

# **Analytik technofunktionaler Eigenschaften von Eigelb mit Schwerpunkt auf den Phospho- bzw. Phosphonolipiden**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

THOMAS JAEKEL

geboren am 20.12.1977, in Jena

Referent: Herr Prof. Dr. Waldemar Ternes  
Korreferentin: Frau Prof. Dr. Carla Vogt  
Tag der Promotion: 11.06.2010

## Zusammenfassung

Die thermische Gelbildung des Eigelbs ist eine technologische Schlüsselfunktion und konnte aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Eigelbs bisher nur unzureichend erforscht werden. Ein neuer Ansatz sollte das Zusammenwirken von Proteinen (insbesondere der Lipoproteine geringer Dichte) und Phospholipiden bei der thermischen Gelbildung näher charakterisieren. Dafür wurden die Phospholipide des Eigelbs enzymatisch mit Phospholipasen modifiziert und die chemischen und rheologischen Veränderungen untersucht. Die enzymatische Behandlung bewirkte einen starken Anstieg des Gehalts an Lysophosphatidylcholin (LPC) von ca. 0,3 auf 5,7 g/100 g Eigelb i. Tr. und eine signifikante Verschiebung des ersten Viskositätsmaximums von ca. 79 auf 97 °C. Es wird daher angenommen, dass LPC, als starker hydrophiler Emulgator, die hydrophoben Bereiche der LDL-Mizellen vor Wechselwirkungen mit den Livetinen schützen kann.

Eine bisher nur unzureichend untersuchte Klasse der polaren Lipide ist die der Glycerophosphonolipide. Über die genaue biologische Funktion oder einen möglichen technologischen Nutzen ist bisher nur wenig bekannt. Da jedoch die Anwesenheit von Glycerophosphonolipiden auch für Eigelb beschrieben wurde, sind weitere Studien erforderlich. Die Analytik der Glycerophosphonolipide gestaltet sich äußerst schwierig, da zum einen Referenzsubstanzen nicht kommerziell erhältlich sind und zum anderen eine starke chemische Ähnlichkeit zu den in biologischen Matrices in erheblich höheren Gehalten vorkommenden Phospholipiden besteht. Durch Synthese von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat als Referenzsubstanz für Phospho-no-Analoga von Phosphatidylethanolamin (PnE) konnte schließlich eine HPLC/ELSD-Methode zur Trennung von Phosphatidylethanolamin und dessen Phosphono-Analogen entwickelt werden. Weiterhin wurde ein charakteristisches Fragmentierungsmuster für PnE mittels ESI-MS<sup>2</sup> erstellt, wodurch eine massen-spektrometrische Identifizierung auch in anderen biologischen Systemen möglich ist. Im negativem Modus dominierten Fragmente, welche auf die Abspaltung einer Fettsäure  $[M - H - RCH_2OOH]^-$  und einer Fettsäure als inneres Anhydrid (Keten)  $[M - H - RCH=C=O]^-$  zurückzuführen sind. Im positiven Modus zeigte sich die selektive Abspaltung der Kopfgruppe  $[PO_3H_2-C_2H_4-NH_3]^+$  durch den charakteristischen Massenpeak des sogenannten „Diacylglycerol-like-fragment-ions“  $[DAG]^+$ .

## Schlagworte

Eigelb, technofunktionelle Eigenschaften, Phosphonolipide

## Abstract

Thermal gelation is a key function concerning the functional properties of egg yolk. But it is due to the complex composition of egg yolk rather difficult to characterize. Therefore, a new approach for a better understanding of the interactions between plasma proteins and phospholipids was made. Modifying yolk phospholipids to lysophospholipids by incubation with phospholipases revealed specific effects for the temperature-dependent behavior of the apparent viscosity (shear rate:  $26 \text{ s}^{-1}$ ), offering a way to enhance understanding of the mechanism of heat-induced gelation. On the one hand fermentation of native egg yolk with phospholipases led to a dramatic increase in the amount of lysophosphatidylcholine (LPC) from approximately 0.3 to 5.7 g/ 100 g (dried matter) and on the other hand to a significant shift of the first viscosity maximum from 79 to 97 °C, indicating that LPC as a strong hydrophilic emulsifier is able to shield the hydrophobic areas at the surface of the LDL micelles.

Glycerophosphonolipids are a rather unknown class among the polar lipids. Only few information is available on a special biological function or the possibility of a specific technological use. But since the presence of glycerophosphonolipids in egg yolk was described earlier, further studies are necessary. Analysis of those lipids is rather difficult due to the lack of commercially available reference substances and the chemical similarity to phospholipids. Therefore, 1,2-dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethyl-phosphonate as reference substance for phosphono-analogs of phosphatidylethanolamine (PnE) has been synthesized. With this a HPLC/ELSD method could be developed to separate phosphatidylethanolamine from its phosphono-analogue. Furthermore, a characteristic ESI-MS<sup>2</sup> fragmentation pattern for PnE was established, which can be used as an identifying “fingerprint” for the analysis of phosphonoethanolamine in other biological systems. In the negative mode the loss of a fatty acid fragment as an internal anhydride (ketene)  $[M - H - RCH=C=O]^-$  and of the whole fatty acid fragment  $[M - H - RCH_2OOH]^-$  was found to be characteristic. In the positive mode the so-called “Diacylglycerol-like-fragment-ion”  $[DAG]^+$  has been observed, which is a result of the loss of the phosphonolipid’s head group  $[PO_3H_2-C_2H_4-NH_3]^+$ .

## Keywords

egg yolk, functional properties, phosphonolipids

THOMAS JAEKEL

**Analytik technofunktioneller Eigenschaften von Eigelb mit  
Schwerpunkt auf den Phospho- bzw. Phosphonolipiden**

*Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Verzeichnis der Formelzeichen und Abkürzungen .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Inhaltsstoffe des Eigelbs</i>.....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Proteine der Granula .....	12
2.1.2	Proteine des Plasmas.....	13
2.1.3	Lipide des Eigelbs.....	14
2.1.4	Andere Inhaltsstoffe.....	15
<b>2.2</b>	<b><i>Technofunktionelle Eigenschaften von Eigelb</i> .....</b>	<b>16</b>
2.2.1	Schaumbildungsvermögen.....	16
2.2.2	Bindende Eigenschaften .....	16
2.2.3	Emulgierende Eigenschaften .....	17
<b>2.3</b>	<b><i>Eiprodukte</i>.....</b>	<b>18</b>
2.3.1	Pasteurisation von Eigelb .....	18
2.3.2	Sprühtrocknung.....	19
2.3.3	Konventionelles Tiefgefrieren.....	19
2.3.4	Gefriertrocknung.....	20
2.3.5	Enzymatische Behandlung mit Phospholipasen .....	22
<b>2.4</b>	<b><i>Analytik der technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb</i> .....</b>	<b>23</b>
2.4.1	Überblick .....	23
2.4.2	Analytische Fragestellung und Methodenauswahl .....	31
<b>2.5</b>	<b><i>Analytik der Phospho- und Phosphonolipide</i>.....</b>	<b>33</b>
2.5.1	Überblick .....	33
2.5.2	Analytische Fragestellung und Methodenauswahl .....	45
2.5.3	Probenvorbereitung.....	47
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Allgemeine Angaben</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Statistische Auswertung der Ergebnisse</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Probenaufarbeitung</i>.....</b>	<b>50</b>
3.3.1	Eigelb-Proben .....	50
3.3.2	Kaltextraktion .....	50
3.3.3	Festphasenextraktion zur Fraktionierung des Eigelblipid-Extraktes .....	50
3.3.4	Enzymatische Behandlung von Eigelb mit Phospholipasen.....	51
<b>3.4</b>	<b><i>Analytische Methoden</i> .....</b>	<b>52</b>
3.4.1	Rheologische Messungen .....	52
3.4.2	Penetrometrische Messungen .....	53
3.4.3	DC.....	53
3.4.4	HPLC/ELSD .....	54
3.4.5	LC-MS <sup>2</sup> .....	55
3.4.6	ATR/FT-IR .....	57
<b>3.5</b>	<b><i>Synthese von PnE</i> .....</b>	<b>58</b>
3.5.1	Synthese von N-Benzylloxycarbonylaminoethylphosphonat .....	58

3.5.2	Synthese von PnE .....	59
3.5.3	Aufreinigung von PnE mittels SPE .....	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Nachweis technofunktioneller Eigenschaften von Eigelb .....</i></b>	<b>60</b>
4.1.1	Bestimmung des Relativen Viskositätsmaximums .....	60
4.1.2	Bestimmung des Fließverhaltens mittels Rheologie .....	63
4.1.3	Bestimmung der Gelstabilität mittels Penetrometrie .....	65
<b>4.2</b>	<b><i>Modifizierung der Phospholipide mit Phospholipasen .....</i></b>	<b>69</b>
4.2.1	Charakterisierung der thermoinduzierten Gelbildung von Eigelb .....	69
4.2.2	Analytik der Phospholipide mittels HPLC/ELSD .....	76
<b>4.3</b>	<b><i>Bestimmung von Phosphonolipiden im Eigelb .....</i></b>	<b>78</b>
4.3.1	Synthese von PnE .....	78
4.3.2	Aufreinigung von PnE mittels SPE .....	79
4.3.3	ESI-MS <sup>2</sup> Fragmentierungsmuster .....	80
4.3.4	Charakterisierung von PnE mittels ATR/FT-IR .....	87
4.3.5	Analytik der Phosphonolipide mittels DC .....	89
4.3.6	Analytik der Eigelb-Phospholipide mittels DC .....	91
4.3.7	Analytik der Phosphonolipide mittels HPLC/ELSD .....	93
4.3.8	Analytik der Eigelb-Phospholipide mittels HPLC/ELSD .....	95
4.3.9	Analytik der Eigelb-Phospholipide mittels LC-MS <sup>2</sup> .....	96
4.3.10	Charakterisierung der unbekannt Substanz mittels ESI-MS <sup>3</sup> .....	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>124</b>
<b>8.1</b>	<b><i>Statistik.....</i></b>	<b>124</b>
8.1.1	Quantitative Bestimmung der Phospholipide .....	124
8.1.2	Test auf Linearität .....	125
8.1.3	Rf-Werte nach der DC-Methode von Kapoulas (1969).....	126
8.1.4	Verfahrenskenngrößen für die HPLC/ELSD-Methode von PnE.....	127
<b>8.2</b>	<b><i>Wissenschaftlicher Werdegang .....</i></b>	<b>130</b>
<b>8.3</b>	<b><i>Abbildungsverzeichnis.....</i></b>	<b>132</b>
<b>8.4</b>	<b><i>Tabellenverzeichnis .....</i></b>	<b>135</b>

# 1 Verzeichnis der Formelzeichen und Abkürzungen

$\infty$	unendlich
a	Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden
ANOVA	<u>A</u> nalysis <u>O</u> f <u>V</u> ariance; Varianzanalyse
ATR	<u>A</u> bgeschwächte <u>T</u> otal- <u>R</u> eflexion
b	Regressionskoeffizient der Kalibriergeraden
EI	<u>E</u> lektronen- <u>I</u> onisation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELSD	<u>E</u> vaporative <u>L</u> ight <u>S</u> cattering <u>D</u> etector; Lichtstredetektor
ESI	<u>E</u> lektro- <u>S</u> pray <u>I</u> onisierung
$\eta$	Dynamische Viskosität
c	Korrekturglied für den Bartlett-Test
$c_1, c_2$	Materialkonstanten
CID	<u>C</u> ollision- <u>I</u> nduced <u>D</u> issociation; Fragmentierung
Cs	Cäsium
DAG	Diacylglycerol
[DAG]	“Diacylglycerol-like-fragment-ion”
DC	<u>D</u> ünnschicht- <u>C</u> hromatographie
$\delta$	Phasenverschiebung
DHB	2,5-Dihydroxybezoessäure
DLS	<u>D</u> ynamische <u>L</u> icht- <u>S</u> treuung
DOG	Diocadecanoylglycerol
$E_0$	Aktivierungsenergie
FAB	<u>F</u> ast <u>A</u> tom <u>B</u> ombardment-Ionisierung
FAME	Fettsäuremethylester
FFE	<u>F</u> lüssig- <u>F</u> lüssig- <u>E</u> xtraktion
$f_i$	Freiheitsgrad bei der Wiederholmessung
FID	<u>F</u> lammen- <u>I</u> onisations- <u>D</u> etektor
FT-IR	<u>F</u> ourier- <u>T</u> ransform- <u>I</u> nfrarotspektroskopie
$G'$	Speichermodul
$G''$	Verlustmodul
$\dot{\gamma}$	Scherrate
GC	<u>G</u> as- <u>C</u> hromatographie
gg	gefriergetrocknet
HPLC	<u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography; Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPTLC	<u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>T</u> hin- <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography; Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
IEF	<u>I</u> so- <u>E</u> lektrische <u>F</u> okussierung
IR	<u>I</u> nfra- <u>R</u> ot Spektroskopie
k	Anzahl der Kalibrierkonzentrationen
K	Konsistenzfaktor
kJ	Kilojoule
kDa	Kilodalton
LC	<u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography; Flüssigchromatographie
Li	Lithium



MALDI	<u>M</u> atrix- <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption <u>I</u> onisierung
MS	<u>M</u> assen- <u>S</u> pektrometrie
n	Anzahl Wiederholmessungen
<i>n</i>	Fließindex
N	Anzahl der Kalibrierproben
P	statistische Sicherheit
PNA	p-Nitroanilin
NMR	<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance; Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NP	<u>N</u> ormal- <u>P</u> hase
past.	pasteurisiert
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PW <sub>Ba</sub>	Prüfwert für den Bartlett-Test
PnE	1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat
Rf-Wert	Retentionsfaktor
R <sub>G</sub>	Gaskonstante
RI	Refraktionsindex-Detektor
RP	<u>R</u> everse <u>P</u> hase; Umkehrphase
s	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
S <sub>G</sub>	Gesamtstandardabweichung
SM	Sphingomyelin
SPE	<u>S</u> olid <u>P</u> hase <u>E</u> xtraction; Festphasenextraktion
S <sub>x0</sub>	Verfahrensstandardabweichung
S <sub>y</sub>	Reststandardabweichung
τ	Schubspannung
τ <sub>0</sub>	Fließgrenze
T	Temperatur
t <sub>0,95</sub>	t-Faktor für Vertrauensbereich mit P = 0,95
TEM	<u>T</u> ransmission- <u>E</u> lektronen- <u>M</u> ikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilan
TPS-Cl	Triisopropylbenzolsulfonylchlorid
UV	<u>U</u> ltra- <u>V</u> iolett-Detektor
V <sub>x0</sub>	Relative Verfahrensstandardabweichung
X <sub>BG</sub>	Bestimmungsgrenze
X <sub>EG</sub>	Erfassungsgrenze
X <sub>i</sub>	Kalibrierkonzentration
X <sub>NG</sub>	Nachweisgrenze
RVM	<u>R</u> elatives <u>V</u> iskositäts- <u>M</u> aximum
y <sub>i</sub>	gemessene Peakfläche je Kalibrierkonzentration
Y <sub>i</sub>	berechneter Messwert

## 2 Einleitung

Hühnereier sind für die menschliche Ernährung von großer Bedeutung. Sie enthalten zum einen eine Reihe von hochwertigen Nährstoffen, in konzentrierter und leicht resorbierbarer Form, und finden zum anderen im Haushalt und in der Lebensmittelindustrie vielfach Verwendung. Der technologische Nutzen von Eigelb beruht im Prinzip auf drei technofunktionellen Eigenschaften: Emulsions- und Schaumbildungsvermögen sowie thermische Gelbildung. Darüber hinaus spielen noch die Farbe und das Aroma eine wichtige Rolle. Laut dem Statistischen Amt der Europäischen Gemeinschaften (Eurostat) hat sich der Umsatz an Eigelbprodukten in Deutschland in den letzten Jahren kontinuierlich erhöht: von 114 Millionen Euro (2005), über 155 Millionen (2006), auf 189 Millionen Euro (2007). Demnach ist der allgemeine Trend hin zum Fertiggericht ungebremst. Hierfür werden jedoch haltbare und mikrobiologisch sichere Zutaten benötigt, welche sich in ihrer technologischen Funktionalität von frischen Zutaten möglichst kaum unterscheiden.

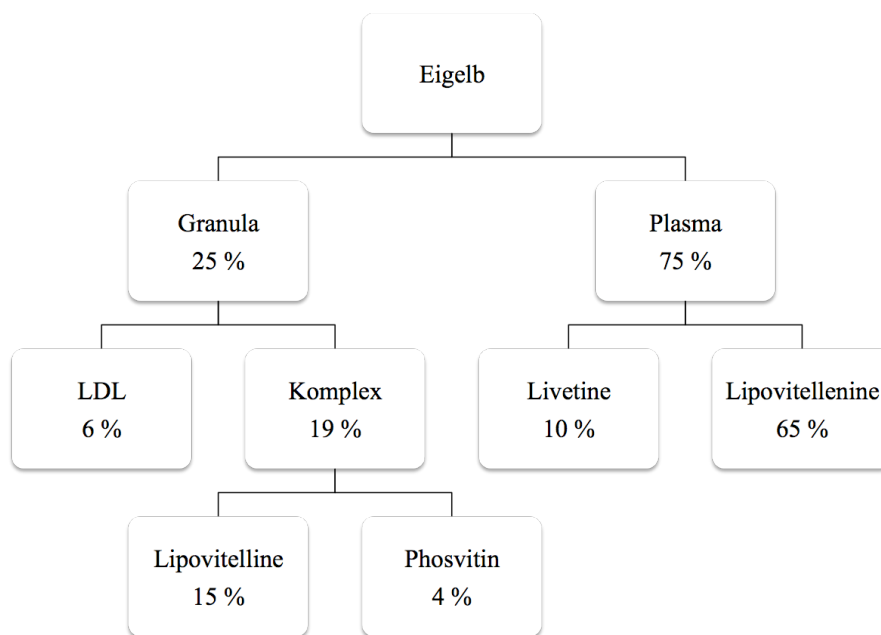
Eigelb wird bisher überwiegend mittels Sprühtrocknung haltbar gemacht. Dem Vorteil geringer Kosten stehen jedoch auch deutliche Verluste hinsichtlich der technofunktionellen Eigenschaften gegenüber. Durch die dramatische Vergrößerung der Oberfläche und der thermischen Belastung bei Temperaturen zwischen 50 und 60 °C ist eine beginnende Denaturierung der Eigelbproteine unvermeidlich (Belitz et al., 2001). Darüber hinaus kommt es zur Bildung von Fehlparomen, welche die Einsatzmöglichkeiten von sprühgetrocknetem Eigelb weiter einschränken. Einen Ausweg hierfür bietet die Gefriertrocknung. Durch die Entwicklung eines neuen Verfahrens konnten die Probleme hinsichtlich der gefrierinduzierten Gelbildung weitestgehend gelöst werden (Jaekel et al., 2008).

Die analytische Erfassung der technofunktionellen Eigenschaften erfolgte dabei mittels rheologischer und penetrometrischer Methoden. Einen Schwerpunkt stellte hierbei die nähere Erforschung der thermischen Gelbildung von Eigelb dar. Zum einen wurde mit dem Relativen Viskositätsmaximum ein neuer Parameter zur Beurteilung der technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb eingeführt; zum anderen wurden die komplexen Zusammenhänge bei der thermischen Gelbildung durch Modifizierung der Phospholipide des Eigelbs mit Phospholipasen näher untersucht. Die Veränderungen innerhalb der Klasse der Phospholipide wurden dabei mittels HPLC/ELSD be-

stimmt. In diesem Zusammenhang wurde auch die Frage nach den Phosphonolipiden im Eigelb aufgeworfen. Über Vorkommen und Funktion dieser Substanzklasse gibt es bisher nur unzureichende Informationen, da aufgrund fehlender Referenzsubstanzen die Analytik der Phosphonolipide nur unter Schwierigkeiten möglich ist. Am Beispiel eines selbst synthetisierten Phosphono-Analogen von Phosphatidylethanolamin sollten schließlich die Phosphonolipide des Eigelbs der Analytik zugänglich gemacht werden. Zur Anwendung kamen dabei neben chromatographischen Techniken wie DC und HPLC/ELSD auch spektroskopische (ATR/FT-IR) und massenspektrometrische Methoden (LC/MS<sup>2</sup>).

## 2.1 Inhaltsstoffe des Eigelbs

Eigelb ist eine komplex zusammengesetzte flüssige Suspension, welche durch Zentrifugation in verschiedene Fraktionen unterteilt werden kann. Der Bodensatz enthält die wasserunlöslichen Bestandteile des Eigelbs und wird als Granula bezeichnet, während der Überstand die wasserlöslichen Bestandteile enthält und als Plasma bezeichnet wird. (Abb. 2-1).



**Abb. 2-1:** Fraktionierung von Eigelb mittels Zentrifugation und Chromatographie

Die Trockenmasse des Eigelbs beträgt ca. 50 % und besteht zu etwa zwei Drittel aus Lipiden und zu einem Drittel aus Proteinen.

### 2.1.1 Proteine der Granula

Wie in Abb. 2-1 ersichtlich, lassen sich die Proteine der Granula in drei Fraktionen unterteilen: Lipovitelline, Phosvitin und LDL (Low Density Lipoproteins), wobei Phosvitin und Lipovitelline jedoch einen stabilen Komplex (Verhältnis 2:1) bilden und nur chromatographisch getrennt werden können.

Bei den Lipovitellinen handelt es sich um Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoproteins, HDL) mit einem Lipidanteil von 22 % i. Tr. (vorwiegend Phospholipide). Die Lipovitelline können in zwei Untereinheiten, das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lipovitellin, unterteilt werden, die sich vor allem in ihrem Phosphorgehalt unterscheiden. Außerdem zeichnen sich die Lipovitelline durch eine hohe Hitzestabilität aus. Werden den Lipovitellinen jedoch die Lipidkomponenten entzogen, so weist das erhaltene Apolipoprotein eine deutlich höhere Hitzeempfindlichkeit auf. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Lipide einen wichtigen Beitrag zur Struktur und damit zur Hitzestabilität der Lipovitelline leisten (Belitz et al., 2001).

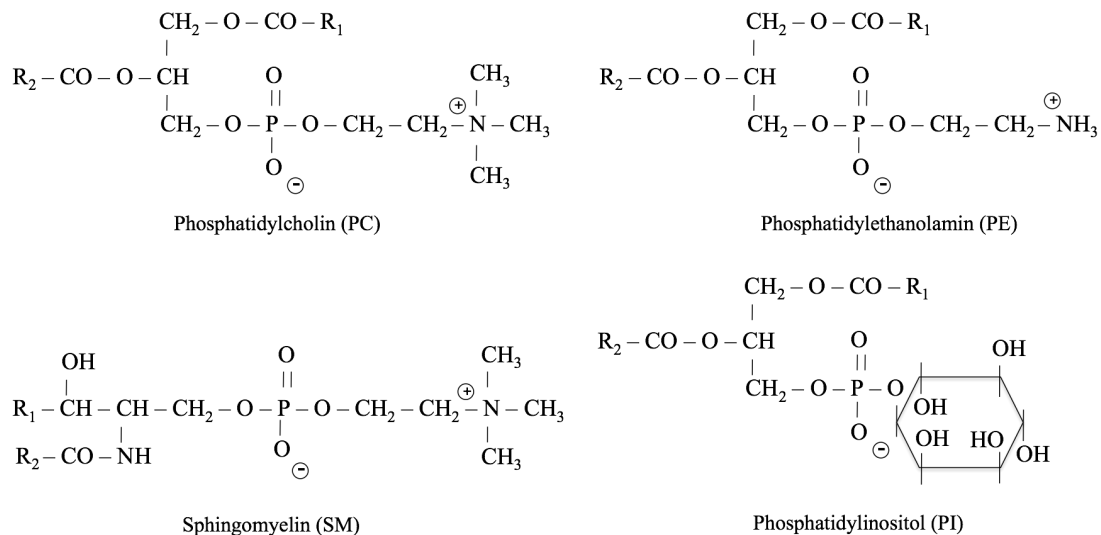
Das Phosvitin ist ein sehr phosphorreiches Glycoprotein und enthält ca. 60 % des im Eigelb gebundenen Phosphors. Es kann weiter in die Untereinheiten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosvitin unterteilt werden. Beim Phosvitin handelt es sich ebenfalls um ein sehr hitzestabiles Protein, welches zudem in der Lage ist, mehrwertige Kationen zu binden.

### **2.1.2 Proteine des Plasmas**

Das Plasma des Eigelbs setzt sich aus zwei Proteingruppen zusammen: Livetine und Lipovitellenine. Die Livetine können weiter in drei Untergruppen unterteilt werden:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Livetine, und weisen ein Molekulargewicht von 80, 45 und 150 kDa auf. Bei den Livetinen handelt es sich um wasserlösliche und eher temperaturempfindliche Proteine. Die Lipovitellenine stellen eine flotierende Fraktion dar, die sich beim Zentrifugieren nach Zusatz von Kochsalz ergibt. Aufgrund ihrer geringen Dichte wird sie als „Low-Density-Lipoproteinfraktion“ (LDL) bezeichnet. Diese ist auf den hohen Anteil an Lipiden in der Fraktion zurückzuführen, der bis zu 90 % i. Tr. betragen kann und sich zu etwa drei Vierteln aus Triacylglyceriden und nur einem Viertel aus Phospholipiden zusammensetzt. Die LD-Lipoproteine sind im Grunde sphärische Mizellen mit einem Kern aus Neutrallipiden (Triacylglyceride, Cholesterol und Cholesterylester), die von einer hydrophilen Membran aus Apolipoproteinen und Phospholipiden umgeben sind (Martin et al., 1964).

### 2.1.3 Lipide des Eigelbs

Die Lipide machen etwa zwei Drittel der Trockenmasse des Eigelbs aus und liegen fast vollständig an Proteine gebunden vor. Davon sind ca. zwei Drittel Triacylglyceride und ein Drittel Phospholipide. Die Fettsäurezusammensetzung der Lipide ist dabei variabel und stark von der Fütterung abhängig.



**Abb. 2-2:** Strukturformeln der Phospholipide des Eigelbs

Die Phospholipide des Eigelbs bestehen zu 73 % aus Phosphatidylcholin (Lecithin), zu 15,5 % aus Phosphatidylethanolamin, zu 2,5 % aus Sphingomyelin und zu 0,6 % aus Phosphatidylinositol. Strukturell handelt es sich bei den Phospholipiden um eine Veresterung des Glycerols oder des Sphingosins mit zwei Fettsäureresten und einer über eine Phosphatbrücke verbundenen Kopfgruppe (siehe Abb. 2-2). PC und PE sind bei pH 7 Zwitterionen. Da die Phospholipide sowohl über unpolare Fettsäurereste, als auch über einen polaren Phosphatrest verfügen, haben diese eine grenzflächenaktive Wirkung. Sie sind deshalb am Aufbau von Membranen in biologischen Systemen beteiligt. Als Emulgatoren spielen die Phospholipide aber auch im Haushalt oder der Industrie eine große Rolle (Belitz et al., 2001).

Weiterhin weist Eigelb mit einem Gehalt von 180 mg Cholesterol pro Eigelb einen deutlich höheren Cholesterolgehalt als alle anderen Lebensmittel auf und wird deshalb herangezogen, um Rückschlüsse auf den Eiweißgehalt in einem Lebensmittel (z. B. Eierteigwaren) zu ziehen. Das Sterin-Derivat Cholesterol ist mit einem Anteil von 96

% der Hauptbestandteil der Sterine des Eigelbs. Weitere Sterine sind z. B. Campesterin oder 7-Cholestanol (Ternes et al., 1994).

#### **2.1.4 Andere Inhaltsstoffe**

Eigelb enthält ca. 1 % Kohlenhydrate in der Trockenmasse. Für technologische Prozesse ist hierbei vor allem der Glucose-Anteil entscheidend, da es durch Reaktionen mit Aminokomponenten (Proteine, PE) während der Trocknung zu Verfärbungen und zu Fehlparomen (off-flavour) kommen kann.

Weiterhin enthält Eigelb eine Reihe von Mineralstoffen und essentiellen Vitaminen. Hierbei sind vor allem Phosphor ( $\approx 0,7\%$ ), Kalium ( $\approx 0,3\%$ ) und Calcium ( $\approx 0,2\%$ ) sowie die fettlöslichen Vitamine E ( $\approx 5\text{ mg}/100\text{ g}$ ) und A ( $\approx 1\text{ mg}/100\text{ g}$ ) und die wasserlösliche Pantothen säure ( $\approx 4\text{ mg}/100\text{ g}$ ) zu nennen (Belitz et al., 2001).

Die Farbe des Eigelbs gilt als Qualitätsmerkmal und wird technologisch in vielen Lebensmitteln genutzt (vor allem Teig- und Backwaren). Hierbei handelt es sich um Carotinoide, welche aus dem Futter stammen. Resorbiert werden dabei bevorzugt Xanthophylle (z. B. Lutein aus grünen Blättern und Zeaxanthin aus Mais).

## **2.2 Technofunktionelle Eigenschaften von Eigelb**

Neben Farbe und Aroma wird Eigelb vor allem aufgrund von drei technofunktionellen Eigenschaften im Haushalt oder in der Lebensmittelindustrie eingesetzt: dem Schaumbildungsvermögen sowie den bindenden und emulgierenden Eigenschaften.

### **2.2.1 Schaumbildungsvermögen**

Eigelb bildet im Gegensatz zu Eiklar beim Aufschlagen bei Raumtemperatur nur sehr instabile Schäume. Erst bei Temperaturen oberhalb von 70 °C bildet sich ein stabiler Schaum. Dazu wird Eigelb in der Wärme solange aufgeschlagen bis die Konsistenz einen optimalen Punkt erreicht (*Punkt der Rose*). Dieser Punkt ist durch ein Maximum im Wasserbindevermögen der Plasmaproteine des Eigelbs charakterisiert. Die Freisetzung von Wasser aus dem Schaum (Drainage) erreicht somit ein Minimum (Ternes et al., 1994). Weiterhin ist am Punkt der Rose eine sehr feinporige Schaumstruktur zu beobachten. Nach Überschreiten des Temperaturoptimums nimmt die Größe der Poren im Schaum zu. Weisen die Proteine aber thermische Schädigungen (z. B. durch den Pasteurisationsprozess) auf, so hat dies Einfluss auf ihre Fähigkeit, einen Eigelbschaum zu stabilisieren.

Das Schaumbildungsvermögen von Eigelb spielt vor allem bei der Herstellung von Saucen und Schäumen eine Rolle (z. B. Sauce Hollandaise oder Sabayon).

### **2.2.2 Bindende Eigenschaften**

Die Proteine des Eigelbs beginnen bei Temperaturen oberhalb von 65 °C zu koagulieren. Durch Aggregation und Assoziation der denaturierten Proteine bildet sich beim Kochen ein dreidimensional vernetztes, schnittfestes Gel aus. Durch Zusatz von Eigelb kann somit eine bindende Wirkung im erhitzten Lebensmittel erzielt werden. Die Festigkeit des thermisch erzeugten Eigelbgels hat dabei direkten Einfluss auf die Bindungswirkung.

Durch Erniedrigung des pH-Wertes, z. B. durch Zusatz von Essigsäure oder durch enzymatische Behandlung mit Phospholipasen kann die Denaturierung der Proteine



entscheidend verzögert werden. Für kochstabile Saucen und Schäume ist das von großer Bedeutung. Limitierender Faktor ist jedoch die Veränderung des Geschmacks, hervorgerufen durch die Säurezugabe und durch Freisetzung freier ungesättigter Fettsäuren. In Wasser emulgierte, ungesättigte Fettsäuren haben einen bitteren Geschmack. Zudem ist der Schwellenwert sehr gering (z. B. 9-12 mmol /L für Ölsäure).

### **2.2.3 Emulgierende Eigenschaften**

Emulsionen sind disperse Systeme von zwei oder mehreren miteinander nicht mischbaren Flüssigkeiten (Belitz et al., 2001). Da sie thermodynamisch instabil sind, muss zu ihrer Bildung Arbeit gegen die Grenzflächenspannung der beiden Phasen geleistet werden. Emulsionen können durch grenzflächenaktive Verbindungen stabilisiert werden, indem durch Bildung von Grenzflächenfilmen das Zusammenfließen der dispersen Phase verhindert wird. Diese Verbindungen werden als Emulgatoren bezeichnet. Bei den Emulgatoren handelt es sich um Moleküle, welche sowohl hydrophobe, als auch hydrophile Gruppen besitzen. Neben den Phospholipiden sind auch die Proteine an der Bildung einer Emulsion durch den Zusatz von Eigelb beteiligt. Aus thermodynamischer Sicht ist es für wasserlösliche Proteine (z. B. Livetine) sogar günstig, sich an der Grenzfläche eines Öltröpfchens anzulagern, da so deren hydrophoben Aminosäurereste dem Geflecht aus Wasserstoffbrücken der sie umgebenden Wassermoleküle entkommen können. Entscheidend für die Eignung als Emulgator ist dabei die Geschwindigkeit, mit der die Proteine an die Grenzfläche diffundieren, und deren Konformationsstabilität. Diese Eigenschaften werden vor allem durch das Molekulargewicht, die Temperatur und das Aminosäureprofil (durch Anzahl der intramolekularen Disulfidbrücken ect.) bedingt.

Werden diese Bestandteile des Eigelbs, z. B. durch thermische Belastung geschädigt, hat dies Einfluss auf die Fähigkeit der einzelnen Komponenten des Eigelbs, eine Emulsion zu stabilisieren. Die emulgierenden Eigenschaften des Eigelbs werden u. a. bei der Herstellung von Mayonnaisen ausgenutzt (Ternes et al., 1994).

## **2.3 Eiprodukte**

Eigelb findet in der Lebensmittelindustrie vielfältige Anwendung. Um jedoch den Erfordernissen der Lebensmittelproduktion zu genügen, muss Eigelb keimfrei und lagerfähig sein. Hierfür haben sich vor allem die Pasteurisation in Kombination mit Kühlung (Temperaturen unter 8 °C) und das Sprühtrocknungsverfahren bewährt. Konventionelle Tiefkühlung (Temperaturen unter -7 °C) ist aufgrund der gefrierinduzierten Gelbildung beim Eigelb nur sehr begrenzt möglich. Dies ist auch der Grund, warum die Gefriertrocknung beim Eigelb bisher noch keine große Rolle spielt. Erst die Kombination aus Vorkristallisation und Kontaktplattengefrierverfahren macht es möglich, gefriergetrocknetes Eigelb unter weitestgehendem Erhalt der technofunktionalen Eigenschaften herzustellen (Jaekel et al., 2008).

### **2.3.1 Pasteurisation von Eigelb**

Aufgrund der großen Nährstoffdichte ist Eigelb ein sehr gutes Nährmedium für Mikroorganismen. Zwar ist rohes Eigelb, solange es sich innerhalb der ungeöffneten Schale befindet, nahezu keimfrei, kann aber leicht beim Aufschlagen der Schale mit Mikroorganismen kontaminiert werden. Eine Keimverminderung mittels Pasteurisation ist daher unumgänglich. Dies kann entweder durch eine hohe Temperatur oder eine lange Heißhaltezeit gewährleistet werden. Somit muss nach einer optimalen Kombination der Heißhaltezeit mit der Pasteurisationstemperatur gesucht werden. Die Pasteurisationsbedingungen müssen dabei so gewählt werden, dass eine sichere Abtötung der Salmonellen und des „Avian influenza virus“ H5N1 erreicht werden kann, ohne dass die thermischen Schädigungen der Bestandteile des Eigelbs zu gravierend werden.

Bei Temperaturen oberhalb von 65 °C beginnt Eigelb zu koagulieren. Nach der Literatur ist bei Eigelb bei einer Temperatur von 61 – 62,3 °C und einer Heißhaltezeit von 210 – 240 Sekunden keine Veränderung der Emulsionseigenschaften festgestellt worden (Ternes et al., 1994).

### **2.3.2 Sprühtrocknung**

Für die Lebensmittelproduktion wird Eigelbpulver bislang überwiegend durch Sprühtrocknung hergestellt. Aufgrund der hohen Trockenmasse kann Eigelb direkt getrocknet werden. Hierfür wird es nach der Pasteurisation mittels Zentrifugalzerstäuber sprühgetrocknet. Der Wassergehalt des Eigelbs sinkt dabei auf 4 - 5 %. Die Temperatur der Luft beträgt hierbei bis zu 60 °C.

Durch das Sprühtrocknungsverfahren treten thermische Schädigungen an den Eigelbproteinen auf, wodurch bedeutende technofunktionelle Eigenschaften des Eigelbs verändert werden. Daher findet sprühgetrocknetes Eigelbpulver bei Lebensmitteln nur begrenzten Einsatz.

### **2.3.3 Konventionelles Tiefgefrieren**

Im Gegensatz zu Eiklar führen Gefrier- und Auftauprozesse beim Eigelb zu einer irreversiblen Erhöhung der Viskosität. Es bildet sich eine gelartige Konsistenz, welche bei der Weiterverarbeitung (Dosier- und Mischprozesse) erhebliche Probleme erzeugt. Die gefrierinduzierte Gelbildung und die daraus resultierende Erhöhung der Viskosität nehmen mit der Lagerungsdauer im gefrorenen Zustand zu. Beim Einfrieren oberhalb des kritischen Temperaturbereiches kristallisiert vor allem das im Eigelb enthaltene Wasser aus. Dies führt zu einer Konzentrierung der löslichen Bestandteile des Eigelbs (z. B. Salze, wasserlösliche Proteine) im noch nicht auskristallisierten Wasser. Dementsprechend nimmt die Konzentration des freien, ungefrorenen Wassers in der Eigelbsuspension ab. Dies führt zu einem teilweisen Verlust der Hydrathülle der Proteine. Durch Umlagerungen der Lipoproteine erfolgt eine weitere Dehydratisierung der Proteine. Die dehydratisierten Proteine aggregieren, so dass sich ein dreidimensionales Netzwerk der Proteine ausbildet (Chang et al., 1977; Miyawaki, 1992). Beim langsamen Einfrieren bilden sich große Eiskristalle, welche die suspendierten Bestandteile des Eigelbs angreifen. Dieser Prozess führt zu einer Denaturierung der Lipoproteine, wodurch die gefrierinduzierte Gelbildung noch verstärkt wird.

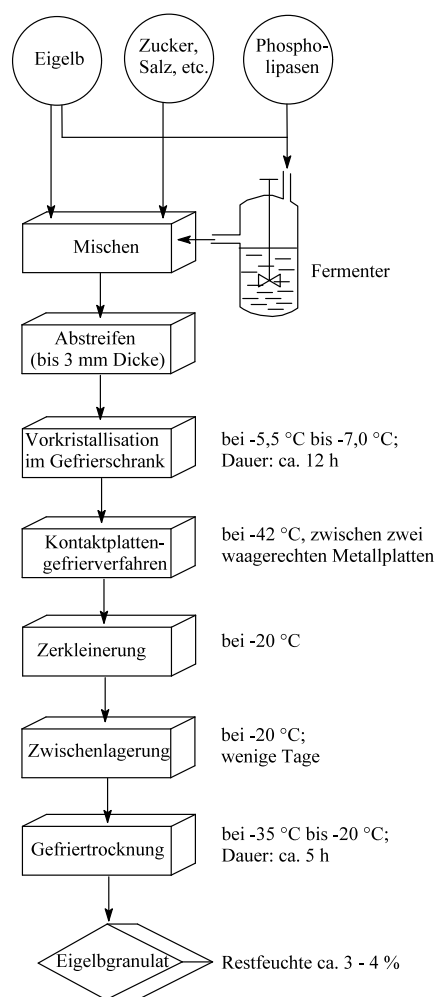
Die irreversible Erhöhung der Viskosität kann nur durch hohe Dosen an wasserlöslichen Zusätzen, wie bis zu 10 % an Kochsalz oder bis zu 40 % an Zucker, verhindert

werden. Durch die geschmackliche Veränderung dieser Produkte ist ihr Einsatz in der Lebensmittelindustrie jedoch stark begrenzt.

