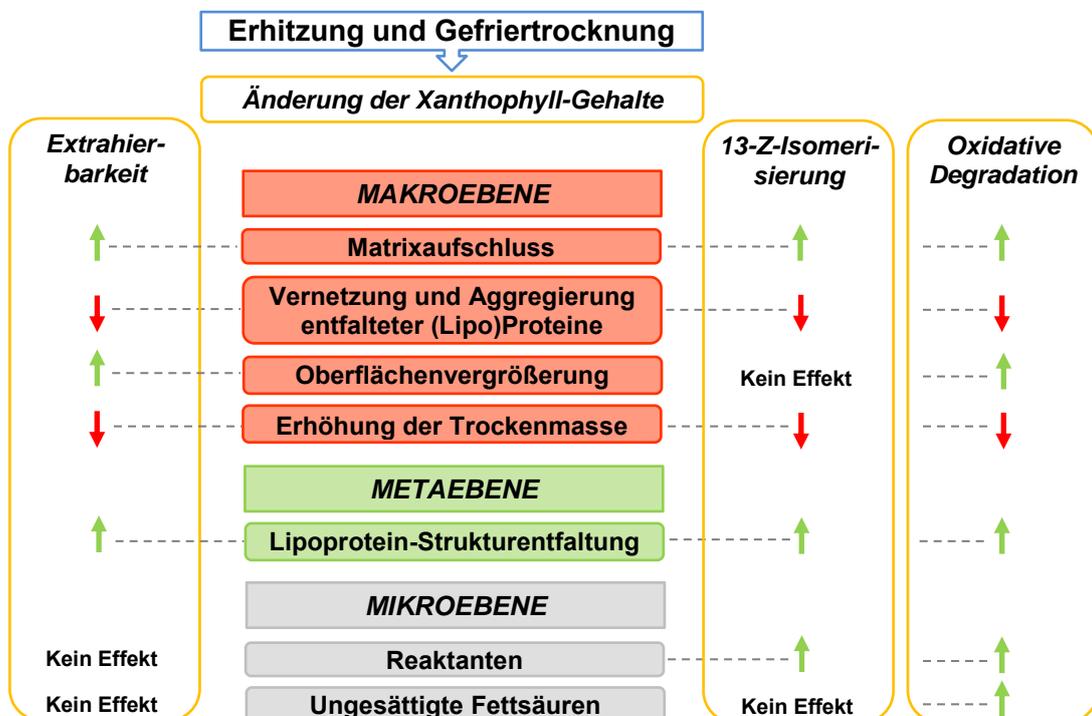


Abb. 5-6: Einflüsse von Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Massenkonzentrationen der Xanthophylle gegliedert nach der Makro-, Meta- und Mikroebene – Kennzeichnung von Erhöhung (grüner Pfeil) oder Verminderung (roter Pfeil) der Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierung und oxidativen Degradation der Xanthophylle

### **Makroebene**

Die **Makroebene** ist gekennzeichnet durch den Aufschluss, die hitzeinduzierte Vernetzung und Aggregation entfalteter Proteine und Lipoproteine unter Gelbildung, die Oberflächenvergrößerung und die Erhöhung des Trockenmassegehalts der Matrix (Abb. 5-6).

Nativ vorhandene physikalische Barrieren wie Zellverbände, Granulastrukturen und Zellmembranen werden bei der Erhitzung und Gefriertrocknung aufgeschlossen, was die Extrahierbarkeit der Xanthophylle verbesserte. Gleichzeitig führte der Matrixaufschluss durch den Verlust des Schutzeffekts der Matrix und die damit verbundene leichtere Diffusion von Reaktanten auch zu 13-Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle.

Bei der **Erhitzung** bedingten Vernetzungen und Aggregationen entfalteter Proteine und Lipoproteine die Ausbildung dreidimensionaler Gelnetze und eine daraus resultierende Einbettung der Xanthophylle in diese neuformierte Matrix. Dies verringerte die Extrahierbarkeit der Xanthophylle. Zudem waren 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle vermutlich aufgrund der verzögerten Diffusion an möglichen isomerisierungs- und oxidationsfördernden Reaktanten vermindert. Bei **Eigelb** und **Plasma** führen auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführende Vernetzungen entfalteter Livetine und LDL zusammen mit LDL-Aggregationen zur Gelbildung am ersten Viskositätsmaximum bei ca. 77 °C. Die Auflösung der Granula, die HDL-Strukturfaltung und auf kovalenten Disulfidbrücken basierende Aggregationen entfalteter Lipoproteine erklären die Entstehung des zweiten Viskositätsmaximums oberhalb 85 °C bei **Eigelb** [Jaekel und Ternes 2009; Jaekel *et al.* 2008]. Im Vergleich zu Eigelb (68 %) und Plasma (85 %) enthalten Granula einen deutlich geringeren LDL-Anteil (12 %) und zudem keine Livetine, was die Gelbildung wesentlich beeinflusst. Daher basiert die thermoinduzierte Gelbildung bei den **Granula** auf Aggregationen entfalteter LDL- und HDL-Strukturen, die über kovalente Disulfidbrücken stabilisiert sind.

Bei der **Gefriertrocknung** erhöhte die abtrocknungsbedingte Oberflächenvergrößerung die Extrahierbarkeit sowie oxidative Degradationen der Xanthophylle [Rodriguez-Amaya 1997]. Aufgrund der bei Trockenmassen oberhalb von 98 % im Glaszustand immobilisierten Probenmatrizes [Jaekel *et al.* 2008; Ternes 2008b; Powrie *et al.* 1963] waren Veränderungen der Lipoproteinstrukturen sowie die Diffusion von Reaktanten in den gefriergetrockneten Proben eingeschränkt [Arakawa *et al.* 2001]. Trotz der abtrocknungsbedingten Aufkonzentrierung der Reaktanten wurden daher geringfügige endogen induzierte 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle erwartet. Die geringe Restfeuchte der Proben nach der Gefriertrocknung könnte Aggregationen der Xanthophylle erhöht und damit die Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen vermindert haben [Britton und Khachik 2009; El-Agamey und McGarvey 2008; Aman *et al.* 2005].

## **Metaebene**

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften sind die Xanthophylle mit dem Lipidzentrum der *core-shell*-Struktur der LDL und der Lipidkavität der HDL-Dimer-Komplexe assoziiert. Daher verbesserten die erhitzungs- und gefriertrocknungsinduzierten Strukturentfaltungen der Lipoproteine auf der **Metaebene** die Extrahierbarkeit der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin. Der Verlust des Schutzes durch die Lipoproteinstruktur erhöhte 13-Z-Isomerisierungen der all-E-Isomere und oxidative Degradationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin. (Abb. 5-6)

Trotz der partiellen LDL-Strukturentfaltung und der ausgeprägten Denaturierung von  $\gamma$ -Livetin bei **67 °C** ist bei hohen Pasteurisationstemperaturen bis zu 68 °C [Ternes 2008b] von einer weitgehenden Erhaltung der Strukturen der Proteine und Lipoproteine auszugehen. Die Erhitzung bei **72 °C** führte dagegen zu signifikanten Strukturveränderungen der LDL, der vollständigen Denaturierung von  $\gamma$ -Livetin, fortgeschrittenen Strukturentfaltungen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Livetine und partiellen Veränderungen der  $\alpha$ -HDL-Struktur. Eine Hitzebehandlung bei **77 °C** resultierte in der vollständigen Entfaltung von  $\alpha$ -Livetin und der LDL sowie ausgeprägten Strukturentfaltungen von  $\beta$ -Livetin und der HDL, besonders von  $\alpha$ -HDL. Nach den Erhitzungen bei **82** und **87 °C** trat kein Peak mehr im DSC-Thermogramm auf, da die Strukturentfaltung der HDL bei 82 °C ausgeprägt und bei 87 °C vollständig ist. Folglich findet die Entfaltung der *core-shell*-Struktur der LDL (ca. 65 bis 76 °C) bei geringeren Temperaturen statt als die der HDL-Dimer-Struktur (ca. 75 bis 84 °C). (Abb. 5-3)

In den **Granula** sind die HDL mit Phosvitin über Phosphocalciumbrücken komplexiert. Dies ist eine mögliche Erklärung für eine höhere Thermostabilität der Granula im Vergleich zu Plasma und Eigelb. Diese Interpretation steht in Einklang mit der Literatur [Anton *et al.* 2000; Le Denmat *et al.* 1999].

Mit Restfeuchtegehalten von maximal  $1,43 \cdot 10^{-2}$  g/g TM wiesen die Proteine und Lipoproteine in den gefriergetrockneten Proben lediglich einzelne Hydrierungsstellen auf [Rupley *et al.* 1983; Wakamatu *et al.* 1983]. Die Entfaltung der Lipoproteine unter Abspaltung des Lipidanteils basierte daher auf einem hohen Ausmaß an strukturverändernden intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten, die im nativen Zustand durch die strukturstabilisierende Hydrathülle kompensiert werden [Roy und Gupta 2004; Finney und Poole 1985; Rupley *et al.* 1983]. Aufgrund der Matrixstabilisierung der Proben im Glaszustand bei Trockenmassen oberhalb von 98 % [Jaekel *et al.* 2008; Ternes 2008b; Powrie *et al.* 1963] waren Entfaltungen der Proteine und Lipoproteine im gefriergetrockneten Zustand und während des Auftauens vernachlässigbar.

Die hohe Einfriergeschwindigkeit bei  $-40\text{ °C}$ , der zur Proteinstabilisierung optimale pH-Wert (6,0) beim Einfrieren [Arakawa *et al.* 2001] und mögliche kryoprotektive Effekte durch aufkonzentrierte Kosolute [Timasheff 2002] könnten für nur geringe gefrierinduzierte Entfaltungen der Proteine, Lipoproteine und Granula verantwortlich sein (Kapitel 5.3).

In Einklang mit Angaben in der Literatur [Jaekel *et al.* 2008; Lea und Hawke 1952] waren die Strukturen der HDL und Granula durch Rehydratation rekonstituierbar, während gefriertrocknungsinduzierte Entfaltungen der LDL partiell irreversibel zu sein scheinen.

Die geringere Stabilität der *core-shell*-Struktur der LDL gegenüber dem HDL-Dimer sowie von Plasma im Vergleich zur HDL-Phosvitin-Komplex-Struktur der Granula bei der Hitzebehandlung bestätigte sich auch hinsichtlich der gefriertrocknungsinduzierten Strukturveränderungen. Basierend auf den Anteilen an LDL war die Stabilität von Plasma gegenüber Eigelb und Granula daher bei der Erhitzung und Gefriertrocknung geringer.

Die bei den untersuchten Chargen ähnlichen Peaks im DSC-Thermogramm bei den erhitzten und gefriergetrockneten Proben belegen matrixunabhängige, erhitzungs- und gefriertrocknungsinduzierte und damit charakteristische Entfaltungen der Proteine und Lipoproteine.

### **Mikroebene**

Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte durch 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen unterliegen neben dem Temperatureinfluss, der Beschaffenheit der Matrix (Makroebene) und den Strukturentfaltungen der Lipoproteine (Metaebene) dem Einfluss von isomerisierungs- und oxidationsfördernden Reaktanten und des Fettsäureprofils der Matrix, da dieses das Ausmaß an oxidativen Degradationen beeinflussen kann (Abb. 5-6).

Phosvitin kann mit prooxidativen Metallkationen Chelate bilden und besitzt eine besonders hohe Bindungskapazität für Eisenionen [Ternes 2008a], durch die eine 13-Z-Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin signifikant erhöht sein kann [Li und Han 2008]. Aufgrund der über  $100\text{ °C}$  hinausgehenden Thermostabilität von Phosvitin [Li-Chan und Kim 2008; Le Denmat *et al.* 1999; Acker und Ternes 1994] wurde eine hitzestabile Bindung der Metallkationen in den Chelatkomplexen angenommen. Bei der Erhitzung ist demnach hauptsächlich der Temperatureinfluss ursächlich für 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle.

Bei der Gefriertrocknung könnte es zu dehydrierungsbedingten Strukturentfaltungen von Phosvitin unter Freisetzung von prooxidativen und isomerisierungsfördernden Metallkationen gekommen sein. Zudem führte die Entfernung der Gutsfeuchte bei der Gefriertrocknung zu einer Aufkonzentrierung solcher Reaktanten. Deren Diffusion war aber aufgrund der Immobilisierung der Matrix im Glaszustand gleichzeitig eingeschränkt [Arakawa *et al.* 2001]. Endogen induzierte 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle sollten daher in deutlich geringem Ausmaß stattfinden.

#### 5.4.2 Evaluation der Ergebnisse im Kontext der formulierten Hypothesen

In den folgenden Ausführungen werden die erhaltenen Ergebnisse in Bezug auf die in Kapitel 1 formulierten Hypothesen betrachtet.

Nach der **ersten Hypothese** kommt es infolge der Erhitzung und Gefriertrocknung zu Veränderungen der Strukturen der Proteine und Lipoproteine (s. Kapitel 5.4.1, Abschnitt „Metaebene“). Wie vermutet beeinflusste dies die Xanthophyll-Gehalte entsprechend der verschiedenartigen Einflussfaktoren nach Abbildung 5-6.

Bei der Versuchsreihe zum Einfluss der **Erhitzung** kam es infolge der Behandlung bei 67 °C aufgrund des geringen Temperatureinflusses nur zu partiellen LDL-Strukturveränderungen und vermutlich geringfügigen Z-Isomerisierungen und oxidativen Degradationen der Xanthophylle. Daher waren die Konzentrationen der Xanthophylle nur marginal verändert. Bei hohen Pasteurisationstemperaturen sind Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte somit nicht quantitativ bedeutend.

Trotz der für LDL signifikanten und bei HDL partiellen Strukturentfaltungen bei der Erhitzung bei 72 °C kompensierten die multifaktoriellen Einflüsse vermutlich auftretende Effekte auf die Xanthophylle. Dies würde die nur geringfügig veränderten Massenkonzentrationen der Xanthophylle erklären.

Gleiches konnte nach der Hitzebehandlung bei 77 °C bei **Eigelb** und **Plasma** beobachtet werden. Dagegen führten bei gleicher Temperatur bei den **Granula** die für LDL abgeschlossene und bei HDL fortgeschrittene Strukturentfaltung sowie der starke Temperatureinfluss zu einer signifikanten Zunahme an 13-Z-Lutein. Eine Ursache dafür könnte in der unterschiedlichen Art der Gelbildung bei den Granula im Vergleich zu Plasma und Eigelb liegen (s. **zweite Hypothese**).

Die infolge der Erhitzung bei 82 °C noch nicht abgeschlossene Strukturentfaltung der HDL war nach der Hitzebehandlung bei 87 °C vollständig. Marginale Änderungen der Xanthophyll-Konzentrationen bei diesen Temperaturstufen können ebenfalls auf die Kompensation der multifaktoriellen Einflüsse zurückgeführt werden. Die signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein der bei 82 und 87 °C erhitzten Proben von **Granula** und **Plasma** basierten vermutlich auf einer erhöhten Extrahierbarkeit der Xanthophylle aufgrund der Lipoprotein-Strukturentfaltung sowie der 13-Z-Isomerisierung von all-E-Lutein. Gleichzeitig führten die hohe Temperaturbelastung bei 87 °C und der Verlust der schützenden Lipoproteinstruktur zu signifikanten Verlusten beider all-E-Isomere bei **Granula** und **Eigelb** infolge von 13-Z-Isomerisierungen und überwiegend oxidativen Degradationen. (Abb. 5-2)

Bei der **Gefriertrocknung** erhöhte neben den erwarteten geringen gefrierinduzierten Strukturveränderungen [Timasheff 2002; Arakawa *et al.* 2001; Strambini und Gabellieri 1996; Wakamatu *et al.* 1982; Chang *et al.* 1977b; Riedel 1972] und der abtrocknungsbedingten Oberflächenvergrößerung vor allem die Entfaltung der Lipoproteine unter Abspaltung der Lipide die Extrahierbarkeit der Xanthophylle. Dies erklärt die signifikanten Zunahmen der Xanthophylle in den gefriergetrockneten Proben von **Granula** und **Plasma**. Dagegen waren die Xanthophyll-Konzentrationen bei gefriergetrocknetem **Eigelb** geringer als im Nativzustand. Ursachen dafür könnten oxidative Degradationen der Xanthophylle sein, die durch die Oberflächenvergrößerung begünstigt waren. Daneben könnte auch eine verminderte Extrahierbarkeit der Xanthophylle aufgrund von Aggregationen bei geringer Restfeuchte eine Rolle spielen.

Die Verluste der Xanthophylle bei gefriergetrocknetem Eigelb stehen in Widerspruch zu den Zunahmen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bei Plasma und Granula sowie zu den Ergebnissen bei gefriergetrocknetem Eigelb von Wenzel (2010). Da die LDL-Mizellen des Plasmas und die Granula-Partikel bei der Zentrifugation erhalten bleiben [Ternes 2008a], basiert diese differierende Beobachtung vermutlich nicht auf strukturellen Veränderungen der Lipoproteine durch die Zentrifugation, die eine erhöhte Extrahierbarkeit der Xanthophylle bei Plasma und Granula bedingen könnten. Dafür spricht auch, dass die anhand der Gehalte in Plasma und Granula errechneten und die analysierten Massenkonzentrationen der Xanthophylle in nativem Eigelb übereinstimmten. Für die Xanthophyll-Verluste bei gefriergetrocknetem Eigelb kann daher keine schlüssige Erklärung gefunden werden.

Da die Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte in den erhitzten und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb im Zusammenhang mit den Strukturentfaltungen der Proteine und Lipoproteine stehen, kann die **erste Hypothese** angenommen werden.