### 2.3.4 Gefriertrocknung

Aufgrund der gefrierinduzierten Gelbildung fand die Gefriertrocknung ebenfalls kaum Anwendung. Jedoch konnten durch die Entwicklung einer Kombination aus Vorkristallisation und Kontaktplattengefrierverfahren die technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb während der Gefriertrocknung weitestgehend erhalten werden (Jaekel et al., 2008).

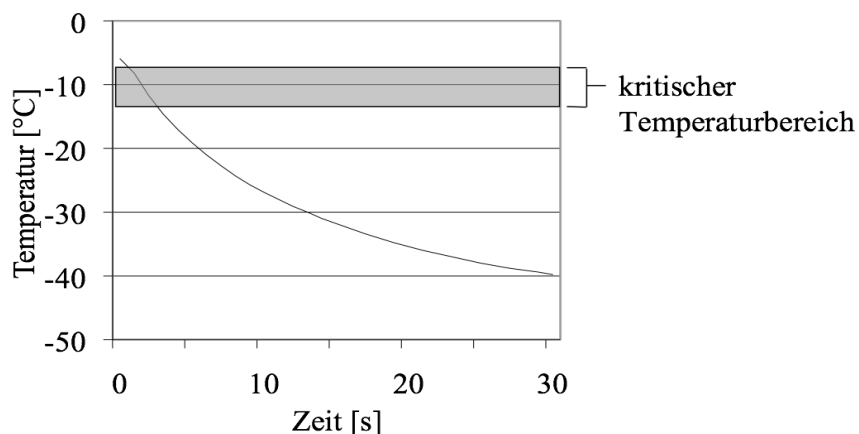
In Abb. 2-3 sind die einzelnen verfahrenstechnischen Grundoperationen für die Gefriertrocknung von Eigelb dargestellt.



**Abb. 2-3:** Fließschema der technologischen Verfahrensschritte für die Gefriertrocknung

Nach dem Mischen des Eigelbs mit evtl. zugesetzten Zutaten wird das Eigelb in dünnen Schichten auf Teflon<sup>®</sup>-Platten aufgetragen. Die ebene Oberfläche ist nötig, um im späteren Kontaktplattengefrierverfahren eine schnelle Temperaturniedrigung zu gewährleisten. Für die anschließende Vorkristallisation wird das Eigelb innerhalb von zwei Stunden auf eine konstante Temperatur von ca.  $-6,3 \pm 0,5$  °C herunter gekühlt.

Laut Riedel (1972) gefrieren etwa 81 % des im Eigelb enthaltenen Wassers bei einer Temperatur von -6 °C aus. Bei einem Wassergehalt von 51 % werden, unter Berücksichtigung der spezifischen Wärmekapazität aller Hauptinhaltsstoffe, etwa 151 kJ zur Kühlung von 1 kg Eigelb von 0 auf -6 °C benötigt. Wird das Eigelb weiter auf Temperaturen unter -14 °C gekühlt, gefriert jedoch nur noch 5 % des im Eigelb enthaltenen Wassers zusätzlich aus. Hierfür werden lediglich 24 kJ benötigt. Somit können mit der Vorkristallisation bereits 86 % der benötigten Wärmeenergie abgeführt werden, ohne dass die gefrierinduzierte Gelbildung einsetzt. Die restlichen 14 % können dann leicht mittels Kontaktplattengefrierverfahren entzogen werden. Dabei wird erreicht, dass der für die gefrierinduzierte Gelbildung kritische Temperaturbereich in weniger als 5 Sekunden durchschritten werden kann (Abb. 2-4).

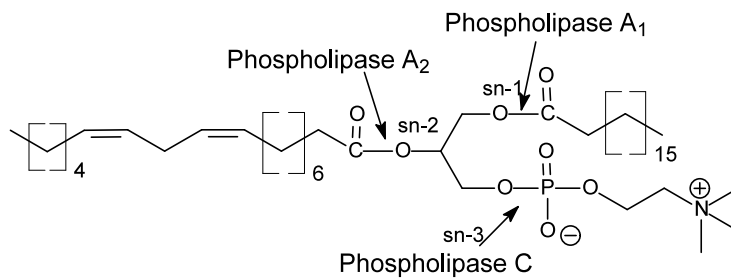


**Abb. 2-4:** Schnelles Durchschreiten des für die gefrierinduzierte Gelbildung kritischen Temperaturbereiches mittels Kontaktplattengefrierverfahren (< 5 s), nach der Vorkristallisation bei -6 °C beginnend (Jaekel et al. 2008)

Die anschließende Gefriertrocknung reduziert den Wassergehalt des Eigelbs unter 6 %, damit beim Wiederauftauen die Proteine im Glaszustand stabilisiert vorliegen und die gefrierinduzierte Gelbildung nicht einsetzen kann.

### 2.3.5 Enzymatische Behandlung mit Phospholipasen

Durch den Einsatz von Phospholipasen können die technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb verändert werden. Hierfür kommen vor allem die Enzyme des A-Typs in Frage. Diese spalten selektiv die Fettsäure in Position sn-1 (Phospholipase A<sub>1</sub>) bzw. sn-2 (Phospholipase A<sub>2</sub>) des Phospholipids ab. Aufgrund dieser Spaltung entstehen Lysophospholipide, welche eine erhöhte Emulgierkapazität gegenüber den Phospholipiden aufweisen (Abb. 2-5).



**Abb. 2-5:** Angriffsorte der Phospholipasen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> beim Phosphatidylcholin

Durch enzymatische Behandlung mit Phospholipasen kann weiterhin die thermische Denaturierung der Proteine entscheidend verzögert werden. Für kochstabile Saucen und Schäume ist das von großer Bedeutung. Limitierender Faktor ist jedoch die Freisetzung freier ungesättigter Fettsäuren, welche einen bitteren Geschmack aufweisen (Schwellenwert<sup>1</sup> für Linolsäure: 4-6 mmol/L). Ungesättigte Fettsäuren sind bevorzugt an der Position sn-2 des Glycerolgerüsts verestert, weshalb die geschmacklichen Veränderungen durch die Verwendung einer Phospholipase vom Typ A<sub>1</sub> nicht so gravierend sind.

<sup>1</sup> Belitz et al., 2001

## **2.4 Analytik der technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb**

### **2.4.1 Überblick**

Zur Analytik der technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb haben sich eine Reihe von physikalischen und elektroforetischen Methoden bewährt. Die bedeutendste analytische Technik ist hierbei jedoch die Rheologie. Durch rheologische Messungen können sowohl Fließeigenschaften und Mechanismen der thermischen Gelbildung, als auch das Verständnis der Zusammenhänge zwischen molekularen Strukturen und dem makroskopischen Fließverhalten der Stoffe näher charakterisiert werden.

#### **Rheologie**

Als Rheologie wird die Wissenschaft bezeichnet, welche sich mit dem Verformungs- und Fließverhalten von Materie beschäftigt. Zur Bestimmung der Viskosität finden verschiedene Ansätze Verwendung. Grundsätzlich wird zwischen drei Arten der Viskositätsmessung unterschieden: Kugelfall-, Kapillar- und Rotationsviskosimetrie.

Beim Kugelfallviskosimeter wird aus der stationären Sinkgeschwindigkeit einer Kugel die Viskosität bestimmt. Da die Schergeschwindigkeit vom vorderen zum hinteren Staupunkt hin jedoch stark abnimmt, ist das Kugelfallviskosimeter nur für Newtonsche Flüssigkeiten geeignet. Disperse Systeme wie Eigelb können somit nicht mit dieser Methode rheologisch untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Viskosität bietet das Kapillarviskosimeter. Hierbei lassen sich durch Messung des Druckabfalls und des Volumenstroms die Schubspannung und die Scherrate ermitteln. Voraussetzung für genaue Messungen ist jedoch eine laminare Durchströmung der Kapillare, was besonders bei heterogenen Systemen problematisch ist.

Die meiste Anwendung finden jedoch Rotationsviskosimeter. Sie ermöglichen die Einstellung definierter Werte für die Scherrate bzw. Schubspannung. Das Grundprinzip besteht aus der Translationsbewegung zweier paralleler Platten. Die Schubspannung lässt sich dabei durch das zur Drehung erforderliche Moment und die Scherrate aus der Winkelgeschwindigkeit ermitteln. Neben dem Platte/Platte-Messsystem finden auch Messgeometrien mit Kegel/Platte und coaxialen Zylindern Verwendung.

Die Kegel/Platte-Geometrie hat den Vorteil, dass im Gegensatz zur Platte/Platte-Geometrie die Schergeschwindigkeit unabhängig vom Radius ist. Sie wurde speziell für hohe Scherraten (bis zu  $10^6 \text{ s}^{-1}$ ) entwickelt und kann auch für hoch viskose Proben verwendet werden. Weitere Vorteile dieser Messgeometrie sind, dass zum einen eventuell vorhandene Luftblasen nach außen gedrückt werden und zum anderen nur relativ geringe Probenmengen für die Messung nötig sind. Bei der Messgeometrie mit koaxialen Zylindern werden nach der Antriebsmöglichkeit zwei Systeme unterschieden: Couette- und Searle-System. Rotiert der äußere Zylinder wird vom Couette-System und rotiert der innere Zylinder wird vom Seale-System gesprochen. Die koaxiale Zylinder-Geometrie eignet sich vor allem für niedrig- bis mittelviskose Proben. Dabei wird bei niedrigviskosen Proben die Doppelspalt-Variante verwendet und bei mittelviskosen Proben der innere Zylinder ausgefüllt.

Bei der Rotationsviskosimetrie wird prinzipiell zwischen zwei Arten der Messung unterschieden: Rotation und Oszillation. Bei Rotationsmessungen wird ein Stoff einer statischen Scherung mit der Schergeschwindigkeit bzw. Scherrate  $\dot{\gamma}$  ausgesetzt. Dies führt zu einer messbaren Reaktion des Stoffes, der sogenannten Schubspannung  $\tau$ . Der Quotient aus Schubspannung und Schergeschwindigkeit ist eine wichtige Kenngröße, welche als dynamische Viskosität  $\eta$  bezeichnet wird (Formel: 2-1):

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

**Formel: 2-1**

$\eta$  = dynamische Viskosität

$\tau$  = Schubspannung

$\dot{\gamma}$  = Scherrate

Bei dynamischer Scherung bzw. Schubspannung ergeben sich Viskositätsverläufe, die auch als Fließkurven bezeichnet werden und zur Charakterisierung des Fließverhaltens dienen. Es wird hierbei im Allgemeinen zwischen Newtonschem- (linearer Zusammenhang zwischen  $\tau$  und  $\dot{\gamma}$ ) und nicht-Newtonschem Verhalten unterschieden. Obwohl in der Vergangenheit das Fließverhalten von Eigelb mit dem Modell von Newton beschrieben wurde (Rao, 1977; Scalzo et al., 1970), hat sich inzwischen die Ansicht durchgesetzt, dass Eigelb ein scherverdünnendes (pseudoplastisches) und damit ein nicht-Newtonsches Verhalten aufweist (Ibarz und Sintes, 1989; Mohr und



Simon, 1992). Unterhalb einer Grenzschergeschwindigkeit von  $100 \text{ s}^{-1}$  zeigt Eigelb ein ausgeprägtes pseudoplastisches Verhalten, das bei Zunahmen von  $\dot{\gamma}$  in Newtonsches Fließen übergeht (Mohr und Simon, 1992). Als Modell zur Beschreibung der Fließkurve eignet sich daher die Herschel-Bulkley-Beziehung (Formel: 2-2):

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$$

**Formel: 2-2**

$K$  = Konsistenzfaktor

$n$  = Fließindex

$\tau_0$  = Fließgrenze

$\dot{\gamma}$  = Scherrate

Der Konsistenzfaktor  $K$  steht synonym für die Viskosität (innere Reibung) und lässt Rückschlüsse auf die Konzentration von Inhaltsstoffen zu. Der Fließindex  $n$  gestattet in Hinblick auf das Strukturverhalten von Stoffen folgende wichtige Unterscheidung (Senge et al., 2004): Gilt  $0 < n < 1$ , liegt scherverdünnendes Verhalten vor, gilt jedoch  $1 < n < \infty$ , handelt es sich um scherverdickendes Verhalten. Nähert sich  $n$  dem Wert eins an, zeigt die Flüssigkeit Newtonsches Fließverhalten. In Dispersionen wie dem Eigelb, kann der Schervorgang zu einer Orientierung der Partikel in die Scherrichtung und in die Richtung des Schergradienten führen. Weiterhin können Agglomerate von Partikeln zerstört und damit Strukturen verändert werden. Die Folge ist eine Verringerung der Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und damit auch der Viskosität. Es liegt somit scherverdünnendes Verhalten vor.

Bei der rheologischen Beurteilung von Stoffen kommt der Fließgrenze eine besondere Bedeutung zu. Unterhalb von  $\tau_0$  kann der Stoff als Festkörper charakterisiert werden. Er ist in der Lage Energie zu speichern und zerfließt nicht unter Einwirkung der Schwerkraft. Erst bei  $\tau > \tau_0$  tritt plastisches Fließen ein.

Für die rheologischen Messungen wird verdünntes Eigelb verwendet (40 %, v/v). Die Verdünnung ist notwendig, um Randeffekte aufgrund des hohen Lipidgehaltes von Eigelb zu vermeiden. Bei verdünntem Eigelb tendiert die Fließgrenze jedoch gegen null, wodurch dieser Parameter bei der Beschreibung des Fließverhaltens vernachlässigt werden kann. In diesem Fall ( $\tau_0 \rightarrow 0$ ) geht der Herschel-Bulkley-Ansatz in die Gleichung von Ostwald/De Waele über (Formel: 2-3):

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

**Formel: 2-3**

$K$  = Konsistenzfaktor

$n$  = Fließindex

$\dot{\gamma}$  = Scherrate

Da sich bei strukturviskosen Flüssigkeiten das Verhältnis von Schubspannung zur Scherrate mit den Scherraten ändert, wird hierbei von der effektiven oder scheinbaren Viskosität gesprochen (DIN 53214). Um die Werte für die Viskosität exakt angeben zu können, muss daher bei nicht-Newtonschen Flüssigkeiten mit der scheinbaren Viskosität auch immer die Scherrate angegeben werden.

Die Viskosität hängt aber auch von der Temperatur ab. Daher ist bei der Bestimmung von Fließkurven die Temperatur von großer Bedeutung (Telis-Romero et al., 2006). Besonders interessant in diesem Zusammenhang sind Messungen der Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur. Bei Stoffen mit einem einfachen thermo-rheologischen Verhalten, d. h. ohne grundsätzliche Strukturänderung während der Temperaturänderung, kann dabei das Modell von Arrhenius angewandt werden, welches den funktionalen Zusammenhang zwischen der Viskosität und der Temperatur näherungsweise beschreibt (Formel: 2-4).

$$\eta(T) = c_1 \cdot e^{-c_2/T}$$

**Formel: 2-4**

$c_1$  und  $c_2$  = Materialkonstanten mit  $c_2 = E_0/R_G$

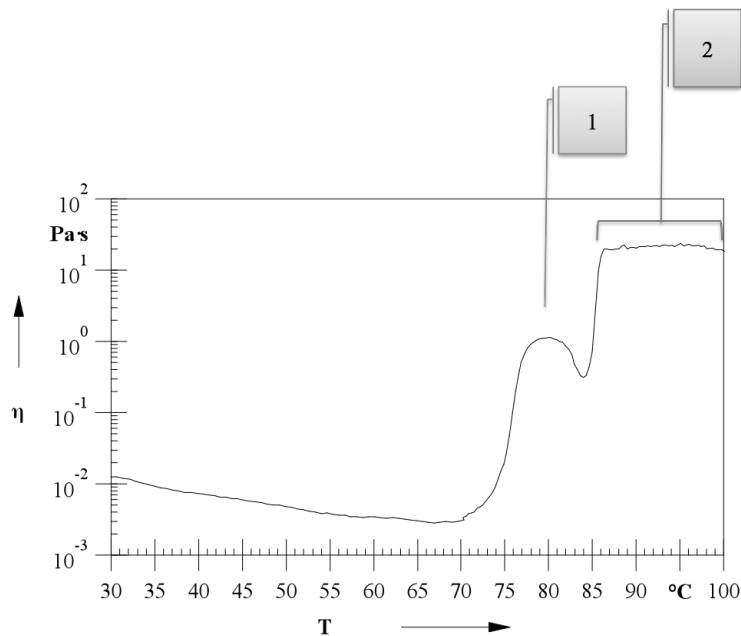
$E_0$  = Aktivierungsenergie

$R_G$  = Gaskonstante

$T$  = absolute Temperatur

Ein einfaches thermo-rheologisches Verhalten zeigen vor allem Polymere. Die Temperaturkurven komplexer Dispersionen wie Eigelb können jedoch nicht mit dem Arrhenius-Modell beschrieben werden. Hierbei dienen allein die Viskosität/Temperatur-Kurven zur Charakterisierung des thermo-rheologischen Verhaltens. Im Temperaturbereich zwischen 55 und 95 °C zeigt verdünntes Eigelb zwei unterschiedliche Viskositätsmaxima (Ternes und Werlein, 1987a). Das erste Maximum der scheinbaren Viskosität ( $26 \text{ s}^{-1}$ ) liegt bei Temperaturen zwischen 75 und 80 °C und ist

durch eine homogene gelartige und doch fließfähige Struktur gekennzeichnet (Abb. 2-6). Aufgrund der für viele Saucen und feine Desserts optimalen Konsistenz wird das Viskositätsmaximum auch als *Punkt der Rose* bezeichnet (Ternes, 1988). Die Erhöhung der Viskosität korreliert dabei mit der Stärke der thermoinduzierten gelartigen Struktur.



**Abb. 2-6:** Viskosität/Temperatur-Kurve von nativem Eigelb, Ausbildung einer fließfähigen, gelartigen Struktur am *Punkt der Rose* (1) und eines dreidimensional vernetzten, schnittfesten Gels (2)

Bei Temperaturen oberhalb von 85 °C zeigt sich ein zweites Maximum bzw. Plateau der scheinbaren Viskosität (bei konstanter Scherrate von  $26 \text{ s}^{-1}$ ). Dieses ist durch Bildung eines dreidimensional vernetzten schnittfesten Gels gekennzeichnet. Durch die Rotation während der Viskositätsmessung wird diese Struktur jedoch irreversibel zerstört. Aufgrund dessen ist diese Methode nicht für die Bestimmung der hitzeinduzierten Gelstabilität geeignet. Weitere Möglichkeiten zur näheren Charakterisierung des rheologischen Verhaltens sind Messungen der Viskosität in Abhängigkeit der Zeit und die Bestimmung des Strukturabbaus bzw. des Wiederaufbaus (Thixotropie). Letzteres wird durch eine stufenweise Veränderung der Scherrate bewirkt. Hierfür dienen Profile, welche eine Ruhephase (mit geringer Scherrate), eine Scherphase (mit hoher Scherrate) und eine Erholungsphase (mit geringer Scherrate) beinhalten. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Erholungskurve. Die Fläche unter der Erholungskurve

wird als Thixotropiefläche bezeichnet und gilt als wichtiger rheodynamischer Parameter. Je größer die Fläche ist, desto größer ist auch die Strukturstabilität der Probe. Aber auch die Bestimmung von Viskositätsdifferenzen zwischen Scher- und Erholungsphase oder der Zeitspanne bis zur Regeneration der Viskosität sind übliche Methoden zur Bestimmung der Strukturstabilität. Neben den Rotationsmessungen sind auch oszillierende Messungen mit Rotationsrheometern, sogenannte dynamische Messungen möglich. Der Drehkörper wird hierbei nicht wie bei den Rotationsmessungen kontinuierlich in eine Richtung gedreht, sondern mit einem kleinen Auslenkungswinkel abwechselnd in beide Richtungen bewegt. Die Probe im Messspalt wird dadurch zu sinusartigen Verformungen gezwungen. Die Reaktion der Probe wird als Schubspannung gemessen und ist zudem zeitlich variabel. Die Amplitude ist dabei materialspezifisch. Die Phasenverschiebung  $\delta$  zwischen Verformung und Reaktion (Schubspannung) variiert zwischen  $0^\circ$  (rein elastischer Körper) und  $90^\circ$  (Newtonsche Flüssigkeit). Aus der Schubspannung und der Amplitude lassen sich komplexe Module berechnen:  $G'$  und  $G''$ . Das Speichermodul  $G'$  repräsentiert den Gesamtwiderstand der Probe gegen die Verformung. Die jeweilige Verformungsenergie wird während eines Schwingungszyklus temporär gespeichert und kann zurück gewonnen werden, wenn die Verformung zurück genommen und danach in Gegenrichtung aufgebaut wird. Beim Verlustmodul  $G''$  wird die zu einem viskosen Fließen aufgewendete Energie in Scherwärme umgewandelt und ist verloren. Rein-viskose Materialien sind somit durch einen Phasenverschiebungswinkel von  $90^\circ$  und einem Wert von  $G' = 0$  für das Speichermodul charakterisiert, während rein-elastische Materialien durch einen Phasenverschiebungswinkel von  $0^\circ$  und durch  $G'' = 0$  gekennzeichnet sind. Bei der Oszillation gibt es vier verschiedene Arten der Messung: Amplitudentest, Frequenztest, Zeittest und Temperaturtest.

Beim Amplitudentest wird bei gleichbleibender Frequenz die Amplitude des Deformationssignals variiert. Interessant ist hierbei lediglich der Bereich in dem  $G'$  und  $G''$  nicht von der Amplitude abhängig sind. Dieser Bereich wird als linearer viskoelastischer Bereich bezeichnet, da hier die Einflüsse der Deformation reversibel sind. Nach der Ermittlung des linearen Amplitudenbereiches können auch die anderen Tests durchgeführt werden. Beim Frequenztest wird die Amplitude (mit einem Wert aus dem linearen Bereich) konstant gehalten und nur die Frequenz variiert. Dieser Test dient zur Bestimmung des Relaxationsverhaltens, wobei durch die Wahl kleiner Fre-

quenzen, welche einen Zeitraum von Tagen oder Monaten beschreiben, ein deutlicher Zeitvorteil entsteht. Der Zeittest wird ebenfalls bei konstanter Amplitude und bei konstanter Winkelgeschwindigkeit durchgeführt. Er dient, analog zum Thixotropietest, dazu Strukturveränderungen und Veränderungen der Materialeigenschaften zu ermitteln. Ein Beispiel für die Anwendung von Zeittests ist die Charakterisierung von Gelierungsvorgängen bei der Herstellung von Gelen. Ein weiterer Test dynamischer Messungen ist der Temperaturtest. Hierbei wird bei konstanter Amplitude und Winkelgeschwindigkeit eine Temperaturrampe angelegt. Der Temperaturtest dient vor allem zur Bestimmung der Kristallisations- und Glastemperatur von Polymeren.

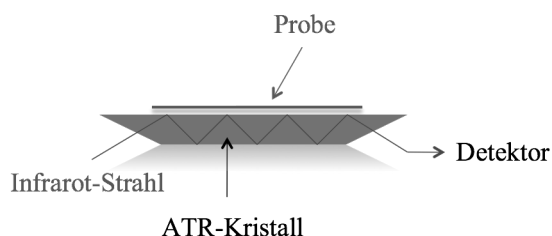
Dynamische Messungen finden besonders bei der Charakterisierung von Gelierungsprozessen Anwendung, da durch Oszillation keine irreversible Zerstörung der Struktur stattfindet. Um dies zu gewährleisten, müssen jedoch die Amplitude und die Frequenz möglichst klein gehalten werden (Aguilera, 1995; Ferry, 1980). Mit dynamischen Messungen ist es zudem möglich zwischen Gelen auf Basis fester Quervernetzungen und auf Basis von Verschlaufungen zu differenzieren. Feste („kovalente“) Gele sind im Gegensatz zu einem Netzwerk aus Verschlaufungen unabhängig von der Frequenz und zeigen eine  $G'$ - $G''$ -Überschneidung. Zusätzlich wurde eine dritte Art von Gel beschrieben, welche zwar eine Frequenzabhängigkeit aber keine  $G'$ - $G''$ -Überschneidung zeigen. Diese werden als „physikalische“ Gele bezeichnet (Stading und Hermansson, 1990; Clark, 1992).

### **Penetrometrie**

Um die Stabilität von festen dreidimensional vernetzten Gelen zu bestimmen eignet sich besonders die Penetrometrie. Hierbei wirkt ein Stempel mit einer konstanten Kraft auf die Oberfläche des Gels ein und penetriert dieses. Je größer die Eindringtiefe des Stempels in das Gel ist, desto instabiler sind die Quervernetzungen innerhalb der Gelstrukturen. Die Geometrie des Stempels und die einwirkende Kraft sind je nach Anwendung variabel. So eignet sich zur Untersuchung von Eigelbgelen eher ein leichter, aus Aluminium gefertigter, kegelförmiger Stempel, während für Backwaren ein aus Kupfer gefertigter, zylinderförmiger Stempel notwendig ist. Die Penetrometrie vereint die Vorteile einer robusten Methode mit einer einfachen Handhabung.

## Spektroskopie

Mit Hilfe von Infrarot- und Ramanspektroskopie kann u. a. die Struktur von Proteinen näher untersucht werden. Besonders die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR) findet hierbei Verwendung. Im Gegensatz zu herkömmlichen IR-Geräten erreichen alle von der Lichtquelle ausgesandten Frequenzen simultan den Detektor, was neben einer erheblichen Zeitersparnis auch das Signal/Rausch-Verhältnis entscheidend erhöht. Zudem zeigen FT-IR-Geräte eine um Größenordnungen erhöhte Intensität. Routinemäßig werden vor allem Transmissions-Messungen durchgeführt. Aufgrund von charakteristischen Absorptionsfrequenzen bzw. -wellenzahlen lassen sich dabei qualitative Aussagen über bestimmte funktionelle Gruppen in einer unbekannt Probe machen. Da für einige Proben wie Pasten, Kunstfasern und wässrige Lösungen die Transmissions-Technik ungeeignet ist, wurde die ATR-Technik (Abgeschwächte Total-Reflexion) entwickelt. Hierfür dient ein sogenanntes Reflexionselement (Kristall mit einem hohen Brechungsindex wie Germanium oder Silberchlorid), in dem Mehrfachreflexionen möglich sind. Hinter der reflektierenden Grenzfläche bilden sich abklingende (evaneszente) Wellen aus, welche mit der Probe wechselwirken können. Die resultierenden wellenlängenabhängigen Absorptionen können dann am Detektor gemessen werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Probe und die Oberfläche des Kristalls möglichst engen Kontakt haben. Neben der einfacheren und schnelleren Handhabung (KBr-Pressling entfällt) besitzt die ATR-Technik den Vorteil, dass auch nicht homogenisierbare Substanzen messbar sind. Zudem kann die Empfindlichkeit über die Eindringtiefe sowie über die Anzahl der Reflexionen eingestellt werden.



**Abb. 2-7:** Prinzipieller Aufbau einer ATR-Messzelle mit ATR-Kristall und Mehrfachreflexion des IR-Strahls

Studien mittels FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit der ATR-Technik dienten u. a. der Aufklärung von Zusammenhängen zwischen der Konformation von  $\beta$ -Lactoglobulin in Lösung und im Gelzustand (Allain et al., 1999).

Während die IR-Spektroskopie auf dem Messprinzip der Absorption beruht, wird bei der Raman-Spektroskopie die Streuung der Strahlung ausgenutzt. In beiden Fällen werden jedoch im Wesentlichen die Grundschrwingungen von Molekülen oder Molekülrotationen angeregt. Ein wesentlicher Vorteil der Raman-Technik ist die Möglichkeit der Verwendung von Glasküvetten. Die Raman-Spektroskopie kann zudem zur Untersuchung des Peptid-Gerüsts von Proteinen, selbst bei hohen Konzentrationen (wie z. B. in Gelen) angewandt werden (Li-Chan, 1996). Hierbei ist außerdem die Unempfindlichkeit gegenüber Wasser ein entscheidender Vorteil.

#### **2.4.2 Analytische Fragestellung und Methodenauswahl**

Die analytische Fragestellung bestand im Wesentlichen darin die technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb mit empfindlichen und sicheren Methoden möglichst umfassend zu beschreiben, um selbst geringe Veränderungen durch die technologischen Prozesse zu erfassen. Ein Schwerpunkt war der Nachweis der technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb nach Anwendung eines neu entwickelten Gefriertrocknungsverfahrens. Im rehydratisierten gefriergetrockneten Eigelb sollten demnach die technologischen Schlüsselfunktionen weitestgehend erhalten bleiben.

Ein weiterer Schwerpunkt war die gezielte Veränderung der technofunktionalen Eigenschaften durch die enzymatische Behandlung mit Phospholipasen. Hierbei sollte der Einfluss der verschiedenen Phospholipase Typen, A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> sowohl auf die Phospholipide, als auch auf die thermische Gelbildung von Eigelb näher untersucht werden. Im Fokus standen vor allem die in diesem Zusammenhang bisher noch nicht untersuchten verschiedenen thermisch induzierten Viskositätsmaxima von Eigelb.

Die technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb bestehen vor allem in der Fähigkeit, Schaum und Emulsionen zu bilden und durch thermische Koagulation der Proteine eine Viskositätserhöhung zu bewirken. Diese Eigenschaften stehen in einem direkten Zusammenhang zueinander. So bewirkt die Ausbildung eines fließfähigen Gels am *Punkt der Rose* eine Stabilisierung des Eigelbschaums (Ternes et al., 1994).

Die Viskositätserhöhung an diesem Punkt ist somit ein entscheidender Parameter sowohl für die thermische Gelbildung als auch für die Schaumstabilität und kann durch rheologische Methoden sicher bestimmt werden. Durch Messungen der Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur mittels Rotationsviskosimeter ergeben sich äußerst interessante Verläufe mit zwei unterschiedlichen Maxima. Da es bisher in der Literatur nur wenige Informationen über deren Ursachen und Zusammenhänge gibt, wurde ein Schwerpunkt auf die Erforschung dieser Viskositätsmaxima gelegt. Für diesen Zweck wurden die Phospholipide des Eigelbs mit verschiedenen Phospholipasen modifiziert. Durch die Beobachtung von Veränderungen bei der thermischen Gelbildung sollten dabei neue Erkenntnisse hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen gewonnen werden. Mittels Rotationsviskosimeter kann zudem das Fließverhalten bestimmt werden. Dieses liefert wichtige Hinweise auf mögliche Strukturveränderungen während der technologischen Prozesse, wie z. B. Aggregation von Proteinen.

Eine weitere technologische Schlüsselfunktion stellt die hitzeinduzierte Gelbildung dar. Mit der Ausbildung eines festen dreidimensionalen Netzwerks beim Erhitzen wirkt Eigelb bindend in Lebensmitteln. Diese Eigenschaft korreliert dabei mit der hitzeinduzierten Gelstabilität, welche mittels Penetrometrie bestimmt werden kann. Die Gelstabilität gibt zugleich auch Auskunft über den Grad der Quervernetzungen im Netzwerk, wovon entscheidende Hinweise auf strukturelle Veränderungen bei den Proteinen abgeleitet werden können. Die emulgierenden Eigenschaften hängen neben den Phospholipiden vor allem von den Proteinen ab. Da aber auch die thermische Gelbildung und das Fließverhalten maßgeblich von den Proteinen abhängen und diesbezügliche Veränderungen bereits erfasst werden, konnte auf eine zusätzliche Bestimmung der emulgierenden Eigenschaften durch die Laserstreuung oder elektrische Leitfähigkeitsmessungen verzichtet werden.



## 2.5 *Analytik der Phospho- und Phosphonolipide*

### 2.5.1 Überblick

Die Bestimmung der Phospho- und Phosphonolipide erfolgt in erster Linie mit chromatographischen Methoden (DC und HPLC). Ferner spielen bei der Identifikation aber auch die Produkte nach saurer oder basischer Hydrolyse sowie spektralanalytische Methoden (IR, NMR) und Massenspektrometrie (LC/MS, GC/MS) eine Rolle.

#### DC

Für die Trennung der polaren Lipide (inklusive der Phospholipide) hat sich bisher besonders die Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgelbasis bewährt. Eine Verbesserung der Trennung der Phospholipidklassen wurde mittels chemischer Modifizierung des Kieselgels mit Magnesiumsilikat -oder oxalat erreicht (Singh und Jiang, 1995). Der Zusatz von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Ammoniumsulfat konnte die Auflösung der Phospholipide mit sauren Resten (Phosphatidylserin von Phosphatidylinositol) entscheidend verbessern (Ando und Saito, 1987; Kaulen, 1972). Borsäure- und Silbernitratzusätze konnten ebenfalls zur Erhöhung der Auflösung beitragen (Myher und Kuksis, 1995).

Als mobile Phase wurde zumeist ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser verwendet. Triethylamin, Ethanol, Hexan und Isopropanol fanden jedoch ebenfalls Anwendung. Eine signifikante Verbesserung der Trennung der Phospholipide konnte durch 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie erreicht werden (Singh und Jiang, 1995). Durch den deutlich gestiegenen Zeitaufwand wurde aber auch die Gefahr der Autoxidation durch Luftsauerstoff erhöht. Erst die Einführung der HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography) erlaubte durch geringere Schichtdicken und kleinere Platten eine höhere Effizienz in der Phospholipidtrennung (Sherma und Jain, 2000). Jedoch wird hiermit keine Trennung der Phospho- von den Phosphonolipiden erreicht. Eine Trennung von 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphonocholin von dessen Phosphoryl-Analogen beschreiben schließlich Moschidis und Demopoulos (1983) mittels präoperativer NP-DC und einem Eluenten, bestehend aus Methanol/Wasser (2:1, v/v). Mit Hilfe dieser Methode werden in einer Reihe von pflanzli-

chen und tierischen Proben (Ziegenmilz, Hühnereigelb, Aprikosenkerne, Schaf-, Ziegen- und Rinderhirn, Baumwoll- und Kenafsaamen) Phosphonolipide nachgewiesen (Moschidis, 1983; Moschidis et al., 1984; Moschidis, 1984; Moschidis, 1986; Mukhamedova et al., 1985; Tolibbaev et al., 1989, Mukhamedova und Glushenkova, 2000).

Zur Detektion der Phospholipide haben sich besonders Sprühreagenzien auf Basis von Molybdänsäure bewährt (Iorio et al., 2003; Zhong et al., 2000): das „Vaskovsky-Reagenz“ (Vaskovsky und Kostetsky, 1968; Vaskovsky und Svetashev, 1972; Vaskovsky et al., 1975) und das Dittmer's Reagenz (Dittmer und Lester, 1964). Durch den Erhitzungstest von Stillway und Harmon (1980) ist darüber hinaus eine spezifische Detektion von Phosphonolipiden möglich. Aber auch Rhodamin 6G oder Berberin können zur UV-Detektion der Phospholipide verwendet werden (Helmy, 2004; Moe et al., 2004; Sommerer et al., 2004; White et al., 1998). Da die Phospholipide in der Regel ungesättigte Fettsäuren enthalten, finden auch zuweilen Jodkammern Verwendung (Berczi und Horvath, 2003; Jansen et al., 1999).

Insgesamt stellt die Dünnschichtchromatographie eine schnelle und kostensparende Methode zur Trennung der Phospholipidklassen dar. Jedoch besteht durch Luftwirkung die Gefahr eines hydrolytischen und/oder oxidativen Angriffes, welcher die Struktur der Phospholipide zerstört (Guan et al., 2001; Pulfer und Murphy, 2003). Darüber hinaus ist die Reproduzierbarkeit, im Vergleich zur HPLC oder GC, eher gering (Breton et al., 1989). Die Gründe hierfür liegen in der starken Abhängigkeit der Methode von Temperatureinflüssen, der Luftfeuchtigkeit und der mobilen Phase. Sensitivität und Auflösung sind ebenfalls geringer verglichen mit HPLC, GC und LC/MS (Wang et al., 2003). Schließlich ist der Arbeitsaufwand durch fehlende Automatisierungsmöglichkeiten relativ hoch.

## **GC**

Da die Phospholipide nicht flüchtig sind, ist eine gaschromatographische Analyse intakter Phospholipide nicht möglich. Deshalb werden die Proben zuvor einer Hydrolyse mit nachgeschalteter Umesterung unterzogen. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) können dann per GC untersucht werden (Tserng und Griffin, 2003). Zur Detektion wird meist ein Flammen-Ionisations-Detektor (FID) verwendet, wel-

cher jedoch den Nachteil der Zerstörung der Probe besitzt (Lima, 2002). Zur Verkürzung des Zeitaufwandes wurde eine „fast-GC“-Methode unter Verwendung von Microbore-Kapillarsäulen entwickelt, welche die Auflösung signifikant erhöht (Mondello et al., 2004). Hierbei stehen jedoch den Vorteilen einer geringeren Bandenbreite, höheren Signal/Rausch-Verhältnissen und einer erhöhten Empfindlichkeit, dem Nachteil einer erheblich verringerten Analyten-Kapazität gegenüber (Bondia-Pons et al., 2004).

Einen limitierenden Faktor hinsichtlich der Anwendbarkeit der GC in der Phospholipidanalytik stellt der Derivatisierungsschritt dar. Neben einer möglichen Modifizierung der Struktur mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Eder, 1995) besteht die Möglichkeit der Entstehung von Artefakten, welche mit FAME-Peaks überlappen können (Malavolta et al., 2004). Zusätzlich besteht die Gefahr, dass kurzkettige FAME wegen ihrer Flüchtigkeit bei der Derivatisierung verloren gehen (Lima, 2002). Aufgrund des hohen Zeitaufwandes, verbunden mit einer verringerten Sensitivität und des Bedarfs an Derivatisierungsreagenzien, überwiegen bei der Analytik der Phospholipide alternative Techniken wie HPLC oder LC/MS.