Entsprechend der **zweiten Hypothese** resultieren aus den charakteristischen Gehalten an Proteinen und Lipoproteinen in Granula, Plasma und Eigelb (Abb. 2-3) unterschiedliche Matrixeigenschaften im Nativzustand und in den behandelten Proben. Dies hat vermutlich Einfluss auf die Xanthophyll-Massenkonzentrationen. Daher waren die Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte bei Granula, Plasma und Eigelb unterschiedlich.

Bei der Untersuchung zum Einfluss der **Erhitzung** ist zu beachten, dass mit den spezifischen Anteilen an Proteinen und Lipoproteinen und deren hitzeinduzierten Wechselwirkungen unterschiedliche Gelbildungseigenschaften bei Granula, Plasma und Eigelb verbunden sind. Diese wurden bei der Beschreibung der Makroebene (s. Kapitel 5.4.1) erläutert.

Demnach waren die Xanthophylle bei den Granula vermutlich in geringerem Ausmaß in die Matrix eingebettet und die Diffusion von Reaktanten weniger verzögert als bei Eigelb und Plasma. Dies könnte die nur bei **Granula** beobachtete signifikante 13-Z-Lutein-Zunahme bei 77 °C im Vergleich zum Nativzustand erklären.

Bei **Eigelb** traten bei allen Temperaturniveaus keine signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein auf, während dies bei den bei 82 und 87 °C erhitzten Proben von Plasma und Granula der Fall war. Hierfür waren vermutlich auch die unterschiedlichen Gelbildungseigenschaften verantwortlich.

Der signifikante Verlust an all-E-Lutein des bei 87 °C erhitzten **Eigelbs** im Vergleich zu 77 °C kann mit der Gelbildung am ersten und zweiten Viskositätsmaximum (s. Kapitel 5.4.1, Abschnitt „Makroebene“) sowie dem Temperatureinfluss erklärt werden. Gegenüber dem ersten Viskositätsmaximum (77 °C) könnten eine schwächere Matrixeinbettung und die vollständige Entfaltung der Lipoproteine am zweiten Viskositätsmaximum (87 °C) die Extrahierbarkeit der Xanthophylle begünstigt haben. Unter dem starken Temperatureinfluss ist gleichzeitig ein hohes Ausmaß an 13-Z-Isomerisierungen und überwiegend oxidativen Degradationen zu erwarten. Vermutlich war aufgrund der schwächeren Matrixeinbettung zudem die Diffusion von Reaktanten bei 87 °C weniger verzögert als bei 77 °C, was 13-Z-Isomerisierungen und besonders oxidative Degradationen der Xanthophylle verstärkt haben könnte. Demnach war die all-E-Lutein-Konzentration infolge der Erhitzung von **Eigelb** bei 87 °C signifikant geringer als bei 77 °C. Dagegen unterschieden sich die Gehalte an all-E-Lutein in den bei 77 und 87 °C erhitzten **Granula** nur marginal, da die Gelbildung hier ausschließlich auf Aggregationen der Lipoproteine basiert.

Für die im Vergleich zu Eigelb und Granula unterschiedlichen Signifikanzen bei **Plasma** war neben den spezifischen Anteilen an gelbildenden Proteinen und Lipoproteinen vermutlich die methodisch bedingte 1:1-Verdünnung verantwortlich, die eine höhere Wärmeleitfähigkeit bewirkt.

Daher könnten das Ausmaß der Entfaltung der Lipoproteine und damit die Extrahierbarkeit sowie 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle bei Plasma ausgeprägter gewesen sein als bei Granula und Eigelb.

Die infolge der **Gefriertrocknung** bei Plasma stärker im Vergleich der beiden untersuchten Chargen differierenden Xanthophyll-Zunahmen als bei den Granula können auf die Zusammensetzung der Lipoproteine zurückgeführt werden. Wie bei LDL im Vergleich zu HDL ist auch bei Plasma gegenüber den Granula ein um den Faktor zwei höherer Anteil an Linolsäure und damit eine höhere Oxidationsanfälligkeit zu erwarten [Anton 2007; Acker und Ternes 1994; Powrie und Nakai 1986; Evans *et al.* 1977]. Darüber hinaus weisen Granula aufgrund der Bindungskapazität von Phosvitin für prooxidative Metallkationen antioxidative Eigenschaften auf [Ternes 2008a]. Demnach hatten unterschiedliche Fettsäuremuster der beiden untersuchten Chargen bei dem oxidationsanfälligeren Plasma vermutlich einen höheren Einfluss auf das Ausmaß oxidativer Degradationen der Xanthophylle als bei den Granula. Dies erklärt, warum die Zunahmen der Xanthophylle bei den beiden Chargen bei gefriergetrocknetem Plasma stärker differierten als bei den Granula.

Neben der methodisch bedingten Verdünnung des Plasmas erklären die spezifischen Anteile an Proteinen und Lipoproteinen und deren Gelbildungseigenschaften sowie die charakteristischen Fettsäureprofile der LDL und HDL die unterschiedlichen Änderungen der Xanthophyll-Massenkonzentrationen bei Granula, Plasma und Eigelb infolge der Erhitzung und Gefriertrocknung. Die **zweite Hypothese** kann somit bestätigt werden.

---

---

Die **dritte Hypothese** erwartet bei den aus verschiedenen Legebetrieben stammenden untersuchten Chargen biodiversitätsbedingte Unterschiede hinsichtlich der Veränderungen der Xanthophyll-Gehalte infolge von Erhitzung und Gefriertrocknung. Dabei wird ein unterschiedliches Ausmaß an oxidativen Degradationen vermutet.

Für oxidative Degradationen der Xanthophylle sind Reaktanten wie Radikale verantwortlich, die bspw. bei der Lipidperoxidation gebildet werden. Unterschiedliche Gehalte an ungesättigten Fettsäuren der beiden untersuchten Chargen, verursacht bspw. durch die Futterzusammensetzung, können daher das Ausmaß oxidativer Degradationen der Xanthophylle beeinflussen. Dies kann die Unterschiede bei den Änderungen der Xanthophyll-Gehalte im Vergleich der beiden untersuchten Chargen erklären.

Die bei Charge 2 gegenüber Charge 1 höheren Verluste an all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin infolge der **Erhitzung** von **Eigelb** und **Granula** bei 87 °C waren vermutlich durch einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren bei Charge 2 bedingt. Dies erklärt auch, dass bei **Plasma** die Zunahmen an 13-Z-Lutein nach den Erhitzungen bei 82 und 87 °C bei Charge 2 deutlich geringer als bei Charge 1 waren. Zudem waren bei Charge 2 die 13-Z-Lutein-Konzentrationen in den bei 82 und 87 °C erhitzten **Granula** ähnlich. Dies galt gleichermaßen für das bei 82 und 87 °C erhitzte **Plasma**. Dagegen war bei Charge 1 die Zunahme an 13-Z-Lutein bei den bei 87 °C erhitzten Proben von **Plasma** und **Granula**, bezogen auf den Nativzustand, höher als bei 82 °C. Dies könnte auch mit dem vermutlich höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren bei Charge 2 erklärt werden, der die Lipidperoxidation, die resultierende Radikalbildung und demnach das Ausmaß oxidativer Degradationen der Xanthophylle unter dem Temperatureinfluss bei 87 °C verstärkt haben könnte.

Die nach der **Gefriertrocknung** höheren Zunahmen beider all-E-Isomere und von 13-Z-Zeaxanthin bei Charge 4 des **Plasmas** basierten vermutlich auf einem niedrigeren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und einem damit geringeren Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle bei Charge 4 im Vergleich zu Charge 3.

Die unterschiedlichen erhitzungs- und gefriertrocknungsinduzierten Änderungen der Xanthophyll-Konzentrationen im Vergleich der beiden Chargen wurden auf verschiedene Gehalte an ungesättigten Fettsäuren und deren Einfluss auf das Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle zurückgeführt. Daraus resultiert die Annahme der **dritten Hypothese**.



Die **vierte Hypothese** stellt dar, dass das während der Erhitzung und Gefriertrocknung induzierte Ausmaß der 13-Z-Isomerisierung bei all-E-Lutein und all-E-Zeaxanthin unterschiedlich ausgeprägt sein könnte, was auf Unterschiede in der Molekülstruktur zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse lassen eine höhere 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein gegenüber all-E-Zeaxanthin vermuten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass infolge der **Erhitzung** nur signifikante Zunahmen an 13-Z-Lutein, nicht aber an 13-Z-Zeaxanthin auftraten. In Einklang hierzu waren bei der **Gefriertrocknung** die bei Plasma und Granula signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein deutlich höher als die von 13-Z-Zeaxanthin. Die höhere 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein kann mit der allylisch gebundenen Hydroxyl-Gruppe des  $\epsilon$ -Iononrings erklärt werden, da aus der Allylspannung ein höherer Energiegehalt und damit eine höhere Reaktionsfreudigkeit des Luteinmoleküls resultiert. Demnach kann die **vierte Hypothese** bestätigt werden.

### 5.4.3 Methodische Aspekte

In diesem Kapitel werden methodische Aspekte, die einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnten, abschließend diskutiert.

Die Zentrifugation des 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnten Eigelbs gewährleistete eine gute Fraktionierung von Plasma und Granula, was durch den geringen Anteil an Granula-Sediment (2,6 %) im Plasma-Überstand gezeigt werden konnte.

Die Eignung der Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode und des HPLC-PDA-(APCI)-MS-Analyseverfahrens zur richtigen, präzisen und zuverlässigen Ermittlung der Xanthophyll-Massenkonzentrationen wurde anhand der hohen Wiederfindungsraten (ca. 99 bis 101 %) und der geringen Variationskoeffizienten (ca. 2 %) bei der Bestimmung der all-E-Isomere nachgewiesen. Die qualitative und quantitative Analyse der Xanthophylle war daher zudem robust, selektiv und insgesamt genau [Kromidas 1999; Gottwald und Stieglitz 1996]. Trotz der partiellen Überlagerung der Peakprofile war folglich die Selektivität bei der chromatographischen Trennung der all-E und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin ausreichend.

Nach dem gewichteten Mittel wurden anhand der Gehalte in Plasma und Granula die Xanthophyll-Konzentrationen im Nativzustand für Eigelb errechnet und mit den bei Eigelb analysierten Konzentrationen verglichen. Die Übereinstimmung der Werte belegte die Eignung des repräsentativ mittels Eigelb optimierten Extraktionsverfahrens für Plasma und Granula.

Die Spezifität der spektralphotometrischen Detektion der Xanthophylle war aufgrund der charakteristischen Absorption im sichtbaren Bereich sichergestellt. Neben den Absorptionsspektren basierte die Identifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin auf den charakteristischen Retentionszeiten und Massenspektren. Dabei kam es unter Matrixeinfluss zu keinen Veränderungen gegenüber den Standardsubstanzen und den Literaturangaben [Wenzel 2010; Glaser 2001; Dachtler 2000].

Bei der Quantifizierung der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin durch Mehrpunktkalibrierung des HPLC-PDA-Analysesystems mit Standardlösungen der all-E-Isomere korrelierte die Absorptionsintensität bei 450 nm linear mit der Konzentration. Die 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin wurden wie bei Wenzel (2010) über die Kalibrierfunktion des jeweiligen all-E-Isomers quantifiziert, da keine Standardsubstanzen verfügbar waren. Dies beeinflusste die Ergebnisse nicht, da die erhitzungs- und gefriertrocknungsinduzierten Veränderungen der Xanthophyll-Konzentrationen betrachtet wurden. Zur exakten Quantifizierung von 13-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin über deren spezifische Kalibrierfunktionen könnten die all-E-Standardsubstanzen mittels der iodkatalysierten Photo-Umwandlung Z-isomerisiert werden [Molnár und Szabolcs 1993], wobei das erhaltene Z-Isomerengemisch chromatographisch aufzutrennen ist [Widomska *et al.* 2009; Widomska und Subczynski 2008].

## 6. Ausblick

Bei der Erhitzung und Gefriertrocknung wirkten die verschiedenen Einflüsse der Makro-, Me-ta- und Mikroebene auf die Massenkonzentrationen der Xanthophylle in Granula, Plasma und Eigelb. Aus den Ergebnissen resultieren weitere Fragestellungen, die der Absicherung der vermuteten sowie der Ermittlung neuer Erkenntnisse dienen können.

- Die im Vergleich der untersuchten Chargen unterschiedlichen Massenkonzentrationsän-derungen der Xanthophylle wurden auf verschiedene Fettsäuremuster zurückgeführt. Weitere Versuche könnten unter Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Matrix (z. B. photometrischer Assay) und des Fettsäurespektrums (z. B. gaschromatographische Analyse) den Einfluss der Matrixzusammensetzung bei den erhitzungs- und gefriertrock-nungsbedingten Veränderungen der Xanthophylle darstellen.
- Aufgrund der vollständigen Strukturentfaltung der Lipoproteine lag die maximale Erhitzung bei 87 °C, bei der signifikante Zunahmen an 13-Z-Lutein und Verluste der all-E-Isomere auftraten. Höhere Erhitzungen könnten klären, welche Temperatur zu einem vollständigen Xanthophyll-Verlust führen würde.
- Zum Nachweis des stereochemisch erklärbaren höheren Z-Isomerisierungspotentials von all-E-Lutein gegenüber all-E-Zeaxanthin könnten separate Standard-Lösungen der beiden all-E-Isomere bei unterschiedlichen Temperaturen erhitzt und die Konzentrationen der all-E- und Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin bestimmt werden. Dabei könnte gleichzeitig die oxidative Degradationsneigung der Xanthophylle betrachtet werden.
- Elektronenmikroskopische Untersuchungen in Anlehnung an die Literatur [siehe Causeret *et al.* 1991; Chang *et al.* 1977a; Chang *et al.* 1977b] sollten absichern, dass die Zentrifu-gation keinen Einfluss auf die Intaktheit der Lipoproteinstrukturen [Ternes 2008a] und da-mit die Extrahierbarkeit der Xanthophylle in Plasma und Granula hat.
- Eine Verbesserung der Bestimmungsmethode könnte durch die Kalibrierung des HPLC-PDA-Analyse-Systems mit selbst hergestellten Standards der 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin erreicht werden.
- Eine weiterführende Studie könnte die gastrointestinale Resorptionsverfügbarkeit der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin aus erhitzten und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb über *in vitro*-Versuche bestimmen. Dies könnte die Aussagen über eine mögliche Verbesserung der Bioakzessibilität der Eigelb-Xantho-phylle und den gesundheitlichen Nutzen, der sich aus den antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide ergibt, präzisieren.

## Zusammenfassung

Um den gesundheitlichen Nutzen eines Lebensmittels im Hinblick auf natürliche funktionelle Inhaltsstoffe zu bewerten, muss die Bioakzessibilität, die durch die Bindung des Nahrungsmittelbestandteils in der Matrix und deren Struktur und Zusammensetzung beeinflusst ist [Canene-Adams und Erdman 2009], untersucht werden. In Eigelb sind die antioxidativen Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin besser bioverfügbar als in pflanzlichen Matrices, da sie aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften mit dem Lipidkern der *core-shell*-Struktur der *Low-Density* Lipoproteine (LDL) und der Lipidkavität der Dimer-Struktur der *High-Density* Lipoproteine (HDL) assoziiert sind [Ternes 2008a; Greene *et al.* 2006; Chung *et al.* 2004; Handelman *et al.* 1999]. Durch Zentrifugation ist Eigelb in Granula und Plasma fraktionierbar, die durch ihre spezifischen Gehalte an Proteinen und Lipoproteinen charakterisiert sind.

Hohe Temperaturen, Licht, Säure, Metallkationen und Enzyme katalysieren Z-Isomerisierungen und Degradationen von Carotinoiden, wobei Degradationen zudem unter Sauerstoffeinfluss und durch Radikale initiiert werden [Belitz *et al.* 2008]. Stereochemisch und thermodynamisch bedingt entstehen bei der Z-Isomerisierung bevorzugt 13-Z-Isomere [Britton und Khachik 2009]. Z-Isomere sind aufgrund ihrer geringeren Aggregationsneigung besser löslich und bioverfügbar als all-E-Isomere [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008]. Dies ist auch hinsichtlich der antioxidativen Effekte von Carotinoiden von Vorteil, die durch die Aggregation reduziert werden [El-Agamey und McGarvey 2008]. Mit Zunahme der Erhitzungsintensität steigt das Ausmaß oxidativer Degradationen der Carotinoide [Schiedt und Liaaen-Jensen 1995].

In dieser Studie wurden die durch Erhitzung und Gefriertrocknung veränderten Massenkonzentrationen der all-E- und 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin in Granula, Plasma und Eigelb untersucht. Da die Xanthophylle mit den Lipiden der LDL und HDL assoziiert sind, wurden dabei die Strukturveränderungen der Proteine und Lipoproteine betrachtet.

In Einklang mit der Literatur erfolgte die Entfaltung der *core-shell*-Struktur der LDL in einem niedrigeren Temperaturbereich (ca. 65 bis 76 °C) als die der Dimer-Struktur der HDL (ca. 75 bis 84 °C). Zudem war die HDL-Phosvitin-Komplexstruktur der Granula thermostabiler als Eigelb und Plasma. Die gefriertrocknungsinduzierte Strukturentfaltung der HDL und Granula war durch Rehydratation rekonstituierbar, während Veränderungen der LDL-Struktur nicht vollständig reversibel zu sein scheinen. Aufgrund des hohen LDL-Anteils wies Plasma eine geringere Stabilität bei der Erhitzung und Gefriertrocknung auf als Eigelb und Granula.

Die Xanthophyll-Gehalte waren bei der Erhitzung und Gefriertrocknung multifaktoriell durch den Aufschluss, die hitzeinduzierte Gelbildung, die Oberflächenvergrößerung und die Erhöhung des Trockenmassegehalts der Matrix (Makroebene), die Strukturveränderungen der Lipoproteine (Metaebene) sowie isomerisierungs- und oxidationsfördernde Reaktanten und das Fettsäureprofil der Matrix (Mikroebene) beeinflusst.

Die infolge der Erhitzungen bei 82 und 87 °C stark ausgeprägte bzw. vollständige Struktur-entfaltung der Lipoproteine verbesserte die Extrahierbarkeit und die hohe Temperatur katalysierte 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle. Dies erklärt die signifikanten Verluste der all-E-Isomere in den bei 87 °C erhitzten Proben von Eigelb und Granula und die signifikanten Zunahmen an 13-Z-Lutein der bei 82 und 87 °C erhitzten Proben von Granula und Plasma. Aufgrund der bei LDL vollständigen und bei HDL fortgeschrittenen Strukturentfaltung bedingte eine Erhitzung bei 77 °C eine signifikante 13-Z-Lutein-Zunahme bei den Granula. Vernetzungen und Aggregationen entfalteter Proteine und Lipoproteine verringerten jedoch die Extrahierbarkeit, 13-Z-Isomerisierungen und oxidative Degradationen der Xanthophylle. Bei einer moderaten Erhitzung bei 72 °C kompensierten die verschiedenen Einflussfaktoren einander. Daher waren trotz der ausgeprägten LDL-Strukturentfaltung nur marginale Veränderungen der Xanthophylle beobachtet worden. Nach einer Erhitzung bei 67 °C blieben die Lipoproteine bis auf partielle Entfaltungen der LDL-Struktur erhalten, was die Xanthophyll-Gehalte nicht beeinflusste.

Die Gefriertrocknung bewirkte eine Entfaltung der Lipoproteine unter Abspaltung der Lipide und eine Vergrößerung der Probenoberfläche, was die Extrahierbarkeit der Xanthophylle verbesserte. Daher waren die Xanthophyll-Gehalte in den gefriergetrockneten Proben von Granula und Plasma signifikant erhöht. Dagegen waren die Massenkonzentrationen der Xanthophylle bei gefriergetrocknetem Eigelb gegenüber dem Nativzustand wahrscheinlich aufgrund von oxidativen Degradationen vermindert. Zudem wurden Aggregationen der Xanthophylle aufgrund der geringen Restfeuchte vermutet, da die Aggregation die Extrahierbarkeit vermindert. Für die im Widerspruch zu den Ergebnissen bei Plasma und Granula stehende Beobachtung bei gefriergetrocknetem Eigelb konnte keine schlüssige Erklärung gefunden werden.

Die zwischen Granula, Plasma und Eigelb differierenden signifikanten Änderungen der Xanthophyll-Massenkonzentrationen wurden mit der methodisch bedingten Verdünnung des Plasmas, den spezifischen Anteilen an Proteinen und Lipoproteinen und deren Gelbildungseigenschaften sowie den unterschiedlichen Fettsäureprofilen der Lipoproteine erklärt. Unterschiede bei den Änderungen der Xanthophyll-Konzentrationen im Vergleich der beiden untersuchten Chargen waren vermutlich durch variierende Gehalte an ungesättigten Fettsäuren und das resultierende Ausmaß an oxidativen Degradationen der Xanthophylle bedingt.

Aus den Massenkonzentrationsänderungen der Xanthophylle wurde abgeleitet, dass die 13-Z-Isomerisierungsneigung von all-E-Lutein stereochemisch bedingt höher ist als bei all-E-Zeaxanthin.

## Summary

To evaluate the nutritional benefit of food with regard to natural functional substances, the bioaccessibility, which is influenced by the linkage of the food component in the matrix and the structure and composition of the matrix [Canene-Adams and Erdman 2009], must be investigated. In egg yolk, the antioxidative xanthophylls, lutein and zeaxanthin, are more bioavailable than in vegetable matrices because of their lipophilic properties; they are associated with the lipid center of the core-shell structure of low-density lipoproteins (LDL) and with the lipid cavity of the dimer structure of high-density lipoproteins (HDL) [Ternes 2008a; Greene *et al.* 2006; Chung *et al.* 2004; Handelman *et al.* 1999]. By centrifugation egg yolk is separable into granules and plasma, which are characterized by their specific contents of proteins and lipoproteins.

High temperatures, light, acid, metal cations, and enzymes catalyze Z-isomerization and degradation of carotenoids; moreover oxygen and radicals initialize degradation [Belitz *et al.* 2008]. Due to stereochemical and thermodynamic factors the formation of 13-Z-isomers is favored during Z-isomerization [Britton and Khachik 2009]. Z-isomers show higher solubility and bioavailability than all-E-isomers because their affinity for aggregation is lower [Liaaen-Jensen und Lutnæs 2008]. This is also advantageous for the antioxidative effects of carotenoids, because the latter are reduced by aggregation [El-Agamey and McGarvey 2008]. Oxidative degradation of carotenoids is more pronounced with intensified heating [Schiedt and Liaaen-Jensen 1995].

In this study, the changes in the mass concentrations of the all-E- and 13-Z-isomers of lutein and zeaxanthin induced by heating and freeze-drying were investigated in granules, plasma and egg yolk. Because the xanthophylls are associated with the lipids of LDL and HDL the structural modifications of the proteins and lipoproteins were examined concomitantly.

Consistent with the literature, the unfolding of the core-shell structure of the LDL occurred at a lower temperature (approximately 65 to 76 °C) than that of the dimer structure of the HDL (approximately 75 to 84 °C). Furthermore, the HDL-phosvitin-complex structure of the granules was more thermostable compared to egg yolk or plasma. The unfolding of HDL and granules induced by freeze-drying was reversible upon rehydration, whereas changes in the LDL-structure did not appear to be completely reversible. Due to the high LDL-content, plasma exhibited lower stability during heating and freeze-drying than egg yolk or granules.

During heating and freeze-drying, the concentrations of the xanthophylls were dependent on multiple factors such as the disintegration, the heat-induced gelling, the surface enlargement and the higher dry matter content of the matrix (macro-level), the structural modifications of the lipoproteins (meta-level), the reactants that catalyze isomerization and oxidative degradation, and the fatty acid profile of the matrix (micro-level).

Distinctive and respectively complete unfolding of the lipoproteins when heated to 82 and 87 °C increased the extractability and the high temperature catalyzed 13-Z-isomerization and oxidative degradation of the xanthophylls. This accounted for the significant decrease in the concentrations of the all-E-isomers in egg yolk and granules when these were heated to 87 °C, and the significant increase in the 13-Z-lutein concentrations in granules and plasma that were heated to 82 and 87 °C. Because the unfolding of LDL was complete and the unfolding of HDL was advanced, heating to 77 °C led to a significant increase in 13-Z-lutein in granules. However, cross-linking and aggregation of unfolded proteins and lipoproteins decreased the extractability, 13-Z-isomerization and oxidative degradation of the xanthophylls. Upon moderate heating at 72 °C, the different influences compensated for each other. This resulted in marginal changes of the xanthophylls despite the distinct unfolding of the LDL. After heating at 67 °C, the lipoproteins were preserved except for a partial unfolding of the LDL structure, which did not influence the xanthophyll mass concentrations.

Freeze-drying caused unfolding of the lipoproteins with separation of the lipids and an enlarged sample surface, which both increased the extractability of the xanthophylls. This resulted in a significant increase in the concentrations of the xanthophylls in freeze-dried granules and plasma. In contrast, the mass concentrations of the xanthophylls in freeze-dried egg yolk decreased compared with the untreated sample. This was most likely due to the oxidative degradation of the xanthophylls. Furthermore, aggregations of the xanthophylls in consequence of the low residual moisture content were assumed because aggregation lowers the extractability. No convincing explanation could be given for the conflicting result for freeze-dried egg yolk when compared to the results for plasma or granules.

Differences in the significant changes in the mass concentrations of the xanthophylls among granules, plasma and egg yolk were explained by the dilution of the plasma due to methodical reasons, the specific contents of proteins and lipoproteins and their gelling properties, and the different fatty acid profiles of the lipoproteins. Different changes in the concentrations of the xanthophylls of the two batches likely resulted from differences in unsaturated fatty acid content and the resulting intensity of oxidative degradation of the xanthophylls.

The changes in the mass concentrations of the xanthophylls indicated a higher potential for 13-Z-isomerization of all-E-lutein compared to all-E-zeaxanthin, which is due to stereochemical factors.

## Literatur

- [Acker und Ternes 1994]** Acker, L.; Ternes, W.: Kapitel 6: Chemische Zusammensetzung des Eies; S. 128, 133 (6.2 Die Proteine des Eigelbs), 152f. (6.5 Lipide des Eies), 160 (6.6 Cholesterol). In: Ternes, W.; Acker, L.; Scholtyssek, S. (Eds.): Ei und Eiprodukte (Band 22, Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, 1994).
- [Aman et al. 2005]** Aman, R.; Schieber, A.; Carle, R.: Effects of Heating and Illumination on Trans-Cis Isomerization and Degradation of  $\beta$ -Carotene and Lutein in Isolated Spinach Chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005), 53: 9512 - 9518.
- [Anderson et al. 1998]** Anderson, T. A.; Levitt, D. G.; Banaszak, L. J.: The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. *Structure* (1998), 6: 895 - 909.
- [Anton et al. 2000]** Anton, M.; Le Denmat, M.; Gandemer, G.: Thermostability of Hen Egg Yolk Granules: Contribution of Native Structure of Granules. *Journal of Food Science* (2000), 65 (4), 581 - 584.
- [Anton et al. 2003]** Anton, M.; Martinet, V.; Dalgalarrodo, M.; Beaumal, V.; David-Briand, E.; Rabesona, H.: Chemical and structural characterization of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry* (2003), 83: 175 - 183.
- [Anton 2007]** Anton, M.: Part I Composition and Extraction of Egg Components (Chapter 1: Composition and Structure of Hen Egg Yolk; Chapter 2: Low-density Lipoproteins (LDL) or Lipovitellenin Fraction; Chapter 3: High-density Lipoproteins (HDL) or Lipovitellin Fraction), S. 1 - 16. In: Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M.; Schade, R. (Eds.): Bioactive Egg Compounds (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007).
- [Arakawa et al. 2001]** Arakawa, T.; Prestrelski, S. J.; Kenney, W. C.; Carpenter, J. F.: Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2001), 46 (1-3): 307 - 326.
- [Banaszak 1991]** Banaszak, L.: Structure and Function of a Lipoprotein: Lipovitellin. *Annual Reviews Biophysics and Biophysical Chemistry* (1991), 20: 221 - 246.
- [Barker 2000]** Barker S. A.: Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A* (2000), 885, 115 - 127.
- [Beatty et al. 2001]** Beatty, S.; Murray, I. J.; Henson, D. B.; Carden, D.; Koh, H.; Boulton, M. E.: Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2001), 42 (2): 439 - 446.

- [Bédécarrats und Leeson 2006]** Bédécarrats, G. Y.; Leeson, S.: Dietary Lutein Influences Immune Response in Laying Hens. *Journal of Applied Poultry Research* (2006), 15: 183 - 189.
- [Belitz et al. 2008]** Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (Eds.): Lehrbuch der Lebensmittelchemie (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 6. Auflage 2008), S. 237 - 251 (Kapitel 3: Lipide - 3.8.4 Carotinoide), 564 - 579 (Kapitel 11: Eier).
- [Bendich und Olson 1989]** Bendich, A.; Olson, J. A.: Biological actions of carotenoids. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal* (1989), 3 (8): 1927 - 1932.
- [Bhosale et al. 2004]** Bhosale, P.; Larson, A. J.; Frederick, J. M.; Southwick, K.; Thulin, C. D.; Bernstein, P. S.: Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye. *The Journal of Biological Chemistry* (2004), 279 (47): 49447 - 49454.
- [Bircan und Barringer 2002]** Bircan, C.; Barringer, S. A.: Use of dielectric properties to detect egg protein denaturation. *Journal of Microwave Power & Electromagnetic Energy* (2002), 37 (2): 89 - 96.
- [Blount und McGraw 2008]** Blount, J. D.; McGraw, K. J.: Chapter 11: Signal Functions of Carotenoid Colouration, S. 213 - 236. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Boileau et al. 1999]** Boileau, A. C.; Merchen, N. R.; Wasson, K.; Atkinson, C. A.; Erdman, J. W. Jr.: Cis-Lycopene Is More Bioavailable Than Trans-Lycopene In Vitro and In Vivo in Lymph-Cannulated Ferrets. *Journal of Nutrition* (1999), 129: 1176 - 1181.
- [Boonnoun et al. 2012]** Boonnoun, P.; Opaskonkun, T.; Prasitchoke, P.; Goto, M.; Shotipruk, A.: Purification of Free Lutein from Marigold Flowers by Liquid Chromatography. *Engineering Journal* (2012), 16 (5): 145 - 155.
- [Bortolotti et al. 2003]** Bortolotti, G. R.; Negro, J. J.; Surai, P. F.; Prieto, P.: Carotenoids in Eggs and Plasma of Red-Legged Partridges: Effects of Diet and Reproductive Output. *Physiological and Biochemical Zoology* (2003), 76 (3): 367 - 374.
- [Bose und Agrawal 2007]** Bose, K. S. C.; Agrawal, B. K.: Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. *Singapore Medical Journal* (2007), 48 (5): 415 - 420.

- [Breithaupt et al. 2003]** Breithaupt, D. E.; Weller, P.; Grashorn, M. A.: Quantification of Carotenoids in Chicken Plasma After Feeding Free or Esterified Lutein and Capsanthin Using High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *Poultry Science* (2003), 82: 395 - 401.
- [Breithaupt 2008]** Breithaupt D. E.: Chapter 13: Xanthophylls in Poultry Feeding, S. 255 - 264. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Britton 1995]** Britton, G.: Chapter 2: UV/Visible Spectroscopy, S. 13 - 62. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 1 B: Spectroscopy (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).
- [Britton et al. 1995]** Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Chapter 2: Carotenoids Today and Challenges for the Future, S. 13 - 26. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 1 A: Isolation and Analysis (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).
- [Britton et al. 2004]** Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.): Carotenoids – Handbook; Section I: Introduction and guidelines on the use of the *Handbook*; Section II: *Main List* - Naturally occurring carotenoids which satisfy the criteria for acceptable identification (Birkhäuser Verlag Basel - Boston - Berlin, 2004), S. 6f, 31 (Section I); Numbers 3, 7, 57.1, 59.1, 119, 133 (Section II).
- [Britton 2008a]** Britton, G.: Chapter 10: Functions of Intact Carotenoids, S. 189 - 212. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Britton 2008b]** Britton, G.: Chapter 15: Functions of Carotenoid Metabolites and Break-down Products, S. 309 - 324. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Britton und Helliwell 2008]** Britton, G.; Helliwell, J. R.: Chapter 6: Carotenoid-Protein Interactions, S. 99 - 118. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Britton et al. 2008]** Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Chapter 1: Special Molecules, Special Properties, S. 1 - 6. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Britton und Khachik 2009]** Britton, G.; Khachik, F.: Chapter 3: Carotenoids in Food, S. 45 - 66. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).

- [Britton et al. 2009a]** Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Chapter 1: Editor's Introduction: A Healthy Debate, S. 1 - 6. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Britton et al. 2009b]** Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Chapter 19: Editor's Assessment, S. 409 - 422. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Budzikiewicz 1998]** Budzikiewicz, H.: Massenspektrometrie – Eine Einführung (Wiley-VCH, Weinheim, 4. Auflage 1998), S. 9 - 45 (Teil I. Grundlagen - 2 Apparative Grundlagen); 47 - 55 (Teil I. Grundlagen – 3 Ionenarten).
- [BVL 1991]** Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit – Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, §35 Vorläufiges Tabakgesetz, §28 b GenTG: „Bestimmung der Trockenmasse in Eiern und Eiprodukten – L 05.00-12, 1991 – 06“ (Band I (L) „Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln“, Beuth Verlag GmbH, Berlin, Wien, Zürich).
- [BVL 2011]** Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit – Liste der zugelassenen Futtermittelzusatzstoffe.  
<http://www.bvl.bund.de> (April 2011)
- [Canene-Adams und Erdman 2009]** Canene-Adams, K.; Erdman, Jr. J. W.: Chapter 7: Absorption, Transport, Distribution in Tissues and Bioavailability, S. 115 - 148. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Castenmiller und West 1998]** Castenmiller, J. J. M.; West, C. E.: Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition* (1998), 18: 19 - 38.
- [Causeret et al. 1991]** Causeret, D.; Matringe, E.; Lorient, D.: Ionic Strength and pH Effects on Composition and Microstructure of Yolk Granules. *Journal of Food Science* (1991), 56, 1532 - 1536.
- [Césarini et al. 2003]** Césarini, J. P.; Michel, L.; Maurette, J. M.; Adhoute, H.; Béjot, M.: Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* (2003), 19 (4): 182 - 189.
- [Chang et al. 1977a]** Chang, C. M.; Powrie, W. D.; Fennema, O.: Microstructure of egg yolk. *Journal of Food Science* (1977), 42 (5): 1193 - 1200.
- [Chang et al. 1977b]** Chang, C. H.; Powrie, W. D.; Fennema, O.: Studies on the Gelation of Egg Yolk and Plasma upon Freezing and Thawing. *Journal of Food Science* (1977), 42 (6): 1658 - 1665.