## **HPLC**

Die erste Trennung von Phospholipiden mittels HPLC wurde von Jungalwala et al. (1975) beschrieben. Die HPLC besticht vor allem durch Schnelligkeit, einer guten Auflösung sowie einer hohen Sensitivität und Spezifität (Lima, 2002). Aufgrund der geringeren Temperaturen im Vergleich zur GC wird das Risiko der Isomerisation von ungesättigten Fettsäuren zudem entscheidend verringert. Einen weiteren direkten Vorteil besitzt die HPLC gegenüber der GC durch den verminderten Kontakt mit Luft-sauerstoff, was die Beständigkeit der Phospholipide hinsichtlich Autoxidation erhöht (Pulfer und Murphy, 2003). Zusätzlich können Fraktionen zur weiteren Untersuchung gesammelt werden (Robins und Patton, 1986). Die Trennung der Phospholipide mittels HPLC erfolgt ausschließlich unter Verwendung von Säulen auf Kieselgelbasis (Peterson und Cummings, 2006). Der innere Durchmesser der verwendeten HPLC-Säulen variiert dabei zwischen 2,0 und 4,6 mm während die Länge zwischen 100 und 250 mm beträgt. Die Länge der Säule korreliert dabei mit der Auflösung (Breton et al., 1989). Der Trennungsmechanismus der Phospholipide beruht auf der Adsorption

der polaren Kopfgruppe an der stationären Phase. Die Polarität der Phospholipide korreliert dabei mit der Retentionszeit (Andrikopoulos, 2002). Die Folge ist eine für Phospholipide typische Elutionsreihenfolge: Phosphatidylglycerol, -ethanolamin, -inositol, -serin und -cholin. Um die Polarität der stationären Phase zu optimieren, wurden diverse Versuche mit chemisch modifiziertem Kieselgel (Diol, Cyanopropyl oder Aminopropyl) durchgeführt (Carunchio et al., 1984; Guan et al., 2001; Holland et al., 2003; Néron et al., 2004; Perona und Ruiz-Gutierrez, 2004; Samet et al., 1989; Stith et al., 2000). Jedoch wurden besonders bei den Aminopropyl-Säulen Schwierigkeiten bei der Elution acider Lipide beobachtet (Christie, W. W., 2007).

Obwohl die Trennung der Phospholipidklassen mittels HPLC bisher ausführlich untersucht worden ist, gibt es kaum Informationen über Methoden zur Trennung der Phospho- von den Phosphonolipiden. Lediglich Moschidis und Andrikopoulos (1987) beschreiben eine HPLC-Methode zur Trennung der Phospholipide von deren Phosphono-Analogen mittels einer mit Benzolsulfonsäure modifizierten Kieselgelsäule und UV-Detektion.

Die Wahl der mobilen Phase hängt vor allem von der Art der Detektion ab. Zur HPLC-Bestimmung der Phospholipide werden folgende Detektoren beschrieben: Refraktionsindex-Detektor (RI), Ultraviolett-Detektor (UV), Fluoreszenz-Detektor und Lichtstreuendetektor (Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD). Durch die starke Abhängigkeit des Brechungsindex von der Temperatur, dem Druck, der Flussrate und dem Lösemittel zeichnet sich der RI-Detektor durch eine geringe Sensitivität und Robustheit aus (Stith et al., 2000). RI-Detektion ist somit nur bei isokratischer Elution möglich. Zur vollständigen Trennung aller Phospholipidklassen ist jedoch eine Gradientenelution nötig (Hoving, 1995), was die Anwendbarkeit des RI-Detektors weiter einschränkt. Die UV-Detektion zählt zu den ältesten Detektionstechniken in der HPLC. Die meisten Phospholipide absorbieren UV-Licht im Bereich von 190 – 210 nm. Obwohl UV-Detektoren eine hohe Empfindlichkeit aufweisen, besitzen diese doch den Nachteil, dass aufgrund starker Absorptionseigenschaften Lösemittel wie Chloroform, Ethylether und Aceton als Eluent ungeeignet sind (Singh und Jiang, 1995). Da neben den Carbonylgruppen nur die (C=C)-Doppelbindungen UV-Licht absorbieren (Hoving, 1995), zeigen Phospholipide mit überwiegend gesättigten Fett-

säureresten im Vergleich zu denen mit überwiegend ungesättigten Fettsäureresten eine signifikant geringe Signalstärke (Bunger und Pison, 1995), was sich nachteilig auf die Quantifizierung auswirken kann. Zur Optimierung der Absorptionseigenschaften im UV können Phospholipide jedoch mit Benzoat, Dinitrobenzoat, Pentafluorbenzoat oder Nicotinsäure derivatisiert werden (Dobson und Deighton, 2001).

Da Phospholipide nicht fluoreszieren, müssen diese mit Coumarin oder Anthracen derivatisiert werden, um eine Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen (Kramer et al., 2002; Thevenon et al., 1998). Obwohl dadurch eine hohe Sensitivität erreicht werden kann (Lima, 2002), findet der Fluoreszenz-Detektor nur wenig Anwendung in der Analytik der Phospholipide. Da der ELSD unempfindlich gegenüber Flussrate und Temperatur ist (Stith et al., 2000), nicht vom Grad der Sättigung von Fettsäureresten abhängig ist (Bunger und Pison, 1995) und Gradientenelution erlaubt, ist dieser sehr gut für die Analytik der Phospholipide geeignet. Als nachteilig hat sich jedoch die für jede Phospholipidklasse variable Response herausgestellt (Seppänen-Laakso et al., 2001). Zur Quantifizierung muss demnach jede Lipidklasse separat kalibriert werden. Typischerweise zeigen Phospholipide mit sauren Resten (Phosphatidylserin, -inositol) geringere Detektorsignale. Zusätzlich besteht besonders bei kleinen Konzentrationen kein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Detektorsignal (Wilkes et al., 1996). Erst mittels post-column Additiven wie Silbernitrat konnte ein linearer Zusammenhang hergestellt werden, was sich positiv auf die Genauigkeit der Quantifizierung ausgewirkt hat (Heron et al., 2004). Zur Bestimmung von Phospholipiden in biologischen Proben mittels HPLC/ELSD wurde die Methode von Becart et al. (1990) mehrmals modifiziert (Avalli und Contarini, 2005; Breton et al., 1989; Bunger und Pison, 1995; Olsson et al., 1996; Seppänen-Laakso et al., 2001; Silversand und Haux, 1997; Stith et al., 2000). Die Methoden zur Trennung der Phospholipide beruhen dabei auf einer Gradientenelution mit einem binären oder tertiären Lösemittelsystem. Durch Erhöhung der Polarität während eines Laufes ist eine gute Trennung aller Phospholipidklassen möglich (Breton et al., 1989). Hierfür haben sich besonders zwei Lösemittelsysteme bewährt: zum einen eine Kombination aus Chloroform/Methanol/Wasser und zum anderen eine Kombination aus Hexan/Isopropanol/Ethanol/Wasser und Acetonitril (Peterson und Cummings, 2005). Zur Verbesserung der Trennung von Phosphatidylinositol hat sich ein Zusatz von Ammoniak bewährt, welcher als Puffer wirkt und gleichzeitig den pH-Wert des

Eluenten erhöht (Gunnarsson et al., 1997). Zusätzlich helfen Ammoniumsalze einer vorzeitigen Säulenalterung vorzubeugen (Guan et al., 2001). Zusätze an Trifluoressigsäure sind ebenfalls möglich, um freie Ladungen der Phosphatgruppe zu neutralisieren und damit störende sekundäre Wechselwirkungen mit den aciden Silanol-Gruppen der stationären Phase zu unterbinden (Suchocka et al., 2003).

Obwohl die HPLC hauptsächlich zur Trennung der Phospholipidklassen genutzt wurde, sind auch Versuche zur Bestimmung molekularer Spezies mittels Umkehrphasen (Reverse-phase HPLC, RP-HPLC) unternommen worden (Bunger und Pison, 1995; Olsson und Salem, 1997). Die Trennung basiert hierbei auf der Stärke der lipophilen Eigenschaften, resultierend aus der Kettenlänge und der Anzahl an Doppelbindungen im Fettsäurerest (Perona und Ruiz-Gutierrez, 2003). Kürzere Kohlenstoff-Ketten bedeuten dabei auch kürzere Retentionszeiten (Pacetti et al., 2004). Zusätzlich zählt jede Doppelbindung als Äquivalent zu ca. 2 Methylengruppen, welche von der C-Kettenlänge abgezogen werden müssen (Andrikopoulos, 2002). Das führt jedoch zur Coelution kritischer Paare (z. B. 16:0 und 18:1), was dementsprechend beachtet werden muss. Zu den Möglichkeiten der Optimierung der Trennleistung gehört u. a. der Gebrauch von Temperaturprogrammen. Myher und Kuksis (1995) beschreiben, wie durch Veränderung der Temperatur während eines Laufes die Auflösung erhöht werden kann. Ein anderer Ansatz besteht darin die Phospholipidklassen zuerst durch DC zu trennen, um anschließend bei der RP-HPLC deren Coelution zu unterbinden (Pulfer und Murphy, 2003). Eine Entfernung der polaren Kopfgruppe mittels vorgeschalteter enzymatischer Hydrolyse durch Phospholipase C ist ebenfalls möglich (Zhang et al., 2002).

Zusammenfassend gilt, dass eine Bestimmung der Phospholipide mittels DC, GC oder HPLC zwar möglich ist, jedoch durch die benötigten Konzentrationen im nanomolaren Bereich limitiert sind (Peterson und Cummings, 2006). Einen analytischen Ausweg bieten hierfür massenspektrometrische Methoden.

## **MS**

Grundlegend wird bei der Vielzahl an verfügbaren massenspektrometrischen Methoden nach Art der Ionenerzeugung und nach Prinzip der Massentrennung unterschied-

den. Bei der Ionenerzeugung wird dann weiter unterschieden zwischen „weicher“ und „harter“ Ionisation. „Weiche“ Ionisationstechniken produzieren weniger Fragmente und ermöglichen somit in der Regel Rückschlüsse auf das gesamte Molekül bzw. Molekül-Ion. Da viele Phospholipide die gleichen Fettsäurereste besitzen und sich lediglich in der Kopfgruppe unterscheiden, ist die Bestimmung molekularer Spezies und eine sichere Identifizierung nur mittels Pseudo-Molekül-Ionen möglich. „Weiche“ Ionisationstechniken erlauben somit eine Bestimmung der molekularen Spezies der Phospholipide (Myher und Kuksis, 1995). Elektronen-Ionisation (EI) als „harte“ Ionisationstechnik eignet sich jedoch hierfür nur bedingt. Neben der starken Fragmentierung besteht ein wesentlicher Nachteil darin, dass EI nur in der Gasphase möglich ist. Da Phospholipide jedoch nicht flüchtig sind, kann diese Form der Ionisation nur in Kombination mit GC nach Hydrolyse und Derivatisierung Verwendung finden.

Zu den „weichen“ Ionisationsarten gehören: „Fast Atom Bombardment“ (FAB), „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation“ (MALDI) und „Electro-Spray Ionisation“ (ESI). FAB gehört zu den ältesten „weichen“ Ionisationstechniken und benötigt eine flüssige, nicht-flüchtige Matrix. Da die Ionisationsenergie indirekt durch diese Matrix auf den Analyten übertragen wird, hängt die Empfindlichkeit der Methode sogleich von der Effizienz der Energieübertragung ab. Darüber hinaus ist der Grad der Fragmentierung im Vergleich zu den anderen „weichen“ Ionisationstechniken deutlich höher.

Obwohl der Prozess der Ionisation mittels MALDI sehr empfindlich und schonend auf den Analyten wirkt, ist die benötigte Matrix abermals der limitierende Faktor (de Hoffmann und Stroobant, 2003). Nur eine homogene Verteilung des Analyten in der Matrix gewährleistet, dass die Ionisation auch repräsentativ zum Gehalt des Analyten verläuft. Als Matrixbestandteil findet meist 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) Verwendung. DHB ist aufgrund des sauren Charakters jedoch nur im positiven Ionen-Modus besonders effektiv. Im negativen Ionen-Modus verursacht DHB ein intensives Hintergrundrauschen (Estrada und Yappert, 2004; Lessig et al., 2004). Einen Ausweg bietet hierbei p-Nitroanilin (PNA). PNA zeichnet sich durch ein höheres Absorptionsvermögen aus und ermöglicht somit eine gesteigerte Empfindlichkeit für Proben mit einem hohen Salzgehalt (Rujoi et al., 2004). Ein Zusatz an Trifluoressigsäure (TFA) kann darüber hinaus das Signal/Rausch-Verhältnis erhöhen. Eine Folge davon ist jedoch der Angriff auf Alkenyl-acyl-PC (Schiller et al., 2003). Die Vorteile von MAL-

DI sind: Schnelligkeit, geringe Probenvorbereitung, eine gute Reproduzierbarkeit und eine höhere Empfindlichkeit als ESI (Schiller et al., 2004; Sommerer et al., 2004). Zu den Nachteilen zählen Einschränkungen hinsichtlich quantitativer Bestimmungen und die Notwendigkeit einer Vortrennung bei komplexen Proben.

Der größte Vorteil von ESI gegenüber MALDI und FAB ist das viel höhere Signal/Rausch-Verhältnis, welches sich positiv auf die Empfindlichkeit auswirkt (Han und Gross, 2005; Ho et al., 2003). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit einer Kopplung mit der HPLC, was die Geschwindigkeit und Effizienz der gesamten Analyse begünstigt. ESI wurde 1989 von der Arbeitsgruppe um John Fenn entwickelt (Fenn et al., 1989). Obwohl der exakte Mechanismus dieser Art der Ionisation noch nicht völlig geklärt ist, so entstehen doch die Ionen, je nach angelegtem elektrischem Potential, durch Verlust oder Anlagerung von Protonen. Die erste Kopplung von HPLC und ESI-MS zur Bestimmung molekularer Spezies von Phospholipiden wurde von Kim et al. (1994) beschrieben. Hierbei konnte gegenüber Thermospray-Techniken eine um 50fach erhöhte Empfindlichkeit erzielt werden. Taguchi et al. (2000) kombinierte erstmals ESI-MS mit Kapillarsäulen, was geringere Flussraten und eine erhöhte Hintergrund-Unterdrückung ermöglichte. Als Folge davon konnten selbst die in Zellextrakten nur in geringen Konzentrationen vorkommenden Phospholipide, als individuelle molekulare Spezies bestimmt werden. Die Trennung der Phospholipidklassen erfolgte dabei mit einer Normalphasen-Kieselgelsäule (150 x 0,3 mm). Über 500 molekulare Spezies, von 10 verschiedenen Phospholipidklassen konnten letztlich so bestimmt werden; bei Probenmengen von nur 5 pmol.

Jedoch wurden auch Veränderungen bei den molekularen Spezies durch die chromatographische Trennung beobachtet (DeLong et al., 2001). Es traten hierbei Verluste bei molekularen Spezies mit weniger als 3 Doppelbindungen auf.

Es werden im Wesentlichen drei Typen von Massenspektrometern unterschieden: Quadrupol-, Ionenfallen- und Flugzeitmassenspektrometer. Bei den ersten beiden Typen werden die unterschiedlichen Massen, nach Ladung, durch Variation der RF- und DC-Potentiale getrennt bzw. gefiltert. Bei Letzterem beruht die Trennung darauf, dass die Geschwindigkeit von Molekülen mit gleicher Energie im feldfreien Raum, allein vom Molekulargewicht abhängt (de Hoffmann und Stroobant, 2003).

Nach Ionisation intakter Phospholipide ist die Ladung entweder an der polaren Kopfgruppe oder am Phosphatrest lokalisiert (Peterson und Cummings, 2006). Phosphati-



dylcholin ist ein Zwitterion mit einer positiven Ladung an der quartären Ammoniumgruppe und einer negativen Ladung am Phosphatrest. Aus diesem Grund ist nur ein einwertiges Kation notwendig, um ein positives Pseudomolekül-Ion zu erhalten. Da die Bildung eines negativen Pseudomolekül-Ions nicht möglich ist, kann die Analyse von PC erheblich vereinfacht werden, indem Addukte mit Cäsium ( $\text{Cs}^+$ ) produziert werden (Estrada und Yappert, 2004). Aus der Verschiebung des Masse/Ladungsverhältnisses von 132,91 (Molekulargewicht von Cs) können dann die Phosphatidylcholinpeaks identifiziert werden. Die anderen Phospholipidklassen benötigen mehr als ein Cs-Ion, um positiv geladene Addukte zu bilden, was sich wiederum in Verschiebungen zu höheren  $m/z$ -Werten bemerkbar macht (Estrada und Yappert, 2004). Eine andere Möglichkeit bietet der Vergleich der Ergebnisse aus den Untersuchungen im positiven und negativen Ionen-Modus. Phosphatidylcholin zeigt im positiven Ionen-Modus Molekülpeaks mit starker Intensität aber keine im negativen Ionen-Modus. Aufgrund der starken Intensität der Phosphatidylcholinpeaks besteht zudem die Gefahr, dass Peaks mit schwächeren Intensitäten (wie z. B. Phosphatidylethanolamin) nicht erkannt werden. Aus diesem Grund ist es ratsam, die Phospholipidklassen vor der MS-Analyse mittels HPLC zu trennen (Ivanova et al., 2001; Lessig et al., 2004; Sowa und Subbaiah, 2004).

Die Phospholipide mit aciden funktionellen Gruppen (Phosphatidylglycerol, -inositol, -serin) werden am besten im negativen Ionen-Modus detektiert. Darüber hinaus besteht der Vorteil im negativen Ionen-Modus, dass weniger Störungen aufgrund individueller Addukte mit der Probenmatrix bestehen (Schiller et al., 2004; Zink und Mangelsdorf, 2004). Obwohl eine Identifizierung der molekularen Spezies aufgrund der theoretischen Molekularmassen prinzipiell möglich ist (Taguchi et al., 2000; Uran et al., 2001) können dennoch keine sicheren Aussagen über die Fettsäurereste getroffen werden. Schließlich sind bei zwei Fettsäureresten pro Phospholipidmolekül mehrere Kombinationen möglich um in Summe auf ein und dasselbe Molekulargewicht zu kommen. Aus diesem Grund sind für die Strukturaufklärung massenspektrometrische Methoden mit Tandem MS nötig. Im ersten MS wird ein Vorläufer-Ion gebildet, welches in weiteren Schritten fragmentiert und im zweiten MS analysiert wird. Für die gezielte Fragmentierung kommen entweder „Collision Induced Dissociation“ (CID) oder spontane Dissoziation in Frage (de Hoffmann und Stroobant, 2001). Im Vergleich zu FAB haben mit ESI generierte Ionen eine geringe innere Energie, was ihre

Stabilität bei MS<sup>2</sup> Analysen beträchtlich erhöht. Aber auch der MS-Typ beeinflusst die Art der Fragmentierung. So wurden bei MS-Geräten mit einer Ionenfalle vorzugsweise Lysophospholipid-Ionen beobachtet, während bei Triple Quadropole MS-Geräten Carboxylat-Anionen gehäuft auftraten (Larsen et al., 2001). Zur Identifizierung der Phospholipide anhand der charakteristischen Kopfgruppe dienen MS<sup>2</sup> Applikationen mit dem Fokus auf Neutralverlusten. Neben dem Verlust von  $m/z$  184 wurden bei Phosphatidylcholin auch Neutralverluste mit  $[M - 15]$ ,  $[M - 60]$  und  $[M - 86]$  beobachtet (Griffiths, 2003). Phosphatidylserin zeigt neben dem Verlust von  $m/z$  185 im negativen Ionen-Modus ein  $[M - 87]^-$  Ion, welches auf den Verlust des Serinrestes zurückzuführen ist. Neben dem charakteristischen Verlust von  $m/z$  260 wurden im MS<sup>2</sup> Spektrum von Phosphatidylinositol noch Anionen mit  $m/z$  233, 241, 259, 279, und 315 beobachtet (Hsu und Turk, 2000b). Phosphatidylethanolamin kann im positiven Ionen-Modus an folgendem charakteristischen Ion identifiziert werden  $[M + H - 141]^+$  (Kerwin et al., 1994). Allgemein betrachtet, verlieren PC und PE durch CID hauptsächlich ihre polare Kopfgruppe, während bei PG und PI eher Alkylreste abgespalten werden (Zink und Mangelsdorf, 2004). Durch Zusatz von Metallionen zur Matrix können im Allgemeinen die Intensität der Fragmente erhöht werden. Cobalt (II) überzeugte bei den Übergangsmetallen für diesen Zweck am meisten (Ho et al., 2003). Aber auch Komplexe mit Lithium ( $Li^+$ ) konnten zur Erhöhung der Intensität der Fragment-Ionen von Phosphatidylethanolamin beitragen (Hsu und Turk, 2000a). Bei Phosphatidylcholin ist der Zusatz von Übergangsmetallen zur Matrix für eine verbesserte Strukturaufklärung aufgrund einer geringen Neigung zur Fragmentierung eher limitiert.

Eine Möglichkeit zur Strukturaufklärung der Fettsäurereste, hinsichtlich der Position der Doppelbindungen mittels CID, bietet die Oxidation ungesättigter Fettsäuren zu vicinal hydroxylierten Derivaten (Moe et al., 2004).

Allgemein besteht die Möglichkeit der Quantifizierung der Phospholipide mittels MS in der Korrelation zwischen Intensität des Ionensignals und der Konzentration in der Probe (de Hoffmann und Stroobant, 2001). Jedoch besteht bei ESI-MS eine Abhängigkeit der Intensität des Signals von der Kettenlänge und vom Grad der Sättigung des Fettsäurerestes sowie von der polaren Kopfgruppe des Phospholipids. Im positiven Ionen-Modus wird Phosphatidylcholin aufgrund seines Zwitterionen-Charakters bevorzugt ionisiert und zeigt somit bei gleicher Konzentration höhere Signalintensität.

ten als andere Phospholipide. Zusätzlich steigt die ESI Response mit der Anzahl der Doppelbindungen aber sinkt mit zunehmender Kettenlänge der Fettsäurereste (Kakela et al., 2003). Aus diesem Grunde sollte sich der Arbeitsbereich im picomolaren Konzentrationsbereich (oder kleiner) bewegen (Koivusalo et al., 2001). In diesem Konzentrationsbereich wurde nämlich ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und des Detektorsignals festgestellt. Die Frage, warum dies nicht auch für höhere Konzentrationen gilt, konnte noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Es wurde lediglich vermutet, dass sich eine Zunahme der zwischenmolekularen Wechselwirkungen mit der Konzentration negativ auf die Response auswirken kann (Han und Gross, 2005). Im negativen Ionen-Modus konnte kein linearer Zusammenhang zwischen Detektorsignal und Konzentration festgestellt werden. Als Ausweg bietet sich eine doppelt logarithmische Auftragung der Konzentration gegen die Intensität an (Zacarias et al., 2002).

Bei der Quantifizierung haben sich interne Standards zur Kontrolle für die Effizienz der Extraktion und zur Bestimmung der Response für die Ionisation einer bekannten Probenkonzentration bewährt. Aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der Ionisation innerhalb der Phospholipidklassen ist es jedoch notwendig, für jede Klasse einen separaten internen Standard zu verwenden. Darüber hinaus ist es außerdem ratsam, auch jeweils einen gesättigten und einen ungesättigten internen Standard zu verwenden (Koivusalo et al., 2001). Als geeignet haben sich hierbei besonders deuterierte Standards erwiesen (Hsu und Turk, 2000b; Isaac et al., 2003; Ma und Kim, 1995; Wen und Kim, 2004). Ein Nachteil dieser Standards ist der hohe Preis. Eine günstigere Möglichkeit bieten da synthetische Phospholipide wie: 12:0-12:0 PE bzw. PC (Hayakawa und Okabayashi, 2004; Ishida et al., 2004), 14:0-14:0 PE und PC (Ishida et al. 2004; Lehmann et al., 1997) und 15:0-15:0 PS, PE und 14:1-14:1 PC (Han und Gross, 2005). Bei der Verwendung von internen Standards für die Quantifizierung sind jedoch zwei Korrekturen für den  $^{13}\text{C}$ -Isotopen Effekt zu beachten. Der erste Korrekturfaktor berücksichtigt die Differenz in der Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen der zu bestimmenden molekularen Spezies und dem internen Standard. Der zweite Korrekturfaktor ergibt sich aus der Überlappung von  $[M + 2]$  Isotopenpeaks mit anderen Molekülpeaks des gleichen  $m/z$ -Wertes. Han und Gross (2001) haben Näherungen für diese Isotopen-Korrekturfaktoren ermittelt und zusammengestellt.

Obwohl sich die ESI-MS<sup>2</sup> als effektive Methode zur Quantifizierung erwiesen hat, müssen jedoch Probenkonzentrationen und Kollisionsenergie berücksichtigt werden (DeLong et al., 2001). So ergaben sich signifikante Unterschiede im Verlust von Carboxylat-Anionen. Je nach Höhe der Kollisionsenergie wurde entweder an Position *sn*-1 (bei höherer Kollisionsenergie) oder an Position *sn*-2 (bei niedriger Kollisionsenergie) bevorzugt vom ungeladenen Phospholipidmolekül abgespalten (Hvattum et al., 1998). Da die Position *sn*-2 im Gegensatz zur Position *sn*-1 im Phospholipidmolekül im allgemeinen mit längeren, ungesättigten Fettsäureresten verestert ist (Olsson und Salem, 1997), resultieren bei geringerer Kollisionsenergie eher Fragmente mit einem höheren Masse/Ladungsverhältnis und umgekehrt.

Bei der Untersuchung der Struktur intakter Phosphonolipidspezies haben sich besonders massenspektrometrische Methoden verdient gemacht. Während für die Klasse der Sphingophosphonolipide bereits eine Reihe von MS-Daten existieren (Jayasimhulu et al., 2007; Kariotoglou und Mastronicolis, 2003; Liebisch et al., 1999), gibt es noch deutlichen Bedarf an MS-Daten und Fragmentierungsmustern für die Klasse der Glycerophosphonolipide.

## **Spektroskopie**

Zur Identifikation von Phosphonolipiden in biologischen Proben wurden überwiegend spektralanalytische Methoden herangezogen. Im IR-Spektrum sind hierfür Banden bei 680 cm<sup>-1</sup> bzw. 735 cm<sup>-1</sup> für die (P-C)-Bindung und bei 1180 cm<sup>-1</sup> für die (O-P-C)-Bindung beschrieben (Mukhamedova et al., 1985, Dembitskii, 1988). Jedoch ist der Unterschied zwischen Phospho- und Phosphonolipiden im NMR-Spektrum deutlicher, da die (P-CH<sub>2</sub>) Protonen im Unterschied zu den (P-O-CH<sub>2</sub>) Protonen zu tiefem Feld verschoben sind (Baer und Basu, 1969). Laut Benezra et al. (1970) erzeugen die (P-CH<sub>2</sub>) Protonen im <sup>1</sup>H-NRM-Spektrum ein Multiplett bei 2,72 ppm und die (P-O-CH<sub>2</sub>) Protonen ein Singulett bei 0,89 ppm.

## **Sonstige Methoden**

Darüber hinaus ist eine Identifikation von Phospho- und Phosphonolipiden durch enzymatische oder saure bzw. basische Hydrolyse möglich. Hierbei werden Fettsäuren,

Glycerin und vor allem die entsprechenden Phosphor- bzw. Phosphonsäurederivate frei, welche getrennt voneinander untersucht werden können. Da die (P-C) Bindung der Phosphonolipide wesentlich stabiler als die (P-O-C) Bindung der Phospholipide ist, werden bei einer sauren Hydrolyse keine Aminoalkohole (Ethanolamin, Cholin) frei, was zur Unterscheidung von Phospho- und Phosphonolipiden dienen kann (Mukhamedova und Glushenkova, 2000). Mittels säurekatalysierter Methanolyse wurde die Struktur von Sphingophosphonolipiden untersucht, wobei Fettsäuren, Phosphonsäurederivate und Sphingosinbasen freigesetzt wurden (Baer und Stanacev, 1966; Itasaka et al., 1973; Moschidis, 1983; Thompson, 1969). 2-Methyl- und 2-Dimethyl-derivate von Aminoethylphosphonsäure wurden ebenfalls nach der Hydrolyse von Sphingophosphonolipiden beobachtet (Kittredge et al., 1967 und 1969). Eine gute Möglichkeit zur Identifikation von Hydrolyseprodukten bietet die Untersuchung mittels GC bzw. GC-MS nach Hydrolyse und Derivatisierung mit TMS (Itasaka et al., 1973, Matsubara, 1975). Das Massenspektrum enthielt hierbei charakteristische Ionen mit  $m/z$  58, 72 und 225.

## 2.5.2 Analytische Fragestellung und Methodenauswahl

Die analytische Fragestellung bestand grundsätzlich darin, eine sichere und effiziente Methode zur Bestimmung der bisher nur unzulänglich erforschten Glycerophosphonolipide zu entwickeln. Ferner soll diese Methode dann zur Untersuchung der Glycerophosphonolipide im Eigelb dienen.

Das erste Problem auf dem Weg zur Bewältigung dieser Aufgabe war, dass keine Referenzsubstanzen für diese Lipidklasse kommerziell erhältlich sind. Somit mussten diese selbst synthetisiert werden. Zur Synthese von Phosphono-Analogen von Phosphatidylethanolamin und -cholin existiert eine Reihe von Publikationen (Baer und Stanacev, 1964; Baer und Basu, 1968; Chacko und Hanahan, 1969; Mucha et al., 1995, Rosenthal und Pousada, 1968; Turner et al., 1968; Yamauchi et al., 1986). Aufgrund der vereinfachten Prozedur und der hohen Ausbeute (60 %), wurde die Methode von Yamauchi et al. (1986) zur Synthese einer Referenzsubstanz für Glycerophosphonolipide verwendet (siehe Abb. 4-9). Nicht beschrieben war dabei jedoch die Synthese der 2-N-Benzoyloxycarbonyl-aminoethylphosphonsäure als Schutz der

Aminogruppe (der Aminoethylphosphon-säure) bei der Veresterung. Einen Ausweg boten hierbei Mucha et al. (1995) mit einer vereinfachten Methode zur Synthese einer N-geschützten Aminoalkylphosphonsäure (siehe Abb. 4-8). Da laut Moschidis et al. (1984) die Eigelb-Phosphonolipide zu 98,1 % aus den Phosphono-Analogen von Phosphatidylethanolamin bestehen, wurde auf die sehr aufwendige Synthese von Phosphono-Analogen des Phosphatidylcholins verzichtet.

Das nächste analytische Problem bestand aus der Trennung der chemisch sehr ähnlichen Phospho- und Phosphonolipide mit chromatographischen Methoden. Neben den DC-Methoden von Moschidis et al. (1984) und Kapoulas (1969) gibt es hierfür in der Literatur bisher nur wenige Ansätze. Ein großer Nachteil der DC-Methode von Kapoulas (1969) besteht zudem in der Gefahr eines hydrolytischen Angriffs, aufgrund des hohen Anteils an Essigsäure im Eluenten sowie in der Lipid-Autoxidation durch Luftsauerstoff.

Einen Ausweg bietet die HPLC, welche zudem eine höhere Auflösung und Empfindlichkeit sowie eine bessere Reproduzierbarkeit aufweist. Die zur Trennung der Phospho- von den Phosphonolipiden bisher beschriebene HPLC-Methode (Moschidis und Andrikopoulos, 1987) beruht auf einer stark aciden Ionenaustauschersäule Partisil SCX (mit Benzolsulfonsäure modifiziertes Kieselgel) mit einem Gradienteneluenten-System aus Methanol/Wasser (4:1, v/v) und Acetonitril sowie UV-Detektion. Ein großer Nachteil der SCX-Säule ist die von Nakamura et al. (1979) beschriebene geringe Lebensdauer (< 2 Monate bei täglichem Gebrauch). Daher sollen zunächst robustere HPLC-Säulen (z. B. auf Basis von unmodifiziertem Kieselgel) auf ihre Eignung zur Trennung der Phospho- von den Phosphonolipiden hin untersucht werden. Weiterhin ist die Quantifizierung von Lipiden mit UV-Detektion aufgrund der unterschiedlichen Response von gesättigten und ungesättigten Fettsäureresten eher problematisch (Hoving, 1995). Da der ELSD vom Sättigungsgrad der Lipide unabhängig ist, stellt dieser für die Detektion der Phospho- und Phosphonolipide die Methode der Wahl dar.

Aufgrund der sehr geringen zu erwartenden Konzentrationen sollen zur Identifizierung der Phosphonolipide vor allem massenspektrometrische Methoden zum Einsatz kommen. Da ESI-MS hierbei eine schonende und effiziente Methode darstellt, eignet sich diese besonders zur Identifikation intakter Moleküle. Das analytische Problem der fehlenden MS-Daten, hinsichtlich eines charakteristischen Fragmentierungsmu-

sters für Glycerophosphonolipide, kann somit mittels ESI-MS<sup>2</sup> ebenfalls beseitigt werden

### 2.5.3 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist notwendig um die Phospholipide aus der Probenmatrix zu extrahieren und störende Inhaltsstoffe wie Proteine und Kohlenhydrate weitestgehend vor der chromatographischen Trennung zu entfernen. Grundsätzlich wird zwischen Flüssig-flüssig- und Festphasenextraktion unterschieden.

Bei der Flüssig-flüssig-Extraktion (FFE) wird die Probe zu zwei nicht-mischbaren Flüssigkeiten gegeben, welche zwei Phasen bilden. Für gewöhnlich wird hierfür ein lipophiles, organisches Lösemittel in Kombination mit Wasser verwendet. Da die Phospholipide aufgrund der funktionellen Kopfgruppe zu den polaren Lipiden gehören, eignen sich polare Lösemittel wie Methanol oder Ethanol am besten für die Extraktion. Die Standardmethode zur Extraktion von Lipiden aus biologischen Proben wurde von Folch et al. (1957) beschrieben. Bei dieser Methode wird ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (2:1, v/v) als Extraktionsmittel verwendet. Eine Modifizierung zur Vereinfachung dieser Methode wurde von Bligh und Dyer (1959) entwickelt. Durch eine zusätzliche Verwendung von Wasser ist die Trennung der Lipide in einem Schritt möglich. Generell wird die Folch-Methode eher bei Gewebeproben und die Bligh & Dyer-Methode eher bei flüssigen biologischen Proben angewandt (Schiller et al., 2004). Eine umweltfreundlichere Methode wurde von Radin (1981) veröffentlicht. Statt des giftigen Chloroform/Methanol-Gemisches wird auf ein Hexan/Isopropanol-Gemisch zurückgegriffen. Neben den Methoden von Bligh & Dyer und Folch zur Extraktion der Gesamtlipide können die Phospholipide des Eigelbs auch selektiv mit Ethanol und Aceton extrahiert werden (Kivini et al., 2004; Schneider, 1989). Hierbei werden zuerst mit Aceton die Triacylglyceride und das Cholesterol und anschließend die Phospholipide mit Ethanol extrahiert. Diese Methode bedient sich der Tatsache, dass Phospholipide zwar sehr gut in Ethanol, aber kaum in Aceton löslich sind (Nielsen, 2007).

Obwohl sich FFE-Methoden bei der Lipidanalytik bewährt haben, sind der immense Verbrauch an gesundheitsschädlichen organischen Lösemitteln sowie der hohe Zeit-

aufwand nicht zu vernachlässigen. Die Festphasenextraktion (SPE) kann da Abhilfe schaffen. Das Prinzip der SPE besteht darin, dass der Analyt an einer stationären Phase adsorbiert wird und erst gezielt durch bestimmte Lösemittel wieder freigesetzt wird. Als Festphase haben sich besonders Säulen aus Kieselgel sowie aus mit Cyano- propyl- oder Aminopropylgruppen modifiziertem Kieselgel bewährt (Ruiz-Gutierrez und Perez-Camino, 2000). Zur Elution eignen sich Lösemittelsysteme aus Methanol, Chloroform oder Hexan. Trotz der Vorteile einer schnellen und verbrauchsarmen Methode, wird die FFE bei der Extraktion der Phospholipide überwiegend angewandt. Denn bei großen Probenmengen werden die Festphasen schnell überladen und die Folge ist eine verminderte Wiederfindung. Zudem muss bei quantitativer Bestimmung die Geschwindigkeit der Extraktion aufgrund der substanzspezifischen Adsorption am Festphasenmaterial zeitaufwendig ausgetestet werden. Große Sorgfalt sollte auch hinsichtlich der Gefahr der Autoxidation der Phospholipide aufgebracht werden. Aus diesem Grund sollten die Lipidproben vor Sauerstoff, Licht und höheren Temperaturen weitestgehend geschützt werden. Als Lagerungstemperatur für die extrahierten Proben wurden  $-70\text{ °C}$  empfohlen (Singh und Jiang, 1995). Zusätzlich sollen zur Vermeidung von Kontaminationen auf Labormaterialien aus Kunststoffen verzichtet und nur „high-grade“-Lösemittel verwendet werden. Ein Zusatz von Antioxidationsmitteln wie butyliertes Hydroxytoluol wurde außerdem beschrieben (Hoving, 1995). Jedoch sollte darauf geachtet werden, dass die verwendeten Reagenzien die UV-Detektion nicht beeinträchtigen (Patton und Robins, 1990).



## **3 Material und Methoden**

### ***3.1 Allgemeine Angaben***

Referenz- und Probelösungen wurden bei -18 °C in braunen Gefäßen (5 mL) aufbewahrt.

Alle verwendeten organischen Lösemittel hatten HPLC-Qualität und wurden von Acros (Geel, Belgien) bezogen.

HPLC-Eluenten wurden nach dem Mischen im Ultraschallbad unter Vakuum entgast. Das verwendete Wasser hatte Millipore 18 M $\Omega$  Qualität (Schwalbach/Ts., Deutschland).

### ***3.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse***

Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwert aus mindestens sechs Wiederholungsmessungen (n = 6) angegeben.

Zur Entscheidung, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Ergebnissen vorliegen, wurden die mittels Grubbs-Test von Ausreißern bereinigten Messreihen dem F- und Mittelwert-t-Test unterzogen. Die Varianzanalyse (ANOVA) wurde mittels Excel<sup>®</sup> 2003 von Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt. Wenn der berechnete Prüfwert dabei kleiner als die Suchgröße aus der t-Tabelle ist, liegt kein signifikanter Unterschied vor und umgekehrt (Hillebrand, 2000).

Der Linearitätstest nach Mandel wurde mittels SigmaPlot 10 von Systat (Erkrath, Deutschland) und mittels „Analyse-it“ von Statcon (Witzenhausen, Deutschland) durchgeführt.

### **3.3 *Probenaufarbeitung***

#### **3.3.1 Eigelb-Proben**

Die untersuchten Schaleneier wurden beim Discounter Penny im 10er-Pack bezogen und bei 8 °C im Kühlschrank bis zur Verwendung aufbewahrt (jedoch nicht länger als 10 Tage). Das Eigelb wurde durch Aufschlagen der Schaleneier gewonnen und manuell vom Eiklar getrennt. Anschließend wurde das Eigelb mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Papier getrocknet. Der Wassergehalt wurde mit der Trockenschrank-Methode (6 h, 103 °C) gravimetrisch bestimmt. Der resultierende Wassergehalt des Eigelbs betrug 47,2 ( $\pm$  0,6) %.

#### **3.3.2 Kaltextraktion**

Zur Extraktion der Phospho- bzw. Phosphonolipide wurden 50,0 g Eigelb homogenisiert und in Anlehnung an die Methoden von Kivini et al. (2004) und Folch et al. (1957) extrahiert. Hierbei wurden zuerst das Wasser und ein Teil der Neutrallipide mit 4 x 50 mL Aceton entfernt und anschließend mit 4 x 100 mL Chloroform/Methanol (2:1, v/v) die polaren Lipide extrahiert. Während der Extraktion wurden die Eigelb/Lösemittel-Suspensionen jeweils 15 min im Ultraschallbad behandelt. Das abfiltrierte Lösemittel aus den 4 Extraktionsschritten wurde anschließend zusammengeführt, abrotiert und der Rückstand in 10 mL Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen.