- [Chen et al. 1995]** Chen, B. H.; Peng, H. Y.; Chen, H. E.: Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1995), 43 (7): 1912 - 1918.
- [Chew und Soon Park 2009]** Chew, B. P.; Soon Park, J.: Chapter 17: The Immune System, S. 363 - 382. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [ChromaDex 2011]** ChromaDex, Inc.: Analysenzertifikate der Xanthophyll-Standards.
- [Chung et al. 2004]** Chung, H.-Y.; Rasmussen, H. M.; Johnson, E. J.: Lutein Bioavailability Is Higher from Lutein-Enriched Eggs than from Supplements and Spinach in Men. *Journal of Nutrition* (2004), 134: 1887 - 1893.
- [Clevidence und Bieri 1993]** Clevidence, B. A.; Bieri, J. G.: Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. *Methods in Enzymology* (1993), 214: 33 - 46.
- [Conrad et al. 1993]** Conrad, K. M.; Mast, M. G.; Ball, H. R.; Froning, G.; MacNeil, J. H.: Concentration of Liquid Egg White by Vacuum Evaporation and Reverse Osmosis. *Journal of Food Science*, 58 (5): 1017 - 1020.
- [Crowe et al. 1990]** Crowe, J. H.; Carpenter, J. F.; Crowe, L. M.; Anchordoguy, T. J.: Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* (1990), 27 (3): 219 - 231.
- [Dachtler 2000]** Dachtler, M.: Direktkopplung moderner Extraktions- und Trenntechniken mit der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung biomedizinisch wirksamer Inhaltsstoffe. (Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie, 2000) in Verbindung mit: **[Dachtler et al. 2001]** Dachtler, M.; Glaser, T.; Kohler, K.; Albert, K.: Combined HPLC-MS and HPLC-NMR On-Line Coupling for the Separation and Determination of Lutein and Zeaxanthin Stereoisomers in Spinach and in Retina. *Analytical Chemistry* (2001), 73: 667 - 674.
- [Delgado-Vargas und Paredes-López 1996]** Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O.: Correlation of HPLC and AOAC Methods to Assess the All-trans-Lutein Content in Marigold Flowers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (1996), 72: 283 - 290.
- [DFG 1991]** Deutsche Forschungsgemeinschaft: Ableitung von Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze nach dem Eichkurvenverfahren, S. XI-A-1 bis XI-A-22. In: Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln (11. Lieferung, Kapitel XI-A, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1991).
- [Dyer-Hurdon und Nnanna 1993]** Dyer-Hurdon, J. N.; Nnanna, I. A.: Cholesterol Content and Functionality of Plasma and Granules Fractionated from Egg Yolk. *Journal of Food Science* (1993), 58 (6): 1277 - 1281.

**[EFSA 2008]** Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on a request from the European Commission on the consequences for the consumer of the use of vitamin A in animal nutrition. *EFSA Journal* (2008), 873: 1 - 81.

**[EFSA 2010a]** EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to vitamin A (including  $\beta$ -carotene) and maintenance of normal vision (ID 4239, 4701), maintenance of normal skin and mucous membranes (ID 4660, 4702), and maintenance of normal hair (ID 4660) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* (2010), 8 (10): 1754 - 1767.

**[EFSA 2010b]** EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to zeaxanthin and maintenance of normal vision (ID1684, 2169, 2888) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* (2010), 8 (10): 1724 - 1742.

**[EFSA 2011a]** EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-carotene and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 19, 197, 1262, 1460), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID 178, 197, 1263, 1461, 1968, 2320) and maintenance of the normal function of the immune system (ID 200, 1462) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No1924/2006. *EFSA Journal* (2011), 9 (4): 2021 - 2043.

**[EFSA 2011b]** EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lutein and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID3427), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID 1605, 1779) and maintenance of normal vision (ID 1779, 2080) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No1924/2006. *EFSA Journal* (2011), 9 (4): 2030 - 2046.

**[EFSA 2011c]** EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lycopene and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID1608, 1609, 1611, 1662, 1663, 1664, 1899, 1942, 2081, 2082, 2142, 2374), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID1259, 1607, 1665, 2143, 2262, 2373), contribution to normal cardiac function (ID1610, 2372), and maintenance of normal vision (ID 1827) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* (2011), 9 (4): 2031 - 2059.

- [EFSA 2011d]** EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to lutein in combination with zeaxanthin and maintenance of normal vision (ID 1606) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* (2011), 9 (4): 2039 - 2053.
- [EFSA 2012]** EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lutein and maintenance of normal vision (ID 1603, 1604, further assessment) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* (2012), 10 (6): 2716 - 2733.
- [El-Agamey und McGarvey 2008]** El-Agamey, A.; McGarvey, D. J.: Chapter 7: Carotenoid Radicals and Radical Ions, S. 119 - 154. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Enzell und Back 1995]** Enzell, C.; Back, S.: Chapter 7: Mass Spectrometry, S. 261 - 320. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 1 B: Spectroscopy (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).
- [Epler und Sander 1992]** Epler, K. S.; Sander, L. C.: Evaluation of reversed-phase liquid chromatography columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *Journal of Chromatography* (1992), 595: 89 - 101.
- [Evans et al. 1968]** Evans, R. J.; Bandemer, S. L.; Davidson, J. A.; Heinlein, K.; Vaghefi, S. S.: Binding of lipid to protein in the low-density lipoprotein from the hen's egg. *Biochimica et Biophysica Acta* (1968), 164 (3): 566 - 574.
- [Evans et al. 1977]** Evans, R. J.; Flegal, C. J.; Foerder, C. A.; Bauer, D. H.; LaVigne, M.: The influence of crude cottonseed oil in feed on the blood and egg yolk lipoproteins of laying hens. *Poultry Science* (1977), 56 (2): 468 - 479.
- [Fehlhaber 1994]** Fehlhaber, K.: Kapitel 11: Mikrobiologie von Eiern und Eiprodukten, S. 294. In: Ternes, W.; Acker, L.; Scholtyssek, S. (Eds.): Ei und Eiprodukte (Band 22, Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, 1994).
- [Fleischmann und Zorn 2008]** Fleischmann, P.; Zorn, H.: Chapter 17: Enzymic Pathways for Formation of Carotenoid Cleavage Products, S. 341 - 366. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Finney und Poole 1985]** Finney, J. L.; Poole, P. L.: Solvent effects on the structure, dynamics and activity of lysozyme. *Journal of Biosciences* (1985), 8 (1-2): 25 - 35.
- [Foissy 2005]** Foissy, H.: Technologie tierischer Lebensmittel. (VO 751.103; Universität für Bodenkultur Wien, VO 751.103, IMB-Verlag, 2005).

- [Forti und Diament 2006]** Forti, N.; Diament, J.: High-Density Lipoproteins: Metabolic, Clinical, Epidemiological and Therapeutic Intervention Aspects. An Update for Clinicians. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* (2006), 87 (5): 614 - 622.
- [Frank und Christensen 2008]** Frank, H. A.; Christensen, R. L.: Chapter 9: Excited Electronic States, Photochemistry and Photophysics of Carotenoids, S. 167 - 188. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): *Carotenoids Volume 4: Natural Functions* (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Furr und Clark 1997]** Furr, H. C.; Clark, R. M.: Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *Journal of Nutritional Biochemistry* (1997), 8 (7): 364 - 377.
- [Gärtner et al. 1996]** Gärtner, C.; Stahl, W.; Sies, H.: Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to beta-carotene in the human. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (1996), 66 (2): 119 - 125.
- [Glaser 2001]** Glaser, T.: Bioverfügbarkeit von Carotinoiden und deren Metabolisierung in Serum und Retina: Anwendung von HPLC-NMR- und HPLC-APCI-MS-Kopplung. (Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie, 2001).
- [Goralczyk und Wertz 2009]** Goralczyk, R.; Wertz, K.: Chapter 16: Skin Photoprotection by Carotenoids, S. 335 - 362. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health* (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Gottwald und Stieglitz 1996]** Gottwald, W.; Stieglitz, A. (Eds.): *Instrumentell-analytisches Praktikum, Physikalische Messtechnik* (Band 4 b, Reihe „Die Praxis der Labor- und Produktionsberufe, VCH, Weinheim, 1996), Seite 11 - 38, 69 - 76, 143 - 165.
- [Grashorn und Grimrath 2005]** Grashorn, M. A.; Grimrath, J. Y.-M.: Unterscheidet sich die Qualität von Bio- und Käfigeiern? DGS - Das Magazin für die Geflügelwirtschaft und Schweineproduktion (2005), 56 (7): 18 - 25.
- [Greene et al. 2006]** Greene, C. M.; Waters, D.; Clark, R. M.; Contois, J. H.; Fernandez, M. L.: Plasma LDL and HDL characteristics and carotenoid content are positively influenced by egg consumption in elderly population. *Nutrition & Metabolism* (2006), 3 (6): 1 - 10.
- [Gregory et al. 1986]** Gregory, G. K.; Chen, T.-S.; Philip, T.: Quantitative Analysis of Lutein Esters in Marigold Flowers (*Tagetes erecta*) by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science* (1986), 51 (4): 1093 - 1094.

- [Hadden et al. 1999]** Hadden, W. L.; Watkins, R. H.; Levy, L. W.; Regalado, E.; Rivadeneira, D. M.; van Breemen, R. B.; Schwartz, S. J.: Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999), 47 (10): 4189 - 4194.
- [Hammershoj et al. 2010]** Hammershoj, M.; Kidmose, U.; Steenfeldt, S.: Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material for egg-laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2010), 90: 1163 - 1171.
- [Handelman et al. 1999]** Handelman, G. J.; Nightingale, Z. D.; Lichtenstein, A. H.; Schaefer, E. J.; Blumberg, J. B.: Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *American Journal of Clinical Nutrition* (1999), 70: 247 - 251.
- [Hart und Scott 1995]** Hart, D. J.; Scott, K. J.: Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry* (1995), 54 (1): 101 - 111.
- [Hasler 2000]** Hasler C. M.: Eggs as a Functional Food: Technology Update. S. 243 - 251. In: Sim, J. S.; Nakai, S.; Guenter, W. (Eds.): *Egg Nutrition and Biotechnology* (CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 2000).
- [Hatta et al. 2008]** Hatta, H.; Kapoor, M. P.; Juneja, L. R.: Chapter 5: Bioactive Components in Egg Yolk, S. 185 - 237. In: Mine, Y. (Ed.): *Egg Bioscience and Biotechnology* (Wiley-Interscience, New Jersey, 2008).
- [Hencken 1992]** Hencken, H.: Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science* (1992), 71: 711 - 717.
- [Hesterberg 2006]** Hesterberg, Karoline: Raman- spektroskopische Untersuchungen zu den Veränderungen des Gehalts an Carotinoiden im Produktlebenszyklus von Eiern von der landwirtschaftlichen Produktion bis zum Verzehr (Dissertation, Fakultät III – Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin, 2006).
- [Holdsworth und Finean 1972]** Holdsworth, G.; Finean, J. B.: A structural study of the Low-Density Lipoprotein Fraction from hen's eggs and of an isolated surface component. *Chemistry and Physics of Lipids* (1972), 9: 217 - 229.
- [Howell et al. 1997]** Howell, W. H.; McNamara, D. J.; Tosca, M. A.; Smith, B. T.; Gaines, J. A.: Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol – a meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* (1997), 65: 1747 - 1764.

- [Itoh et al. 1986]** Itoh, T.; Kubo, M.; Adachi, S.: Isolation and Characterization of Major Apoproteins from Hen's Egg Yolk Granule. *Journal of Food Science* (1986), 51 (5): 1115 - 1117.
- [Jaekel et al. 2008]** Jaekel, T.; Dautel, K.; Ternes, W.: Preserving functional properties of hen's egg yolk during freeze-drying. *Journal of Food Engineering* (2008), 87: 522 - 526.
- [Jaekel und Ternes 2009]** Jaekel, T.; Ternes, W.: Changes in rheological behaviour and functional properties of hen's egg yolk induced by processing and fermentation with phospholipases. *International Journal of Food Science and Technology* (2009), 44: 567 - 573.
- [Johnson und Krinsky 2009]** Johnson, E. J.; Krinsky, N. I.: Chapter 14: Carotenoids and Coronary Heart Disease, S. 287 - 300. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health* (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Jolivet et al. 2006]** Jolivet, P.; Boulard, C.; Beaumal, V.; Chardot, T.; Anton, M.: Protein Components of Low-Density Lipoproteins Purified from Hen Egg Yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54 (12): 4424 - 4429.
- [Juneja und Kim 1997]** Juneja, L. R.; Kim, M.: Egg yolk proteins, S. 57 - 71. In: Yamamoto, T.; Juneja, L. R.; Hatta, H.; Kim, M. (Eds.): *Hen Eggs: Their Basic and Applied Science*. (CRC Press, New York, 1997).
- [Karadas et al. 2005]** Karadas, F.; Pappas, A. C.; Surai, P. F.; Speake, B. K.: Embryonic development within carotenoid-enriched eggs influences the post-hatch carotenoid status of the chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology* (2005), Part B 141: 244 - 251.
- [Karasová et al. 2003]** Karasová, G.; Brandšteterová, E.; Lachová, M.: Matrix Solid Phase Dispersion as an Effective Preparation Method for Food Samples and Plants before HPLC Analysis. *Czech Journal of Food Sciences* (2003), 21 (6): 219 - 234.
- [Kasper 2004]** Kasper, H. (Ed.): „Ernährungsmedizin und Diätetik (Elsevier GmbH München, Urban & Fischer Verlag, 10. neubearbeitete Auflage 2004), S. 33f, 47, 49 - 51, 300, 320 - 322, 430, 451f.
- [Keil 2013]** Keil, H.: Untersuchungen zum Einfluss von Verarbeitungstechnologien auf die Proteinstrukturen von Eigelb mit Hilfe der DSC (Masterarbeit, Hochschule Fulda, 2013).
- [Khachik 2001]** Khachik, F.: Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants. United States Patent No. US 6,262,284 B1 (2001)

- [Khachik 2009]** Khachik, F.: Chapter 2: Analysis of Carotenoids in Nutritional Studies, S. 7 - 44. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Kohler 1995]** Kohler, B. E.: Chapter 1: Electronic Structure of Carotenoids, S. 1 - 12. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 1 B: Spectroscopy (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).
- [Köhn et al. 2008]** Köhn, S.; Kolbe, H.; Korger, M.; Köpsel, C.; Mayer, B.; Auweter, H.; Lüddecke, E.; Bettermann, H.; Martin, H.-D.: Chapter 5: Aggregation and Interface Behaviour of Carotenoids, S. 53 - 98. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Korger 2005]** Korger, M.: Aggregationsverhalten von Carotinoiden in Membranen unilamellarer Liposomen – Synthese, Präparation, Charakterisierung, UV/VIS- und CD-Spektroskopie (Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 2005).
- [Kostecka-Gugala et al. 2003]** Kostecka-Gugala, A.; Latowski, D.; Strzalka, K.: Thermotropic phase behaviour of  $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine multibilayers is influenced to various extents by carotenoids containing different structural features - evidence from differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta* (2003), 1609 (2): 193 - 202.
- [Kostic et al. 1995]** Kostic, D.; White, W. S.; Olson, J. A.: Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and  $\beta$ -carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *American Journal of Clinical Nutrition* (1995), 62: 604 - 610.
- [Kromidas 1999]** Kromidas, S.: Validierung in der Analytik, S. 47 – 196 (Kapitel 3: Die Validierungsparameter oder nach ISO 17025: Verfahrensmerkmale). In: Gruber, U.; Klein, W. (Eds.): Die Praxis der instrumentellen Analytik (Wiley-VCH, Weinheim, 1999).
- [Kuksis 1992]** Kuksis, A.: Yolk lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* (1992), 1124: 205 - 222.
- [Kulozik und Daimer 2007]** Kulozik, U.; Daimer, K.: Steigerung der Emulgierereigenschaften von Eigelb durch thermische und enzymatisch-thermische Behandlung. (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V., Abschlussbericht zu AiF-FV 14041 N, 2007).
- [Kulozik und Strixner 2011]** Kulozik, U.; Strixner, T.: Fraktionierung und getrennte Ausnutzung des technologisch-funktionellen Potentials der Eigelbhauptfraktionen Plasma und Granula. (FEI - Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V., AiF 16009 N, 2011).

- [LAAS 2001]** The Los Angeles atherosclerosis study: Dwyer, J. H.; Navab, M.; Dwyer, K. M.; Hassan, K.; Sun, P.; Shircore, A.; Hama-Levy, S.; Hough, G.; Wang, X.; Drake, T.; Merz, C. N.; Fogelman, A. M.: Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis. *Circulation* (2001), 103 (24): 2922 - 2927.
- [Lai et al. 1996]** Lai, S.-M.; Gray, J. I.; Flegal, C. J.; Cooper, T.: Deposition of Carotenoids in Eggs from Hens Fed Diets Containing Saponified and Unsaponified Oleoresin Paprika. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (1996), 72 (2): 166 - 170.
- [LAST 2004]** The Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial): Richer, S.; Stiles, W.; Statkute, L.; Pulido, J.; Frankowski, J.; Rudy, D.; Pei, K.; Tsiপুরsky, M.; Nyland, J.: Double-masked, placebocontrolled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration. *Optometry* (2004); 75 (4): 216 - 230.
- [Lazrak et al. 1987]** Lazrak, T.; Milon, A.; Wolff, G.; Albrecht, A.-M.; Miehé, M.; Ourisson, G.; Nakatani, Y.: Comparison of the effects of inserted C<sub>40</sub>- and C<sub>50</sub>-terminally dihydroxylated carotenoids on the mechanical properties of various phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* (1987), 903 (1): 132 - 141.
- [Lea und Hawke 1952]** Lea, C. H.; Hawke, J. C.: Lipovitellin – 2. The influence of water on the stability of Lipovitellin and the effects of freezing and of drying. *Biochemical Journal* (1952), 52 (1): 105 - 114.
- [Le Denmat et al. 1999]** Le Denmat, M.; Anton, M.; Gandemer, G.: Protein Denaturation and Emulsifying Properties of Plasma and Granules of Egg Yolk as Related to Heat Treatment. *Journal of Food Science* (1999), 64 (2): 194 - 197.
- [Leeson und Caston 2004]** Leeson, S.; Caston, L.: Enrichment of Eggs with Lutein. *Poultry Science* (2004), 83: 1709 - 1712.
- [Lehmann 1996]** Lehmann, W. D. (Ed.): Massenspektrometrie in der Biochemie (Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - Oxford, 1996), S. 7 - 39 (Kapitel 1: Elektronenstoß-Ionisierung und Prinzipien der Massenanalyse), 43 - 52 (Kapitel 2: Chemische Ionisation).
- [Lessin et al. 1997]** Lessin, W. J.; Catigani, G. L.; Schwartz, S. J.: Quantification of cis-trans-Isomers of Provitamin A Carotenoids in Fresh and Processed Fruits and Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1997), 45: 3728 - 3732.
- [Li und Han 2008]** Li, X.-X.; Han, L.-J.: Iron(II)-induced isomerization of (*all-E*)-xanthophyll pigments lutein, zeaxanthin, and  $\beta$  cryptoxanthin in acetone. *European Food Research and Technology* (2008), 227 (5): 1307 - 1313.

- [Liaaen-Jensen 1995]** Liaaen-Jensen, S.: Chapter 9: Combined Approach: Identification and Structure Elucidation of Carotenoids, S. 343 - 354. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Carotenoids Volume 1 B: Spectroscopy (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).
- [Liaaen-Jensen 2008]** Liaaen-Jensen, S.: Chapter 8: Structure and Properties of Carotenoid Cations, S. 155 - 166. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Liaaen-Jensen und Lutnøes 2008]** Liaaen-Jensen, S.; Lutnøes, B. F.: Chapter 3: E/Z-Isomers and Isomerization, S. 15 - 36. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Li-Chan et al. 1995]** Li-Chan, E. C. Y.; Powrie, W. D.; Nakai, S.: Chapter 6: The Chemistry of Eggs and Egg Products; S. 105 - 176. In: Stadelman, W. J.; Cotterill, O. J. (Eds.): Egg science and technology (Food Product Press, New York, fourth edition 1995).
- [Li-Chan und Kim 2008]** Li-Chan, E. C. Y.; Kim, H.-O.: Chapter 1: Structure and Chemical Compositions of Egg, S. 1 - 95. In: Mine, Y. (Ed.): Egg Bioscience and Biotechnology (Wiley-Interscience, New Jersey, 2008).
- [Lohninger et al. 2003]** Lohninger, H.; Fröhlich, J.; Mizaikoff, B.; Rosenberg, E.: Teach/Me – Instrumentelle Analytik (CD-ROM).  
[http://www.vias.org/tmanalytik\\_germ/wrapnt\\_massenspektrometrie4.html](http://www.vias.org/tmanalytik_germ/wrapnt_massenspektrometrie4.html) (November 2010)
- [Majchrzak und Elmadfa 1997]** Majchrzak, D.; Elmadfa, I.: Gehalt an Vitamin A, Vitamin E und Carotinoiden in handelsüblichen Hühnereiern. *Ernährung/Nutrition* (1997), 21 (11): 492 - 495.
- [Martin et al. 1964]** Martin, W. G.; Augustyniak, J.; Cook, W. H.: Fractionation and Characterization of the Low-Density Lipoproteins of Hen's Egg Yolk. *Biochimica et Biophysica Acta* (1964), 84: 714 - 720.
- [McBee und Cotterill 1979]** McBee, L. E.; Cotterill, O. J.: Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *Journal of Food Science* (1979), 44 (3): 656 - 667.
- [McNamara 2000]** McNamara, D. J.: Eggs, Dietary Cholesterol and Heart Disease Risk: an International Perspective. S. 55 - 63. In: Sim, J. S.; Nakai, S.; Guenter, W.: Egg Nutrition and Biotechnology (CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK, 2000).
- [Meyer 1999]** Meyer, V. R. (Ed.): Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern (Wiley-VCH Weinheim, 2. erweiterte Auflage 1999,), S. 156f.

- [Mohr und Simon 1992]** Mohr, K.-H.; Simon, S.: Kinetische Untersuchungen zur Denaturierung der Eigelbproteine durch rheologische Messungen. *Die Nahrung* (1992), 36 (6): 530 - 538.
- [Molnár und Szabolcs 1993]** Molnár, P.; Szabolcs, J.: (Z/E)-photoisomerization of C40-carotenoids by iodine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* (1993), 261 - 266.
- [Motulsky 2007]** Motulsky, H. J.: Prism 5 Statistics Guide. (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, 2007), S. 132 - 143.
- [Moussa et al. 2002]** Moussa, M.; Martinet V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; Anton, M.: Low-density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* (2002), 57: 1695 - 1706.
- [Na et al. 2004]** Na, J.-C.; Song, J.-Y.; Lee, B.-D.; Lee, S.-J.; Lee, C.-Y.; An, G.-H.: Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. *Animal Feed Science and Technology* (2004), 117: 305 - 315.
- [Nys 2000]** Nys, Y.: Dietary carotenoids and egg yolk coloration – a review. *Archiv für Geflügelkunde* (2000), 64: 45 - 54.
- [Palozza et al. 2009]** Palozza, P.; Serini, S.; Ameruso, M.; Verdecchia, S.: Chapter 11: Modulation of Intracellular Signalling Pathways by Carotenoids, S. 211 - 234. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Parker 1996]** Parker, R. S.: Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal* (1996), 10 (5): 542 - 551.
- [Pérez-Gálvez et al. 2000]** Pérez-Gálvez, A.; Garrido-Fernández, J.; Mínguez-Mosquera, M. I.: Effect of High-Oleic Sunflower Seed on the Carotenoid Stability of Ground Pepper. *Journal of the American Oil Chemist's Society JAOCS* (2000), 77 (1): 79 - 83.
- [Pérez-Gálvez et al. 2005]** Pérez-Gálvez, A.; Rios, J. J.; Mínguez-Mosquera, M. I.: Thermal Degradation Products Formed from Carotenoids during a Heat-Induced Degradation Process of Paprika Oleoresins (*Capsicum annum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2005), 53: 4820 - 4826.
- [Pfander 1995]** Pfander, H.: Chapter 6: Chromatography: Part I. General Aspects, S. 109 - 116. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Carotenoids Volume 1 A: Isolation and Analysis (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).

- [Pfander und Riesen 1995]** Pfander, H.; Riesen, R.: Chapter 6: Chromatography: Part IV. High-Performance Liquid Chromatography, S. 145 - 190. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 1 A: Isolation and Analysis (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).
- [Philip et al. 1976]** Philip, T.; Weber, C. W.; Berry, J. W.: Utilization of Lutein and Lutein-Fatty Acid Esters by Laying hens. *Journal of Food Science* (1976), 41: 23 - 25.
- [POLA 2006]** The POLA Study Group (Pathologies Oculaires Liées à l'Age): Delcourt, C.; Carriere, I.; Delage, M.; Barberger-Gateau, P.; Schalch, W.: Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2006), 47 (6): 2329 - 2335.
- [Powrie et al. 1963]** Powrie, W. D.; Little, H.; Lopez, A.: Gelation of Egg Yolk. *Journal of Food Science* (1963), 28 (1): 38 - 46.
- [Powrie und Nakai 1986]** Powrie, W. D.; Nakai, S.: The chemistry of eggs and egg products, S. 2 (Chapter 1: Composition and Structure of Hen Egg Yolk). In: Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M.; Schade, R. (Eds.): Bioactive Egg Compounds (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007).
- [Riedel 1972]** Riedel, L.: Enthalpie-water content diagram for lean beef. Recommendations for the Processing and Handling of Frozen Foods, second ed. IIR, Paris: 28 - 29. In: Oetjen, G.-W. (Ed.): Freeze-Drying (Wiley-VCH, Weinheim, 1999), S. 3 und In: Saravacos, G. D.; Kostaropoulos, A. E. (Eds.): Handbook of Food Processing Equipment. (Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, 2002), S. 422.
- [Rock 2009]** Rock, C. L.: Chapter 13: Carotenoids and Cancer, S. 269 - 282. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Rodriguez-Amaya 1997]** Rodriguez-Amaya, D. B.: Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed, and Stored Foods (Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1997).
- [Rodriguez-Amaya 2001]** Rodriguez-Amaya, D. B.: A Guide to Carotenoid Analysis in Foods (ILSI Press, International Life Sciences Institute, Washington D. C., USA, 2001).
- [Rodriguez-Amaya 2003]** Rodriguez-Amaya, D. B.: Chapter 3.2: Food Carotenoids: Analysis, Composition and Alterations during Storage and Processing of Foods, S. 35 - 37. In: Elmadfa, I.; Anklam, E.; König, J. S. (Eds.): Modern Aspects of Nutrition: Present Knowledge and Future Perspectives. *Forum of Nutrition* (2003), 56 (S. Karger AG, Basel, 2003).

- [Ros 1994]** Ros, J.: Kapitel 14: Technologie der industriellen Verarbeitung von Eiern zu Eiprodukten, S. 330 - 332, 345. In: Ternes, W.; Acker, L.; Scholtyssek, S. (Eds.): Ei und Eiprodukte (Band 22, Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, 1994).
- [Roy und Gupta 2004]** Roy, I.; Gupta, M. N.: Review: Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnology and Applied Biochemistry* (2004), 39: 165 - 177.
- [Rudolf und Kuhlisch 2008]** Rudolf, M.; Kuhlisch, W. (Eds.): Biostatistik – Eine Einführung für Biowissenschaftler, S. 97 - 118 (Kapitel 5: Formulieren und Prüfen von Hypothesen), 279 - 313 (Kapitel 8: Varianzanalyse), (Pearson Studium – Biologie, Addison-Wesley Verlag, 2008).
- [Rupley et al. 1983]** Rupley, J. A.; Gratton, E.; Careri, G.: Water and globular proteins. *Trends in Biochemical Sciences* (1983), 8 (1): 18 - 22.
- [Sander et al. 1994]** Sander, L. C.; Sharpless, K. E.; Craft, N. E.; Wise, S. A.: Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Analytical Chemistry* (1994), 66 (10): 1667 - 1674.
- [Sander et al. 2000]** Sander, L. C.; Sharpless, K. E.; Pursch, M.: C<sub>30</sub> Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (2000), 880 (1-2): 189 - 202.
- [Santos et al. 1996]** Santos, M. S.; Meydani, S. N.; Leka, L.; Wu, D.; Fotouhi, N.; Meydani, M.; Hennekens, C. H.; Gaziano, J. M.: Natural killer cell activity in elderly men is enhanced by beta-carotene supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition* (1996), 64: 772 - 777.
- [Schalch et al. 2009]** Schalch, W.; Landrum, J. T.; Bone, R. A.: Chapter 15: The Eye, S. 301 - 334. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Schiedt und Liaaen-Jensen 1995]** Schiedt, K.; Liaaen-Jensen, S.: Chapter 5: Isolation and Analysis, S. 81 - 108. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: Carotenoids Volume 1 A: Isolation and Analysis (Birkhäuser Verlag Basel, 1995).
- [Schlatterer und Breithaupt 2006]** Schlatterer, J.; Breithaupt, D. E.: Xanthophylls in Commercial Egg Yolks: Quantification and Identification by HPLC and LC-(APCI)MS Using a C<sub>30</sub> Phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54: 2267 - 2273.
- [Schröder 1991]** Schröder, E. (Ed.): Massenspektrometrie – Begriffe und Definitionen (Heidelberger Taschenbücher Band 260, Springer Verlag, Heidelberg, 1991), S. 7f, 48f, 68.
- [Seuß-Baum 2005]** Seuß-Baum, I.: Eier als Nährstofflieferanten. *Fleischwirtschaft* (2005), 85 (9): 117 - 122.

- [Shen et al. 2009]** Shen, Y.; Hu, Y.; Huang, K.; Yin, S.; Chen, B.; Yao, S.: Solid-phase extraction of carotenoids. *Journal of Chromatography A* (2009), 1216 (30): 5763 - 5768.
- [Sies und Stahl 2004]** Sies, H.; Stahl, W.: Carotenoids and UV protection. *Photochemical and Photobiological Sciences* (2004), 3 (8): 749 - 752.
- [Smith und Back 1975]** Smith, M. B.; Back, J. F.: Thermal Transitions in the Low-Density Lipoprotein and Lipids of the Egg Yolk of Hens. *Biochimica et Biophysica Acta* (1975), 388: 203 - 212.
- [Stadelman und Schmieder 2002]** Stadelman, W. J.; Schmieder, H.: Functional Uses of Eggs – An Overview; S. 3 - 8. In: Watson, R. R. (Ed.): Eggs and Health Promotion (Iowa State Press, 2002).
- [Stahl et al. 1992]** Stahl, W.; Schwarz, W.; Sundquist, A. R.; Sies, H.: cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1992), 294 (1): 173 - 177.
- [Stracke et al. 2009]** Stracke, B. A.; Rüfer, C. E.; Bub, A.; Briviba, K.; Seifert, S.; Kunz, C.; Watzl, B.: Bioavailability and nutritional effects of carotenoids from organically and conventionally produced carrots in healthy men. *British Journal of Nutrition* (2009), 101: 1664 - 1672.
- [Strambini und Gabellieri 1996]** Strambini, G. B.; Gabellieri, E.: Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophysical Journal* (1996), 70 (2): 971 - 976.
- [Stringham und Hammond 2008]** Stringham, J. M.; Hammond, B. R.: Macular Pigment and Visual Performance Under Glare Conditions. *Optometry & Vision Science* (2008), 85 (2): 82 - 88.
- [Su et al. 2002]** Su, Q.; Rowley, K. G.; Balazs, N. D. H.: Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B* (2002), 781: 393 - 418.
- [Surai und Speake 1998]** Surai, P. F.; Speake, B. K.: Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *Journal of Nutritional Biochemistry* (1998), 9 (11): 645 - 651.
- [Surai et al. 1998]** Surai, P. F.; Ionov, I. A.; Kuklenko, T. V.; Kostjuk, I. A.; MacPherson, A.; Speake, B. K.; Noble, R. C.; Sparks, N. H.: Effect of supplementing the hen's diet with vitamin A on the accumulation of vitamins A and E, ascorbic acid and carotenoids in the egg yolk and in the embryonic liver. *British Poultry Science* (1998), 39 (2): 257 - 263.

- [Surai et al. 2001]** Surai, P. F.; Speake, B. K.; Wood, N. A.; Blount, J. D.; Bortolotti, G. R.; Sparks, N. H.: Carotenoid discrimination by the avian embryo: a lesson from wild birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* (2001), 128 (4): 743 - 750.
- [Surai et al. 2003]** Surai, A. P.; Surai, P. F.; Steinberg, W.; Wakeman, W. G.; Speake, B. K.; Sparks, N. H. C.: Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science* (2003), 44 (44): 612 - 619.
- [Tang und Russell 2009]** Tang, G.; Russell, R. M.: Chapter 8: Carotenoids as Provitamin A, S. 149 - 172. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health* (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Telis und Kieckbusch 1998]** Telis, V. R. N.; Kieckbusch, T. G.: Viscoelasticity of Frozen/Thawed Egg Yolk as Affected by Salts, Sucrose and Glycerol. *Journal of Food Science* (1998), 63 (1): 20 - 24.
- [Terao et al. 1980]** Terao, J.; Yamauchi, R.; Murakami, H.; Matsushita, S.: Inhibitory effects of tocopherols and  $\beta$ -carotene on singlet oxygen-initiated photooxidation of methyl linoleate and soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation* (1980), 4 (1-2): 79 - 93.
- [Ternes und Acker 1994a]** Ternes, W.; Acker, L.: Kapitel 7: Physikalisch-chemische Eigenschaften; S. 197 (7.2 Gefrierpunkte), 198 (7.4 Der pH-Wert), 203 (7.6 Viskosität). In: Ternes, W.; Acker, L.; Scholtyssek, S. (Eds.): *Ei und Eiprodukte* (Band 22, Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, 1994).
- [Ternes und Acker 1994b]** Ternes, W.; Acker, L.: Kapitel 8: Mikrostruktur und mikrostrukturelle Veränderungen des Eiinhalts; S. 211, 213, 214f (8.2 Strukturveränderungen durch technologische Prozesse). In: Ternes, W.; Acker, L.; Scholtyssek, S. (Eds.): *Ei und Eiprodukte* (Band 22, Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, 1994).
- [Ternes und Acker 1994c]** Ternes, W.; Acker, L.: Kapitel 10: Funktionelle Eigenschaften der Eier bei der Verarbeitung von Lebensmitteln; S. 261f (10.2 Funktionelle Eigenschaften des Eigelbs). In: Ternes, W.; Acker, L.; Scholtyssek, S. (Eds.): *Ei und Eiprodukte* (Band 22, Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg, 1994).
- [Ternes et al. 1995]** Ternes, W.; Krämer, P.; Menzel, R.; Zeifelder, K.: Verteilung von fettlöslichen Vitaminen (A, E, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>) und Carotinoiden (Lutein, Zeaxanthin) in den Lipiden von Granula und Plasma des Eigelbs. *Archiv für Geflügelkunde* (1995), 5: 261 - 268.
- [Ternes et al. 2005]** Ternes, W.; Täufel, A.; Tunger, L.; Zobel, M. (Eds.): *Lebensmittellexikon* (B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, Hamburg, 4. Auflage 2005), S. 444 - 449.