#### **3.3.3 Festphasenextraktion zur Fraktionierung des Eigelblipid-Extraktes**

Zur Aufreinigung der Phospho- bzw. Phosphonolipide wurden die Neutrallipide mittels Festphasenextraktion abgereichert. Ferner sollten die Phospho- bzw. Phosphonolipide durch Fraktionierung angereichert werden. Hierfür wurden Glaskartuschen (15 x 150 mm) mit jeweils 8 g Kieselgel 60 (5 – 17  $\mu$ m) befüllt und mit Chloroform konditioniert. Nach Aufgabe von 1 mL Lipid-Extrakt (siehe 3.3.2) wurden zuerst die Neutrallipide mit 5 x 10 mL Chloroform abgereichert und anschließend die Phospho-

bzw. Phosphonolipide mit jeweils 5 x 10 mL Chloroform/Methanol-Gemischen (mit ansteigendem Methanol-Gehalt) fraktioniert. Das Lösemittel wurde anschließend abrotiert und der Rückstand in 5 mL Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen.

### **3.3.4 Enzymatische Behandlung von Eigelb mit Phospholipasen**

Für die Fermentation des Eigelbs wurden folgende Enzyme verwendet: Lecitase® Ultra, eine Phospholipase A<sub>1</sub> (mikrobiellen Ursprungs) wurde dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von Novozymes (Bagsvaerd, Dänemark) und Sternenzym PLP, eine Phospholipase A<sub>2</sub> (aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen) wurde dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von SternEnzym (Ahrensburg, Deutschland). Die Aktivität wurde von den jeweiligen Unternehmen mit 10.000 U/g für Lecitase® Ultra und mit 1.000 für Sternenzym PLP spezifiziert.

Die enzymatische Behandlung des Eigelbs erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 50 (± 0,1) °C im Wasserbad Typ 3041 (Köttermann, Deutschland) für 3 Stunden. Zum Abbruch der enzymatischen Reaktion wurde das fermentierte Eigelb auf 72 (± 0,1) °C aufgeheizt und für 5 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Der Ausgleich der unterschiedlichen Aktivitäten der verwendeten Enzyme erfolgte über die Dosierung im Eigelb: 0,1 % Phospholipase A<sub>1</sub> und 0,75 % Phospholipase A<sub>2</sub> (siehe 4.2.2).

### 3.4 *Analytische Methoden*

#### 3.4.1 Rheologische Messungen

Die rheologischen Messungen wurden unter Verwendung eines Physica UDS 200 (Anton Paar, Deutschland) durchgeführt. Zum Zubehör gehörten ein Platte/Platte-System (DIN 53018-1, Radius 50 mm, Spalt 0,6 mm) und ein TEK 150/UDS Peltierelement (Anton Paar, Deutschland), welches eine direkte Temperierung der Probe (max. dev. 0,2 °C) während der Messung ermöglichte.

Das temperaturabhängige Viskositätsverhalten wurde in Anlehnung an die Methode von Ternes und Werlein (1987a) bestimmt. Hierbei wird nach Probenzugabe (ca. 1,5 mg) und Einstellung des Messspalts die Temperatur linear erhöht (von 30 – 70 °C um 4 °C/min und von 70 – 100 °C um 2 °C/min) und die scheinbare Viskosität (konstante Scherrate von 26 s<sup>-1</sup>) kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (ein Messwert alle 10 Sekunden). Um eine Koagulation von Proteinen an der Proben-Oberfläche und einen Verlust von Wasser während der Messung zu vermeiden, wurde ein Überzug aus einem niedrigviskosen Paraffinöl (25 – 80 mPa\*s) verwendet. Der Einfluss des Paraffinöls auf die scheinbare Viskosität war dabei zu vernachlässigen.

Das Fließverhalten des verdünnten Eigelbs (40 %, v/v) wurde durch Messung der Schubspannung bei Erhöhung der Schergeschwindigkeit von 1 auf 500 s<sup>-1</sup> und konstanter Temperatur (30 °C) bestimmt. Da Eigelb ein strukturviskoses nicht-Newtonisches Fließverhalten aufweist (Telis-Romero et al., 2006), wurden die Fließparameter durch Regression der Fließkurven nach dem Modellansatz von Ostwald/De Waele ermittelt.

Die Überprüfung der Messgenauigkeit des Rheometers wurde mit mittels Kalibrieröl „Standard 2000 AW“ (ZMK-Analytik GmbH, Deutschland) bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 30 °C, 40 °C) durchgeführt.

Die eingestellten Messparameter sind in folgender Tabelle nochmals zusammengefasst (Tab. 3-1):

**Tab. 3-1:** Messparametereinstellungen für die Rheologie

Messparameter	Fließkurve	Punkt der Rose
Messsystem	MP 31 (50 mm, 0 °)	MP 31 (50 mm, 0 °)
Messzelle	TEK 150P	TEK 150P
Messspalt [mm]	0,6	0,6
Schergeschwindigkeit [ $s^{-1}$ ]	1 – 500	26
Temperatur [ $^{\circ}C$ ]	30	30 – 100
Vorscherung [s]	60 (bei $100 s^{-1}$ )	-
Ruhephase [s]	30	-
Messzeit [s]	60	1200

### 3.4.2 Penetrometrische Messungen

Die hitzeinduzierte Gelstabilität wurde mittels Penetrometer (OFD, Deutschland) bestimmt, welcher mit einem Metall-Stempel in der Form eines umgedrehten Kegelstumpfes (Durchmesser Grundfläche: 1,9 cm, Durchmesser Deckfläche: 1,0 cm) versehen war. Der Stempel wurde manuell auf die erhitzte Probe (Durchmesser: 2,7 cm) geführt und entsichert, wodurch dieser mit einer konstanten Kraft auf das Eigelbgel einwirken konnte. Die gemessene Eindringtiefe verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Gelstabilität der Probe. Zur Messung wurde verdünntes Eigelb (1:1, v/v) zuerst in einem temperierten Wasserbad 3041 (Köttermann, Deutschland) für 20 Minuten auf  $80^{\circ}C$  erhitzt und dann auf  $20^{\circ}C$  abgekühlt. Anschließend erfolgte die penetrometrische Bestimmung der Probe.

### 3.4.3 DC

Die Trennung der Phospho- von den Phosphonolipiden mittels Dünnschichtchromatographie erfolgte an Kieselgelplatten (0,2 mm Schichtdicke) ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G (Roth, Karlsruhe, Deutschland) nach den Methoden von Moschidis et al. (1984) und

Kapoulas (1969). Die Detektion der Phospho- und Phosphonolipide wurde mit Hilfe der Methode von Stillway et al. (1980) realisiert. Für das Sprühreagenz wurden folgende Substanzen verwendet: Molybdän(VI)-oxid (Sigma, Nr.: 69850), Molybdänpulver (Aldrich, Nr.: 203823) von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und 95 – 98 % Schwefelsäure ROTIPURAN® von Roth (Karlsruhe, Deutschland).

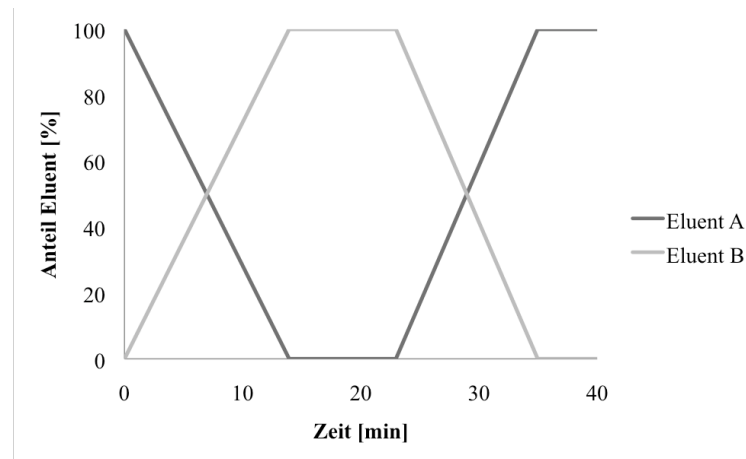
### 3.4.4 HPLC/ELSD

Die chromatographische Bestimmung der Phospholipide des Eigelbs erfolgte unter Verwendung eines WellChrom HPLC-Systems (Knauer, Berlin, Deutschland). Das HPLC-System bestand aus einer K1001 Pumpe, einem K1500 Solvent-Organizer und einem 3-Wege Injektor mit 20 µL Injektionsschleife. Zur Detektion wurde ein Sedex 75 Lichtstreuendetektor von S.E.D.E.R.E (Alfortville, Frankreich) verwendet. Die Geräteeinstellungen wurden in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 3-2):

**Tab. 3-2:** ELSD-Geräteeinstellung

ELSD-Parameter	Einstellung
Nebuliser gas (N <sub>2</sub> ) pressure [bar]	2,2
Drift tube temperature [°C]	50

Die Trennung erfolgte mittels Kieselgel-Säule (LiChrosorb 60 – 5, 150 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße) von Knauer (Berlin, Deutschland) und Gradienten-Elution, bei einer Flussrate von 1 mL/min. Eluent A bestand aus Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (80:19,5:0,5, v/v/v) und Eluent B aus Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v). Die Gradienten-Elution erfolgte nach folgendem Schema (Abb. 3-1):



**Abb. 3-1:** Schema der Gradienten-Elution für die HPLC-Trennung der Phospholipide, Eluent A: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (80:19,5:0,5, v/v/v), Eluent B: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v)

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Phospholipide erfolgte nach der Methode von Avalli und Contarini. (2005). Die Ergebnisse der Kalibrierung für PC, PE und LPC sind im Anhang zusammengefasst (siehe 8.1.1). Die Wiederfindungen nach der Probenaufbereitung wurden für die untersuchten Phospholipide mit  $86 \pm 3 \%$  (PE),  $91 \pm 2 \%$  (PC) und  $84 \pm 6 \%$  (LPC) bestimmt ( $n = 6$ ).

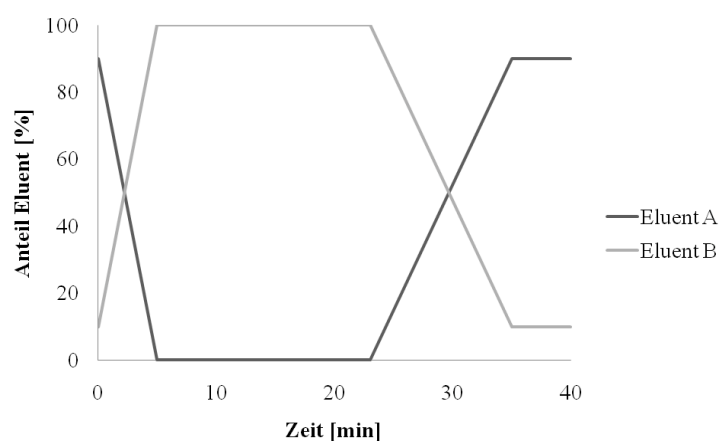
### 3.4.5 LC-MS<sup>2</sup>

Die Untersuchung der Lipidfraktionen erfolgte unter Verwendung eines „LCQ Ion trap“ Massenspektrometers mit ESI-Interface Kopplung (Thermo Finnigan, USA). Die Optimierung (Tuning) der Ionisation wurde mit Hilfe von Referenzsubstanzen (401 mg/L PnE, 323 mg/L PE, 440 mg/L PC, 513 mg/L LPC) vorgenommen. Dabei gelangte die Referenzlösung über eine Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 0,25 mL/min in das ESI-Interface. Als „Sheat gas“ wurde mittels Stickstoffgenerator bereitgestellter Stickstoff verwendet. Die zur Trennung verwendeten Parametereinstellungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 3-3):

**Tab. 3-3:** MS-Geräteeinstellung

MS-Parameter	Einstellung
Spray needle voltage [kV]	4,5
Sheat gas flow [units]	80
Aux gas flow [units]	20
Capillary temperature [°C]	270
Source current [uA]	80 (pos); 100 (neg)
Normalised collision energy [%]	55

Das verwendete HPLC-System war von Waters (Milford MA, USA), bestehend aus einer 616 Pumpe, einem 600S Controller und einem 717 Plus Autosampler. Die analytische Trennung erfolgte mit einer Kieselgel-Säule (LiChrosorb 60 – 5, 150 x 2 mm, 5 µm Partikelgröße) von Knauer (Berlin, Deutschland). Die Flussrate betrug dabei 0,4 mL/min. Die Methode wurde in Anlehnung an die HPLC-Methode von Avalli und Contarini (2005) entwickelt. Aufgrund der geringeren Flussrate musste der Chloroform-Anteil des Eluenten A auf 90 % erhöht und der Anteil an Eluent B bereits innerhalb der ersten fünf Minuten linear auf 100 % gesteigert werden (Abb. 3-2).



**Abb. 3-2:** Schema der Gradienten-Elution für die LC-MS-Trennung der Phospholipide, Eluent A: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (90:9,5:0,5, v/v/v), Eluent B: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v)



### 3.4.6 ATR/FT-IR

Die Untersuchung des synthetisierten Phosphonolipids wurde mittels Tensor 27 FT-IR System von Bruker (Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte dabei mittels Opus 6.5 Software. Zur Messung wurde eine MIRacle ATR-Zelle von PIKE Technologies (Madison WI, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen ZnSe-Kristall, welcher auf einer QuickLock Grundplatte montiert ist. Die verwendeten Parameter wurden in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 3-4):

**Tab. 3-4:** ATR/FT-IR Geräteeinstellung

Parameter	Einstellung
Phasenkorrekturmodus	Mertz
Apodisationsfunktion	Blackmann-Harris (3-Term)
Auflösung [ $\text{cm}^{-1}$ ]	4
Messzeit [scans]	16 (Probe, Hintergrund)
Apertur [mm]	6
Spiegelgeschw. [kHz]	20

### 3.5 *Synthese von PnE*

Die Synthese von PnE (1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonsäure) wurde in 3 Schritten durchgeführt (siehe 4.3.1):

1. Synthese von N-Benzyloxycarbonylaminoethylphosphonat (Mucha et al., 1995)
2. Kondensation von N-Benzyloxycarbonylaminoethylphosphonat mit 1,2-Dioctadecanoyl-glycerol (Yamauchi et al., 1986)
3. Hydrogenolyse zur Entfernung der N-Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Yamauchi et al., 1986).

#### 3.5.1 *Synthese von N-Benzyloxycarbonylaminoethylphosphonat*

Zum Schutz der Aminogruppe wurde die Aminoethylphosphonsäure mit einer N-Benzyloxycarbonyl-Gruppe versehen. Die Synthese von N-Benzyloxycarbonylaminoethylphosphonat erfolgte dabei gemäß Mucha et al. (1995). Die dafür erforderlichen Einwaagen sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 3-5):

**Tab. 3-5:** Einwaagen der zur Synthese von N-Benzyloxycarbonylaminoethylphosphonat eingesetzten Chemikalien

Chemikalie	Einwaage [g]
Aminoethylphosphonsäure (Aldrich, Nr.: 324817)	1,00
Trimethylchlorosilan (Aldrich, Nr.: C72854)	2,60
Triethylamin (Aldrich, Nr.: 471283)	2,40 in 32 mL CHCl <sub>3</sub>
Triethylamin (Aldrich, Nr.: 471283)	1,60 in 8 mL CHCl <sub>3</sub>
Benzylchloroformat (Aldrich, Nr.: 119938)	1,60
Natriumhydroxid (Sigma, Nr.: S5881)	20,00 in 500 mL H <sub>2</sub> O

### 3.5.2 Synthese von PnE

Die Synthese von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat erfolgte in Übereinstimmung mit Yamauchi et al. (1986). Hierfür wurden folgende Chemikalien verwendet:

**Tab. 3-6:** Einwaagen der zur Synthese von PnE verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Einwaage [g]
1,2-Dioctadecanoyl-glycerol (Sigma, Nr. D8519)	0,51
2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (Aldrich, Nr. 119490)	0,26
N-Benzoyloxycarbonylaminoethylphosphonat (synthetisiert)	0,33
Natriumsulfat (Sigma, Nr. 238597)	≈ 1
Palladium-Kohle 10 % (Aldrich, Nr. 205699)	0,11

### 3.5.3 Aufreinigung von PnE mittels SPE

Die Aufreinigung von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat bzw. Abreicherung der Neutrallipide erfolgte mittels Festphasenextraktion. Dabei wurden Glaskartuschen (15 x 150 mm) mit jeweils 6 g Kieselgel 60 (5 – 17 µm) von Roth (Karlsruhe, Deutschland) befüllt und mit Chloroform konditioniert. Nach Aufgabe des synthetisierten und recrystallisierten PnE wurde die Säule zuerst mit 4 x 10 mL Chloroform und weiter mit 4 x 10 mL Chloroform/Methanol (16:1, v/v) extrahiert. Anschließend konnte das aufgereinigte PnE mit 4 x 10 mL Chloroform/Methanol (2:1, v/v) von der Säule gelöst, das Lösemittel abrotiert und der Rückstand 24 h im Exsikkator getrocknet werden.

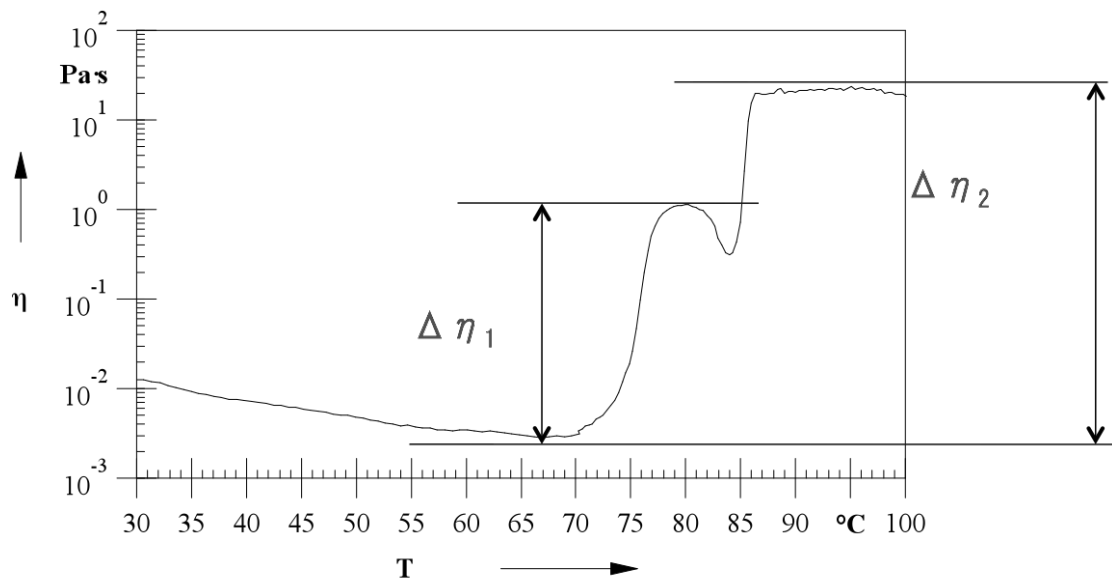
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Nachweis technofunktionaler Eigenschaften von Eigelb

Um die Veränderungen der technofunktionalen Eigenschaften von Eigelb während technologischer Prozesse wie Pasteurisation, Trocknungs- und Gefriervorgängen sicher und ohne einen zu großen personellen, apparativen und finanziellen Aufwand beschreiben zu können, sind physikalisch-analytische Methoden wie Rheologie oder Penetrometrie von besonderem Interesse.

#### 4.1.1 Bestimmung des Relativen Viskositätsmaximums

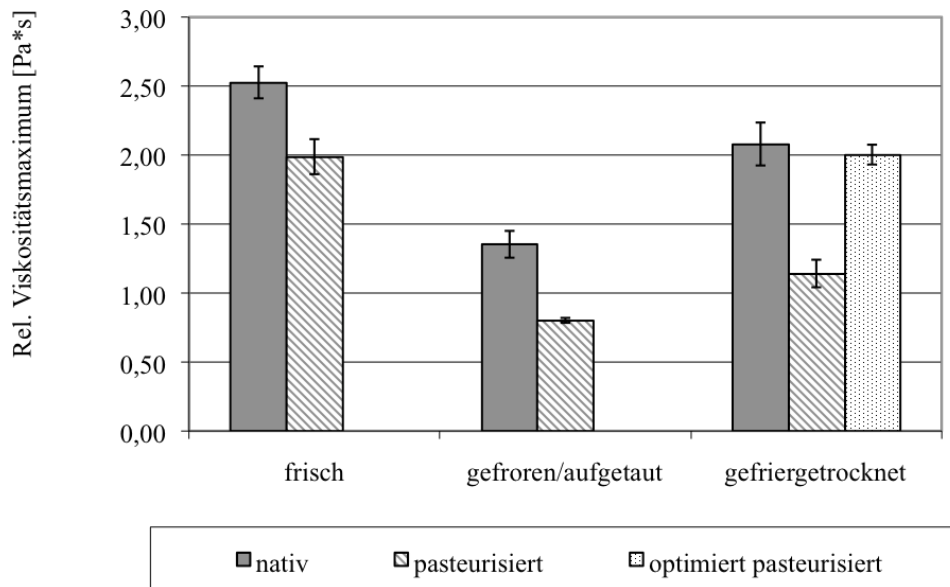
Das Relative Viskositätsmaximum (RVM) ist ein neuer Parameter, welcher zur Beurteilung der hitzeinduzierten Gelbildung und damit auch der technofunktionalen Eigenschaften des Eigelbs dienen kann. Die Grundlage für die Bestimmung des Relativen Viskositätsmaximums bilden Messungen der scheinbaren Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur. Laut Ternes (1988) erreicht warm gerührtes Eigelb einen Punkt optimaler Konsistenz, den *Punkt der Rose*, welcher sich durch Bildung einer Rosenblüten-ähnlichen Form auf einem mit Eigelb versehenem, angeblasenem Kochlöffel bemerkbar macht. Dieser *Punkt der Rose* resultiert aus der hitzeinduzierten Auffaltung der Livetine, welche mit den LDL-Mizellen des Plasmas wechselwirken können (Ternes et al., 1994). Die Folge davon ist die Bildung einer hitzeinduzierten, gelartigen Struktur, welche in der Lage ist Eigelbschäume zu stabilisieren (Ternes und Werlein, 1987b). Aufgrund des großen technologischen Nutzens in einer Vielzahl von Lebensmitteln, wie Saucen und feinen Desserts, kann die Ausbildung dieser fließfähigen gelartigen Struktur zu den technofunktionalen Eigenschaften des Eigelbs gezählt werden. Die Ausbildung der gelartigen Struktur korreliert dabei mit der Viskosität und kann durch Messung der scheinbaren Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt werden. In der Temperaturspanne zwischen 30 und 100 °C zeigt verdünntes Eigelb (40 %, v/v) ein Minimum und zwei Maxima der scheinbaren Viskosität (bei konstanter Scherrate von 26 s<sup>-1</sup>) (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1:** Messung der scheinbaren Viskosität von verdünntem Eigelb (40 %, v/v) in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstanter Scherrate von  $26 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta\eta_1$  = Differenz zwischen dem Minimum und dem erstem Maximum der scheinbaren Viskosität (Relatives Viskositätsmaximum),  $\Delta\eta_2$  = Differenz zwischen dem Minimum und dem zweiten Maximum der scheinbaren Viskosität

Das erste Viskositätsmaximum (Abb. 4-1) ergibt sich dabei aus der Erhöhung der Viskosität am *Punkt der Rose*. Demnach kann die Differenz zwischen dem Minimum und dem ersten Maximum der scheinbaren Viskosität ( $\Delta\eta_1$ ), das Relative Viskositätsmaximum, zur Bestimmung der Stärke der hitzeinduzierten gelartigen Struktur am *Punkt der Rose* herangezogen werden.

Besonders nützlich hat sich die Bestimmung des Relativen Viskositätsmaximums beim Nachweis der technofunktionellen Eigenschaften von gefriergetrocknetem Eigelb mit einer selbstentwickelten, neuartigen Methode gezeigt.



**Abb. 4-2:** Veränderungen hinsichtlich des Relativen Viskositätsmaximums von nativem Eigelb, konventionell tiefgefrorenem/wieder aufgetautem Eigelb und gefriergetrocknetem Eigelb mit  $n = 6$  (Jaekel et al., 2008)

In Abb. 4-2 ist zu sehen, dass das Relative Viskositätsmaximum von konventionell tiefgefrorenem/wiederaufgetautem Eigelb im Vergleich zu nativem Eigelb dramatisch abnimmt. Dies trifft auf das handelsüblich pasteurisierte Eigelb noch in besonderem Maße zu. Die Verluste hinsichtlich des Relativen Viskositätsmaximums von gefriergetrocknetem/rehydratisiertem Eigelb sind dagegen deutlich geringer und unterscheiden sich nicht signifikant von denen des handelsüblich pasteurisierten Eigelbs.

Auch bei der für die Gefrier Trocknung entwickelten Vorkristallisation konnten die Veränderungen der technofunktionellen Eigenschaften mit Hilfe der Bestimmung des Relativen Viskositätsmaximums weiter verfolgt werden (Tab. 4-1).

**Tab. 4-1:** Veränderungen hinsichtlich des Relativen Viskositätsmaximums (RVM) von nativem und pasteurisiertem Eigelb in Abhängigkeit von der Vorkristallisation mit  $n = 6$  (Jaekel et al., 2008)

Eigelb	nativ	vorkristallisiert	pasteurisiert	pasteurisiert und vorkristallisiert
RVM [Pa*s]	$2,5 \pm 0,12$	$2,5 \pm 0,12$	$2,0 \pm 0,13$	$2,0 \pm 0,09$

Obwohl, wie in Tab. 4-1 gezeigt, ein signifikanter Unterschied zwischen nativem und pasteurisiertem Eigelb hinsichtlich des Relativen Viskositätsmaximums besteht, so gilt dies jedoch nicht für die Vorkristallisation. Durch Bestimmung des Relativen Viskositätsmaximums konnte hierbei gezeigt werden, dass die Vorkristallisation von nativem und handelsüblich pasteurisiertem Eigelb keinen messbaren Einfluss auf die Fähigkeit zur Ausbildung der hitzeinduzierten gelartigen Struktur hat.

#### 4.1.2 Bestimmung des Fließverhaltens mittels Rheologie

Das Fließverhalten spielt bei vielen Prozessen in der Lebensmittelindustrie wie bei der Verarbeitung oder beim Transport eine wichtige Rolle. Durch Kenntnis der Fließparameter kann gezielt Einfluss auf die Arbeitsweise der Prozesstechnik wie hydraulischer Transport mittels Pumpen, Mischprozesse, Trenntechnik bis hin zur Produktabfüllung genommen werden. Ferner dient die Bestimmung der Fließparameter der Charakterisierung von Strukturveränderungen durch technologische Prozesse wie Pasteurisation, Gefrier- oder Trocknungsvorgängen.

In der folgenden Tabelle (Tab. 4-2) wurden die Fließparameter von nativem und pasteurisiertem Eigelb in Abhängigkeit von der Vorkristallisation zusammengefasst. Der Konsistenzfaktor  $K$  steht synonym für die Viskosität der Probe. Ein hoher Wert für  $K$  zeigt eine zähe Konsistenz für das in Wasser gelöste getrocknete Eigelbpulver an, was sich auf die weitere Verarbeitung negativ auswirkt. Der Fließindex  $n$  charakterisiert das allgemeine Fließverhalten. Natives verdünntes Eigelb zeigt mit einem Wert von  $n = 1$  ein strukturloses Newtonsches Fließverhalten.

**Tab. 4-2:** Veränderungen des Fließverhaltens von nativem und handelsüblich pasteurisiertem Eigelb im Hinblick auf die Vorkristallisation mit  $n = 6$  (Jaekel et al., 2008)

Eigelb	nativ	vorkristallisiert	pasteurisiert	pasteurisiert und vorkristallisiert
$[Pa*s^n]$	$0,014 \pm 0,005$	$0,014 \pm 0,004$	$0,033 \pm 0,004$	$0,033 \pm 0,006$
$n$	$0,99 \pm 0,05$	$1,00 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,06$

Im Gegensatz zur Vorkristallisation führt die handelsübliche Pasteurisation zu einer signifikanten Veränderung im Fließverhalten von verdünntem Eigelb (Abb. 4-2). Während sich der Konsistenzfaktor erhöht, sinkt der Fließindex signifikant. Das handelsüblich pasteurisierte Eigelb zeigt somit eine höhere Viskosität und scherverdünnendes Verhalten, was auf eine Schädigung der Eigelbinhaltsstoffe schließen lässt. Die Vorkristallisation hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Fließverhalten von nativem und pasteurisiertem Eigelb.

In der folgenden Tabelle (Tab. 4-3) wurde das Fließverhalten von nativem und pasteurisiertem Eigelb bei unterschiedlichen Gefrier- bzw. Trocknungsverfahren zusammengefasst.

**Tab. 4-3:** Veränderungen im Fließverhalten von nativem und pasteurisiertem Eigelb in Abhängigkeit von der Gefriermethode (gefriergetrocknet/rehydratisiert und konventionell tiefgefroren/aufgetaut), mit  $n = 6$  (Jaekel et al., 2008)

Eigelb	gefrier- getrocknet <sup>a</sup>	tiefgefroren/ aufgetaut <sup>a</sup>	gefrier- getrocknet <sup>b</sup>	tiefgefroren/ aufgetaut <sup>b</sup>	gefrier- getrocknet <sup>c</sup>
$K [Pa*s^n]$	$0,16 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,11$	$0,14 \pm 0,02$
$n$	$0,78 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,03$

<sup>a</sup> natives Eigelb

<sup>b</sup> handelsüblich pasteurisiertes Eigelb (Temperaturen oberhalb von 65 °C)

<sup>c</sup> unter optimierten Bedingungen pasteurisiertes Eigelb (64 °C, 2 min)



Das konventionell tiefgefrorene Eigelb zeigt im Vergleich zum nativen bzw. pasteurisierten Eigelb die deutlichsten Unterschiede (Tab. 4-3). Der Konsistenzfaktor hat sich erheblich erhöht, was auf eine höhere Zähigkeit des gefrorenen und wieder aufgetauten Eigelbs schließen lässt. Der Fließindex ist wiederum deutlich kleiner 1, wodurch zusätzlich scherverdünnendes Verhalten angezeigt wird, was auf einen Zerfall von Aggregationen durch die Scherkräfte hindeutet. Bei vielen technologischen Prozessen (z. B. Rühren, Pumpen) wirkt sich ein scherverdünnendes Fließverhalten zudem eher nachteilig aus. In Kombination mit der erhöhten Zähigkeit ist dieses Eigelb somit in Hinblick auf eine industrielle Verwendung als problematisch zu beurteilen. Die Ergebnisse für die vorkristallisierten und im Kontaktplattenverfahren schnellgefrorenen Proben liegen in etwa dazwischen, was auf eine schonendere Behandlung während des Gefrierprozesses schließen lässt. Die gefrierinduzierte Gelbildung konnte mit dem neuartigen Kontaktplattenverfahren in Kombination mit der Vorkristallisation deutlich verringert werden.

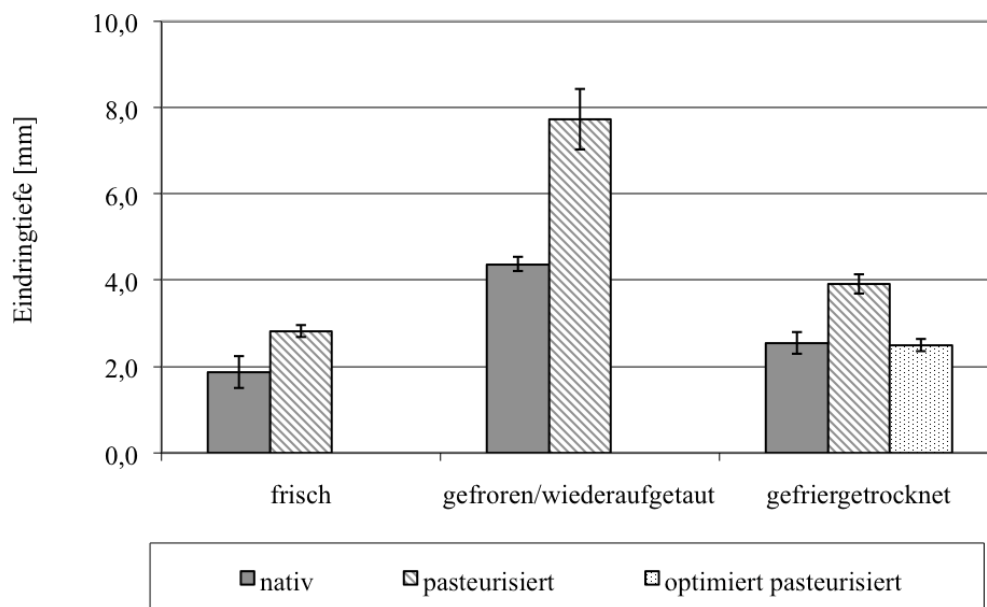
Der Effekt der Hochtemperaturpasteurisation ist jedoch hierbei kaum ausgeprägt.

#### **4.1.3 Bestimmung der Gelstabilität mittels Penetrometrie**

Die thermische Koagulierbarkeit der Eigelbproteine gehört zu den wichtigsten technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb. Beim Erhitzen von Eigelb oberhalb von 80 °C aggregieren die denaturierten Proteine und bilden, durch eine dreidimensionale Vernetzung untereinander ein schnittfestes Gel aus. Dieser Prozess wird laut Kiosseoglou und Paraskevopoulou (2005) durch hydrophobe Wechselwirkungen der Plasmaproteine dominiert und letztlich durch Bildung kovalenter Disulfid-Brücken unter Zuhilfenahme der Proteine der Granula stabilisiert. Die Festigkeit des Gels korreliert mit dem Erhalt der technofunktionellen Eigenschaften des Eigelbs und kann durch Messung der Eindringtiefe mittels Penetrometer bestimmt werden. Eine hohe Eindringtiefe des Penetrometers in das Gel entspricht dabei einer geringen Gelfestigkeit und lässt auf eine Beeinträchtigung der technofunktionellen Eigenschaften schließen. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der gefriergetrockneten Eigelbproben korrelieren sehr gut mit denen des Relativen Viskositätsmaximums (vgl. Abb. 4-2). In Abb. 4-3 zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Eindringtiefe, d.h. eine deutliche Ab-

nahme der Gelfestigkeit des nativem Eigelbs nach konventionellem Tiefgefrieren und Wiederauftauen. Dies gilt jedoch nicht für die gefriergetrockneten und rehydratisierten Eigelbproben. Hier zeigt sich kein signifikanter Anstieg der Eindringtiefe des Penetrometers. Nur beim handelsüblich pasteurisierten Eigelb ist dies der Fall. Demnach führt die thermische Vorschädigung des Eigelbs (bei Temperaturen bis zu 68 °C) während der Pasteurisation zu einem verstärkten Verlust technofunktionaler Eigenschaften. Noch dramatischer ist dieser Effekt jedoch beim handelsüblich pasteurisierten Eigelb. Bei Pasteurisationstemperaturen höher als 64 °C führte die anschließende Gefrierdrying dazu, dass die Herstellung von Sabayon, einem Eigelbschaum mit Weinaroma welcher sich insbesondere durch seine cremig schaumige Konsistenz auszeichnet (Bickel, 1984), nicht mehr möglich war.

Durch Optimierung der Pasteurisationsbedingungen (64 °C, 2 min) konnte die Vorschädigung jedoch deutlich verringert werden. Zwischen den Werten der Eindringtiefe des gefriergetrockneten nativen und des unter optimierten Bedingungen pasteurisierten Eigelbs ist kein signifikanter Unterschied erkennbar (Abb. 4-3).



**Abb. 4-3:** Veränderungen hinsichtlich des Stabilität des hitzeinduzierten, dreidimensional vernetzten Gels von nativem Eigelb, konventionell tiefgefrorenem und wieder aufgetautem Eigelb und gefriergetrocknetem Eigelb, mit n = 6 (Jaekel et al., 2008)

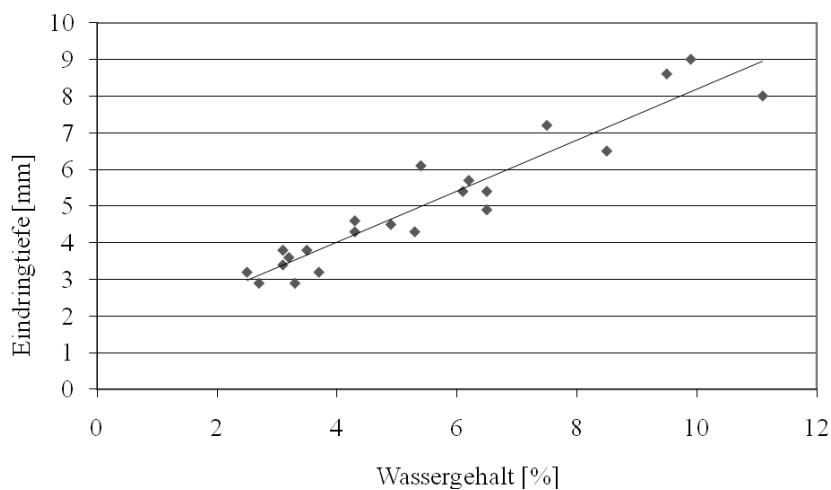
Bei der Vorkristallisation korrelieren die Ergebnisse der penetrometrischen Messungen ebenfalls gut mit denen des Relativen Viskositätsmaximums (vgl. Tab. 4-2). Die

Vorkristallisation hat keinen signifikanten Einfluss auf die hitzeinduzierte Gelstabilität von Eigelb (Tab. 4-4). Lediglich die Werte für Eindringtiefe der handelsüblich pasteurisierten Eigelbproben weichen signifikant von denen des nativen Eigelbs ab.

**Tab. 4-4:** Veränderungen hinsichtlich der Stabilität des hitzeinduzierten, dreidimensional vernetzten Gels von nativem und pasteurisiertem Eigelb in Abhängigkeit von der Vorkristallisation, mit  $n = 6$  (Jaekel et al., 2008)

Eigelb	nativ	vorkristallisiert	pasteurisiert	pasteurisiert und vorkristallisiert
Eindringtiefe [mm]	$1,9 \pm 0,37$	$1,7 \pm 0,20$	$2,9 \pm 0,14$	$2,5 \pm 0,29$

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Untersuchungen mittels Penetrometrie war der lineare Zusammenhang zwischen dem Rest-Wassergehalt des Eigelbs nach der Gefriertrocknung und der Eindringtiefe (Abb. 4-4, 8.1.2).