- [Ternes 2008a]** Ternes, W. (Ed.): Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung (Behr's Verlag, Hamburg, 3. Auflage 2008), S. 73f (Kapitel 2: Lipide – 2.11 Antioxidantien), 604 - 640 (Kapitel 11: Ei und Eiprodukte – 11.3 Zusammensetzung des Eigelbs, 11.4 Technofunktionelle Eigenschaften des Eigelbs, 11.5 pH-Wert-Änderung während der Lagerung, 11.6 Die Verwendung von Eiern in der Küche), 734, 750 - 754 (Kapitel 13: Gemüse und Obst – 13.4 Thermische und enzymatische Einwirkung auf Gerüstsubstanzen; 13.5 Farbgebende Inhaltsstoffe).
- [Ternes 2008b]** Ternes, W.: Eiprodukte; aktuelle Trends in der Verarbeitung und Verwendung, S. 210 - 223. In: Brade, W.; Flachowsky, G.; Schrader, L.: Legehuhnzucht und Eierzeugung - Empfehlungen für die Praxis (Sonderheft 322, vTI Agriculture and Forestry Research, 2008).
- [Thierau *et al.* 2014]** Thierau, S.; Keil, H.; Seuss-Baum, I.; Hensel, O.: Effects of Heat Treatment and Freeze-Drying on the Protein and Lipoprotein Structures of Egg Yolk as Determined Using Differential Scanning Calorimetry (DSC). *Agricultural Communications* (2014), 2 (3): 27 - 37.
- [Timasheff 2002]** Timasheff, S. N.: Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002), 99 (15): 9721 - 9726.
- [University of Bristol 2005]** University of Bristol, Life Sciences Mass Spectrometry Facility – Natural Environment Research Council: High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS).  
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html> (November 2010)
- [Universität Stuttgart 2004]** Universität Stuttgart, Institut für Raumfahrtsysteme: Messverfahren für strömende Plasmen – Kapitel 5: Massenspektrometrie.  
[http://www.irs.uni-stuttgart.de/lehre/v\\_messverfahren\\_plasma\\_selfstudy\\_online/Kap-5\\_Massenspektrometrie/Kap-5\\_Massenspektrometrie.pdf](http://www.irs.uni-stuttgart.de/lehre/v_messverfahren_plasma_selfstudy_online/Kap-5_Massenspektrometrie/Kap-5_Massenspektrometrie.pdf) (Oktober 2010)
- [USDA 2014]** United States Department of Agriculture: Agricultural Research Service - National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26 (Full report 11167, 11304, 11457).  
<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list> (Februar 2014)
- [Vaghefi 2002]** Vaghefi, S. B.: Chapter 9: Eggs and Health: Myths and Misconceptions, S. 83 - 100 (Section 2. Cholesterol and Health: Role of Eggs). In: Watson, R. R. (Ed.): *Eggs and Health Promotion* (Iowa State Press, 2002).

- [van der Horst-Graat et al. 2004]** van der Horst-Graat, J. M.; Kok, F. J.; Schouten, E. G.: Plasma carotenoid concentrations in relation to acute respiratory infections in elderly people. *British Journal of Nutrition* (2004), 92 (1): 113 - 118.
- [van het Hof et al. 1998]** van het Hof, K. H.; Gärtner, C.; West, C. E.; Tijburg, L. B. M.: Potential of Vegetable Processing to Increase the Delivery of Carotenoids to Man. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (1998), 68 (6): 366 - 370.
- [van het Hof et al. 2000]** van het Hof, K. H.; West, C. E.; Weststrate, J. A.; Hautvast, J. G. A. J.: Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids. *Journal of Nutrition* (2000), 130: 503 - 506.
- [Wakamatu et al. 1982]** Wakamatu, T.; Sato, Y.; Saito, Y.: Relationship between Solubility Change during Dehydration and Unfreezable Water in Egg Yolk and Low Density Lipoprotein. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* (1982), 56 (2): 117 - 122.
- [Wakamatu et al. 1983]** Wakamatu, T.; Sato, Y.; Saito, Y.: On sodium chloride action in the gelation process of low density lipoprotein (LDL) from hen egg yolk. *Journal of Food Science* (1983), 48 (2): 507 - 512.
- [Wakamatu 1993]** Wakamatu, T.: Gelation of Low Density Lipoprotein (LDL) from hen egg yolk during freezing and thawing, S. 279 - 283. In: Nishinari, K.; Doi, E. (Eds.): *Food Hydrocolloids: Structures, Properties, and Functions* (Plenum Press, New York, 1993).
- [Wang 2009]** Wang, X.-D.: Chapter 18: Biological Activities of Carotenoid Metabolites, S. 383 - 408. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.: *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health* (Birkhäuser Verlag, Basel, 2009).
- [Waters 2004]** Waters Corporation: *Waters 2695 Trennmodul Benutzerhandbuch; Anhang C (Anmerkungen zu Lösungsmitteln) – C.3 Mischbarkeit von Lösungsmitteln*.
- [Waters 2011]** Waters Corporation: *Waters 996 PDA Detector – Operator's Guide (Kapitel: 5.4.2 "Photometric Error")*.
- [Watson et al. 1991]** Watson, R. R.; Prabhala, R. H.; Plezia, P. M.; Alberts, D. S.: Effect of beta-carotene on lymphocyte subpopulations in elderly humans: evidence for a dose-response relationship. *American Journal of Clinical Nutrition* (1991), 53: 90 - 94.
- [Watzl und Bub 2001]** Watzl, B.; Bub, A.: Carotinoide. *Ernährungs-Umschau* (2001), 48 (2): 71 - 74.
- [Weedon und Moss 1995]** Weedon, B. C. L.; Moss, G. P.: Chapter 3: Structure and Nomenclature, S. 27 - 70. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): *Carotenoids Volume 1 A: Isolation and Analysis* (Birkhäuser Verlag, Basel, 1995).

- [Wenzel 2010]** Wenzel, M.: Einfluss von Pasteurisation, Trocknung und Lagerung auf die Carotinoidgehalte von sprüh- und gefriergetrocknetem Eigelbpulver. (Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement, 2010).
- [Wenzel et al. 2010]** Wenzel, M.; Seuss-Baum, I.; Schlich, E.: Influence of Pasteurization, Spray- and Freeze-Drying, and Storage on the Carotenoid Content in Egg Yolk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2010), 58 (3): 1726 - 1731.
- [Westphal et al. 2003]** Westphal, G.; Gerber, G.; Lipke, B. (Eds.): Proteine - nutritive und funktionelle Eigenschaften (Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2003), S. 102f (Kapitel 2: Eigenschaften von Proteinen; 2.1.2 Protein-Protein-Wechselwirkungen).
- [White et al. 1994]** White, W. S.; Stacewicz-Sapuntzakis, M.; Erdman, J. W. Jr.; Bowen, P. E.: Pharmacokinetics of beta-carotene and canthaxanthin after ingestion of individual and combined doses by human subjects. *Journal of the American College of Nutrition* (1994), 13 (6): 665 - 671.
- [Widomska und Subczynski 2008]** Widomska, J.; Subczynski, W. K.: Transmembrane localization of cis-isomers of zeaxanthin in the host dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* (2008), 1778: 10 - 19.
- [Widomska et al. 2009]** Widomska, J.; Kostecka-Gugala, A.; Latowski, D.; Gruszecki, W. I.; Strzalka, K.: Calorimetric studies of the effect of cis-carotenoids on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Chemistry* (2009), 140 (1-3): 108 - 114.
- [Wingerath et al. 1998]** Wingerath, T.; Sies, H.; Stahl, W.: Xanthophyll esters in human skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1998), 355 (2): 271 - 274.
- [Wisniewska et al. 2006]** Wisniewska, A.; Widomska, J.; Subczynski, W. K.: Carotenoid-membrane interactions in liposomes: effect of dipolar, monopolar, and nonpolar carotenoids. *Acta Biochimica Polonica* (2006), 53 (3): 475 - 484.
- [Wooten und Hammond 2002]** Wooten, B. R.; Hammond, B. R.: Macular pigment: influences on visual acuity and visibility. *Progress in Retinal and Eye Research* (2002), 21 (2): 225 - 240.
- [Wyss und von Lintig 2008]** Wyss, A.; von Lintig, J.: Chapter 16: Cleavage of  $\beta$ -Carotene to Retinal, S. 325 - 340. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 4: Natural Functions (Birkhäuser Verlag, Basel, 2008).
- [Yamamoto und Omori 1994]** Yamamoto, Y.; Omori, M.: Antioxidative activity of egg yolk lipoproteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (1994), 58 (9): 1711 - 1713.

- [Yeum et al. 2009]** Yeum, K.-J.; Aldini, G.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I.: Chapter 12: Anti-oxidant/Prooxidant Actions of Carotenoids, S. 235 - 268. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.): Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health (Birkhäuser Verlag Basel, 2009).
- [YMC 2011]** YMC Europe GmbH: Analytical Columns – YMC 30.  
<http://www.ymc.de/ymceurope/products/analyticalLC/analyticalColumns/YMC30.htm> (Juni 2011)
- [Yue et al. 2006]** Yue, X.; Xu, Z.; Prinyawiwatkul, W.; King, J. M.: Improving Extraction of Lutein from Egg Yolk Using an Ultrasound-Assisted Solvent Method. *Journal of Food Science* (2006), 71 (4): 239 - 241.
- [Zhang et al. 1991]** Zhang, L. X.; Cooney, R. V.; Bertram, J. S.: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* (1991), 12 (11): 2109 - 2114.
- [Zhao et al. 2006]** Zhao, L.; Zhao, G.; Chen, F.; Wang, Z.; Wu, J.; Hu, X.: Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54 (21): 8346 - 8351.

## **Anhang**

**Anhang 1:** Geräte und Materialien

**Anhang 2:** Bestimmung von Lutein und Zeaxanthin

**Anhang 3:** Prozentuale Anteile an 13-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration

**Anhang 4:** Statistische Auswertung ( $\alpha = 0,05$ ) der Versuchsreihen zum Einfluss der Erhitzung und Gefriertrocknung auf die Protein- und Lipoproteinstrukturen und Massenkonzentrationen der Xanthophylle in Granula, Plasma und Eigelb

### 1. Allgemein

- Analysenwaage AT 261 Delta Range® (Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)
- Ultraschallbad Sonorex Super RK 510H, 35 kHz (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland)
- Wasseraufreinigungssystem arium 611UV (Sartorius Stedim Biotech S. A., Aubagne, Frankreich)

### 2. Vorbereitung, Behandlung und Extraktion der Proben; Trockenmassebestimmung

- Cellulose-Rundfilter Rotilabo® Typ 111A, Ø = 125 mm (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Gefriertrockner beta 2-16 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland)
- IKA-Ultra-Turrax T25 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Labofuge 400R mit Hämatokrit-Teller (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland)
- Mini-Kreisschüttler Orbital (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- **MSPD Sorbens:** Reprosil-Pur-Basic C<sub>18</sub>-HD, Partikelgröße 10 µm, Kohlenstoffbeladung 25 % (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland)
- Multifuge X1R mit Rotor FIBERLite® F15-6x 100 y (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland)
- RC-Spritzenvorsatzfilter PERFECT-Flow, Ø = 25 mm, Porengröße = 0,45 µm (WICOM Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland)
- Schockkühler BCF15A 110721 (Zanussi Professional/Electrolux Professional GmbH, Herborn, Deutschland)
- Schüttelwasserbad Typ 1083, Temperaturgenauigkeit ± 0,5 K (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)
- Seesand reinst, Partikelgröße = 0,1 - 0,3 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Trockenschrank Kelvitron® t (Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland)
- Vakuumverpackungsmaschine A 300/16 MC (MULTIVAC Sepp Haggenmüller GmbH & Co. KG, Wolfertschwenden, Deutschland)

### 3. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

- Kalorimeter Typ DSC 1 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz)

#### 4. HPLC-PDA-MS-Analyse

- **Druckluft:** DK50-2x2V/110 (ekom, Piešťany, Slowakei)
- **HPLC-Anlage:** Waters Alliance 2695 Separations Module mit Entgaser, Pumpe, Autosampler und Photodiodenarray-Detektor Waters PDA 996 (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)
- **HPLC-Trennsäule:** Stability 100 C<sub>30</sub> (ST 15.30.S2546, Batch 260210506202 und 140508506210), endcapped, 5 µm, 250 x 4,6 mm, Porendurchmesser 100 Å, Oberfläche 350 m<sup>2</sup>/g, 25 % Kohlenstoffbeladung, polymere Synthese (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland)
- **HPLC-Vorsäule:** Stability C<sub>30</sub>, endcapped, 5 µm, 10 x 4,0 mm (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland)
- **Säulenofen:** Gynkotec STH 585 (Gynkotec Gesellschaft für den Bau wissenschaftlich-technischer Geräte mbH, Germering, Deutschland)
- **Stickstoff-Generator:** LC-MS NGM-11 (CMC Instruments GmbH, Eschborn, Deutschland)
- **Triple-Quadrupol-Massenspektrometer:** Quattro LC (Micromass UK Limited, Manchester, Großbritannien)
- **Wasserkühlung:** WK 500 (Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland)

**Standardsubstanzen** (LGC Promochem, Wesel, Deutschland & ChromaDex, Inc., Irvine, Kalifornien, USA)

- **Lutein** 5 mg, expiration date: 04/2013, Lot number: 00012453-0549 / CDXA-08-0549, Reinheit (HPLC): 95,9 %
- **Zeaxanthin** 5 mg, expiration date: 08/2013, Lot number: 00026504-5426 / CDXA-10-5426, Reinheit (HPLC): 98,6 %
- **β-Carotin** 5 mg, expiration date: 01/2013, Lot number: 00003211-316 / CDXA-10-0385, Reinheit (HPLC): 95,4 %

**Lösungsmittel HPLC-Grade** (LGC Promochem, Wesel, Deutschland)

- Methanol, Ethanol, Methansäure, Methyl-tert-butylether (MTBE), Tetrahydrofuran (THF), Chloroform, Heptan, Ethylacetat, Leichtpetroleumether

#### 5. Software

- **Kalorimeter (DSC 1):** STARe Evaluation Software, Version 11.00a
- **HPLC-PDA-MS-Analysesystem:** MassLynx 4.0
- **Statistik:** IBM® SPSS® Statistics, Version 20 und Excel®

1. HPLC-PDA-Analyse

a) Optimierung

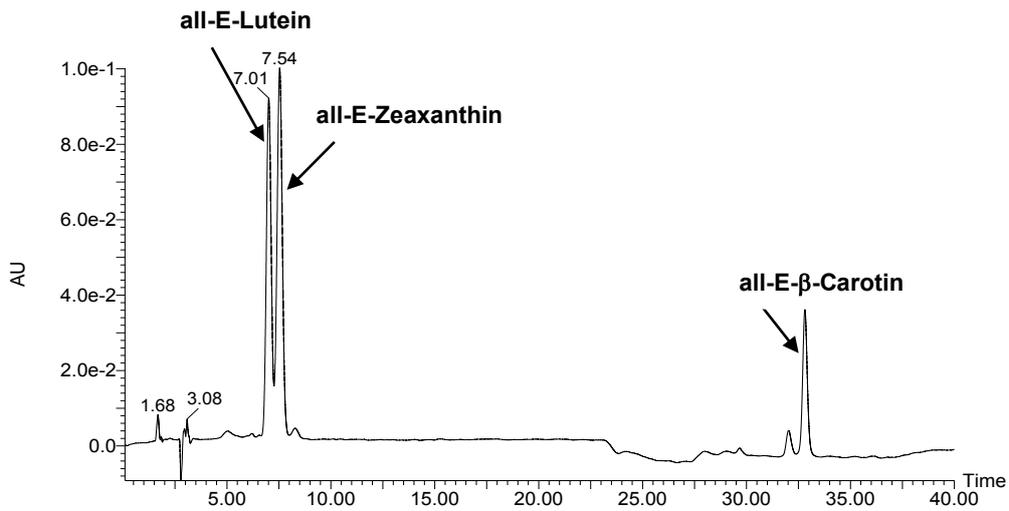


Abb. 1a: Chromatogramm des äquimolaren Standardgemischs aus Lutein, Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin (je 5  $\mu\text{g/mL}$ )

b) Linearität, LOD und LOQ sowie Kalibrierung

Tab. 1b-1: Konzentrationsniveaus bei der Linearitätsüberprüfung

Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Volumen Stammlösung ad Endvolumen [mL]
20,00	1,0 mL ad 5 mL
10,00	0,5 mL ad 5 mL
5,00	0,25 mL ad 5 mL
2,50	0,125 mL ad 5 mL
1,25	0,125 mL ad 10 mL
0,50	0,05 mL ad 10 mL
0,20	0,02 mL ad 10 mL
0,10	0,025 mL ad 25 mL
0,05	0,025 mL ad 50 mL
0,02	0,02 mL ad 100 mL

Tab.1b-2: Kalibrierbereich der HPLC-PDA-Analysemethode

Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Volumen Stammlösung ad Endvolumen [mL]
5,00	0,250 mL ad 5 mL
2,50	0,125 mL ad 5 mL
1,25	0,125 mL ad 10 mL
0,50	0,050 mL ad 10 mL
0,20	0,020 mL ad 10 mL
0,10	0,025 mL ad 25 mL