**Abb. 4-4:** Lineare Korrelation zwischen dem Rest-Wassergehalt nach der Gefriertrocknung und der Eindringtiefe des Penetrometers mit  $R^2 = 0,901$  (Jaekel et al., 2008)

Der Rest-Wassergehalt sollte ungeachtet von Erwägungen betreffend der mikrobiellen Stabilität nach der Gefriertrocknung nicht mehr als 6 % im Eigelb betragen. Bei Werten unter 5,8 % liegt das Wasser vollständig gebunden im Eigelb vor. Die Proteine

sind somit während des Tauens im Glaszustand stabilisiert (Powrie et al., 1963). Bei höheren Rest-Wassergehalten ist diese Stabilisierung nicht mehr gewährleistet. Die Eigelbproteine verlieren im zunehmenden Maße die Fähigkeit, ein stabiles hitzeinduziertes Gel auszubilden.

Die Bestimmung der Eindringtiefe mittels Penetrometrie stellt somit eine sichere und hinreichend empfindliche Methode zur Bewertung der technofunktionalen Eigenschaften von Eigelb dar. Sie ist zudem robust und zeichnet sich durch eine einfache Handhabung aus.

## **4.2 Modifizierung der Phospholipide mit Phospholipasen**

### **4.2.1 Charakterisierung der thermoinduzierten Gelbildung von Eigelb**

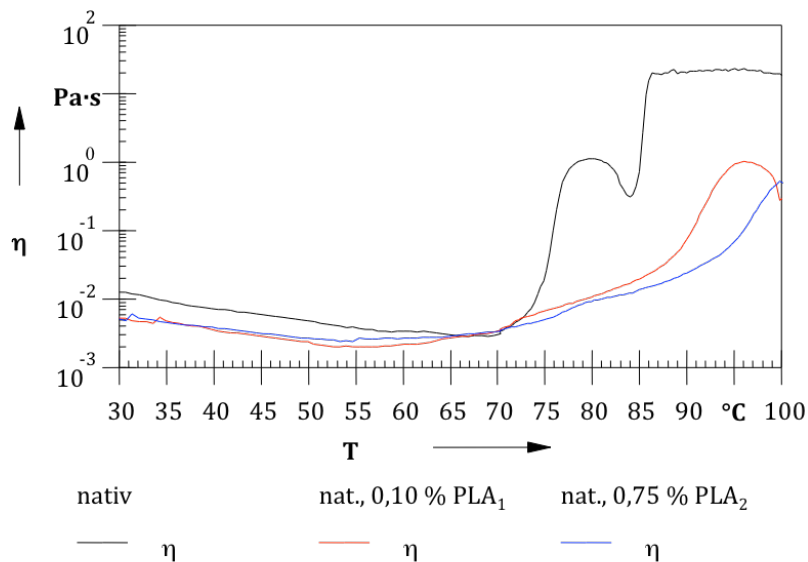
Laut Clark et al. (2001) beinhaltet der Mechanismus der hitzeinduzierten Gelbildung uniformer, globulärer Proteine prinzipiell drei Phasen: 1. thermische Auffaltung und Dimerisierung der Proteine, 2. Bildung linearer Stränge aus kleinen, sphärischen Aggregaten und 3. ungeordneten Quervernetzung dieser Stränge. Obwohl das generelle theoretische Modell zur Beschreibung der hitzeinduzierten Gelbildung des Eigelbs herangezogen werden kann, muss jedoch beachtet werden, dass Eigelb keine isolierte Proteinlösung, sondern eine komplexe Dispersion ist. Eigelb kann durch Zentrifugation leicht in zwei Fraktionen unterteilt werden: Plasma und Granula. Das Plasma besteht zu 85 % aus LDL und zu 15 % aus Livetinen. Die Lipoproteine geringer Dichte sind sphärische Mizellen mit einem Kern aus Neutrallipiden (Triacylglyceride, Cholesterol und Cholesterylester) und einer Hülle aus Apolipoproteinen und Phospholipiden (Martin et al., 1964). Als Livetine wird dagegen eine wasserlösliche Proteinfraction bezeichnet, welche in weitere Untergruppen unterteilt werden kann, hauptsächlich in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Livetine (Martin et al., 1957). Die Granula besteht aus wasserunlöslichen Partikeln (Durchmesser 1,0 – 1,3  $\mu\text{m}$ ), welche wiederum zu 70 % aus HDL (High Density Lipoproteins), zu 16 % aus Phosvitin und zu 12 % aus LDL aufgebaut sind und dispergiert in der Fett-in-Wasser-Emulsion des Eigelbs vorliegen.

Laut Cordobés et al. (2004) kann die hitzeinduzierte Gelbildung des Eigelbs als ein mehrstufiger Mechanismus angesehen werden, welcher die Denaturierung der Proteine, die Aggregation von teilweise denaturierten Proteinen und die ungeordneten Assoziation dieser Protein-Aggregate beinhaltet.

### **Natives Eigelb**

Wie in Abb. 4-5 ersichtlich, zeigt verdünntes, natives Eigelb (40 %, v/v) bei ca. 65 °C zuerst ein Viskositätsminimum, gefolgt von einem steilen Anstieg der scheinbaren Viskosität (bei konstanter Scherrate von 26  $\text{s}^{-1}$ ) und einem Maximum bei ca. 79 °C. Laut Ternes und Werlein (1987a) ist der Anstieg zum ersten Viskositätsmaximum ein Resultat der Wechselwirkungen zwischen den aufgefalteten Livetinen und den teil-

weise denaturierten LDL. Die  $\alpha$ -Livetine liegen bereits bei einer Temperatur von 60 °C und die  $\gamma$ -Livetine bei einer Temperatur von 69 °C denaturiert vor (Dixon und Cotterill, 1981). Die Denaturierung der LDL beginnt bei Temperaturen oberhalb von 72 °C (Le Denmat et al., 1999).



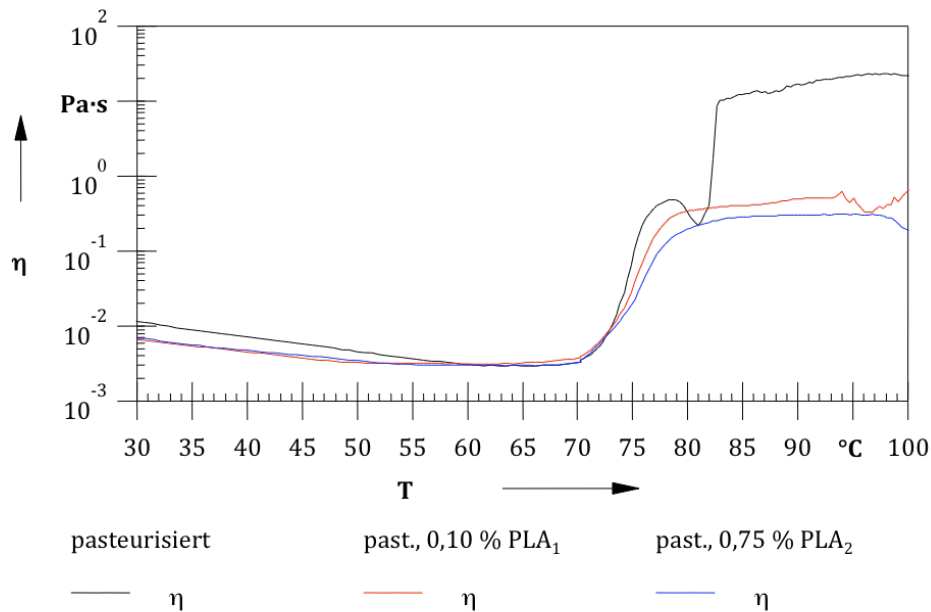
**Abb. 4-5:** Veränderungen im temperaturabhängigen Viskositätsverhalten von nativem Eigelb (nat.) nach Behandlung mit Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>) und Sternenzym PLP (PLA<sub>2</sub>) bei konstanter Scherrate von 26 s<sup>-1</sup>, mit n = 6 (Jaekel und Ternes, 2009)

Durch die Modifizierung der Phospholipide mit Phospholipasen, wurde das erste Viskositätsmaximum zu höheren Temperaturen verschoben (Abb. 4-5). Da dieser Anstieg der scheinbaren Viskosität auf die Wechselwirkungen zwischen den Livetinen und den LDL zurückzuführen ist, wird angenommen, dass aus der enzymatischen Behandlung des Eigelbs eine Beeinträchtigung dieser Wechselwirkungen resultiert. Nikiforidis und Kiosseoglou (2007) veröffentlichten kürzlich eine Arbeit über den Einfluss von Tweens (synthetische hydrophile Emulgatoren) bei der Inhibierung der hitzeinduzierten Destabilisierung von Emulsionen auf Eigelbbasis. Es wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei welchem Wechselwirkungen zwischen Tweens und den hydrophoben Außenbereichen des Grenzflächenfilms eine entscheidende Rolle spielen. Als Folge dessen sind die hydrophoben Außenbereiche des Grenzflächenfilms gegenüber hydrophoben Wechselwirkungen mit Proteinen geschützt und können während der Hitzebehandlung keine Aggregate bilden. Da Lysophosphatidylcholin, welches wäh-

rend der enzymatischen Behandlung vermehrt gebildet wird, ebenfalls ein effektiver hydrophiler Emulgator ist, können die Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen mit den Tweens direkt auf die Ergebnisse der Modifizierung der Eigelb-Phospholipide mit Phospholipasen übertragen werden. Demnach ist das freigesetzte LPC in der Lage die hydrophoben Außenbereiche der LDL-Mizellen vor hydrophoben Wechselwirkungen mit den denaturierten Livetinen zu schützen, was zu einem verzögerten Anstieg der Viskosität führt. Diese Vermutung wird untermauert durch das Modell von Mine (1997). Er konnte zeigen, dass sich durch thermische Behandlung der hydrophobe Kern der LDL-Mizellen nach außen wölbt und einen stabilen Komplex mit LPC und freien Fettsäuren bildet. Infolge dessen sind keine hydrophoben Wechselwirkungen zwischen LDL und denaturierten Livetinen möglich und das erste Viskositätsmaximum wird zu höheren Temperaturen hin verschoben.

### **Handelsüblich pasteurisiertes Eigelb**

Der Vergleich von handelsüblich pasteurisiertem Eigelb (Abb. 4-6) mit nativem Eigelb (Abb. 4-5) zeigt hinsichtlich des temperaturabhängigen Viskositätsverhaltens keinen grundlegenden Unterschied. Jedoch zeigt nach enzymatischer Behandlung mit Phospholipasen das handelsüblich pasteurisierte Eigelb im Gegensatz zum nativen Eigelb einen rapiden Anstieg der scheinbaren Viskosität (Scherrate beträgt konstant  $26 \text{ s}^{-1}$ ) bei ca.  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die enzymatische Behandlung mit Phospholipasen führte demnach beim handelsüblich pasteurisierten Eigelb zu keiner signifikanten Verschiebung des ersten Viskositätsanstiegs. Es wird somit angenommen, dass die Hitzebehandlung des Eigelbs während der Pasteurisation zu Veränderungen innerhalb der LDL-Struktur geführt hat, welche die Bildung eines stabilen LPC/LDL-Komplexes verhindern konnte. Infolgedessen erfolgte keine Unterbindung der Wechselwirkungen zwischen den aufgefalteten Livetinen und den LDL-Mizellen.



**Abb. 4-6:** Veränderungen im temperaturabhängigen Viskositätsverhalten von handelsüblich pasteurisiertem (past.) und verdünntem Eigelb (40 %, v/v) nach Behandlung mit Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>) und Sternenzym PLP (PLA<sub>2</sub>) bei konstanter Scherrate von 26 s<sup>-1</sup>, mit n = 6 (Jaekel und Ternes, 2009)

Im Gegensatz zum unbehandelten Eigelb zeigt das mit Phospholipasen inkubierte handelsüblich pasteurisierte Eigelb kein definiertes Viskositätsmaximum, sondern einen trotz zunehmender Temperatur stagnierenden Verlauf der scheinbaren Viskosität (Abb. 4-6). Es bildete sich eine homogene gelartige, fließfähige Struktur aus, welche bis 100 °C stabil blieb. Es waren zudem keine sichtbaren Anzeichen von Protein-Aggregation, Bildung eines Gelnetzwerkes, Partikeln oder der Freisetzung von Lipiden sichtbar. Durch Modifizierung der Phospholipide des Eigelbs mit Phospholipasen wurde eine entscheidende Stufe der hitzeinduzierten Gelbildung des Eigelbs inhibiert. Bei genauer Betrachtung der Viskositätsverläufe unbehandelter Eigelbproben (vgl. Abb. 4-5 und Abb. 4-6) zeigt sich bei Temperaturen oberhalb 78 °C eine geringe Abnahme, gefolgt von einem zweiten deutlichen Anstieg der scheinbaren Viskosität. Laut Ternes und Werlein (1987a) sind die Neutrallipide bei Temperaturen bis zum Erreichen des ersten Viskositätsmaximums hauptsächlich im Inneren der LDL-Mizellen inkorporiert. Bei Temperaturen oberhalb davon beginnt jedoch durch Denaturierung und Destabilisierung der LDL-Partikel eine Freisetzung der Neutrallipide, wodurch die scheinbare Viskosität verringert wird. Welche Rolle die Scherkräfte hierbei spielen, ist noch unbekannt. Nach Freisetzung der Neutrallipide beginnt je-



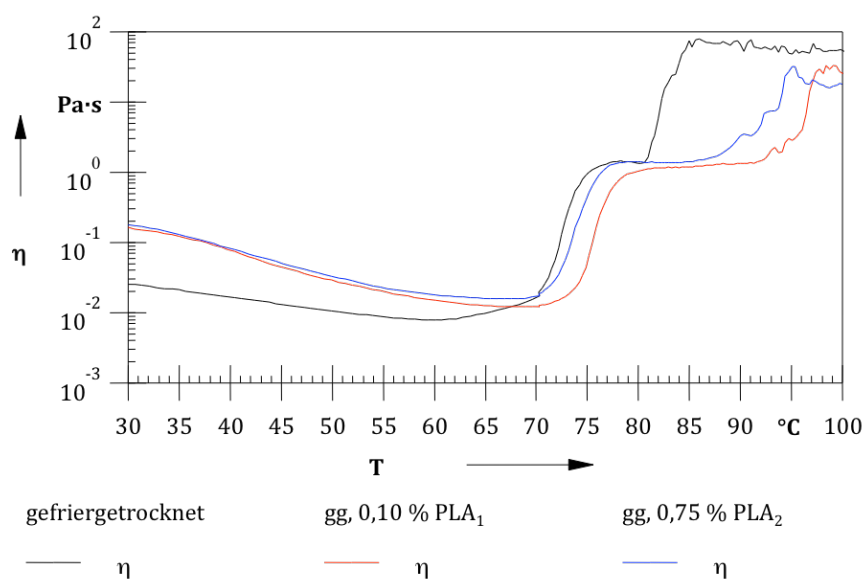
doch durch Denaturierung der Proteine, Aggregation und Assoziation ein weiterer starker Anstieg der scheinbaren Viskosität. Dies wird durch die Arbeit von Kumar und Mahadeva (1970) untermauert, welche Aggregation von Plasmaproteinen mit einem teilweisen oder vollständigen Verlust der Lipide in Verbindung bringt. Die Bildung unlöslicher LDL-Aggregate nach Verlust der Lipide würde auch den plötzlichen Wandel in der Textur (von fließfähig zu schnittfest) nach Überschreitung des zweiten Viskositätsminimums erklären. Eine irreversible Assoziation von Aggregaten der Plasma- und Granulabestandteile unter Ausbildung von kovalenten Disulfid-Brücken könnte die Gelbildung vervollständigen und stabilisieren, wie Kiosseoglou und Paraskevopoulou (2005) vorschlagen. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass kommerziell erhältliches gekühltes Eigelb bis zu 14 % Eiklar enthält. Somit könnten Eiklar-Proteine wie Ovalbumin ebenfalls eine Rolle spielen. Laut Donovan et al. (1975) denaturiert Ovalbumin bei Temperaturen oberhalb von 84 °C. Aufgrund dessen kann nicht zweifelsfrei geklärt werden, inwieweit der zweite Viskositätsanstieg durch Ovalbumin beeinflusst ist. Da jedoch der Viskositätsverlauf des handelsüblich pasteurisierten Eigelbs kaum von dem des nativen Eigelbs abweicht, sollte der Einfluss des geringen Eiklaranteils an der thermischen Gelbildung zu vernachlässigen sein.

Aufgrund der Stagnation der scheinbaren Viskosität beim enzymatisch behandelten und handelsüblich pasteurisierten Eigelb (Abb. 4-6) wird vermutet, dass die LDL-Mizellen durch Wechselwirkungen mit LPC vor einer Destabilisierung geschützt werden, und somit keine Freisetzung der Neutrallipide erfolgt. Ebenso ist bei Temperaturen bis zu 100 °C kein zweiter Viskositätsanstieg erkennbar, was zusätzlich auf eine Stabilisierung der LDL-Strukturen schließen lässt. Dieser Effekt ist sehr interessant für kommerzielle Applikation, da die cremig-schaumige Konsistenz selbst beim Kochen erhalten bleibt.

### **Gefriergetrocknetes Eigelb**

Grundsätzlich zeigen natives, handelsüblich pasteurisiertes und gefriergetrocknetes Eigelb den gleichen Verlauf im temperaturabhängigen Viskositätsverhalten (vgl. Abb. 4-5, und Abb. 4-7). Erst die Behandlung mit Phospholipasen führt hierbei zu deutlich sichtbaren Veränderungen. Die enzymatische Behandlung der gefriergetrockneten

und handelsüblich pasteurisierten Eigelbproben führte im Gegensatz zum nativen Eigelb zu keiner signifikanten Verschiebung des ersten Anstiegs der scheinbaren Viskosität (bei konstanter Scherrate von  $26 \text{ s}^{-1}$ ). Zusätzlich zeigt allein das enzymatisch behandelte und gefriergetrocknete Eigelb bei Temperaturen oberhalb von  $85 \text{ °C}$  einen zweiten Viskositätsanstieg (Abb. 4-7). Somit hat der Prozess der Gefrier Trocknung einen Einfluss auf die thermische Gelbildung des Eigelbs. Während die enzymatische Behandlung mit Phospholipasen bei den nativen und handelsüblich pasteurisierten Eigelbproben die Bildung von dreidimensional vernetzten festen Gelstrukturen verhinderte, gilt dies jedoch nicht für die gefriergetrockneten Eigelbproben.



**Abb. 4-7:** Veränderungen im temperaturabhängigen Viskositätsverhalten von gefriergetrocknetem Eigelb (gg) nach Behandlung mit Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>) und Sternezym PLP (PLA<sub>2</sub>), bei konstanter Scherrate von  $26 \text{ s}^{-1}$ , mit  $n = 6$  (Jaekel und Ternes, 2009)

Ein limitierender Faktor bei der Gefrier Trocknung von Eigelb ist die gefrierinduzierte Gelbildung. Dieser irreversible Prozess beginnt bereits bei Temperaturen unterhalb von  $-7 \text{ °C}$ , ist aber zwischen  $-10$  und  $-14 \text{ °C}$  am intensivsten (Powrie et al., 1963; Tellis und Kieckbusch, 1997). Bei der gefrierinduzierten Gelbildung lagern sich die LDL-Mizellen des Eigelbs zusammen und bilden eine weitmaschige Struktur aus. Dieser Prozess geht mit einer Erhöhung der Viskosität einher. Beim Einfrieren oberhalb des kritischen Temperaturbereiches kristallisiert vor allem das im Eigelb enthaltene Wasser aus. Dies führt zu einer Konzentrierung der löslichen Bestandteile des Eigelbs (z. B. Salze, wasserlösliche Proteine) im noch nicht auskristallisierten Was-

ser. Dementsprechend nimmt die Konzentration des freien, ungefrorenen Wassers in der Eigelbsuspension ab. Dies führt zu einem teilweisen Verlust der Hydrathülle der Proteine. Durch Umlagerungen der Lipoproteine erfolgt eine weitere Dehydratisierung der Proteine. Infolgedessen bildet sich durch Aggregation und Assoziation ein dreidimensionales Netzwerk aus (Chang et al., 1977; Miyawaki, 1992).

Obwohl durch die Kombination Vorkristallisation/Kontaktplattengefrierverfahren die gefrierinduzierte Gelbildung bei der Gefriertrocknung signifikant reduziert werden konnte (Jaekel et al., 2008), ist eine Erhöhung der Viskosität bei den enzymatisch behandelten Eigelbproben (Temperaturen unterhalb von 60 °C) signifikant (Abb. 4-7). Eisbildung und die daraus resultierende Dehydrierung der Proteine könnte auch zur Destabilisierung des von Mine (1997) beschriebenen LPC/LDL-Komplexes beitragen. Als Folge dessen könnte eine Verhinderung der thermischen Bildung von festen, dreidimensionalen Netzwerken nicht mehr gewährleistet werden. In Abb. 4-7 wird dies durch den zweiten Viskositätsanstieg bei Temperaturen oberhalb von 85 °C angezeigt. Da der zweite Anstieg der scheinbaren Viskosität (bei konstanter Scherrate von 26 s<sup>-1</sup>) im Vergleich zum unbehandelten Eigelb jedoch signifikant zu höheren Temperaturen verschoben ist, hat dies Einfluss auf die technofunktionellen Eigenschaften. Die Eindringtiefe des Penetrometers erhöhte sich dramatisch nach Behandlung mit Phospholipasen (Tab. 4-5). Somit wird die Fähigkeit zur Ausbildung eines schnittfesten dreidimensional vernetzten Gels durch die enzymatische Behandlung signifikant vermindert.

**Tab. 4-5:** Rheologische und physikalische Veränderungen von gefriergetrocknetem Eigelb durch Behandlung mit Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>) und Sternenzym PLP (PLA<sub>2</sub>), mit n = 6 (Jaekel und Ternes, 2009)

Eigelb	unfermentiert	0,10 % PLA <sub>1</sub>	0,75 % PLA <sub>2</sub>
Eindringtiefe [mm]	2,6 ± 0,3	4,8 ± 0,2	5,3 ± 0,4
Konsistenzfaktor [Pa*s]	0,16 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,15 ± 0,01
Fließindex	0,78 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,79 ± 0,01

Obwohl die Behandlung des Eigelbs mit Phospholipasen zu deutlichen Veränderungen hinsichtlich der thermischen Gelbildung führt, zeigen sich nur geringe Auswirkungen auf das Fließverhalten. Besonders interessant ist hierbei jedoch, dass sich signifikante Unterschiede in Hinblick auf den Typ der Phospholipase ergaben. Während die Behandlung mit Sternenzym PLP (PLA<sub>2</sub>) keine signifikante Änderung des Fließverhaltens bewirkte, so führte die Behandlung mit Lecitase<sup>®</sup> Ultra (PLA<sub>1</sub>) zu einer signifikanten Erhöhung des Konsistenzfaktors und zu einer Verringerung des Fließindex. Einer Ursache hierfür könnten die Unterschiede bezüglich der Hydrolyse der Phospholipide sein (4.2.2). Durch die sich aus diesen Werten abzuleitende Erhöhung der Viskosität (bei konstanter Temperatur von 30 °C) und der Verschärfung des scherverdünnenden Verhaltens zeigt Sternenzym PLP in Hinblick auf die Optimierung der industriellen Prozesstechnik bessere Ergebnisse.

#### **4.2.2 Analytik der Phospholipide mittels HPLC/ELSD**

Zur Modifizierung der Phospholipide des Eigelbs wurden zwei verschiedene Typen von Phospholipasen verwendet: Lecitase<sup>®</sup> Ultra, eine Phospholipase vom Typ A<sub>1</sub> (mikrobiellen Ursprungs) und Sternenzym PLP, eine Phospholipase vom Typ A<sub>2</sub> (isoliert aus Schweine-Pankreas). Die Enzyme unterscheiden sich prinzipiell darin, an welcher Stelle der Fettsäurerest vom Glycerolgerüst bevorzugt abgespalten wird: PLA<sub>1</sub> für sn-1 und PLA<sub>2</sub> für sn-2. Um Unterschiede hinsichtlich der Wirkung auf die technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb zwischen den beiden Enzym-Typen zu erforschen, wurde die Dosierung so angepasst, dass der resultierende Gehalt an Lysophosphatidylcholin (LPC) gleich groß ist. Tab. 4-6 zeigt den dramatischen Anstieg im Gehalt von LPC nach Behandlung mit Phospholipasen. Es ergeben sich hierbei jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der eingesetzten Enzyme. Aufgrund des gleichen Gehaltes an LPC sollte auch eine entsprechende Abnahme an Phosphatidylcholin (PC) zu erwarten sein. Dennoch ist der Gehalt an PC nach Behandlung mit Sternenzym PLP signifikant geringer als der nach Behandlung mit Lecitase<sup>®</sup> Ultra (Tab. 4-6). Der Grund liegt hierbei in der Limitierung der verwendeten HPLC-Methode. Im Gegensatz zu Sternenzym PLP baut Lecitase<sup>®</sup> Ultra auch Phosphatidylethanolamin (PE) in hohem Maße zu Lysophosphatidylethanolamin

(LPE) ab (siehe Tab. 4-6), welches dann mit PC coeluiert. Die enzymatische Behandlung von Eigelb mit Lecitase® Ultra führt dabei zu einer PE-Hydrolyse von ca. 78 %. Dennoch zeigen die Ergebnisse im temperaturabhängigen Viskositätsverhalten und der hitzeinduzierten Gelstabilität kaum Unterschiede hinsichtlich des Enzymtyps (vgl. 4.2.1). Demnach spielt das Verhältnis von LPE/LPC keine entscheidende Rolle bei der thermischen Gelbildung.

**Tab. 4-6:** Chemische Veränderungen innerhalb der Gruppe der Phospholipide von gefriergetrocknetem Eigelb durch Behandlung mit Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>) und Sternenzym PLP (PLA<sub>2</sub>), mit n = 6 (Jaekel und Ternes, 2009)

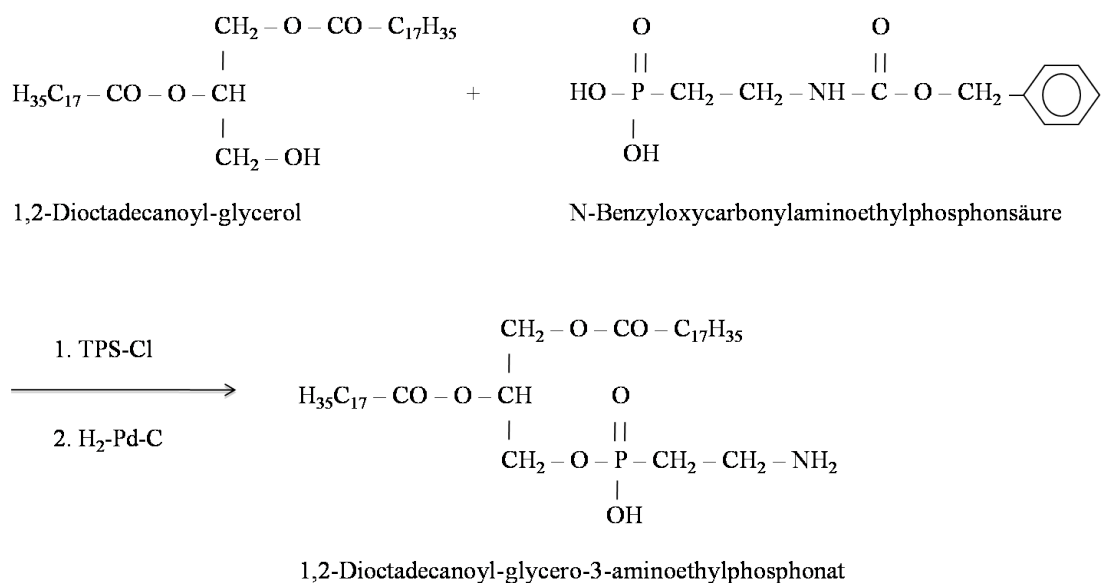
Eigelb	unfermentiert	0,10 % PLA <sub>1</sub>	0,75 % PLA <sub>2</sub>
Phosphatidylethanolamin <sup>a</sup>	2,7 ± 0,4	0,6 ± 0,1	2,2 ± 0,2
Phosphatidylcholin <sup>a,*</sup>	11,3 ± 0,8	5,0 ± 0,5	3,4 ± 0,1
Lysophosphatidylcholin <sup>a</sup>	0,27 ± 0,04	5,7 ± 0,5	5,8 ± 0,2

<sup>a</sup> [g/100g i. Tr.]

\* PC + LPE

Lediglich hinsichtlich des Fließverhaltens ergaben sich zwar geringe aber dennoch signifikante Unterschiede (Tab. 4-5). Inwieweit diese Veränderungen jedoch auf den Gehalt an LPE bzw. PE zurückzuführen sind, bleibt unklar. In weiteren Studien soll dieser Zusammenhang näher erforscht werden.





**Abb. 4-9:** Synthese von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat durch Kondensation von N-Benzoyloxycarbonylaminoethylphosphonsäure mit 1,2-Dioctadecanoyl-glycerol und anschließender Entfernung der Schutzgruppe mittels katalytischer Hydrogenolyse, TPS-Cl = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (Yamauchi et al., 1986)

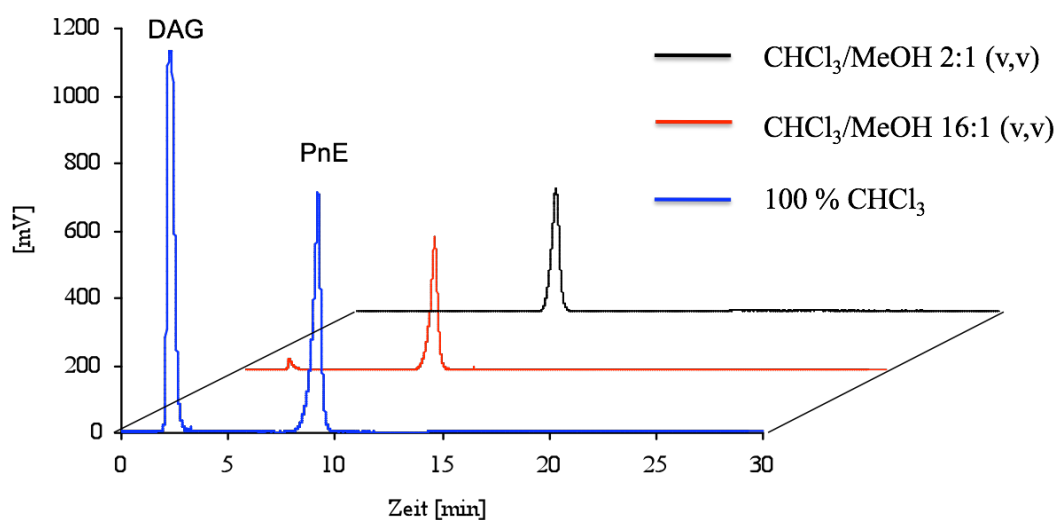
Nach dreimaliger Rekristallisierung ergab sich für die Auswaage von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat ein Wert von 0,0295 g. Die Ausbeute beträgt demnach 13 %.

Die erzielte Ausbeute weicht deutlich von der von Yamauchi et al. (1986) mit 84 % angegebenen ab. Hierfür sind mehrere Ursachen möglich. Zum einen wurde zur Erhöhung der Reinheit das Syntheseprodukt dreimalig (statt einmalig) rekristallisiert und zum anderen wird angenommen, dass aufgrund der nicht optimierten Hydrogenolyse-Apparatur die Abspaltung der Schutzgruppe nur unzureichend war.

### 4.3.2 Aufreinigung von PnE mittels SPE

Da das Syntheseprodukt auch nach zweimaliger Rekristallisierung im HPLC-Chromatogramm noch Verunreinigungen (Dioctadecanoylglycerol) aufwies, wurde das 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat mittels Festphasenextraktion noch weiter aufgereinigt (Abb. 4-10). Hierbei konnte durch Spülen der Kieselgel-

Säule mit Chloroform bzw. Chloroform/Methanol-Gemischen das Dioctadecanoyl-glycerol (DOG) vom 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat (PnE) abgetrennt werden (siehe 3.5.3).



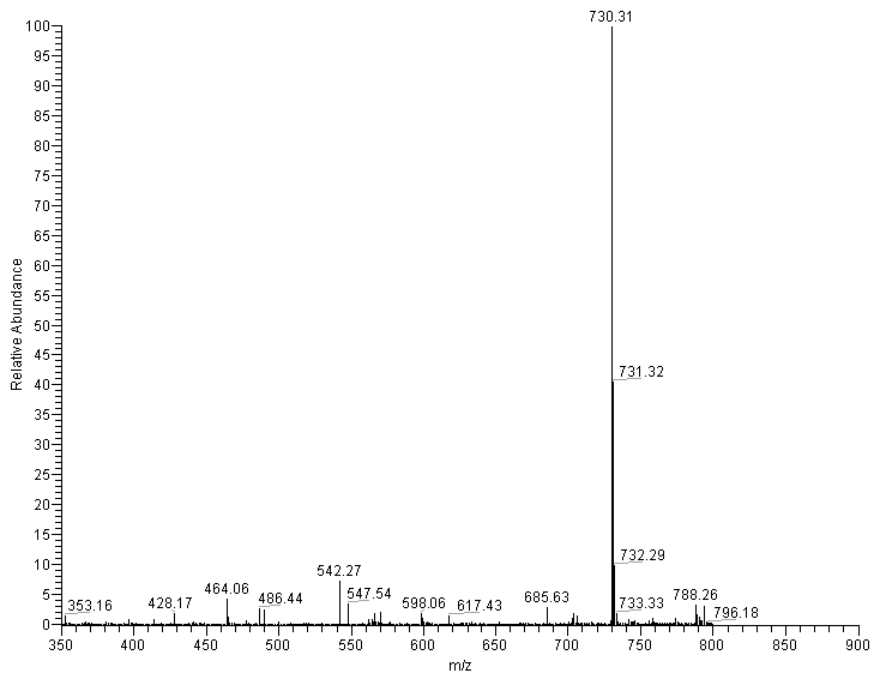
**Abb. 4-10:** Aufreinigung von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat (PnE) mittels Festphasenextraktion (Si), DAG = Diacylglycerol (Ternes und Jaekel, 2010)

### 4.3.3 ESI-MS<sup>2</sup> Fragmentierungsmuster

Das synthetisierte und aufgereinigte 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat wurde mittels ESI-MS<sup>2</sup> untersucht, um Rückschlüsse auf das Fragmentierungsmuster von Glycerophosphonolipiden ziehen zu können. In der Literatur gibt es für diese Substanzklasse noch keine derartigen Daten. Anhand der charakteristischen Massenpeaks soll dann eine sichere Identifizierung von Phosphonolipiden in Eigelb gewährleistet werden.

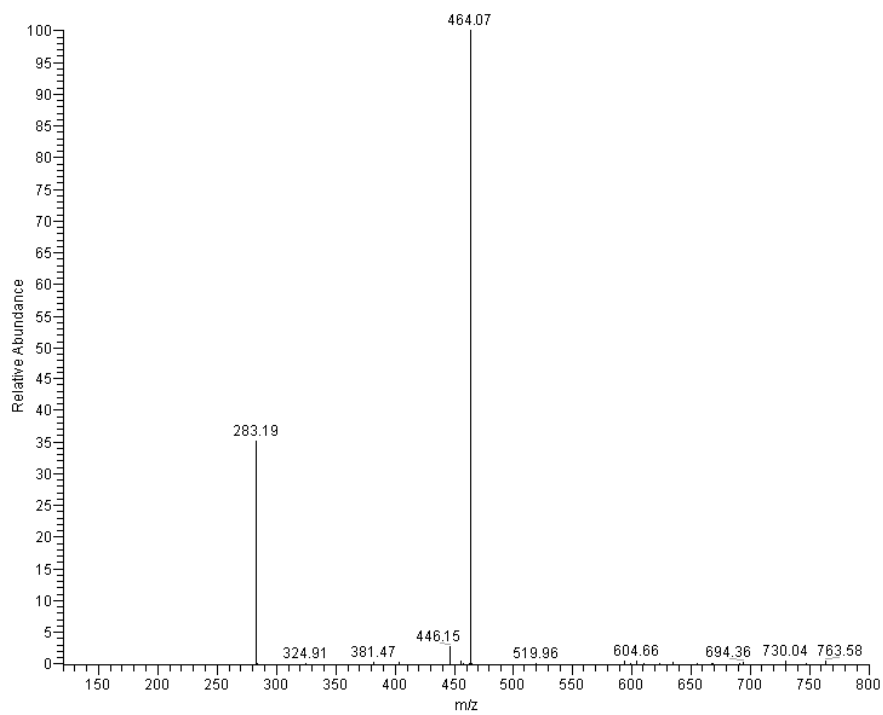
Die exakte Masse des synthetisierten 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonats ergibt sich aus der Summenformel C<sub>41</sub>H<sub>82</sub>O<sub>7</sub>NP mit M = 731,59. Im negativem Ionen-Modus zeigt PnE einen Peak von der Masse *m/z* 730 (Abb. 4-11). Dieser ist durch Deprotonierung des Phosphonat-Restes zu erklären [M - H]<sup>-</sup> (deprotonierter Molekülpeak).





**Abb. 4-11:** ESI-MS-Spektrum von PnE im negativen Ionen-Modus (Ternes und Jaekel, 2010)

Eine weitere Fragmentierung des deprotonierten Molekül-Anions  $[M - H]^-$  ergibt drei charakteristische Tochter-Anionen (Abb. 4-12).