## 2. Extraktionsmethode

Tab. 2-1: Vergleich der im Nativzustand ermittelten (a) und anhand der Ergebnisse bei Plasma und Granula nach dem gewichteten Mittel errechneten (b) Massenkonzentrationen  $\pm$  Standardabweichung [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ] von Lutein und Zeaxanthin bei Eigelb

Nativzustand	Xanthophyll-Massenkonzentrationen [ $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ]				Differenz aus a und b [%]
	Granula	Plasma	Eigelb (a)	Gewichtetes Mittel Eigelb (b)	
all-E-Lutein	2495,3 $\pm$ 98,7	4177,1 $\pm$ 84,4	3928,4 $\pm$ 39,1	3807,1 $\pm$ 87,6	+3,1
	1706,4 $\pm$ 45,9	2707,4 $\pm$ 27,0	2557,5 $\pm$ 28,2	2487,2 $\pm$ 31,2	+2,8
	2808,6 $\pm$ 88,3	4468,6 $\pm$ 143,4	4112,3 $\pm$ 105,4	4103,4 $\pm$ 131,2	+0,2
	1626,7 $\pm$ 75,1	2537,5 $\pm$ 21,5	2429,1 $\pm$ 1,1	2337,1 $\pm$ 33,3	+3,8
all-E-Zeaxanthin	2098,4 $\pm$ 84,5	3747,8 $\pm$ 78,8	3591,3 $\pm$ 33,7	3384,9 $\pm$ 80,1	+5,8
	999,3 $\pm$ 34,6	1711,3 $\pm$ 19,4	1668,4 $\pm$ 27,6	1554,7 $\pm$ 22,7	+6,8
	1769,8 $\pm$ 45,8	3014,2 $\pm$ 83,5	2842,3 $\pm$ 79,8	2740,4 $\pm$ 75,2	+3,6
	1285,7 $\pm$ 52,0	2155,0 $\pm$ 32,8	2146,8 $\pm$ 4,8	1963,8 $\pm$ 37,0	+8,5
13-Z-Lutein	296,5 $\pm$ 10,3	410,1 $\pm$ 6,6	374,0 $\pm$ 2,2	385,1 $\pm$ 7,4	-3,0
	192,3 $\pm$ 6,3	308,2 $\pm$ 6,9	311,4 $\pm$ 2,8	282,7 $\pm$ 6,8	+9,2
	264,8 $\pm$ 6,3	386,4 $\pm$ 11,4	372,0 $\pm$ 3,3	359,6 $\pm$ 10,2	+3,3
	157,2 $\pm$ 5,3	236,2 $\pm$ 4,4	235,1 $\pm$ 13,1	218,9 $\pm$ 4,6	+6,9
13-Z-Zeaxanthin	393,0 $\pm$ 11,7	709,8 $\pm$ 8,5	579,7 $\pm$ 1,8	640,1 $\pm$ 9,3	-10,4
	195,7 $\pm$ 6,4	323,6 $\pm$ 9,1	318,4 $\pm$ 7,8	295,4 $\pm$ 8,5	+7,2
	341,6 $\pm$ 12,8	635,3 $\pm$ 20,0	532,5 $\pm$ 23,7	570,7 $\pm$ 18,5	-7,2
	272,1 $\pm$ 9,3	440,3 $\pm$ 8,7	424,2 $\pm$ 11,4	403,3 $\pm$ 8,8	+4,9

## 3. Identifizierung von Lutein und Zeaxanthin

### a) Chromatographisches Verhalten

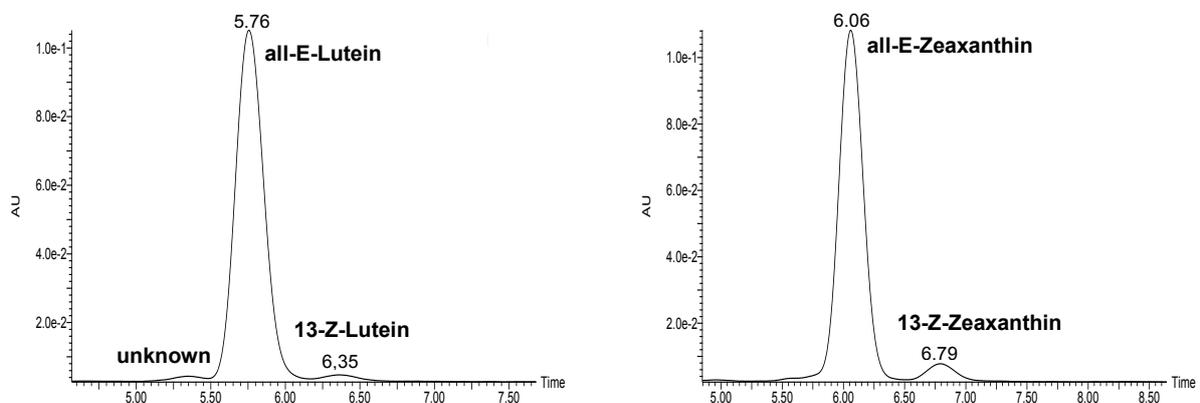


Abb. 3a: Chromatogramme der separaten Standardlösungen (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) von Lutein (links) und Zeaxanthin (rechts)

## b) Massenspektrometrie

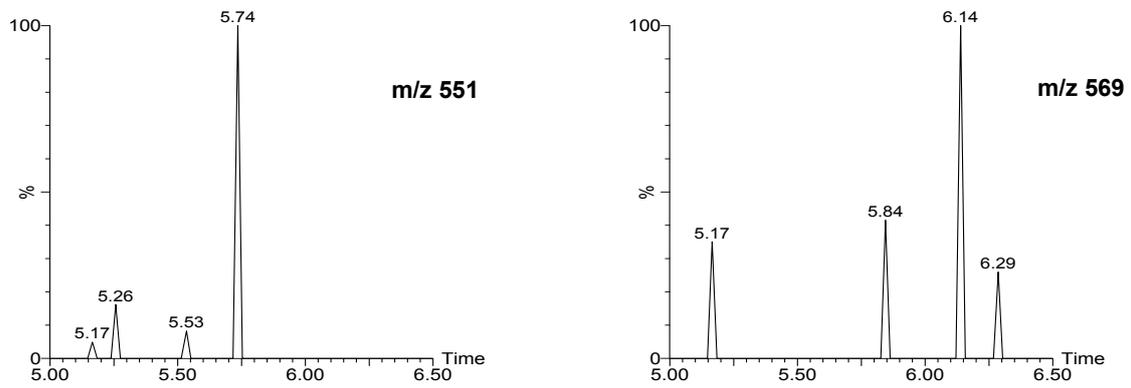


Abb. 3b-1: Standardlösung – Selektion des Fragmentions  $m/z$  551  $[M+H-H_2O]^+$  (links) und des Moleküliions  $m/z$  569  $[M+H]^+$  (rechts) im Elutionsbereich der Lutein-Isomere

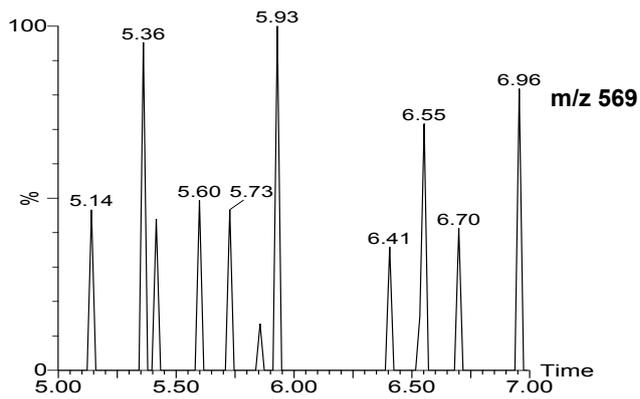


Abb. 3b-2: Standardlösung – Selektion des Moleküliions  $m/z$  569  $[M+H]^+$  im Elutionsbereich der Zeaxanthin-Isomere

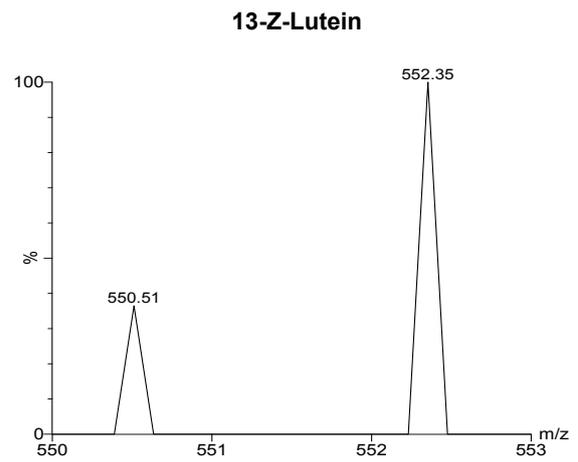
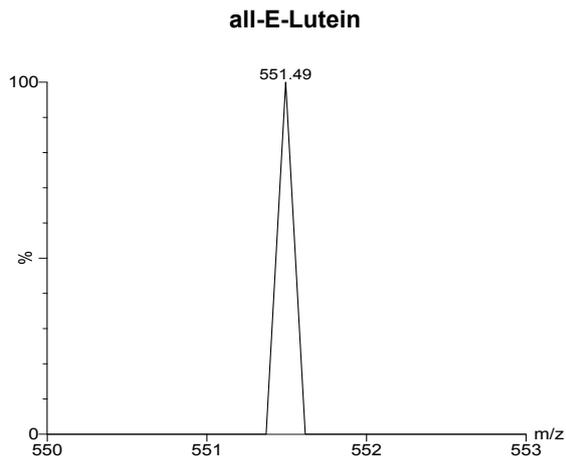


Abb. 3b-3: Eigelb – Selektion des charakteristischen m/z-Bereichs am Peakmaximum von all-E-Lutein (links) und 13-Z-Lutein (rechts) mit corona 3,0 kV und cone 35 V

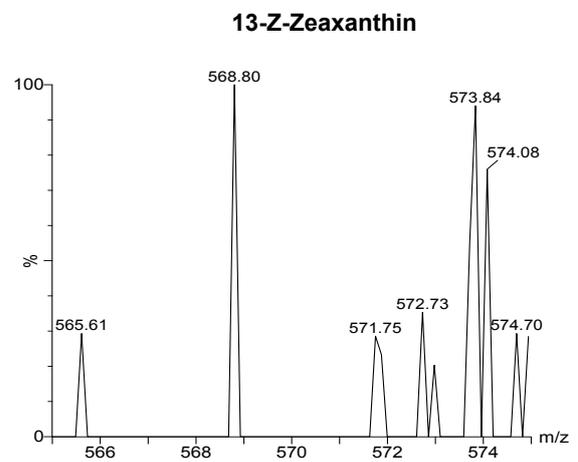
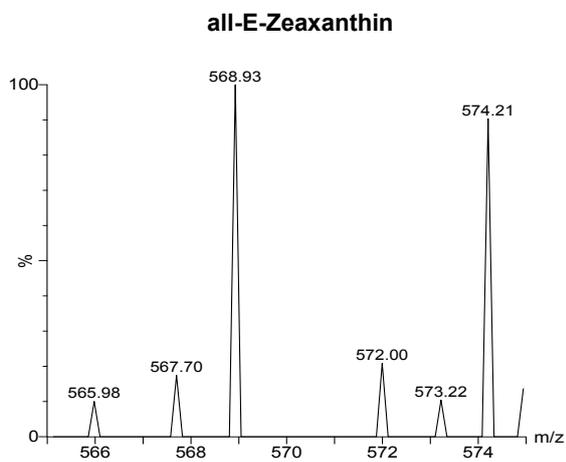


Abb. 3b-4: Eigelb – Selektion des charakteristischen m/z-Bereichs am Peakmaximum von all-E-Zeaxanthin (links) und 13-Z-Zeaxanthin (rechts) mit corona 2,9 kV und cone 30 V

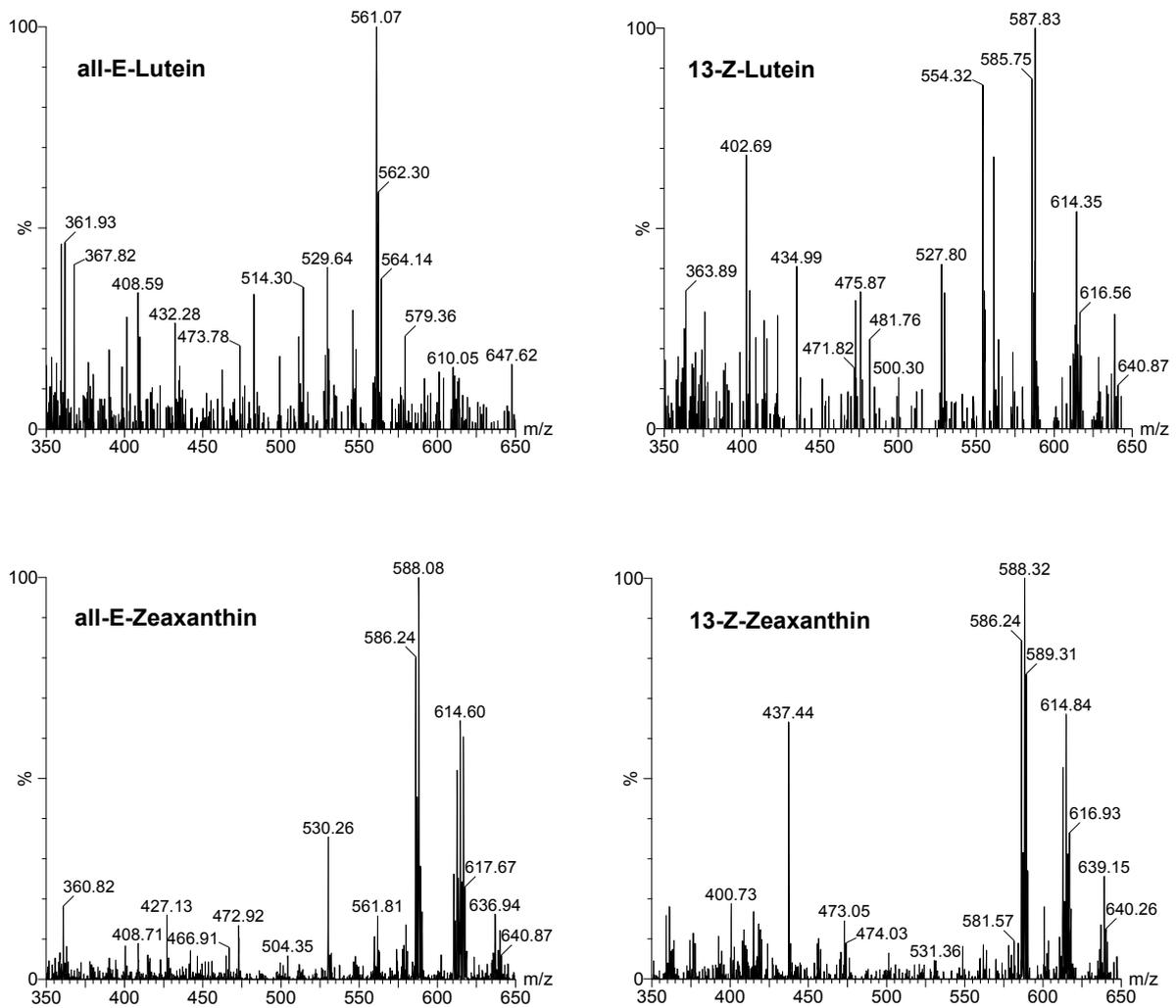


Abb. 3b-5: Eigelb – TIC am Peakmaximum von all-E-Lutein (oben links) und 13-Z-Lutein (oben rechts) und TIC am Peakmaximum von all-E-Zeaxanthin (unten links) und 13-Z-Zeaxanthin (unten rechts)

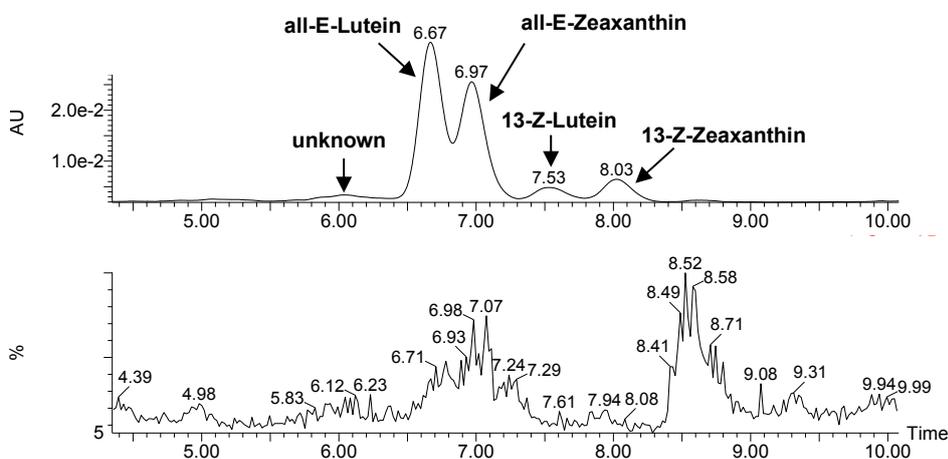


Abb. 3b-6: Eigelb – Chromatogramm (oben) und TIC-Messung (unten; corona 3,0 kV und cone 35 V) XLII

### Anhang 3

## Prozentuale Anteile an 13-Z-Lutein und 13-Z-Zeaxanthin an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration

### 1. Versuchsreihe zum Einfluss der Erhitzung

Tab.: Prozentuale Anteile der 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration in nativen und erhitzten Proben von Granula, Plasma und Eigelb (Charge 1 / Charge 2)

Anteile der 13-Z-Isomere an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration [%]		
Granula	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
<i>Nativ</i>	5,6 / 6,2	7,4 / 6,3
67 °C	5,8 / 6,4	7,7 / 6,5
72 °C	6,1 / 6,7	7,9 / 6,7
77 °C	6,1 / 6,8	8,0 / 6,7
82 °C	6,2 / 7,0	7,8 / 6,8
87 °C	6,6 / 7,5	7,9 / 6,9
Plasma	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
<i>Nativ</i>	4,5 / 6,1	7,9 / 6,4
67 °C	4,7 / 6,3	8,1 / 6,6
72 °C	5,5 / 6,2	8,2 / 6,5
77 °C	4,9 / 6,5	8,2 / 6,7
82 °C	5,6 / 6,7	8,1 / 6,6
87 °C	5,9 / 6,8	8,2 / 6,6
Eigelb	13-Z-Lutein	13-Z-Zeaxanthin
<i>Nativ</i>	4,4 / 6,4	6,8 / 6,6
67 °C	4,6 / 6,6	7,0 / 6,7
72 °C	4,6 / 6,7	7,0 / 6,6
77 °C	4,6 / 6,7	7,0 / 6,7
82 °C	4,7 / 6,9	6,8 / 6,6
87 °C	5,2 / 7,1	7,1 / 6,7

## 2. Versuchsreihe zum Einfluss der Gefriertrocknung

Tab.: Prozentuale Anteile der 13-Z-Isomere von Lutein und Zeaxanthin an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration in nativen und gefriergetrockneten Proben von Granula, Plasma und Eigelb bei Charge 3 und 4

<b>Anteile der 13-Z-Isomere an der Gesamt-Xanthophyll-Massenkonzentration [%]</b>			
<b>Granula</b>		<b>13-Z-Lutein</b>	<b>13-Z-Zeaxanthin</b>
<b>Charge 3</b>	<i>Nativ</i>	5,1	6,6
	<i>Gefriergetrocknet</i>	5,2	6,4
<b>Charge 4</b>	<i>Nativ</i>	4,7	8,1
	<i>Gefriergetrocknet</i>	4,8	7,7
<b>Plasma</b>		<b>13-Z-Lutein</b>	<b>13-Z-Zeaxanthin</b>
<b>Charge 3</b>	<i>Nativ</i>	4,5	7,5
	<i>Gefriergetrocknet</i>	5,1	6,6
<b>Charge 4</b>	<i>Nativ</i>	4,4	8,2
	<i>Gefriergetrocknet</i>	4,7	8,0
<b>Eigelb</b>		<b>13-Z-Lutein</b>	<b>13-Z-Zeaxanthin</b>
<b>Charge 3</b>	<i>Nativ</i>	4,7	6,8
	<i>Gefriergetrocknet</i>	4,9	6,3
<b>Charge 4</b>	<i>Nativ</i>	4,5	8,1
	<i>Gefriergetrocknet</i>	4,5	7,6

**Anhang 4      Statistische Auswertung ( $\alpha = 0,05$ ) der Versuchsreihen  
zum Einfluss der Erhitzung und Gefriertrocknung auf  
die Protein- und Lipoproteinstrukturen und Massenkon-  
zentrationen der Xanthophylle in Granula, Plasma und  
Eigelb**

**Bedingungen**

***Erhitzung***

**Xanthophyll-Massenkonzentrationen**

einfaktorielle univariate ANOVA

$F_{\text{crit}} = 4,39$

***Gefriertrocknung***

**$\Delta H$  und Xanthophyll-Massenkonzentrationen**

einfaktorielle univariate ANOVA

$F_{\text{crit}} = 18,51$

## 1. Erhitzung

<b>Granula</b>	<b>Normierte Gesamtenthalpie <math>\Delta H</math></b>			
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>	<b>Tukey-B</b>
<b>Charge 1</b>	$p = 0,72$	$p > \alpha$ <b>Ausnahme</b> Nativ / 72 °C	$p = 1,97E-05$  $F = 409,70$ ( $F_{crit} = 6,59$ )	<b>Nativ vs. 72 °C</b> <b>Nativ vs. 77 °C</b> <b>67 °C vs. 72 °C</b> <b>67 °C vs. 77 °C</b> <b>72 °C vs. 77 °C</b>
<b>Charge 2</b>	$p = 0,49$	$p > \alpha$ <b>Ausnahme</b> Nativ / 72 °C	$p = 4,04E-06$  $F = 906,36$ ( $F_{crit} = 6,59$ )	<b>Nativ vs. 72 °C</b> <b>Nativ vs. 77 °C</b> <b>67 °C vs. 72 °C</b> <b>67 °C vs. 77 °C</b> <b>72 °C vs. 77 °C</b>
<b>Plasma</b>	<b>Peak 1</b>			
<b>Charge 1</b>	$p = 0,91$	$p > \alpha$	$p = 6,85E-03$  $F = 144,52$ ( $F_{crit} = 18,51$ )	<b>Nativ vs. 67 °C</b>
<b>Charge 2</b>	$p = 0,88$	$p > \alpha$	$p = 1,53E-03$  $F = 653,90$ ( $F_{crit} = 18,51$ )	<b>Nativ vs. 67 °C</b>
<b>Plasma</b>	<b>Peak 2</b>			
<b>Charge 1</b>	$p = 0,54$	$p > \alpha$ <b>Ausnahme</b> 67 °C / 77 °C	$p = 1,29E-02$  $F = 14,54$ ( $F_{crit} = 6,59$ )	<b>Nativ vs. 77 °C</b> <b>67 °C vs. 77 °C</b> <b>72 °C vs. 77 °C</b>
<b>Charge 2</b>	$p = 0,99$	$p > \alpha$ <b>Ausnahme</b> 67 °C / 77 °C	$p = 9,80E-04$  $F = 56,78$ ( $F_{crit} = 6,59$ )	<b>Nativ vs. 77 °C</b> <b>67 °C vs. 72 °C</b> <b>67 °C vs. 77 °C</b> <b>72 °C vs. 77 °C</b>
<b>Eigelb</b>				
<b>Charge 1</b>	$p = 0,37$	$p > \alpha$ <b>Ausnahmen</b> Nativ / 67 °C 67 °C / 72 °C	$p = 2,01E-03$  $F = 92,63$ ( $F_{crit} = 9,55$ )	<b>Nativ vs. 72 °C</b> <b>67 °C vs. 72 °C</b>
<b>Charge 2</b>	$p = 0,82$	$p > \alpha$ <b>Ausnahme</b> Nativ / 72 °C	$p = 8,41E-06$  $F = 628,16$ ( $F_{crit} = 6,59$ )	<b>Nativ vs. 67 °C</b> <b>Nativ vs. 72 °C</b> <b>Nativ vs. 77 °C</b> <b>67 °C vs. 72 °C</b> <b>67 °C vs. 77 °C</b> <b>72 °C vs. 77 °C</b>

<b>Granula</b>	<b>all-E-Lutein</b>			
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>	<b>Tukey-B</b>
<b>Charge 1</b>	p = 0,96	p > $\alpha$	p = 4,96E-03 F = 11,50	Nativ vs. 82 °C <b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 72 °C vs. 87 °C 77 °C vs. 87 °C
<b>Charge 2</b>	p = 0,54	p > $\alpha$ <b>Ausnahme</b> 77 °C / 82 °C	p = 2,58E-02 F = 5,91	<b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 82 °C vs. 87 °C
<b>Plasma</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,92	p > $\alpha$	p = 0,16 F = 2,38	/
<b>Charge 2</b>	p = 0,99	p > $\alpha$	p = 0,24 F = 1,86	/
<b>Eigelb</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,61	p > $\alpha$ <b>Ausnahmen</b> Nativ / 77 °C 72 °C / 77 °C 77 °C / 82 °C 77 °C / 87 °C	p = 3,53E-03 F = 13,09	Nativ vs. 82 °C <b>Nativ vs. 87 °C</b> 67 °C vs. 82 °C <b>67 °C vs. 87 °C</b> 77 °C vs. 82 °C <b>77 °C vs. 87 °C</b>
<b>Charge 2</b>	p = 0,93	p > $\alpha$	p = 4,74E-03 F = 11,70	<b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 72 °C vs. 87 °C <b>77 °C vs. 87 °C</b>

<b>Granula</b>	<b>all-E-Zeaxanthin</b>			
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>	<b>Tukey-B</b>
<b>Charge 1</b>	p = 0,99	p > $\alpha$	p = 1,28E-02 F = 7,92	<b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 77 °C vs. 87 °C
<b>Charge 2</b>	p = 0,80	p > $\alpha$ <b>Ausnahme</b> 77 °C / 82 °C	p = 3,15E-02 F = 5,41	<b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 82 °C vs. 87 °C
<b>Plasma</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,96	p > $\alpha$ <b>Ausnahme</b> 82 °C / 87 °C	p = 0,10 F = 3,10	/
<b>Charge 2</b>	p = 0,78	p > $\alpha$ <b>Ausnahme</b> 72 °C / 77 °C	p = 0,21 F = 1,99	/
<b>Eigelb</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,85	p > $\alpha$ <b>Ausnahmen</b> Nativ / 77 °C 72 °C / 77 °C 77 °C / 82 °C 77 °C / 87 °C	p = 1,05E-02 F = 8,59	Nativ vs. 82 °C <b>Nativ vs. 87 °C</b> 67 °C vs. 82 °C <b>67 °C vs. 87 °C</b>
<b>Charge 2</b>	p = 0,94	p > $\alpha$	p = 1,28E-02 F = 7,93	<b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 72 °C vs. 87 °C

<b>Granula</b>	<b>13-Z-Lutein</b>			
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>	<b>Tukey-B</b>
<b>Charge 1</b>	p = 0,99	p > $\alpha$ <b>Ausnahmen</b> Nativ / 72 °C Nativ / 87 °C	p = 5,46E-05  F = 57,57	Nativ vs. 67 °C Nativ vs. 72 °C <b>Nativ vs. 77 °C</b> <b>Nativ vs. 82 °C</b> <b>Nativ vs. 87 °C</b> 67 °C vs. 72 °C 67 °C vs. 77 °C <b>67 °C vs. 82 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 72 °C vs. 77 °C <b>72 °C vs. 87 °C</b> 82 °C vs. 87 °C
<b>Charge 2</b>	p = 1,00	p > $\alpha$	p = 1,94E-03  F = 16,35	<b>Nativ vs. 77 °C</b> <b>Nativ vs. 82 °C</b> <b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 82 °C</b> <b>67 °C vs. 87 °C</b> 72 °C vs. 82 °C <b>72 °C vs. 87 °C</b>
<b>Plasma</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,68	p > $\alpha$ <b>Ausnahmen</b> Nativ / 67 °C Nativ / 82 °C 67 °C / 72 °C 67 °C / 77 °C 67 °C / 87 °C 72 °C / 82 °C 77 °C / 82 °C 82 °C / 87 °C	p = 5,65E-06  F = 124,46	Nativ vs. 72 °C Nativ vs. 77 °C <b>Nativ vs. 82 °C</b> <b>Nativ vs. 87 °C</b> 67 °C vs. 72 °C <b>67 °C vs. 82 °C</b> 67 °C vs. 87 °C 72 °C vs. 77 °C <b>72 °C vs. 82 °C</b> 72 °C vs. 87 °C 77 °C vs. 82 °C 77 °C vs. 87 °C
<b>Charge 2</b>	p = 0,99	p > $\alpha$	p = 6,17E-03  F = 10,57	<b>Nativ vs. 82 °C</b> <b>Nativ vs. 87 °C</b> <b>67 °C vs. 82 °C</b> <b>72 °C vs. 82 °C</b>
<b>Eigelb</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,92	p > $\alpha$ <b>Ausnahme</b> 67 °C / 82 °C	p = 4,61E-02  F = 4,56	Nativ vs. 87 °C
<b>Charge 2</b>	p = 0,63	p > $\alpha$	p = 0,69  F = 0,63	/

<b>Granula</b>	<b>13-Z-Zeaxanthin</b>			
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>	<b>Tukey-B</b>
<b>Charge 1</b>	p = 0,87	p > $\alpha$ <b>Ausnahme</b> 77 °C / 87 °C	p = 4,29E-04 F = 28,13	Nativ vs. 67 °C Nativ vs. 72 °C Nativ vs. 77 °C 67 °C vs. 77 °C 72 °C vs. 77 °C 72 °C vs. 82 °C 72 °C vs. 87 °C 77 °C vs. 82 °C 77 °C vs. 87 °C
<b>Charge 2</b>	p = 0,67	p > $\alpha$	p = 8,52E-02 F = 3,38	/
<b>Plasma</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,98	p > $\alpha$	p = 3,68E-02 F = 5,05	Nativ vs. 82 °C
<b>Charge 2</b>	p = 0,86	p > $\alpha$	p = 7,98E-02 F = 3,49	/
<b>Eigelb</b>				
<b>Charge 1</b>	p = 0,67	p > $\alpha$ <b>Ausnahmen</b> Nativ / 82 °C 67 °C / 82 °C	p = 8,36E-02 F = 3,41	/
<b>Charge 2</b>	p = 0,89	p > $\alpha$ <b>Ausnahmen</b> Nativ / 77 °C 67 °C / 77 °C 77 °C / 82 °C 77 °C / 87 °C	p = 0,11 F = 3,03	/

## 2. Gefriertrocknung

### Rehydrierte Proben

<b>Granula</b>	<b>Normierte Gesamtenthalpie <math>\Delta H</math></b>		
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>
<b>Charge 3</b>	$p = 1,00$	$p > \alpha$	$p = 0,55$ $F = 0,52$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,54$	$p > \alpha$	$p = 0,43$ $F = 0,99$
<b>Plasma</b>	<b>Peak 1</b>		
<b>Charge 3</b>	$p = 0,89$	$p > \alpha$	$p = 3,68E-03$ $F = 270,37$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,74$	$p > \alpha$	$p = 0,40$ $F = 1,12$
<b>Plasma</b>	<b>Peak 2</b>		
<b>Charge 3</b>	$p = 0,70$	$p > \alpha$	$p = 0,50$ $F = 0,68$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,66$	$p > \alpha$	$p = 0,49$ $F = 0,72$
<b>Eigelb</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 1,00$	$p > \alpha$	$p = 0,15$ $F = 5,41$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,99$	$p > \alpha$	$p = 0,19$ $F = 3,77$

**Gefriergetrocknete Proben**

<b>Granula</b>	<b>all-E-Lutein</b>		
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>
<b>Charge 3</b>	$p = 0,94$	$p > \alpha$	$p = 1,34E-02$ $F = 73,20$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,89$	$p > \alpha$	$p = 3,97E-02$ $F = 23,72$
<b>Plasma</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 0,93$	$p > \alpha$	$p = 3,70E-02$ $F = 25,53$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,88$	$p > \alpha$	$p = 9,73E-03$ $F = 101,32$
<b>Eigelb</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 1,00$	$p > \alpha$	$p = 0,21$ $F = 3,25$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,86$	$p < \alpha$ <b>Keine Varianzhomogenität</b>	$p = 9,27E-03$ $F = 106,36$

<b>Granula</b>	<b>all-E-Zeaxanthin</b>		
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>
<b>Charge 3</b>	$p = 0,89$	$p > \alpha$	$p = 1,40E-02$ $F = 70,02$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,87$	$p < \alpha$ <b>Keine Varianzhomogenität</b>	$p = 2,52E-02$ $F = 38,21$
<b>Plasma</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 0,93$	$p > \alpha$	$p = 1,02E-02$ $F = 96,65$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,88$	$p > \alpha$	$p = 4,99E-03$ $F = 199,08$
<b>Eigelb</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 0,95$	$p > \alpha$	$p = 0,25$ $F = 2,59$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,90$	$p > \alpha$	$p = 2,61E-02$ $F = 36,81$

<b>Granula</b>	<b>13-Z-Lutein</b>		
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>
<b>Charge 3</b>	$p = 0,87$	$p > \alpha$	$p = 5,38E-03$ $F = 184,34$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,90$	$p > \alpha$	$p = 1,29E-02$ $F = 75,75$
<b>Plasma</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 0,92$	$p > \alpha$	$p = 8,08E-03$ $F = 122,25$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,85$	$p < \alpha$ <b>Keine Varianzhomogenität</b>	$p = 1,49E-04$ $F = 6720,67$
<b>Eigelb</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 0,85$	$p > \alpha$	$p = 0,34$ $F = 1,54$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,76$	$p > \alpha$	$p = 0,29$ $F = 2,07$

<b>Granula</b>	<b>13-Z-Zeaxanthin</b>		
	<b>Kolmogorov-Smirnov-Test</b>	<b>Zweistichproben-F-Test</b>	<b>einfaktorielle univariate ANOVA</b>
<b>Charge 3</b>	$p = 0,88$	$p > \alpha$	$p = 1,27E-02$ $F = 77,28$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,89$	$p < \alpha$ <b>Keine Varianzhomogenität</b>	$p = 4,32E-02$ $F = 21,64$
<b>Plasma</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 0,98$	$p > \alpha$	$p = 0,27$ $F = 2,33$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,90$	$p > \alpha$	$p = 6,57E-03$ $F = 150,78$
<b>Eigelb</b>			
<b>Charge 3</b>	$p = 0,95$	$p > \alpha$	$p = 8,06E-02$ $F = 10,93$
<b>Charge 4</b>	$p = 0,92$	$p > \alpha$	$p = 2,83E-02$ $F = 33,85$



ISSN 0931-6264