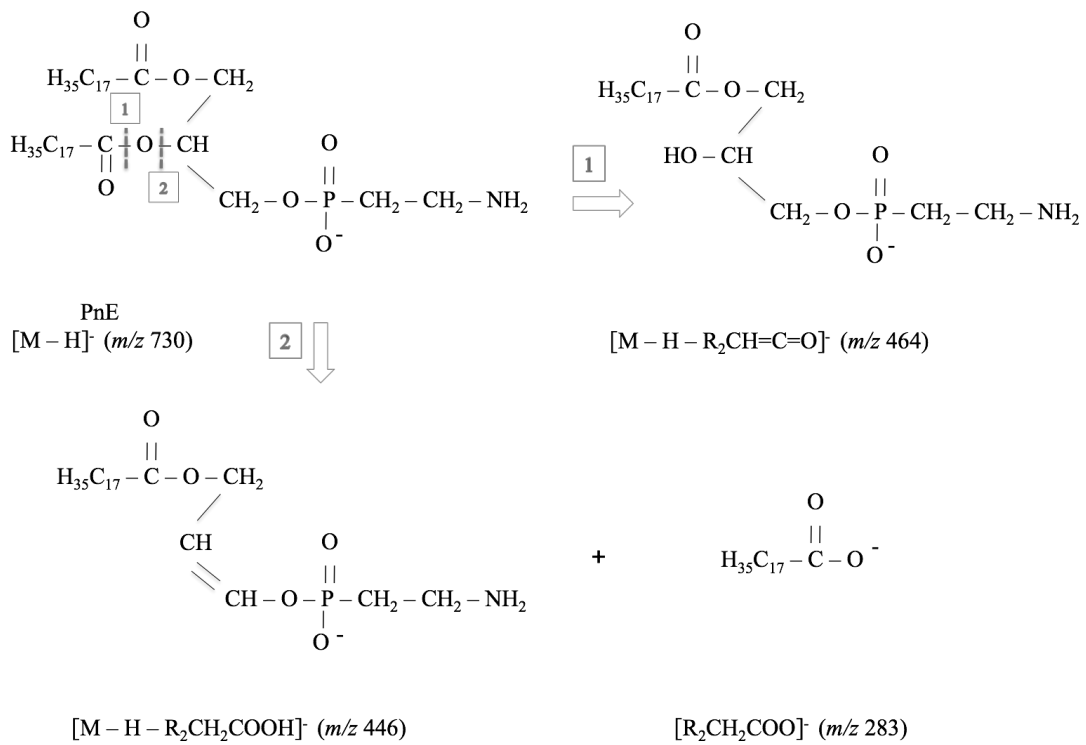
**Abb. 4-12:** ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des  $[M - H]^-$  Ions von PnE mit  $m/z$  730 (Ternes und Jaekel, 2010)

Die Massen sind in folgender Tabelle zusammengestellt (Tab. 4-7):

**Tab. 4-7:** Massen der Fragmente von  $[M - H]^-$  nach ESI-MS<sup>2</sup> im negativen Ionen-Modus

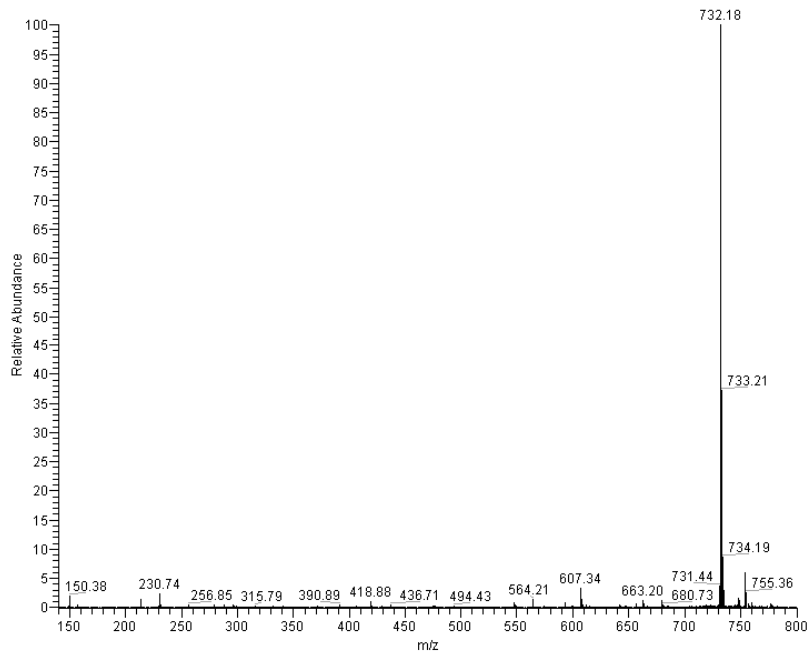
Mutter-Anion [ $m/z$ ]	Tochter-Anion [ $m/z$ ]	Differenz [ $m/z$ ]
730	464	266
730	446	284
730	283	447

Der dominanteste Peak im ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum von PnE ist der mit der Masse  $m/z$  464. Diese ergibt sich durch Verlust eines Stearinsäurerestes als inneres Anhydrid (Keten)  $[M - H - RCH=C=O]^-$ . Durch Verlust eines gesamten Stearinsäurerestes ergibt sich das zweite Tochter-Anion mit der Masse  $m/z$  446  $[M - H - RCH_2OOH]^-$ . Dieser Peak zeigt jedoch nur eine sehr geringe Intensität. Die deprotonierte Stearinsäure ist mit einer Masse von  $m/z$  283 ebenfalls als Peak im MS<sup>2</sup> Spektrum sichtbar  $[RCH_2COO]^-$ . Die Fragmentierung von PnE mittels ESI im negativen Ionen-Modus erfolgt demnach analog PE (Hsu und Turk, 2005). Unter vergleichbaren Bedingungen spaltet das Distearoylphosphatidylethanolamin  $[M - H]^-$  mit  $m/z$  746 ebenfalls bevorzugt ein Keten ab:  $[M - H - RCH=C=O]^-$  mit  $m/z$  480. Hieraus ergibt sich für PnE im negativen Ionen-Modus folgendes Fragmentierungsmuster (Abb. 4-13):



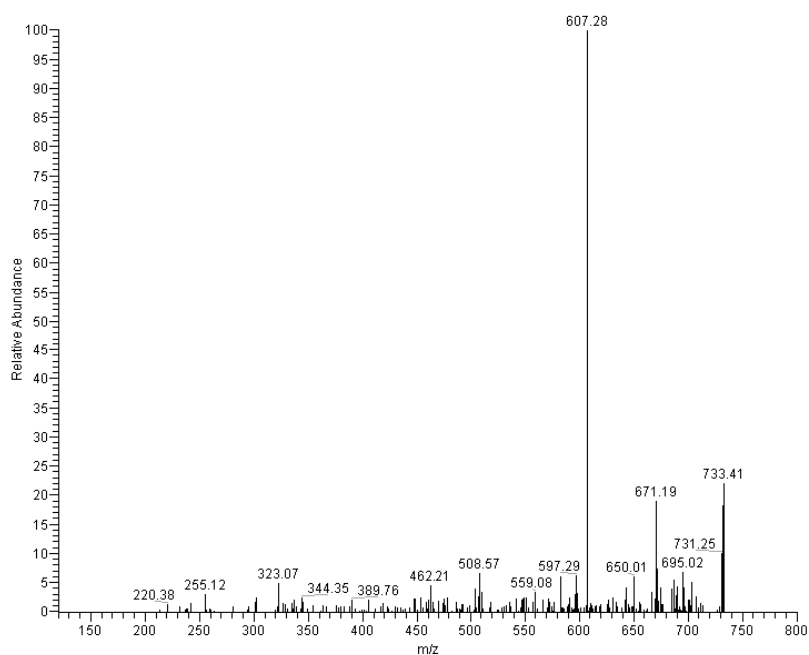
**Abb. 4-13:** Fragmentierung von PnE (1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat) mittels ESI-MS<sup>2</sup> in charakteristische Tochter-Ionen im negativen Ionen-Modus

Bei Abb. 4-13 ist zu beachten, dass die Stellung des Fettsäurerestes bei der Fragmentierung aufgrund der zwei Stearinsäurereste nicht weiter untersucht werden konnte. In der Literatur ist für Phosphatidylsäure jedoch beschrieben, dass beim Verlust des Ketens aus sterischen Gründen die sn-2 Stellung favorisiert ist (Hsu und Turk, 2005). Aus diesem Grund wird angenommen, dass dieser Zusammenhang auch für PnE gilt. Im positiven Ionen-Modus zeigt das Massenspektrum für PnE einen Molekülpeak mit der Masse  $m/z$  732 (Abb. 4-14).



**Abb. 4-14:** ESI-MS-Spektrum von PnE im positiven Ionen-Modus (Ternes und Jaekel, 2010)

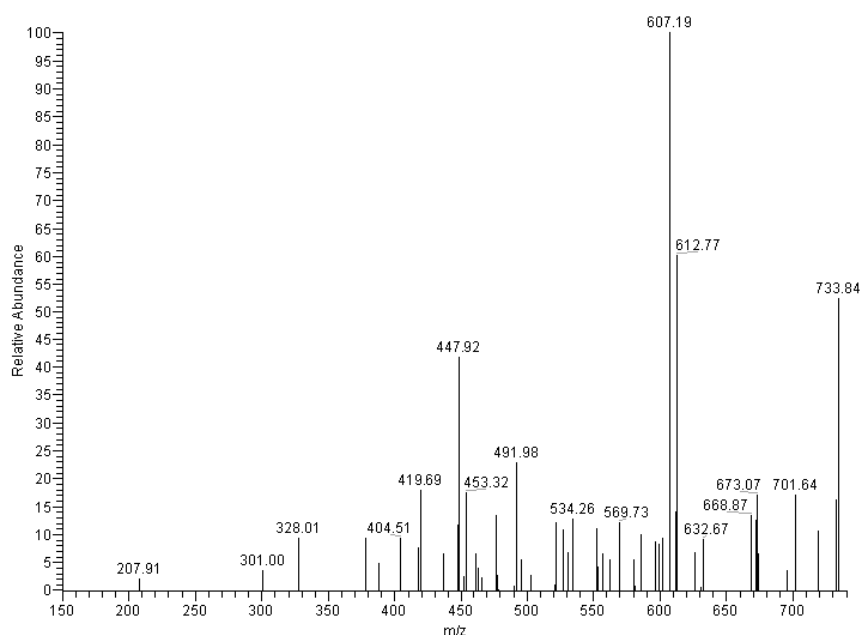
Der Massenpeak mit der Masse  $m/z$  732 ist durch Protonierung der Aminogruppe des Ethanolaminrestes zu erklären:  $[M + H]^+$ . Bei der Fragmentierung des protonierten Molekül-Kations zeigen sich jedoch Unterschiede zum negativen Ionen-Modus. Das ESI-MS/MS Spektrum von PnE (Abb. 4-14) zeigt lediglich ein Tochter-Ion mit der Masse  $m/z$  607.



**Abb. 4-15:** ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des  $[M + H]^+$  Ions von PnE mit  $m/z$  732 (Ternes und Jaekel, 2010)



Da eine Erhöhung der Kollisionsenergie nicht zur Bildung weiterer charakteristischer Spaltprodukte geführt hat, wurde zur Verstärkung der Fragmentierung dem Syntheseprodukt ein Zusatz von 0,1 % Essigsäure zugegeben. Im ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum (Abb. 4-17) zeigt sich dann auch ein weiteres Tochter-Kation mit der Masse  $m/z$  448, welches durch Eliminierung einer Stearinsäure gebildet wurde  $[M + H - RCOOH]^+$  (analog Abb. 4-13).



**Abb. 4-17:** ESI-MS<sup>2</sup>-Spektrum des  $[M + H]^+$  Ions von PnE ( $m/z$  732) mit Zusatz von 1 % HAc (Ternes und Jaekel, 2010)

Die Massen der mittels ESI-MS<sup>2</sup> im positiven Modus hauptsächlich gebildeten Kationen wurden in folgender Tabelle (Tab. 4-8) zusammengefasst. Da die restlichen Massenpeaks im Vergleich zu den Hauptpeaks nur eine geringe relative Häufigkeit aufweisen, werden diese in der weiteren Betrachtung vernachlässigt.

**Tab. 4-8:** Massen der Fragmente von  $[M - H]^-$  nach ESI-MS<sup>2</sup> im positiven Ionen-Modus

Mutter-Anion [ $m/z$ ]	Tochter-Anion [ $m/z$ ]	Differenz [ $m/z$ ]
732	607	125
732	448*	284

\* mit Zusatz von 1 % Essigsäure

Für die Phosphono-Analogen von Phosphatidylethanolamin kann zur Identifizierung mittels ESI-MS<sup>2</sup> folgendes noch nicht zuvor beschriebenes charakteristisches Fragmentierungsmuster herangezogen werden (Tab. 4-9).

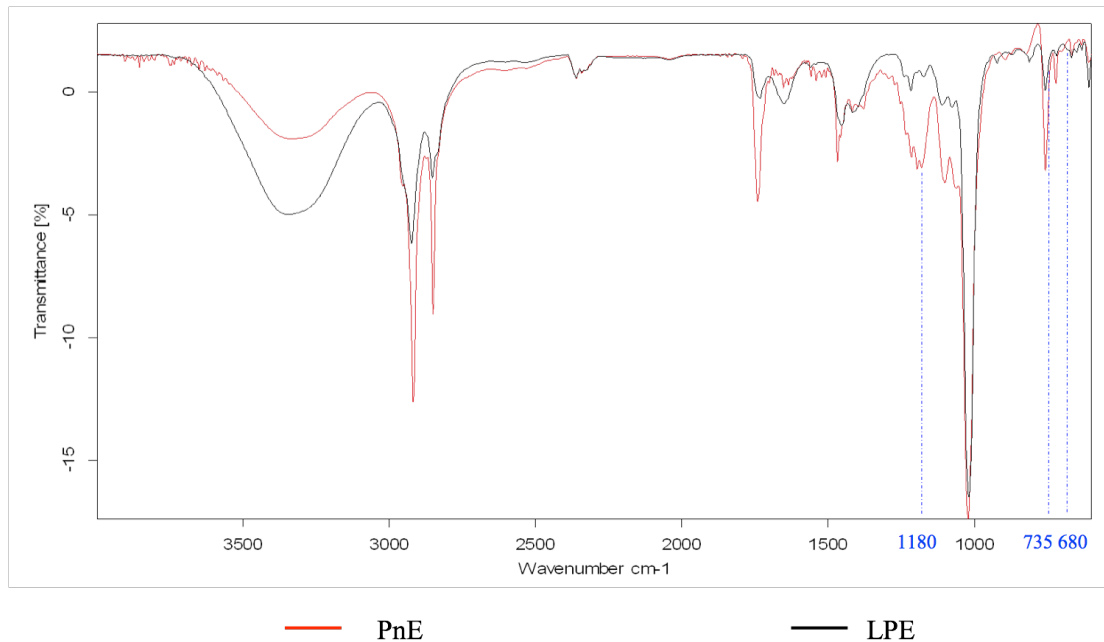
**Tab. 4-9:** ESI-MS<sup>2</sup> Fragmentierungsmuster von PnE

	Positiver Ionen-M.	[m/z]	Negativer Ionen-M.	[m/z]
Molekülpeak	[M+H] <sup>+</sup>	732	[M-H] <sup>-</sup>	730
Abspaltung Keten	[M+H-RCH=C=O] <sup>+</sup>	-	[M-H-RCH=C=O] <sup>-</sup>	464
Abspaltung Fettsäure	[M+H-RCOOH] <sup>+</sup>	448*	[M-H-RCOOH] <sup>-</sup>	446
Abspaltung Kopfgruppe	[DAG] <sup>+</sup>	607	[DAG] <sup>-</sup>	-
Fettsäure	[RCO] <sup>+</sup>	-	[RCOO] <sup>-</sup>	283

\* mit Zusatz von 1 % Essigsäure

#### 4.3.4 Charakterisierung von PnE mittels ATR/FT-IR

Zur Ermittlung charakteristischer Banden von Phosphonolipiden im IR-Spektrum wurde das synthetisierte 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat mittels ATR/FT-IR untersucht. Die in der Literatur beschriebenen Daten hinsichtlich charakteristischer IR-Banden für Phosphonolipide sind sehr gering und zum Teil widersprüchlich. Für die Wellenlänge einer möglichen (P-C)-Bande existieren drei unterschiedliche Angaben: 680, 735 und 1180 cm<sup>-1</sup> (Dembitskii, 1988; Hasegawa et al., 1976; Mukhamedova et al., 1985). Keine dieser beschriebenen Banden konnte jedoch unter den gegebenen Bedingungen bestätigt werden (Abb. 4-18).



**Abb. 4-18:** ATR/FT-IR-Spektrum von 33  $\mu\text{g}$  PnE im Vergleich zu 22  $\mu\text{g}$  LPE, die in der Literatur beschriebenen charakteristischen Wellenlängen für Phosphonolipide: 680  $\text{cm}^{-1}$ , 735  $\text{cm}^{-1}$  und 1180  $\text{cm}^{-1}$  für die (P-C)-Bindung (Mukhamedova et al., 1985; Dembitskii, 1988; Hasegawa et al., 1976) wurden gesondert gekennzeichnet (Ternes und Jaekel, 2010)

Zum Vergleich wurde das ATR/FT-IR-Spektrum von LPE unter gleichen Bedingungen erstellt. Die ermittelten Banden wurden in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 4-10):

**Tab. 4-10:** FTIR-Banden von PnE und LPE

	PnE [ $\text{cm}^{-1}$ ]	LPE [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Literatur [ $\text{cm}^{-1}$ ]
(C-H)-Valenzschwingungen	2918, 2850	2923, 2852	2850-2960*
(C=O)-Valenzschwingungen	1741	1733	1720-1765 <sup>†</sup>
(N-H)-Deformationsschwingungen	1653	1653	1560-1650*
(C-H)-Deformationsschwingungen	1467	1454	1430-1470*
PO <sub>2</sub> -Valenzschwingungen	1179	1179	1145-1200 <sup>†</sup>
(P-O-C)-Valenzschwingungen	1023	1019	970-1200 <sup>†</sup>
PO <sub>2</sub> -Valenzschwingungen	756	757	740-830 <sup>†</sup>

\* Hesse et al. (2005)

<sup>†</sup> Nzai und Proctor (1998)



Neben den in der Literatur bereits beschriebenen IR-Banden konnten für PnE keine weiteren IR-Banden mittels ATR/FT-IR beobachtet werden. Auch erbrachte der Vergleich der IR-Banden von PnE mit LPE keine eindeutigen Hinweise auf für Phosphonolipide charakteristische Banden (Tab. 4-10). Da zudem keine der beschriebenen (P-C)-Banden zu einem späteren Zeitpunkt von anderen Forscherteams bestätigt wurde, liegt dies den Schluss nahe, dass sich unter den gegebenen Umständen die IR-Spektroskopie zur sicheren Identifizierung von Phosphonolipiden nicht eignet.

In Abb. 4-19 ist das von Moschidis et al. (1984) publizierte IR-Spektrum des aus Eigelb extrahierten Phosphono-Analogs von PE gezeigt. Auch hierbei ist keine für eine (P-C)-Bindung charakteristische Bande erkennbar. Da keine Diskussion der Ergebnisse erfolgte, verbleibt die Identifizierung eines Phosphonolipids aufgrund des IR-Spektrums nicht nachvollziehbar.

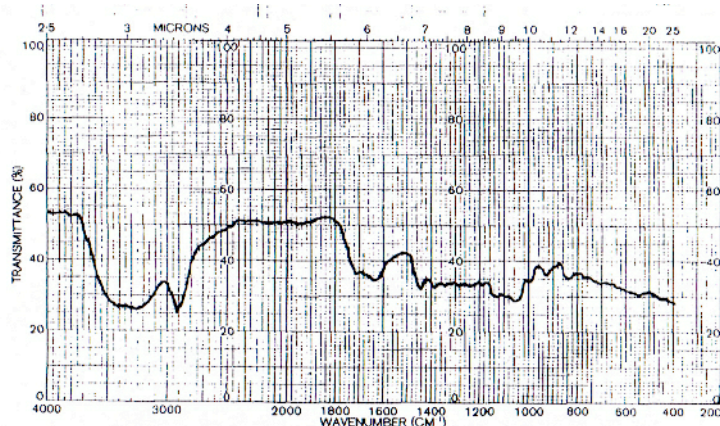


Fig. 3. IR spectrum of the phosphono analogue of phosphatidylethanolamine fractionated on a silicic acid column from the total egg yolk phosphonolipids.

**Abb. 4-19:** IR-Spektrum des von Moschidis et al. (1984) aus Eigelb extrahierten Phosphono-Analogs von PE, keine Hinweise auf eine für (P-C)-Bindung charakteristische Bande:  $680\text{ cm}^{-1}$ ,  $735\text{ cm}^{-1}$  und  $1180\text{ cm}^{-1}$  (Mukhamedova et al., 1985; Dembitskii, 1988; Hasegawa et al., 1976)

### 4.3.5 Analytik der Phosphonolipide mittels DC

Mittels Synthese von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat konnte ein Phosphono-Analog von Phosphatidylethanolamin hergestellt werden, welches als Vergleichssubstanz für die Analytik der Phosphonolipide dienen soll. Zunächst sollten die bisher publizierten Ergebnisse hinsichtlich des Phosphonolipid-Anteils im Eigelb nachvollzogen werden. Nach Durchführung der DC-Methode von Moschidis et al.

(1984) konnte jedoch keine Auftrennung der Phospholipide von den Phosphonolipiden beobachtet werden (Abb. 4-20). Während Phosphatidylethanolamin wie erwartet am Start zurückgehalten wird, läuft PnE nicht mit der Eluenten-Front mit und verbleibt ebenfalls am Start der DC-Folie. Da die hierfür geschaffenen Chromatographie-Bedingungen denen in der Publikation beschriebenen weitestgehend gleichen, sind zunächst keine Gründe für die abweichenden Ergebnisse ersichtlich. Die Identifizierung der Phosphonolipide im Eigelb wurde laut Moschidis et al. (1984) mittels IR und NMR vorgenommen. Zwar sind IR-Spektren der isolierten Phosphonolipide in der Publikation enthalten, jedoch wurde auf jegliche Diskussion verzichtet. Auf eine charakteristische Bande für Phosphonolipide wurde in diesem Zusammenhang nicht hingewiesen (siehe auch Abb. 4-19). Die Ergebnisse der NMR-Untersuchung fehlen gänzlich. Aus diesen Gründen kann nicht mehr nachvollzogen werden, wie die Identifizierung der Phosphonolipide erfolgt ist. Es bestehen somit Zweifel hinsichtlich der publizierten Erkenntnisse, welche durch die Ergebnisse mit der synthetisierten Phosphonolipid-Referenzsubstanz (Abb. 4-20) untermauert werden.

Im Gegensatz zur Trennung der Phospho- von den Phosphonolipiden konnte jedoch bei der Detektion mittels Dittmer & Lester-Sprühreagenz in Kombination mit dem Erhitzungstest von Stillway et al. (1980) eine visuelle Unterscheidung zwischen den Phospho- und Phosphonolipiden vorgenommen werden (Abb. 4-21). Nach Erhitzung der mit dem Sprühreagenz behandelten DC-Platten auf 100 °C für 15 min zeigt das Phosphatidylethanolamin eine braune Farbe, während die blaue Farbe des PnE-Spots bleibt. Die Nachweisgrenze für Phosphonolipide wurde für diese Methode mit 0,03 µmol angegeben. Für PnE ergibt sich daraus eine Nachweisgrenze von 21,93 µg.



**Abb. 4-20:** links 81 µg Phosphatidylethanolamin (PL) und rechts 41 µg PnE entwickelt mit der Methode von Moschidis et al. (1984) und detektiert mit dem Dittmer & Lester-Sprühreagenz.



**Abb. 4-21:** links 81 µg Phosphatidylethanolamin (PL) und rechts 41 µg PnE entwickelt mit der Methode von Moschidis et al. (1984), detektiert mit Dittmer & Lester-Sprühreagenz und Erhitzungstest von Stillway et al. (1980).

Die chromatographische Trennung von Phospho- und Phosphonolipiden gelang schließlich mittels der Methode von Kapoulas (1969). Hierbei wurde die DC-Trennung mit folgendem Eluenten erreicht: Chloroform/90 % Essigsäure (3:2, v/v). Die ermittelten Rf-Werte für die Phospho- und Phosphonolipide wurden in folgender Tabelle zusammengefasst:

**Tab. 4-11:** Rf-Werte der Phospho- und Phosphonolipide nach der Methode von Kapoulas (1969) mit n = 7 (siehe auch Anhang 8.1.3)

	Rf-Wert	Rf-Wert*
1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat	0,8	0,8
Phosphatidylethanolamin	0,5	0,6
Phosphatidylcholin	0,2	0,2

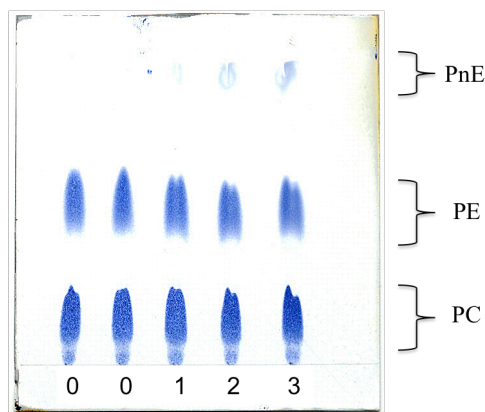
\* Kapoulas (1969)

#### 4.3.6 Analytik der Eigelb-Phospholipide mittels DC

Mit Hilfe der Methoden von Kapoulas (1969) und Stillway et al. (1980) konnten nun Proben (n > 6) aus dem Eigelbextrakt (siehe 3.3.2) auf Phosphonolipide hin untersucht werden. Hierbei wurden jeweils 20 µL des Lipidextraktes spotweise auf die DC

aufgegeben. Die Aufgabemenge wurde hierbei durch die hohe Lipidkonzentration (hohe Viskosität) des Extraktes begrenzt. Es konnten jedoch keine charakteristischen blauen Spots detektiert werden. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze und der auf die DC-Platte aufgetragenen Lipid-Menge ist der Anteil an Phosphonolipiden im Eigelb geringer als 0,02 %. Das entspricht einem Anteil von  $\approx 0,07$  % der Gesamtlipide und  $\approx 0,2$  % der Gesamtphospholipide des Eigelbs.

Um jedoch auch Veränderungen des Laufverhaltens durch die Eigelbmatrix auszuschließen, wurden die Lipidextrakte mit PnE-Referenzsubstanz aufgestockt (Abb. 4-22). Neben der guten Trennung von PE und PnE ist deutlich sichtbar, dass die Detektion von PnE auch bei Gehalten im Bereich der Nachweisgrenze nur geringfügig durch die Eigelbmatrix behindert wird.

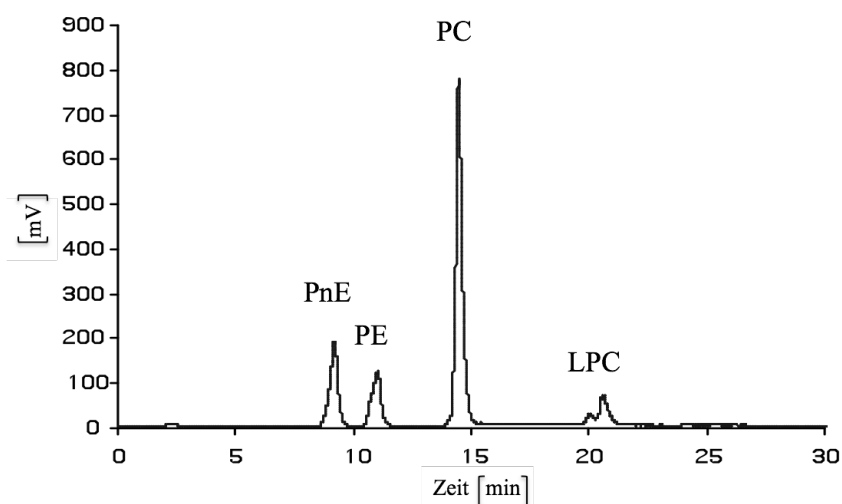


**Abb. 4-22:** Aufstockung von Eigelblipid-Proben (jeweils 20  $\mu$ l) mit PnE, 0 = ohne Aufstockung, 1 = Aufstockung mit 21  $\mu$ g PnE, 2 = Aufstockung mit 31  $\mu$ g PnE, Aufstockung mit 41  $\mu$ g PnE (Ternes und Jaekel, 2010)

Unter den gegebenen Bedingungen konnten keine Phosphonolipide im Eigelb nachgewiesen werden. Für die Detektion (Stillway et al., 1980) gilt hierbei eine Nachweisgrenze von 0,03  $\mu$ mol (entspricht 22  $\mu$ g für 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat). Bei Annahme, dass etwa 1 % der Phospholipid-Fraktion aus Phosphonolipiden besteht (Moschidis et al., 1984), müssen demnach ca. 94  $\mu$ g Phosphonolipide je Spot enthalten sein. Da diese Menge an Phosphonolipiden jedoch deutlich über der Nachweisgrenze liegt, werden die Zweifel hinsichtlich der von Moschidis et al. (1984) getätigten Aussagen weiter bekräftigt.

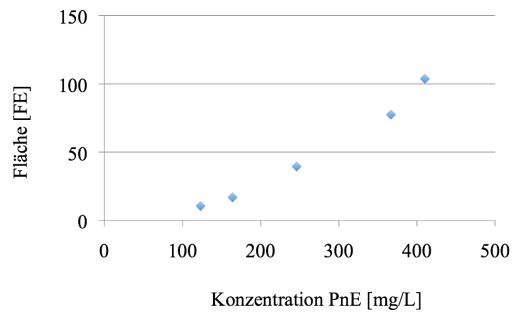
### 4.3.7 Analytik der Phosphonolipide mittels HPLC/ELSD

Mit Hilfe der synthetisierten Phosphonolipid-Vergleichssubstanz (PnE) konnte eine HPLC/ELSD-Methode zur Trennung der Phosphono- von den Phospholipiden entwickelt werden. Hierfür hat sich eine bereits bestehende Methode (Avalli und Contarini, 2005) als geeignet erwiesen (siehe auch 8.1.4). PnE eluiert hier bei 9 min und ist mit einem Abstand von 2 min von PE basisliniengetrennt (Abb. 4-23).

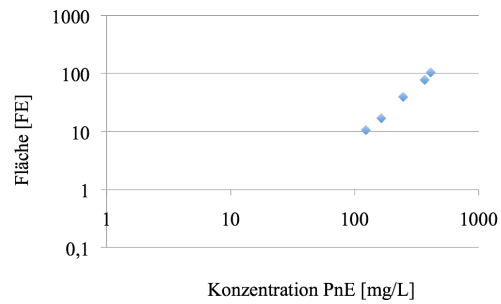


**Abb. 4-23:** Trennung von Phospho- und Phosphonolipiden mittels HPLC/ELSD, PnE = 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lysophosphatidylcholin; Kieselgel-Säule: LiChrosorb 60 – 5 (150 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße), Flussrate: 1 mL/min, Eluent A: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (80:19,5:0,5, v/v/v), Eluent B aus Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v)

Um die Eignung der HPLC/ELSD Methode für die Bestimmung von Phosphono-Analogen des Phosphatidylethanolamins festzustellen, wurden die Verfahrenskenndaten mittels externer Kalibration bestimmt. Hierfür wurden zunächst die unterschiedlichen Konzentrationen von PnE gegen das Detektorsignal linear aufgetragen (Mittelwert aus  $n = 6$ , ausreisserbereinigt mittels Grubbs-Test). Wie in Abb. 4-24 zu sehen ist, besteht kein linearer Zusammenhang in diesem Konzentrationsbereich, was auf dem Detektions-Prinzip des Lichtstredetektors beruht. Für die Kalibration von ELSD-Daten hat sich deshalb ein doppelt logarithmischer Ansatz (Wilkes et al., 1996) bewährt (Abb. 4-25).



**Abb. 4-24:** externe Kalibration von PnE in linearer Auftragung



**Abb. 4-25:** externe Kalibration von PnE in doppelt logarithmischer Auftragung

Nach Prüfung des Kalibrierbereichs auf Varianzhomogenität nach Bartlett (siehe Anhang 8.1.4) wurden folgende Kenndaten bestimmt:

**Tab. 4-12:** Zusammenfassung der Verfahrenskennaten für die Bestimmung von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat mittels HPLC/ELSD (siehe Anhang 8.1.4)

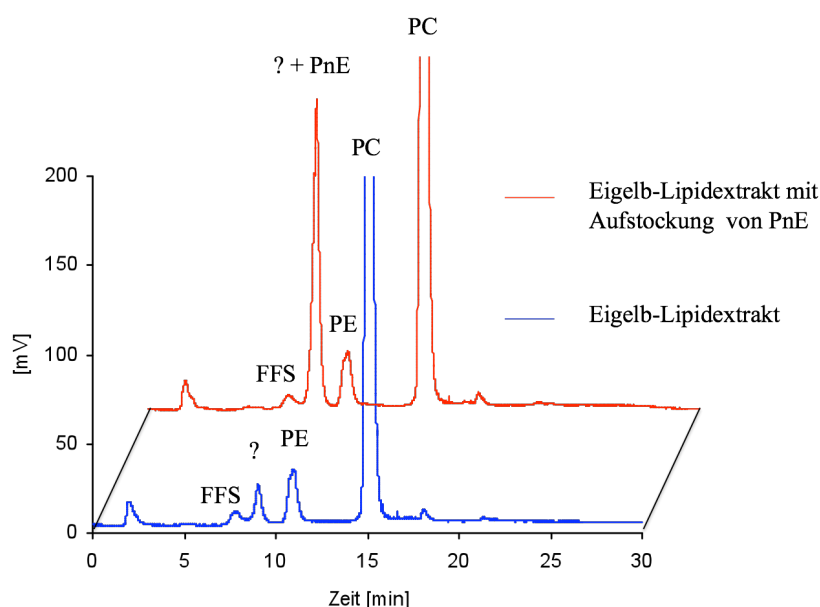
Verfahrenskennaten		Wert
Ordinatenabschnitt	a	-2,940 mV
Regressionskoeffizient	b	1,891 mV/(mg*L <sup>-1</sup> )
Bestimmtheitsmaß	R <sup>2</sup>	0,998
Reststandardabweichung	s <sub>y</sub>	3,04 mV
Verfahrensstandardabweichung	s <sub>x0</sub>	1,61 mg/L
Relative Verfahrensstandardabweichung	V <sub>x0</sub>	0,61 %
Nachweisgrenze	x <sub>NG</sub>	4,6 mg/L
Erfassungsgrenze	x <sub>EG</sub>	9,2 mg/L
Bestimmungsgrenze	x <sub>BG</sub>	13,8 mg/L bei 33,3 % Präzision

Wie in Tab. 4-12 ersichtlich ergab sich für die Reststandardabweichung der Kalibriergeraden ein Wert von 3,04 mV. Für den gegebenen Arbeitsbereich lässt sich daraus die Verfahrensstandardabweichung bestimmen, welche ein Maß für die Leistungsfähigkeit des gewählten Analysenverfahrens darstellt. Für s<sub>x0</sub> ergab sich ein Wert von 1,61 mg/L. Um jedoch eine vom Arbeitsbereich unabhängige Aussage treffen zu können, wurde die Relative Verfahrensstandardabweichung bestimmt, welche

nach Hillebrand (2000) möglichst einen Wert kleiner 2 % haben sollte. Mit 0,61 % ist diese Forderung für die HPLC/ELSD Methode erfüllt.

#### 4.3.8 Analytik der Eigelb-Phospholipide mittels HPLC/ELSD

Nach Abreicherung der Neutrallipide durch eine Festphasenextraktion mit Chloroform und Fraktionierung der polaren Lipide durch Chloroform/Methanol-Gemische (3.3.3) wurden diese mittels HPLC/ELSD untersucht. Bei der Fraktion 14:1 (Extraktion mit Chloroform/Methanol (14:1, v/v)) zeigt sich im Chromatogramm (Abb. 4-26) bei der Retentionszeit von PnE überraschend der Peak einer unbekannten Substanz. Die anschließende Aufstockung mit PnE belegte zudem die vollständige Co-Elution mit der unbekannten Substanz.



**Abb. 4-26:** Aufstockung Eigelblipid-Fraktion 14:1 mit PnE auf 37 mg/L, eine unbekannte Substanz coeluiert mit PnE; Kieselgel-Säule: LiChrosorb 60 – 5 (150 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße), Flussrate: 1 mL/min, Eluent A: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (80:19,5:0,5, v/v/v), Eluent B aus Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v) (Ternes und Jaekel, 2010)

Eine semiquantitative Analyse, mittels internen Standards, war aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit der Eigelblipid-Fraktionierung nicht möglich. Um jedoch festzustellen, ob es sich bei dieser unbekannten Substanz doch um Phospholipide handelt,

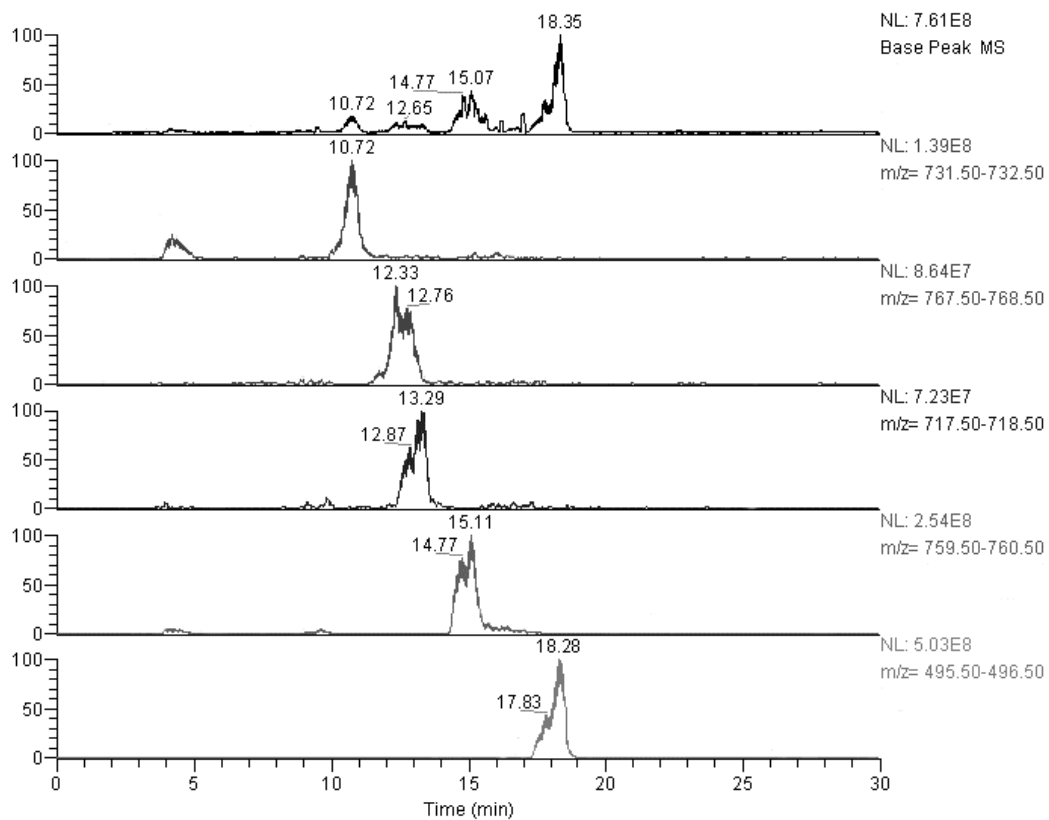
wurde die Fraktion 14:1 mittels LC-MS<sup>2</sup> untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel (4.3.10) diskutiert.

#### **4.3.9 Analytik der Eigelb-Phospholipide mittels LC-MS<sup>2</sup>**

Zur näheren Charakterisierung der mittels HPLC/ELSD detektierten unbekannt Substanz (Abb. 4-26) sowie zur Beurteilung, ob es sich hierbei tatsächlich um Phosphonolipide handelt, wurde die HPLC-Methode zunächst den besonderen Erfordernissen der LC/MS angepasst. Das Säulenmaterial und die Länge der analytischen Säule konnten beibehalten werden. Jedoch war eine Halbierung des Innendurchmessers nötig, um einen geringeren Fluss zu ermöglichen.

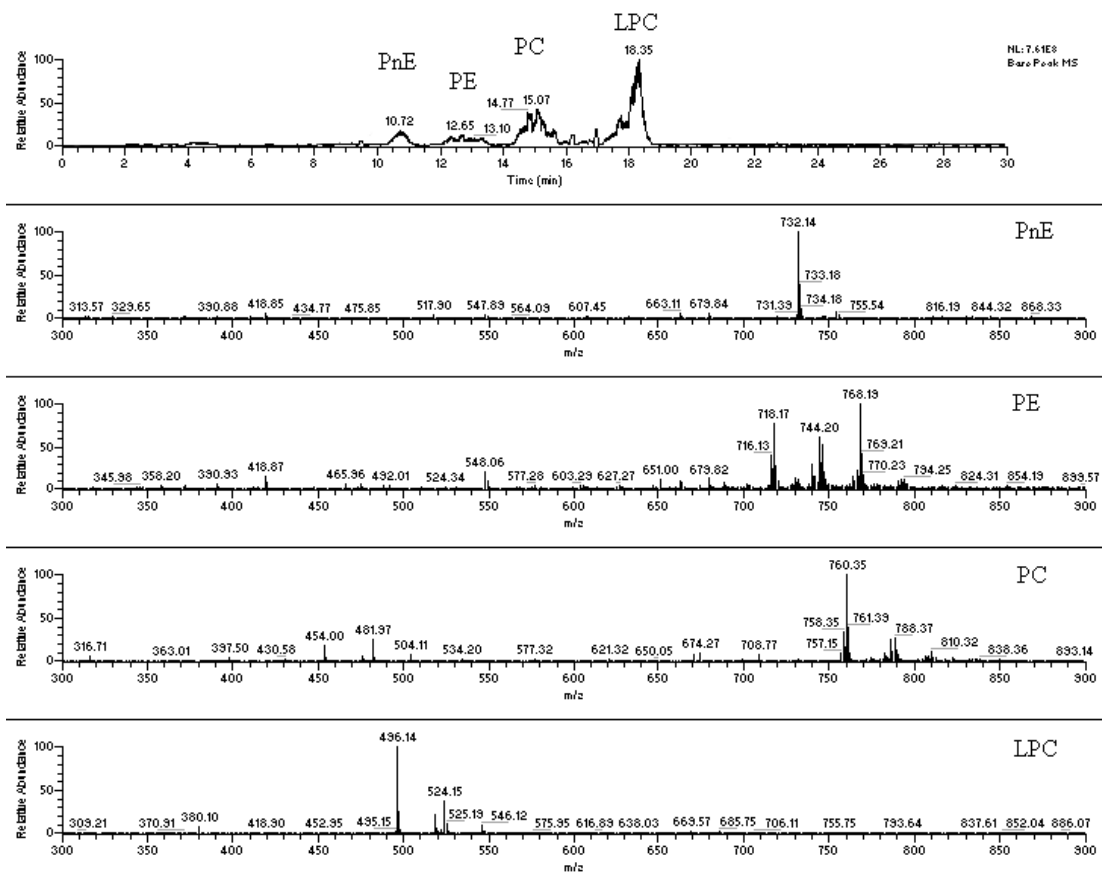
Eine gute Trennung der Phospholipide (inklusive PnE) war schließlich in Anlehnung an die Methode von Avalli und Contarini (2005) durch Erhöhung des Chloroform-Anteils von Eluent A auf 90 % und durch lineare Steigerung des Eluent B-Anteils innerhalb von 5 min auf 100 % möglich. Das folgende Chromatogramm zeigt die LC/MS Trennung der polaren Lipide, aufgeschlüsselt nach den ermittelten Hauptmassen.





**Abb. 4-27:** Trennung von Phospho- und Phosphonolipiden per LC-MS im positiven Ionen-Modus  $[M + H]^+$  aufgeschlüsselt nach den Hauptmassen, PnE = 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lysophosphatidylcholin; HPLC-Säule: LiChrosorb 60 – 5 (150 x 2 mm, 5  $\mu$ m Partikelgröße), Flussrate: 0,4 mL/min, Eluent A: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (90:9,5:0,5, v/v/v), Eluent B aus Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v)

Neben der Retentionszeit ermöglichen die Spektren der einzelnen Phospholipidklassen (Abb. 4-27) eine sichere Zuordnung zu den LC-MS Peaks und geben zusätzlich Hinweise auf die jeweiligen molekularen Spezies (Taguchi et al., 2005).



**Abb. 4-28:** Trennung der Phospho- und Phosphonolipide (Referenzsubstanzen) per LC-MS im positiven Ionen-Modus  $[M + H]^+$  mit dazugehörigen Massenspektren, PnE = 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lysophosphatidylcholin; HPLC-Säule: LiChrosorb 60 – 5 (150 x 2 mm, 5  $\mu$ m Partikelgröße), Flussrate: 0,4 mL/min, Eluent A: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (90:9,5:0,5, v/v/v), Eluent B aus Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v)

In Übereinstimmung mit Literaturdaten (Uran et al., 2001; Kerwin et al., 1994; Boselli et al., 2008 und Pacetti et al., 2005) wurden die möglichen molekularen Spezies der untersuchten Phospholipid-Referenzsubstanzen (Abb. 4-28) im Vergleich zu den aus Eigelb extrahierten Phospholipiden (Abb. 4-29) in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 4-13). Es zeigt sich hierbei eine große Übereinstimmung.

**Tab. 4-13:** Zusammenfassung der möglichen molekularen Spezies der Phospholipide

Phospholipid- klasse	$m/z$ [M + H] <sup>+</sup>	Molekulare Spezies *	Referenz- substanzen	Eigelb- Lipidfraktion 14:1
PE	768	AoSPE, GLnPE, hLOPE	x	x
PE	744	GPOPE, SLPE, Di-OPE	x	x
PE	718	POPE, PoSPE	x	x
PC	760	POPC, PoSPC	x	x
LPC	496	PLPC	x	x
LPC	518	LnLPC	-	x

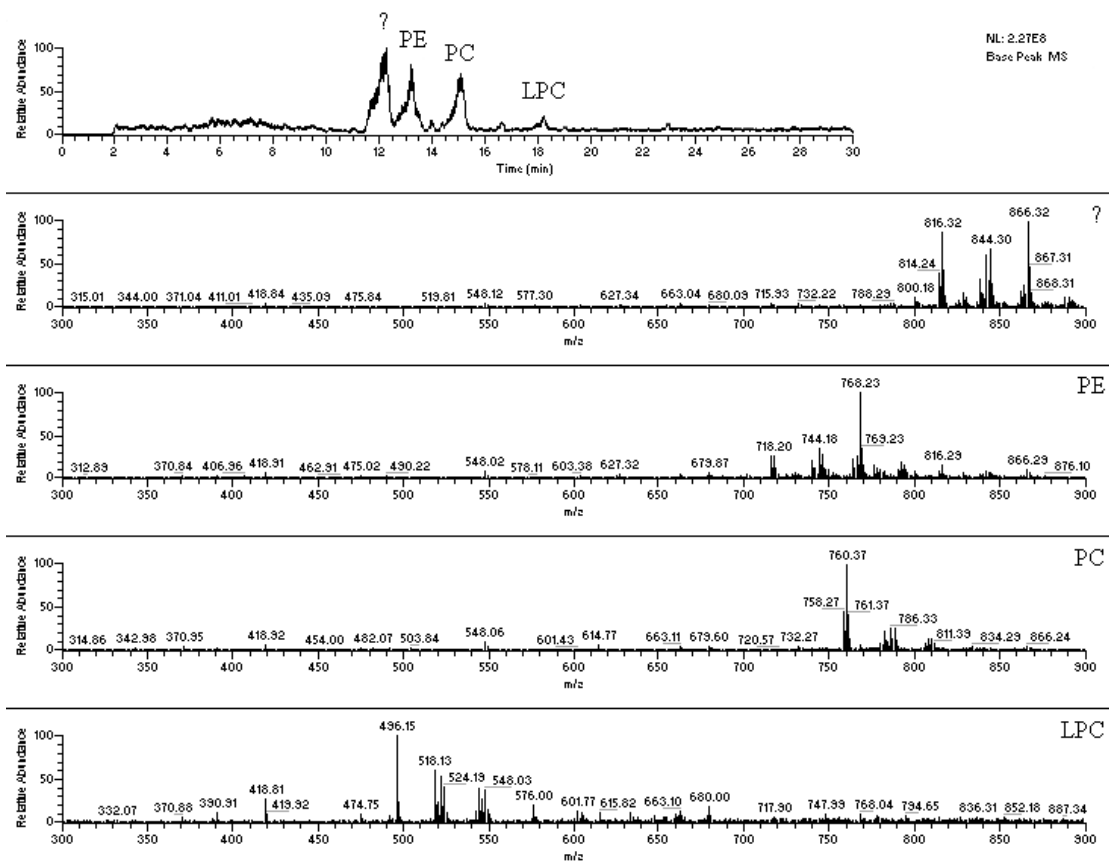
\* ... Ao = Arachidonsäure, G = Gadoleinsäure, L = Linolsäure, Ln =  $\gamma$ -Linolensäure, hL = Homo- $\gamma$ -linolensäure, O = Ölsäure, P = Palmitinsäure, Po = Palmitoleinsäure, S = Stearinsäure

x ... Im Chromatogramm ist der entsprechende Massenpeak enthalten

- ... Im Chromatogramm ist der entsprechende Massenpeak nicht enthalten

#### 4.3.10 Charakterisierung der unbekannt Substanz mittels ESI-MS<sup>3</sup>

Mit Hilfe der an die LC/MS angepassten HPLC-Methode konnten nun die fraktionierten Eigelblipid-Extrakte auf Phosphonolipide hin untersucht werden. Das ESI-MS Spektrum der unbekannt Substanz (Abb. 4-29) zeigt im positiven Ionen-Modus drei dominierende Molekülpeaks [M + H]<sup>+</sup> mit den Massen  $m/z$  866, 844, und 816 (Abb. 4-29).



**Abb. 4-29:** ESI-MS Chromatogramm der Eigelblipid-Fraktion 14:1 im positiven Ionen-Modus  $[M + H]^+$  mit dazugehörigen Massenspektren, PnE = 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat, PE = Phosphatidylethanolamin, PC = Phosphatidylcholin, LPC = Lysophosphatidylcholin; HPLC-Säule: LiChrosorb 60 – 5 (150 x 2 mm, 5  $\mu$ m Partikelgröße), Flussrate: 0,4 mL/min, Eluent A: Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid (90:9,5:0,5, v/v/v), Eluent B aus Chloroform/Methanol/30 % Ammoniumhydroxid/Wasser (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v) (Ternes und Jaekel, 2010)

Die gezielte Fragmentierung der Kationen mit den Massen  $m/z$  866, 844, 816 sollte nun Hinweise auf bestimmte funktionelle Gruppen geben und die Frage klären, ob es sich hierbei tatsächlich um Phosphonolipide handelt.

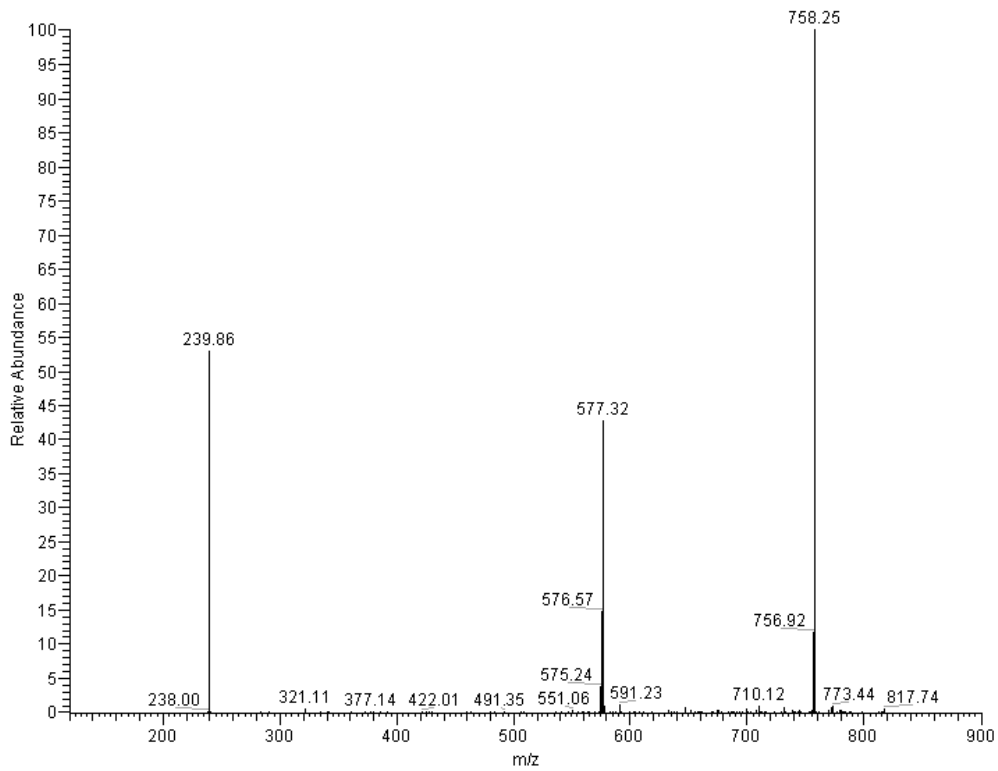


Abb. 4-30: ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des [M + H]<sup>+</sup> Ions mit  $m/z$  816 (Ternes und Jaekel, 2010)

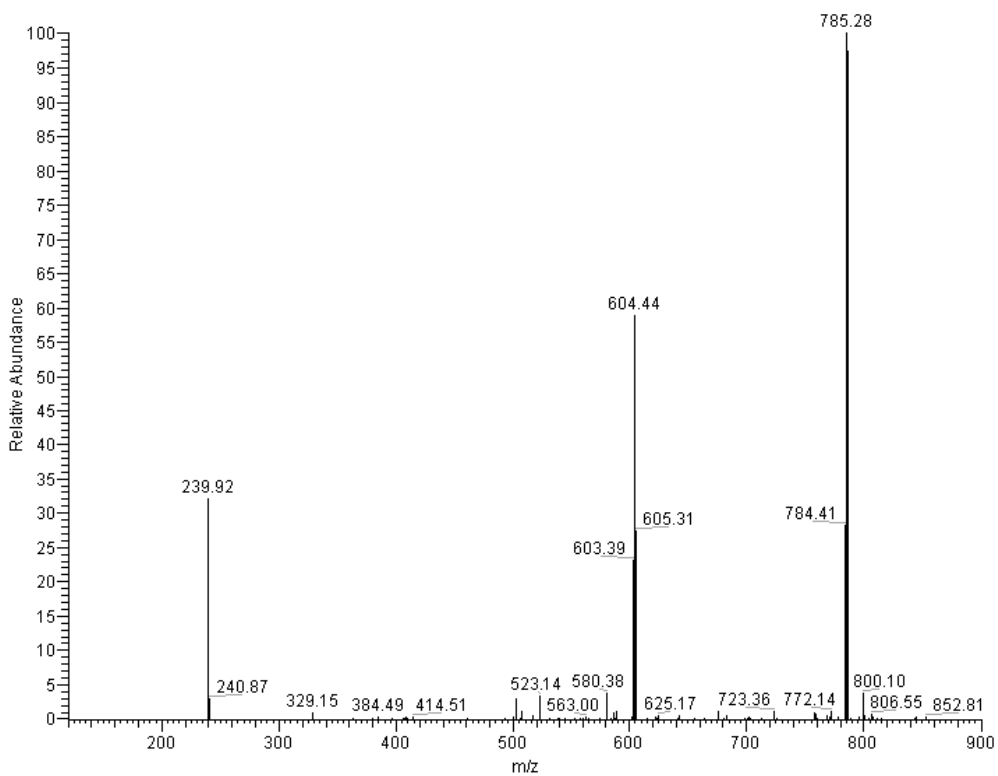
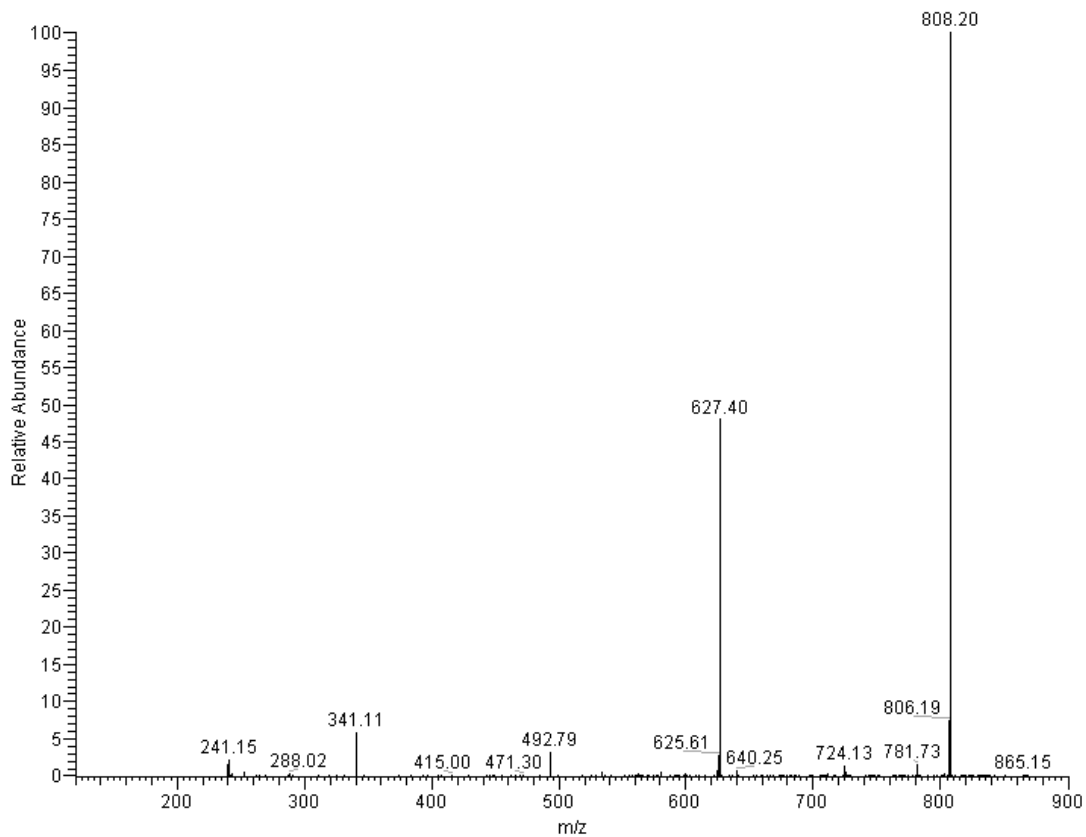


Abb. 4-31: ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des [M + H]<sup>+</sup> Ions mit  $m/z$  844



**Abb. 4-32:** ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum des [M + H]<sup>+</sup> Ions mit  $m/z$  866 (Ternes und Jaekel, 2010)

Die ESI-MS<sup>2</sup> Spektren der drei dominierenden Massen zeigen ein einheitliches Fragmentierungsmuster, was auf eine Substanzklasse schließen lässt. Obwohl sich die Massen der protonierten Molekülpeaks [M + H]<sup>+</sup> deutlich unterscheiden, werden jeweils Fragmente mit der Masse  $m/z$  58 und 239 abgespalten (Abb. 4-30, Abb. 4-31 und Abb. 4-32). Zur besseren Übersicht wurden die Fragmente der drei dominierenden Massenpeaks in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 4-14):

**Tab. 4-14:** Massen der Fragmente von  $[M + H]^+$  der unbekannt Substanzklasse mittels ESI-MS<sup>2</sup> im positiven Ionen-Modus

Mutter-Ion [ $m/z$ ]	Tochter- Ion [ $m/z$ ]	Differenz [ $m/z$ ]
866	808	58
866	627	239
866	241	625
844	785	59
844	604	240
844	240	604
816	758	58
816	577	239
816	240	576

Das Fragment mit der Masse  $m/z$  239 ist zudem in den ESI-MS<sup>2</sup> Spektren als Kation  $[F + H]^+$  mit  $m/z$  240 bzw. 241 erkennbar (Abb. 4-30, Abb. 4-31 und Abb. 4-32). Wird angenommen, dass es sich hierbei um die Kopfgruppe handelt, können Phospho- bzw. Phosphonolipide mit den Resten Ethanolamin ( $m/z$  141), Cholin ( $m/z$  183), Glycerol ( $m/z$  172), Serin ( $m/z$  185) und Inositol ( $m/z$  260) schon aufgrund der Masse sicher ausgeschlossen werden. Zudem werden Phosphatidylglycerole –und inositole aufgrund des fehlenden basischen Restes bevorzugt im negativen Ionen-Modus gemessen.

Bei der Untersuchung der unbekannt Substanzklasse mittels ESI-MS im negativen Ionen-Modus zeigen sich wiederholt drei dominante Massenpeaks  $[M - H]^-$  mit den Massen  $m/z$  864, 842, und 814. Da sich die Massen im positiven und negativen Modus jeweils um  $m/z$  2 unterscheiden, kann angenommen werden, dass die unbekannt Substanzklasse neben einer basischen auch einen sauren Rest enthält. Zur weiteren Charakterisierung wurde die Fragmentierung mittels ESI-MS<sup>3</sup> untersucht (Abb. 4-33, Abb. 4-34 und Abb. 4-35).

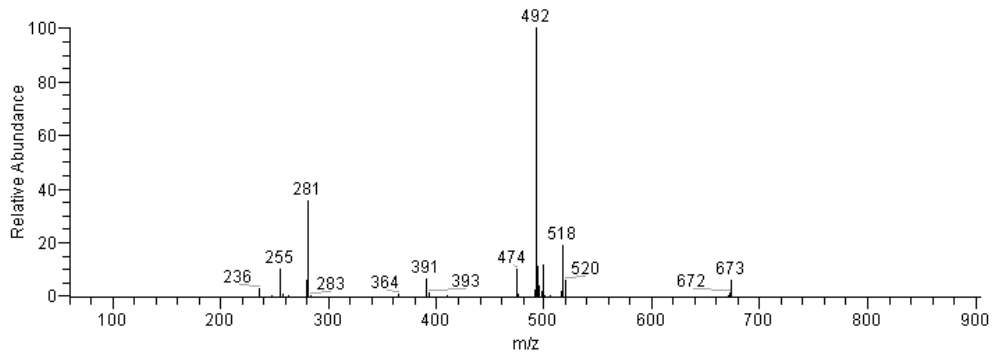
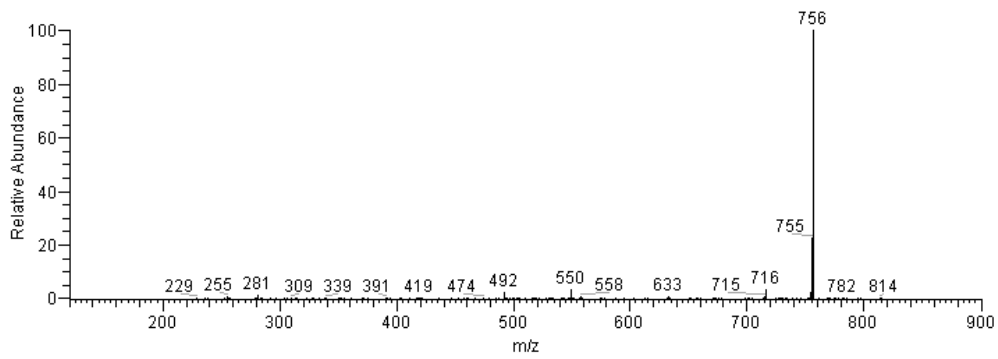


Abb. 4-33: ESI- MS<sup>3</sup> Spektrum des [M – H] Ions mit  $m/z$  814 bzw. 756 (Ternes und Jaekel, 2010)

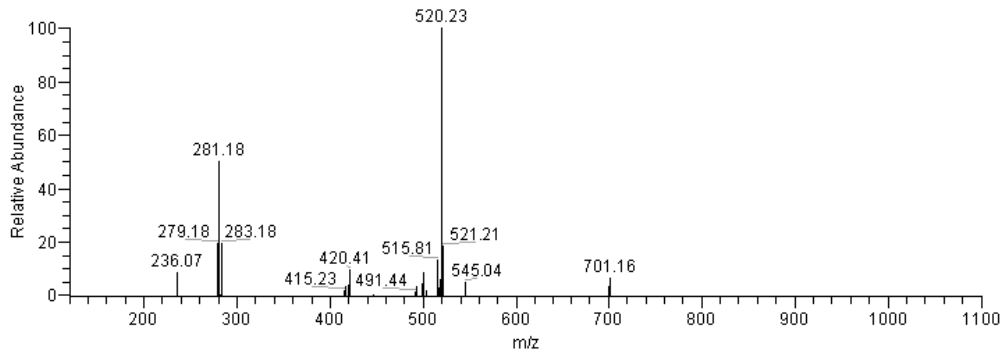
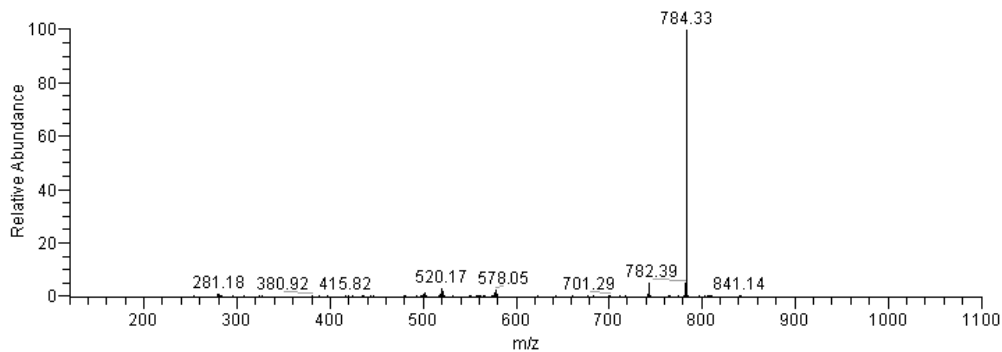
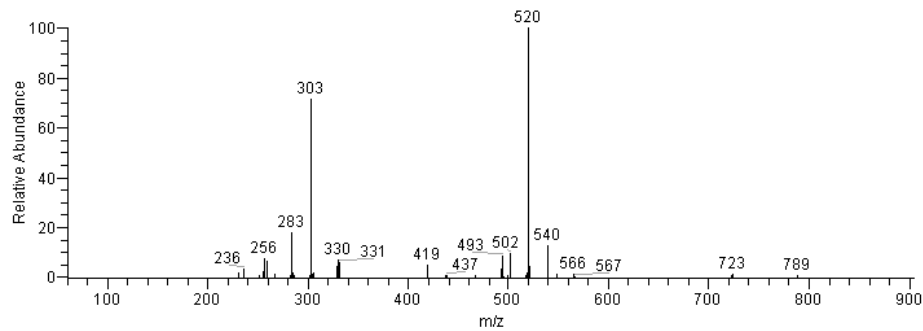
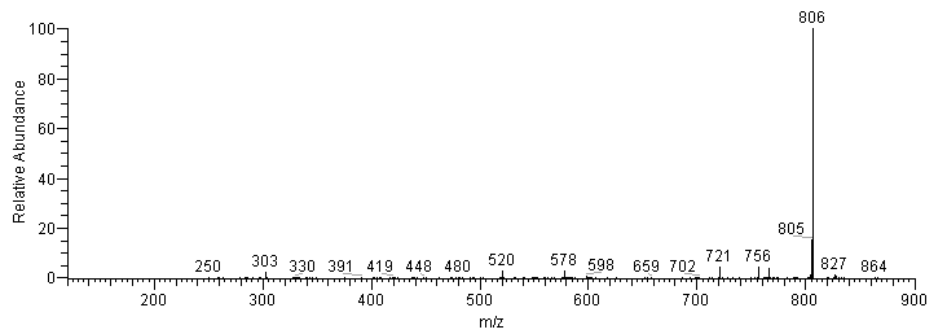


Abb. 4-34: ESI- MS<sup>3</sup> Spektrum des [M – H] Ions mit  $m/z$  842 bzw. 784 (Ternes und Jaekel, 2010)





**Abb. 4-35:** ESI- MS<sup>3</sup> Spektrum des [M – H]<sup>-</sup> Ions mit  $m/z$  864 bzw. 806 (Ternes und Jaekel, 2010)

Die mittels ESI-MS<sup>3</sup> ermittelten Massen wurden in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 4-15):

**Tab. 4-15:** ESI-MS<sup>3</sup> Analyse der unbekannt Substanzklasse aus der Eigelblipid-Fraktion 14:1 (im negativen Ionen-Modus)

Mutter-Ion [ $m/z$ ]	Tochter-Ion [ $m/z$ ]	Tochter-Ion [ $m/z$ ]	Differenz [ $m/z$ ]
864	806		58
	806	520	286
	806	303	503
842	784		58
	784	520	264
	784	281	503
814	756		58
	756	492	264
	756	281	475
	756	255	501

Wie in Tab. 4-15 ersichtlich, so werden auch im negativen Ionen-Modus Fragmente mit der Masse  $m/z$  58 vom deprotonierten Molekülpeak  $[M - H]^-$  abgespalten. Die sich daraus ergebenden Fragmente  $[M - H - 58]^-$  wurden mittels ESI-MS<sup>3</sup> weiter fragmentiert. Hierbei ergaben sich Tochter-Ionen, welche aufgrund ihrer Massen  $m/z$  255, 281 und 303 auf freie Fettsäuren hindeuten. Dieser Befund wird gestützt durch die Ergebnisse der Fragmentierung von PnE (vgl. 4.3.3). Auch hier konnte im ESI-MS<sup>2</sup> Spektrum (negativer Ionen-Modus) die Stearinsäure als freie Fettsäure  $[RCOO]^-$  detektiert werden.

Wird dem Hinweis gefolgt, dass Fettsäuren abgespalten wurden, kann weiter angenommen werden, dass es sich bei dieser Substanzklasse um ein Diacylglycerol mit einer unbekanntem Kopfgruppe ( $m/z$  239) handelt. Die restlichen Massen mit  $m/z$  520 und 492 (Tab. 4-15) lassen sich auf diesem Wege ebenfalls erklären, indem das Molekül nach Abspaltung des Fragmentes mit  $m/z$  58  $[M - H - 58]^-$  zusätzlich eine Fettsäure als Keten abspaltet  $[M - H - 58 - RCH=C=O]^-$ . Auch diese Annahme lässt sich durch die Ergebnisse aus 4.3.3 stützen.

Die sich aus den Ergebnissen der ESI-MS<sup>3</sup> Analyse der unbekanntem Substanzklasse ergebenden Schlussfolgerungen wurden in folgender Tabelle nochmals zusammengestellt (Tab. 4-16):

**Tab. 4-16:** Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der ESI-MS<sup>3</sup> Analyse der unbekanntem Substanzklasse aus der Eigelbplid-Fraktion 14:1

$[M - H]^-$	$[M - H - 58]^-$	$[M - H - 58 - RCH=C=O]^-$	$[RCOO]^-$
$[m/z]$	$[m/z]$	$[m/z]$	$[m/z]$
864	806	520	303 (Ao)*
842	784	520	281 (O bzw. E)*
814	756	492	281, 255 (O bzw. E, P)*

\* Ao = Arachidonsäure, E = Elaidinsäure O = Ölsäure, P = Palmitinsäure

Werden die Ergebnisse der gesamten massenspektrometrischen Analyse der unbekanntem Substanzklasse zusammengefasst, ergibt sich folgendes Fragmentierungsmuster:



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Mit dem anhaltenden Trend hin zu Fertiggerichten steigt gleichzeitig der Bedarf an haltbar gemachten Zutaten, wie z. B. Eigelb. Die vorbehandelten Eigelbprodukte sollten dabei in ihrer technologischen Funktionalität weitestgehend dem frischen Eigelb gleichen. Um dies zu überprüfen, wurde nach geeigneten Analyseverfahren gesucht. Aus praktischen Erwägungen in Hinblick auf die Anwendbarkeit in der Industrie wurde jedoch der Fokus auf einfache Handhabung und Kosteneinsparung gesetzt. Mit Hilfe rheologischer und penetrometrischer Methoden konnte somit ein Nachweis der technofunktionellen Eigenschaften von gefriergetrocknetem/rehydratisiertem Eigelb erbracht werden. Einen Schwerpunkt bildete dabei die Bestimmung des Relativen Viskositätsmaximums mittels Rheologie. Dieser zuvor noch nicht beschriebene Parameter lässt sich durch die Messung der scheinbaren Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur berechnen. Das Relative Viskositätsmaximum gibt dabei die Zunahme der scheinbaren Viskosität (Scherrate:  $26 \text{ s}^{-1}$ ) zum ersten Viskositätsmaximum zwischen  $75$  und  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  wieder und korreliert mit der Fähigkeit zur Ausbildung der optimalen gelartigen Konsistenz am „Punkt der Rose“. In Kombination mit Messungen der hitzeinduzierten Gelstabilität (Penetrometrie) und der Bestimmung des Fließverhaltens (Rheologie) ist schließlich eine schnelle und sichere Beurteilung der technofunktionellen Eigenschaften von Eigelb möglich.

Die thermische Gelbildung von Eigelb gehört zu den technologischen Schlüsselfunktionen und ist aufgrund der komplexen Zusammenhänge zwischen den Eigelbbestandteilen nur unzureichend erforscht. Neben den Proteinen spielen dabei vor allem die Phospholipide eine entscheidende Rolle. Durch Modifizierung der Phospholipide des Eigelbs mit Phospholipasen sollten daher neue Erkenntnisse über die thermische Gelbildung gewonnen werden. Von besonderem Interesse war dabei der Einfluss der enzymatischen Behandlung auf den Verlauf der scheinbaren Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur. Die thermoinduzierte Gelbildung von Eigelb ist prinzipiell ein mehrstufiger Prozess, welcher mit der Denaturierung von Proteinen beginnt und sich über Aggregation der denaturierten Proteine und Assoziation der Aggregate fortsetzt. Wird der Verlauf der scheinbaren Viskosität in einem Temperaturbereich zwischen  $55$  und  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  untersucht, ergeben sich zwei Viskositätsmaxima (Scherrate:  $26 \text{ s}^{-1}$ ), wel-

che jeweils unterschiedliche Stufen der Gelbildung beschreiben. Während der erste Viskositätsanstieg lediglich auf die Wechselwirkungen zwischen den entfalteten Livetinen und den z. T. denaturierten Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) zurückzuführen ist, folgt der zweite Viskositätsanstieg aus der festen und irreversiblen Assoziation der Aggregate koagulierter Proteine. Der Viskositätsabfall zwischen dem ersten und dem zweiten Viskositätsmaximum ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Freisetzung von Lipiden durch die thermische Schädigung der LDL-Mizellen zurückzuführen. Die enzymatische Modifizierung der Phospholipide des Eigelbs mittels Phospholipasen führte zu spezifischen Effekten in Hinsicht auf den Viskositätsverlauf und erlaubt somit neue Erkenntnisse über die hitzeinduzierte Gelbildung von Eigelb. Bei nativem Eigelb führte die enzymatische Behandlung zu einer signifikanten Verschiebung des ersten Viskositätsanstiegs von 79 zu 97 °C. Es wird demnach angenommen, dass aufgrund der erhöhten Bildung von Lysophosphatidylcholin (LPC), welches als starker hydrophiler Emulgator wirkt, die Bildung eines stabilen LPC-LDL-Komplexes begünstigt wird. Als Folge dessen werden die hydrophoben Bereiche der z. T. denaturierten LDL-Mizellen vor Wechselwirkungen untereinander sowie mit anderen denaturierten Proteinen wie den Livetinen geschützt und der Viskositätsanstieg wird zu höheren Temperaturen hin verschoben. Bei handelsüblich pasteurisiertem Eigelb führt die Hitzebehandlung (bei Temperaturen bis zu 68 °C) zu einer Vorschädigung der Eigelbproteine, infolge dessen vermutlich kein stabiler LPC-LDL-Komplex gebildet werden konnte. Denn im Gegensatz zu nativem Eigelb konnte bei handelsüblich pasteurisiertem Eigelb keine signifikante Verschiebung des ersten Viskositätsmaximums zu höheren Temperaturen hin beobachtet werden. Dennoch führte die enzymatische Behandlung mit Phospholipasen dazu, dass hierbei nach dem ersten Viskositätsmaximum mit steigender Temperatur weder ein Viskositätsabfall noch ein erneuter Anstieg zu erkennen war. Die scheinbare Viskosität (Scherrate:  $26 \text{ s}^{-1}$ ) stagnierte auf dem Niveau des ersten Maximums bis zu einer Temperatur von 100 °C. Diese Ergebnisse legen nahe, dass LPC die durch die Pasteurisation vorgeschädigten LDL-Mizellen durch Komplexbildung stabilisieren kann. Infolge dessen kommt es nicht zur Freisetzung von Lipiden und schließlich zur Koagulation der Apolipoproteine. Die hitzeinduzierte Gelbildung durch Aggregation und Assoziation denaturierter Proteine wird somit bis zu einer Temperatur von 100 °C unterbunden. Dadurch ergeben sich neue Applikationsmöglichkeiten für die Lebensmittelindustrie, insbesondere für warm ge-

rührte Produkte wie Saucen oder feine Desserts, welche auch bei höheren Temperaturen nicht beginnen sollen zu stocken. Obwohl das mit Phospholipasen behandelte gefriergetrocknete/rehydratisierte Eigelb einen zweiten Viskositätsanstieg zeigt, so ist dieser doch signifikant zu höheren Temperaturen (oberhalb von 87 °C) verschoben. Im Gegensatz zum nativen und handelsüblich pasteurisierten Eigelb ist hierbei zwar keine vollständige Inhibierung der hitzeinduzierten Gelbildung möglich, dennoch wurde die Hitzestabilität der Proteine durch die enzymatische Behandlung signifikant erhöht. Dies konnte durch die Ergebnisse der Untersuchungen der Gelstabilität mittels Penetrometrie weiter untermauert werden. Die mit Phospholipasen behandelten gefriergetrockneten/rehydratisierten Eigelbproben zeigten signifikant höhere Eindringtiefen, was auf eine geringere Stabilität bzw. einen geringeren Grad der Quervernetzungen im hitzeinduzierten Gelnetzwerk schließen lässt.

Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Ergebnisse zwischen den Phospholipase-Typen wurden lediglich bei der Ermittlung des Fließverhaltens bei 30 °C und bei der quantitativen Bestimmung der Phospholipide mittels HPLC/ELSD beobachtet. So zeigt die Behandlung mit Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>) im Gegensatz zu Sternenzym PLP (PLA<sub>2</sub>) eine signifikante Erhöhung des Konsistenzfaktors und eine Abnahme des Fließindex, was zum einen auf eine Erhöhung der Viskosität und zum anderen eine Verstärkung des scherverdünnenden Verhaltens schließen lässt. Darüber hinaus werden ca. 78 % des Phosphatidylethanolamins abgebaut. Inwieweit diese Effekte jedoch zusammenhängen, ist noch unklar und sollte in weiteren Studien erforscht werden.

Eine bisher noch kaum erforschte Klasse innerhalb der polaren Lipide sind die Glycerophosphonolipide. Über ihre genaue Funktion in biologischen Systemen sowie über spezifische Eigenschaften, welche möglicherweise einen technologischen Nutzen erbringen können, ist nur wenig bekannt. Da es keine kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen auf dem Markt gibt, bereitet die qualitative und quantitative Bestimmung der Glycerophosphonolipide noch erhebliche Probleme. Weitere analytische Schwierigkeiten bestehen in der großen chemischen Übereinstimmung zwischen den Glycerophosphono- und den Glycerophospholipiden und den erheblichen Unterschieden im Gehalt in vielen biologischen Matrices. Aus diesen Gründen wurde zuerst mit 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat eine Referenzsubstanz für die Klasse der Glycerophosphonolipide synthetisiert und darauf aufbauend eine

HPLC/ELSD-Methode zur Trennung der Glycerophospho- von den Glycerophosphonolipiden entwickelt. Die Nachweisgrenze für die 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat beträgt hierbei im Lösemittel 4,6 mg/L. Weiterhin wurde zur näheren Charakterisierung und zur besseren qualitativen Bestimmung der Glycerophosphonolipide das spezifische Fragmentierungsmuster von 1,2-Dioctadecanoyl-glycero-3-aminoethylphosphonat mittels ESI-MS<sup>2</sup> ermittelt. Der Versuch einer qualitativen Bestimmung von Glycerophosphonolipiden durch Ermittlung spezifischer Banden mittels ATR/FT-IR erbrachte jedoch keine verwertbaren Ergebnisse.

Im Eigelb konnten mittels DC bis zu einer Nachweisgrenze von 0,02 % keine Glycerophosphonolipide nachgewiesen werden. Die weitere Bestimmung mit Hilfe der HPLC/ELSD-Methode war durch eine coeluiierende unbekannte Substanz nicht möglich. Diese konnte jedoch mittels LC-MS<sup>3</sup> näher charakterisiert werden. Hierbei ergaben sich deutliche Hinweise auf ein Diacylglycerid mit einer noch unbekanntem Kopfgruppe. Aufgrund des Fragmentierungsmusters konnten aber dabei bekannte Glycerophosphonolipide sicher ausgeschlossen werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse erscheint die weitere Erforschung von Phosphonolipiden in Eigelb nicht sinnvoll. Jedoch ist eine sichere Identifizierung und quantitative Bestimmung des unbekanntem Diacylglycerids ein interessantes und vielversprechendes Forschungsfeld für weitere Studien.

## 6 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Waldemar Ternes für die fruchtbare Zusammenarbeit sowie für sein Vertrauen und die mir eröffneten Freiräume.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. C. Vogt für ihre fachliche Unterstützung.

Für die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie für so manch angenehme Zerstreung danke ich herzlichst Frau Dr. S. Kreuz, Herrn J. Gunter, Herrn C. Bohnsack und Frau S. Satters.

Dem gesamten Arbeitskreis Chemische Analytik möchte ich danken und besonders Herrn A. Zimmermann, Herrn Q.-D. Pham, Herrn J. Rosenthal, Frau D. Matthias, Frau A. Büthe und Frau Dr. A. Drotleff für die freundliche und praktische Unterstützung im Arbeitsalltag.

Des Weiteren danke ich dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (durch den AiF) und dem FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. Bonn) ohne deren finanzielle Unterstützung (Projekt 15512 N) dieses Forschungsvorhaben nicht hätte realisiert werden können.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Herrn F. Hackelöer, welcher mir besonders in den schwierigen Phasen den nötigen Rückhalt gegeben hat.

Schließlich möchte ich den wichtigsten Menschen danken, meinen Eltern, welche immer an mich geglaubt und mich doch nie unter Druck gesetzt haben und mir alles erst ermöglicht haben.



## 7 Literaturverzeichnis

- Aguilera JM. 1995. Gelation of whey proteins. *Food Technology*, 49 (10):83-89.
- Allain A-F, Paquin P, Subirade M. 1999. Relationships between conformation of  $\beta$ -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26:337-344.
- Ando S, Saito M. 1987. In: Kuksis A, Hrsg. *Chromatography of lipids in biomedical research and clinical diagnosis*. Amsterdam: Elsevier, 266-310.
- Andrikopoulos NK. 2002. Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (5):473-505.
- Avalli A, Contarini G. 2005. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A*, 1071 (1-2):185-190.
- Baer E, Stanacev NZ. 1964. Phosphonolipids. I. Synthesis of a phosphonic acid analogue of cephalin. *Journal of Biological Chemistry*, 239:3209-3214.
- Baer E, Stanacev NZ. 1966. Phosphonolipids. VI. Chemical and enzymatic degradation for study of structure. *Canadian Journal of Biochemistry*, 44 (6):893-897.
- Baer E, Basu H. 1968. Phosphonolipids. XVI. An alternative method for the synthesis of phosphonic acid analogues of L-alpha-cephalins. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46 (4):351-354.
- Baer E, Basu H. 1969. Phosphonic acid analogues of carbohydrate metabolites. I. Synthesis of L-and D-dihydroxypropylphosphonic acid. *Canadian Journal of Biochemistry*, 47 (10):955-960.
- Becart I, Chevalier C, Biesse JP. 1990. Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with light scattering detector: Application to raw materials for cosmetic use. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13 (2):126-129.
- Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. 2001. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5. Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Benezra C, Pavanaram SK, Baer E. 1970. Detection of carbon. Phosphorus bonds by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48 (9):991-993.
- Berczi A, Horvath G. 2003. Lipid rafts in the plant plasma membrane? *Acta Biologica Szegediensis*, 47 (1-4):7-10.
- Bickel W. 1984. *Der große Pellaprat. Die moderne und internationale Kochkunst*. München: Gräfe und Unzer.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37:911-917.
- Bondia-Pons I, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. 2004. Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 809 (2):339-344.
- Boselli E, Pacetti D, Curzi F, Frega NG. 2008. Determination of phospholipid molecular species in pork meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and evaporative light scattering detection. *Meat Science*, 78:305-313.

- Breton L, Serkiz B, Volland JP, Lepagnol J. 1989. A new rapid method for phospholipid separation by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 497:243-249.
- Bunger H, Pison U. 1995. Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 672 (1):25-31.
- Carunchio V, Nicoletti I, Frezza L, Sinibaldi M. 1984. High-performance liquid chromatography of phospholipids on chemically bonded silica gel. *Annali di Chimica*, 74:331-339.
- Chacko GK, Hanahan DJ. 1969. Chemical synthesis of phosphonic acid monoether analogues of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 176 (1):190-193.
- Chang CH, Powrie WD, Fennema O. 1977. Studies on gelation of egg-yolk and plasma upon freezing and thawing. *Journal of Food Science*, 42 (6):1658-1665.
- Chang CM, Powrie WD, Fennema O. 1977. Microstructure of egg-yolk. *Journal of Food Science*, 42 (5):1193-1200.
- Christie WW. 2007. HPLC Separation of Phospholipids. [http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/hplc\\_pl/index.htm](http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/hplc_pl/index.htm).
- Clark AH. 1992. Gels and gelling. In: Schwartzberg HG, Hartel RW, Hrsg. *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker Inc., 263-305.
- Clark AH, Kavanagh GM, Ross-Murphy SB. 2001. Globular protein gelation - Theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15 (4-6):383-400.
- Cordobés F, Partal P, Guerrero A. 2004. Rheology and microstructure of heat-induced egg yolk gels. *Rheologica Acta*, 43 (2):184-195.
- De Hoffmann E, Stroobant V. 2001. *Mass spectrometry: Principles and applications* 2. Aufl. Chichester: Wiley
- DeLong CJ, Baker PR, Samuel M, Cui Z, Thomas MJ. 2001. Molecular species composition of rat liver phospholipids by ESI-MS/MS: The effect of chromatography. *Journal of Lipid Research*, 42 (12):1959-1968.
- Dembitskii. 1988. Lipids of marine origin. IV. 1,2-Di-O-alkylglycerophospho- and -phosphonolipids from the marine sponge *Ectyodoryx kovdaicum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 24 (5):642-643.
- Dittmer JC, Lester RL. 1964. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research*, 5:126-127.
- Dixon DK, Cotterill OJ. 1981. Electrophoretic and chromatographic changes in egg-yolk proteins due to heat. *Journal of Food Science*, 46 (4):981-983.
- Dobson G, Deighton N. 2001. Analysis of phospholipid molecular species by liquid chromatography - Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of diacylglycerol nicotines. *Chemistry and Physics of Lipids*, 111 (1):1-17.
- Donovan JW, Mapes CJ, Davis JG, Garibaldi JA. 1975. Differential scanning calorimetric study of stability of egg-white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26 (1):73-83.
- Eder K. 1995. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 671 (1-2):113-131.
- Estrada R, Yappert MC. 2004. Alternative approaches for the detection of various phospholipid classes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39 (4):412-422.

- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 (4926):64-71.
- Ferry JD. 1980. Viscoelastic properties of polymers. 3. Aufl. New York: John Wiley & Sons.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226 (1):497-509.
- Griffiths WJ. 2003. Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids. *Mass Spectrometry Reviews*, 22 (2):81-152.
- Guan Z, Grunler J, Piao S, Sindelar PJ. 2001. Separation and quantitation of phospholipids and their ether analogues by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 297 (2):137-143.
- Gunnarsson T, Ekblad L, Karlsson A, Michelsen P, Odham G, Jergil B. 1997. Separation of polyphosphoinositides using normal-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection or electrospray mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 254 (2):293-296.
- Han X, Gross RW. 2001. Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 295 (1):88-100.
- Han X, Gross RW. 2005. Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrometry Reviews*, 24 (3):367-412.
- Hasegawa S, Tamari M, Kametaka M. 1976. Isolation of diacylglyceryl-2-aminoethylphosphonate from bovine liver. *Journal of Biochemistry*, 80: 531-535.
- Hayakawa J, Okabayashi Y. 2004. Simultaneous analysis of phospholipid in rabbit bronchoalveolar lavage fluid by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (3):583-592.
- Helmy FM. 2004. Comparative studies of the endogenous phospholipids and their in vitro hydrolysis by endogenous phospholipases of various tissues from 7-day-old chicks: A thin layer chromatographic and densitometric analysis. *Cell Biochemistry and Function*, 22 (6):389-398.
- Heron S, Dreux M, Tchaplal A. 2004. Post-column addition as a method of controlling triacylglycerol response coefficient of an evaporative light scattering detector in liquid chromatography-evaporative light-scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1035 (2):221-225.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B. 2005. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Hillebrand U. 2000. *Erläuterungen zur Statistik in der Analytik: Eine Darstellung mit Beispielen*. Aachen: Shaker Verlag.
- Ho YP, Huang PC, Deng KH. 2003. Metal ion complexes in the structural analysis of phospholipids by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17 (2):114-121.
- Holland WL, Stauter EC, Stith BJ. 2003. Quantification of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid by HPLC with evaporative light-scattering detection. *Journal of Lipid Research*, 44 (4):854-858.

- Hoving EB. 1995. Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 671 (1-2):341-362.
- Hsu FF, Turk J. 2000a. Characterization of phosphatidylethanolamine as a lithiated adduct by triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization. *Journal of Mass Spectrometry*, 35 (5):595-606.
- Hsu FF, Turk J. 2000b. Characterization of phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate by electrospray ionization tandem mass spectrometry: A mechanistic study. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 11 (11):986-999.
- Hsu F-F, Turk. J. 2005. Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of complex lipids: structural characterization and mechanisms of fragmentation. Champaign: AOCS Press.
- Hvattum E, Hagelin G, Larsen A. 1998. Study of mechanisms involved in the collision-induced dissociation of carboxylate anions from glycerophospholipids using negative ion electrospray tandem quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12 (19):1405-1409.
- Ibarz A, Sintes J. 1989. Rheology of egg yolk. *Journal of Texture Studies*, 20:161-167.
- Iorio E, Di Vito M, Spadaro F, Ramoni C, Lococo E, Carnevale R, Lenti L, Strom R, Podo F. 2003. Triacsin C inhibits the formation of 1H NMR-visible mobile lipids and lipid bodies in HuT 78 apoptotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1634 (1-2):1-14.
- Isaac G, Bylund D, Mansson JE, Markides KE, Bergquist J. 2003. Analysis of phosphatidylcholine and sphingomyelin molecular species from brain extracts using capillary liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neuroscience Methods*, 128 (1-2):111-119.
- Ishida M, Yamazaki T, Houjou T, Imagawa M, Harada A, Inoue K, Taguchi R. 2004. High-resolution analysis by nano-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the identification of molecular species of phospholipids and their oxidized metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (20):2486-2494.
- Itasaka O, Hori T, Uno A, Iwamori M. 1973. Occurrence of ceramide phosphorylethanolamine containing hydroxy fatty acid in a bivalve. *Journal of Biochemistry*, 73 (1):191-193.
- Ivanova PT, Cerda BA, Horn DM, Cohen JS, McLafferty FW, Brown HA. 2001. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of changes in phospholipids in RBL-2H3 mastocytoma cells during degranulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (13):7152-7157.
- Jaekel T, Dautel K, Ternes W. 2008. Preserving functional properties of hen's egg yolk during freeze-drying. *Journal of Food Engineering*, 87:522-526.
- Jaekel T, Ternes W. 2009. Changes in rheological behavior and functional properties of hen's egg yolk induced by processing and fermentation with phospholipases. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:567-573.
- Jansen SM, Groener JE, Poorthuis BJ. 1999. Lysosomal phospholipase activity is decreased in mucopolipidosis II and III fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1436 (3):363-369.
- Jayasimhulu K, Hunt SM, Kaneshiro ES, Watanabe Y, Giner JL. 2007. Detection and identification of *Bacteriovorax stolpii* UKi2 sphingophospholipid molecular

- species. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 18 (3):394-403.
- Jungalwala FB, Turel RJ, Evans JE, McCluer RH. 1975. Sensitive analysis of ethanamine- and serine-containing phosphoglycerides by high-performance liquid chromatography. *Biochemical Journal*, 145 (3):517-526.
- Kakela R, Somerharju P, Tyynela J. 2003. Analysis of phospholipid molecular species in brains from patients with infantile and juvenile neuronal-ceroid lipofuscinosis using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*, 84 (5):1051-1065.
- Kapoulas VM. 1969. The chromatographic separation of phosphonolipids from their phospholipid analogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 176 (2):324-329.
- Kariotoglou DM, Mastronicolis SK. 2003. Sphingophosphonolipid molecular species from edible mollusks and a jellyfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136 (1):27-44.
- Kaulen HD. 1972. Separation of phosphatidylserine and -inositol by one-dimensional thin-layer chromatography of lipid extracts. *Analytical Biochemistry* 45 (2):664-667.
- Kerwin JL, Tuininga AR, Ericsson LH. 1994. Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 35 (6):1102-1114.
- Kim HY, Wang TC, Ma YC. 1994. Liquid chromatography/mass spectrometry of phospholipids using electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, 66 (22):3977-3982.
- Kiosseoglou V, Paraskevopoulou A. 2005. Molecular interactions in gels prepared with egg yolk and its fractions. *Food Hydrocolloids*, 19 (3):527-532.
- Kittredge JS, Isbell AF, Hughes RR. 1967. Isolation and characterization of the N-methyl derivatives of 2-aminoethylphosphonic acid from the sea anemone, *Anthopleura xanthogrammica*. *Biochemistry*, 6 (1):289-295.
- Kittredge JS, Horiguchi M, Williams PM. 1969. Aminophosphonic acids: Biosynthesis by marine phytoplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29 (2):859-863.
- Kivini H, Jarvenpaa EP, Aro H, Huopalahti R, Ryhanen EL. 2004. Qualitative and quantitative liquid chromatographic analysis methods for the determination of the effects of feed supplements on hen egg yolk phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (13):4289-4295.
- Koivusalo M, Haimi P, Heikinheimo L, Kostianen R, Somerharju P. 2001. Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: Effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. *Journal of Lipid Research*, 42 (4):663-672.
- Kramer SD, Hurley JA, Abbott NJ, Begley DJ. 2002. Lipids in blood-brain barrier models in vitro I: Thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography for the analysis of lipid classes and long-chain polyunsaturated fatty acids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 38 (10):557-565.
- Kumar SA, Mahadeva S. 1970. Physicochemical studies on gelation of hens egg yolk - delipidation of yolk plasma by treatment with phospholipase-C and extraction with solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18 (4):666-&.

- Larsen A, Uran S, Jacobsen PB, Skotland T. 2001. Collision-induced dissociation of glycerophospholipids using electrospray ion-trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 (24):2393-2398.
- Le Denmat M, Anton M, Gandemer G. 1999. Protein denaturation and emulsifying properties of plasma and granules of egg yolk as related to heat treatment. *Journal of Food Science*, 64 (2):194-197.
- Lehmann WD, Koester M, Erben G, Keppler D. 1997. Characterization and quantification of rat bile phosphatidylcholine by electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 246 (1):102-110.
- Lessig J, Gey C, Suss R, Schiller J, Glander HJ, Arnhold J. 2004. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 137 (2):265-277.
- Li-Chan ECY. 1996. The application of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science and Technology* 7:361-370.
- Liebisch G, Drobnik W, Reil M, Trumbach B, Arnecke R, Olgemoller B, Roscher A, Schmitz G. 1999. Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Journal of Lipid Research*, 40 (8):1539-1546.
- Lima A. 2002. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 465:81-91.
- Malavolta M, Bocci F, Boselli E, Frega NG. 2004. Normal phase liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of phospholipid molecular species in blood mononuclear cells: Application to cystic fibrosis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 810 (2):173-186.
- Martin WG, Vandegaer JE, Cook WH. 1957. Fractionation of livetins and the molecular weights of the alpha-components and beta-components. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 35 (4):241-250.
- Martin WG, Augustyniak J, Cook WH. 1964. Fractionation + characterization of low-density lipoproteins of hens egg yolk. *Biochimica et Biophysica Acta*, 84 (6):714-720.
- Matsubara T. 1975. The structure and distribution of ceramide aminoethylphosphonates in the oyster (*Ostrea gigas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 388 (3):353-360.
- Mine Y. 1997. Structural and functional changes of hen's egg yolk low-density lipoproteins with phospholipase A(2). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (12):4558-4563.
- Miyawaki O, Abe T, Yano T. 1992. Freezing and ice structure formed in protein gels. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56 (6):953-957.
- Moe MK, Anderssen T, Strom MB, Jensen E. 2004. Vicinal hydroxylation of unsaturated fatty acids for structural characterization of intact neutral phospholipids by negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (18):2121-2130.
- Mohr KH, Simon S. 1992. Kinetic investigations of the denaturation of egg yolk proteins by rheological measurements. *Nahrung*, 36 (6):530-538.
- Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Costa R, Chiofalo B, Dugo P, Dugo G. 2004. Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography-mass spec-

- trometry in the analysis of lipids. *Journal of Chromatography A*, 1035 (2):237-247.
- Moschidis MC, Demopoulos CA. 1983. Silicic acid column chromatography of phosphonolipids. II. Separation of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, cardiolipin and other related phospholipids. *Journal of Chromatography A*, 259 (3):504-507.
- Moschidis MC. 1983. Isolation of goat spleen phosphonolipids by thin-layer chromatography: Their identification and silicic acid column chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, 268 (3):485-492.
- Moschidis MC, Demopoulos CA, Kritikou LG. 1984. Isolation of hen's egg phosphonolipids by thin-layer chromatography, their identification and silicic acid column chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, 292 (2):473-478.
- Moschidis MC. 1984. Sheep and goat brain phosphonolipids: isolation by thin-layer chromatography, identification and column chromatography. *Journal of Chromatography A*, 298 (2):366-371.
- Moschidis MC. 1986. Isolation of beef brain phosphonolipids by thin layer chromatography: their identification and silicic acid column chromatographic separation. *Zeitschrift für Naturforschung*, 41 (3):369-373.
- Moschidis MC, Andrikopoulos NK. 1987. Separation of the phosphono analogues of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from related phospholipids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 403:363-365.
- Mucha AK, P.; Plenat, F.; Cristau, H. J. 1995. Preparation of benzyl N-benzyloxycarbonylaminophosphonates and -aminophosphonites - The scope and limitations of O-benzyl-N,N'-dicyclohexylisourea method. *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 105 (1-4):187-193.
- Mukhamedova KS, Tolibbaev I, Glushenkova AI. 1985. Phosphonolipids of Kenaf Seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 21 (5):708-709.
- Mukhamedova KS, Glushenkova AI. 2000. Natural phosphonolipids. *Chemistry of Natural Compounds*, 36 (4):329-341.
- Myher JJ, Kuksis A. 1995. General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 671 (1-2):3-33.
- Nakamura H, Zimmermann CL, Pisano JJ. 1979. Analysis of histidine-containing dipeptides, polyamines, and related amino acids by high-performance liquid chromatography: Application to guinea pig brain. *Analytical Biochemistry*, 93:423-429.
- Néron S, El Amrani F, Potus J, Nicolas J. 2004. Separation and quantification by high-performance liquid chromatography with light scattering detection of the main wheat flour phospholipids during dough mixing in the presence of phospholipase. *Journal of Chromatography A*, 1047 (1):77-83.
- Nielsen H. 2007. Production of phospholipids from spray-dried egg yolk by consecutive in situ solid phase extraction with acetone and ethanol. *LWT Food Science and Technology*, 40 (8):1337-1343.
- Nikiforidis CV, Kiosseoglou V. 2007. The role of Tween in inhibiting heat-induced destabilization of yolk-based emulsions. *Food Hydrocolloids*, 21 (8):1310-1318.

- Nzai JM, Proctor A. 1998. Determination of phospholipids in vegetable oil by fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (10):1281-1289.
- Olsson NU, Harding AJ, Harper C, Salem N, Jr. 1996. High-performance liquid chromatography method with light-scattering detection for measurements of lipid class composition: Analysis of brains from alcoholics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 681 (2):213-218.
- Olsson NU, Salem N, Jr. 1997. Molecular species analysis of phospholipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 692 (2):245-256.
- Pacetti D, Malavolta M, Bocci F, Boselli E, Frega NG. 2004. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometric analysis and quantification of phosphatidylcholine molecular species in the serum of cystic fibrosis subjects supplemented with docosahexaenoic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (20):2395-2400.
- Pacetti D, Boselli E, Hulan HW, Frega NG. 2005. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry of phospholipid molecular species in eggs from hens fed diets enriched in seal blubber oil. *Journal of Chromatography A*, 1097 (1-2):66-73.
- Patton GM, Robins SJ. 1990. Extraction of phospholipids and analysis of phospholipid molecular species. *Methods in Enzymology*, 187:195-215.
- Perona JS, Ruiz-Gutierrez V. 2003. Simultaneous determination of molecular species of monoacylglycerols, diacylglycerols and triacylglycerols in human very-low-density lipoproteins by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 785 (1):89-99.
- Perona JS, Ruiz-Gutierrez V. 2004. Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection. *Journal of Separation Science*, 27 (9):653-659.
- Peterson BL, Cummings BS. 2006. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography* 20 (3):227-243.
- Powrie WD, Little H, Lopez A. 1963. Gelation of egg yolk. *Journal of Food Science*, 28 (1):38-46.
- Pulfer M, Murphy RC. 2003. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, 22 (5):332-364.
- Radin NS. 1981. Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. *Methods in Enzymology*, 72:5-7.
- Rao MA. 1977. Rheology of liquid foods - A review. *Journal of Texture Studies*, 8:135-168.
- Riedel L. 1972. Enthalpie-water content diagramm for lean beef. Recommendations for the processing and handling of frozen food. 2. Aufl. Paris: IIR.
- Robins SJ, Patton GM. 1986. Separation of phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography: Potentials for use in metabolic studies. *Journal of Lipid Research*, 27 (2):131-139.
- Rosenthal AF, Pousada M. 1968. Inhibition of phospholipase C by phosphonate analogs of glycerophosphatides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 164 (2):226-237.



- Ruiz-Gutierrez V, Perez-Camino MC. 2000. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *Journal of Chromatography A*, 885 (1-2):321-341.
- Rujoi M, Estrada R, Yappert MC. 2004. In situ MALDI-TOF MS regional analysis of neutral phospholipids in lens tissue. *Analytical Chemistry*, 76 (6):1657-1663.
- Samet JM, Friedman M, Henke DC. 1989. High-performance liquid chromatography separation of phospholipid classes and arachidonic acid on cyanopropyl columns. *Analytical Biochemistry*, 182 (1):32-36.
- Scalzo AM, Dickerson Jr. RW, Peeler JT, Read Jr. RB. 1970. The viscosity of egg and egg products. *Food Technology*, 24:1301-1307.
- Schiller J, Suss R, Arnhold J, Fuchs B, Lessig J, Muller M, Petkovic M, Spalteholz H, Zschornig O, Arnold K. 2004. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research*, 43 (5):449-488.
- Schneider M. 1989. Fractionation and purification of lecithin. In: Szuhaj BF, Hrsg. *Lecithins: sources, manufacture & uses*. Champaign, IL: AOCS Press, 109-130.
- Senge B, Blochwitz R, Bentlin S. 2004. Rheologische Stoffkennwerte richtig bestimmen. *Deutsche Milchwirtschaft*, 7:256-260.
- Seppanen-Laakso T, Laakso I, Vanhanen H, Kiviranta K, Lehtimaki T, Hiltunen R. 2001. Major human plasma lipid classes determined by quantitative high-performance liquid chromatography, their variation and associations with phospholipid fatty acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 754 (2):437-445.
- Sherma J, Jain R. 2000. Planar chromatography in clinical chemistry. In: Meyers RA, Hrsg. *Encyclopedia of analytical chemistry*. Chichester: Wiley, 1583-1603.
- Silversand C, Haux C. 1997. Improved high-performance liquid chromatographic method for the separation and quantification of lipid classes: Application to fish lipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 703 (1-2):7-14.
- Singh AK, Jiang Y. 1995. Quantitative chromatographic analysis of inositol phospholipids and related compounds. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 671 (1-2):255-280.
- Sommerer D, Suss R, Hammerschmidt S, Wirtz H, Arnold K, Schiller J. 2004. Analysis of the phospholipid composition of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from man and minipig by MALDI-TOF mass spectrometry in combination with TLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (1):199-206.
- Sowa JM, Subbaiah PV. 2004. Variable recoveries of fatty acids following the separation of lipids on commercial silica gel TLC plates. Selective loss of unsaturated fatty acids on certain brands of plates. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 813 (1-2):159-166.
- Stading M, Hermansson A-M. 1990. Viscoelastic behavior of  $\beta$ -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4:121-135.
- Stillway LW, Harmon SJ. 1980. A procedure for detecting phospholipids on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research*, 21 (8):1141-1143.
- Stith BJ, Hall J, Ayres P, Waggoner L, Moore JD, Shaw WA. 2000. Quantification of major classes of *Xenopus* phospholipids by high performance liquid chroma-

- tography with evaporative light scattering detection. *Journal of Lipid Research*, 41 (9):1448-1454.
- Suchocka Z, Gronostajska D, Suchocki P, Pachecka J. 2003. New HPLC method for separation of blood plasma phospholipids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (4-5):859-865.
- Taguchi R, Hayakawa J, Takeuchi Y, Ishida M. 2000. Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 35 (8):953-966.
- Taguchi R, Houjou T, Nakanishi H, Yamazaki T, Ishida M, Imagawa M, Shimizu T. 2005. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 823 (1):26-36.
- Telis VRN, Kieckbusch TG. 1997. Viscoelasticity of frozen/thawed egg yolk. *Journal of Food Science*, 62 (3):548-550.
- Telis-Romero J, Thomaz CEP, Bernardi M, Telis VRN, Gabas AL. 2006. Rheological properties and fluid dynamics of egg yolk. *Journal of Food Engineering*, 74 (2):191-197.
- Ternes W, Werlein HD. 1987a. Viscosity of egg-yolk in a high-temperature range in correlation to salt, sugar, acid and alcohol. *Archiv für Geflügelkunde*, 51 (5):173-179.
- Ternes W, Werlein HD. 1987b. Stability of egg-yolk-foams. *Archiv für Geflügelkunde*, 52 (1):1-4.
- Ternes W. 1988. The rose of the egg yolk. In: Lasztity R, Hrsg. *Functional properties of food proteins. Proceedings of international seminar of the Federation of European Chemical Societies- Working Party on Food Chemistry*. Budapest, Hungary.
- Ternes W, Acker L, Scholtyssek S. 1994. *Ei und Eiprodukte*. Berlin und Hamburg: Paul Parey.
- Ternes W, Jaekel T. 2010. Analysis of glycerophosphonolipids in egg yolk. *European Food Research and Technology*, 230 (4):559-570
- Thevenon C, El Bawab S, Chantegrel B, Lagarde M. 1998. Highly sensitive measurement of lipid molecular species from biological samples by fluorimetric detection coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708 (1-2):39-47.
- Thompson GA, Jr. 1969. The metabolism of 2-aminoethylphosphonate lipids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta*, 176 (2):330-338.
- Tolibbaev I, Mukhamedova KS, Glushenkova AI. 1989. Phosphono analogue of phosphatidylethanolamines from kenaf seeds. *Chemistry of Natural Compounds*, 25 (6):848-849.
- Tserng KY, Griffin R. 2003. Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, 323 (1):84-93.
- Turner DL, Silver MJ, Holburn RR, Baczynski E, Brown AB. 1968. An unsaturated phosphonic acid analogue of phosphatidylethanolamine and its activity in blood-clotting systems. *Lipids*, 3 (3):234-238.
- Uran S, Larsen A, Jacobsen PB, Skotland T. 2001. Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 758 (2):265-275.

- Vaskovsky VE, Kostetsky EY. 1968. Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *Journal of Lipid Research*, 9 (3):396.
- Vaskovsky VE, Svetashev VI. 1972. Phospholipid spray reagents. *Journal of Chromatography A*, 65 (2):451-453.
- Vaskovsky VE, Kostetsky EY, Vasendin IM. 1975. A universal reagent for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography A*, 114 (1):129-141.
- Wang Y, Krull IS, Liu C, Orr JD. 2003. Derivatization of phospholipids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 793 (1):3-14.
- Wen Z, Kim HY. 2004. Alterations in hippocampal phospholipid profile by prenatal exposure to ethanol. *Journal of Neurochemistry*, 89 (6):1368-1377.
- White T, Bursten S, Federighi D, Lewis RA, Nudelman E. 1998. High-resolution separation and quantification of neutral lipid and phospholipid species in mammalian cells and sera by multi-one-dimensional thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 258 (1):109-117.
- Wilkes JG, Churchwell MI, Billedeau SM, Vollmer DL, Volmer DA, Thompson HC, Jr., Lay JO, Jr. 1996. Determination of underivatized fumonisin B1 and related compounds by HPLC. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 392:93-103.
- Wright DJ. 1986. In: Hudson BJB, Hrsg. *Developments in food proteins*. London: Applied Science Publishers, 61-90.
- Yamauchi KU, F.; Tabata, S.; Kinoshita, M. 1986. Synthesis of glycerophosphonolipids containing aminoalkylphosphonic acids. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 1 (5):765-770.
- Zacarias A, Bolanowski D, Bhatnagar A. 2002. Comparative measurements of multicomponent phospholipid mixtures by electrospray mass spectroscopy: relating ion intensity to concentration. *Analytical Biochemistry*, 308 (1):152-159.
- Zhang L, Hu S, Cook L, Dovichi NJ. 2002. Analysis of aminophospholipid molecular species by methyl-beta-cyclodextrin modified micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 23 (17):3071-3077.
- Zhong JH, Guo QY, Ye RG, Lindholm B, Wang T. 2000. Phospholipids in dialysate and the peritoneal surface layer. *Advances in Peritoneal Dialysis*, 16:36-41.
- Zink KG, Mangelsdorf K. 2004. Efficient and rapid method for extraction of intact phospholipids from sediments combined with molecular structure elucidation using LC-ESI-MS-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380 (5-6):798-812.

## 8 Anhang

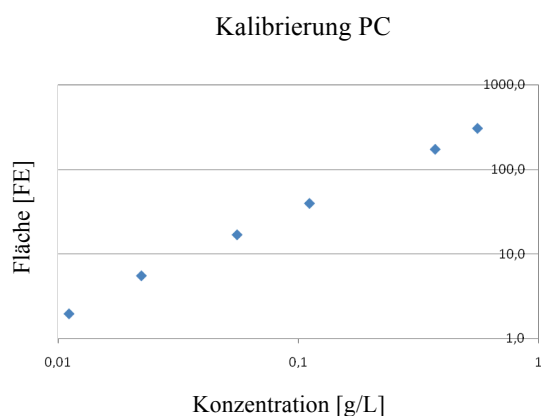
### 8.1 Statistik

#### 8.1.1 Quantitative Bestimmung der Phospholipide

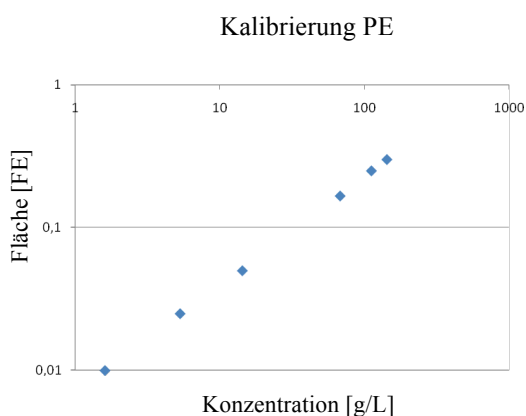
Die quantitative Bestimmung der Phospholipide des Eigelbs wurde laut Methode von Avalli und Contarini (2005) durchgeführt. Die Fläche wurde als Funktion der Kalibrierkonzentration in doppelt logarithmischer Form aufgetragen. Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Kalibrierparameter für die quantitative Bestimmung der Phospholipide

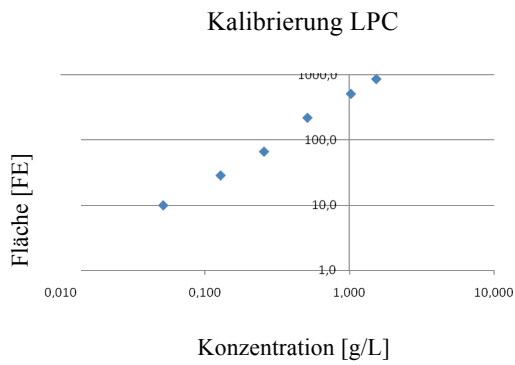
Phospholipid	Ordinatenabschnitt [log FE]	Regressionskoeffizient [log FE/(g/L)]	Bestimmtheitsmaß
PE	2,8021	1,2894	0,9982
PC	2,5948	1,2713	0,9972
LPC	2,6802	1,3410	0,9964



doppelt logarithmische Auftragung der Fläche gegen die Kalibrierkonzentration von PC



doppelt logarithmische Auftragung der Fläche gegen die Kalibrierkonzentration von PE



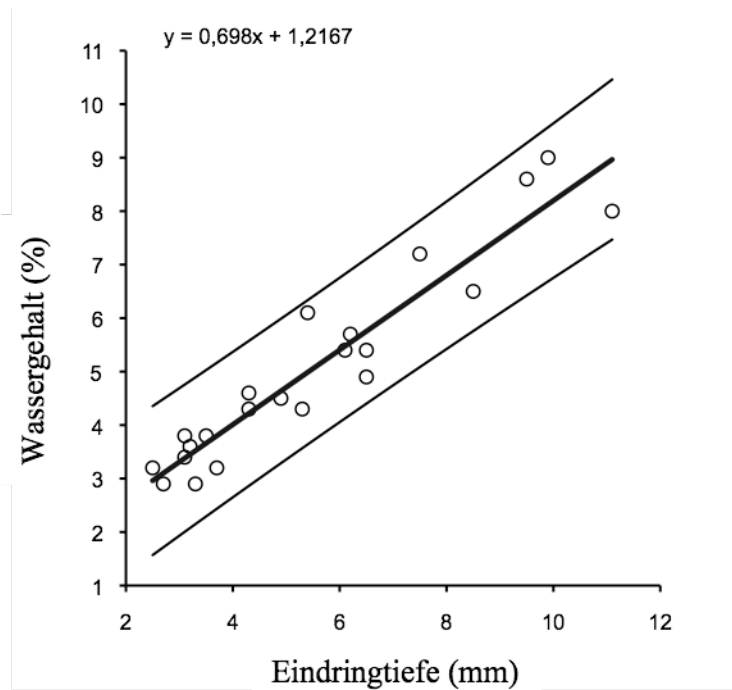
doppelt logarithmische Auftragung der Fläche gegen die Kalibrierkonzentration von LPC

### 8.1.2 Test auf Linearität

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Restwassergehalt von gefriergetrocknetem Eigelb (moisture content) und der Eindringtiefe des Penetrometers (penetration value). Ergebnisse des EP6-P Linearity Tests der Analyse-it Software von STATCON:

**Equality of variance test**  
Accept

**Lack of linear fit test**  
Accept



### 8.1.3 Rf-Werte nach der DC-Methode von Kapoulas (1969)

---

Messung	Laufstrecke PE [cm]	Laufstrecke PC [cm]	Laufstrecke PnE [cm]	Ende Laufstrecke [cm]
1	4,0	1,7	7,2	8,5
2	4,1	1,9	7,1	8,7
3	3,5	1,7	6,8	7,7
4	3,9	1,8	7,0	8,2
5	3,9	1,8	7,0	8,4
6	3,9	1,7	7,2	8,8

---

### 8.1.4 Verfahrenskenngrößen für die HPLC/ELSD-Methode von PnE

Die Bestimmung der Verfahrenskenngrößen für die HPLC/ELSD-Methode von PnE wurde nach Hillebrand (2000) mittels Excel® 2003 durchgeführt.

#### Prüfung des Kalibrierbereichs auf Varianzhomogenität nach Bartlett

Kalibrierprobe		1	2	3	4	5
$n_i$	30	6	6	6	6	6
$1/f_i$	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Messwerte		98,68	76,34	38,25	18,38	12,80
Messwerte		102,51	75,70	42,18	15,46	13,35
Messwerte		103,14	77,90	39,92	15,19	8,31
Messwerte		105,56	79,10	37,01	19,90	11,86
Messwerte		106,58	77,00	36,46	15,03	9,21
Messwerte		105,47	78,75	42,81	17,38	7,80
$k$	5					
$s$		2,89	1,35	2,66	2,00	2,41
$s^2$		8,36	1,82	7,06	3,98	5,80
$f_i \cdot s_i^2$	135,12	41,81	9,11	35,30	19,91	28,99
$\log s^2$	3,40	0,92	0,26	0,85	0,60	0,76
$f_i \cdot \log s^2$	16,98	4,61	1,30	4,24	3,00	3,82
$s_G$	2,325					
$c$	1,08					
$PW_{Ba}$	2,87 < 9,49 $\equiv$ Homogenität der Varianzen					

**Bestimmung der Reststandardabweichung, Verfahrensstandardabweichung und Relativen Verfahrensstandardabweichung**

Kalibrierprobe	1	2	3	4	5	
$x_i$	261,93	410	367	246	164	123
$y_i$	103,66	77,47	39,44	16,89	10,56	
$\log x_i$	2,37	2,61	2,56	2,39	2,21	2,09
$\log y_i$		2,02	1,89	1,60	1,23	1,02
b	1,89					
a	-2,94					
N	5					
$Y_i$		100,20	81,12	38,14	17,71	10,28
$(y_i - Y_i)^2$	27,75	11,93	13,37	1,70	0,68	0,07
$s_y$	3,04					
$s_{x0}$	1,61	ppm				
$V_{x0}$	0,61	%	≤	2		



### Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze mittels externer Kalibration

Kalibrierprobe	1	2	3	4	5	
LOG $(x_i - \bar{x})^2$	0,200	0,057	0,036	0,000	0,026	0,081
$(x_i - \bar{x})^2$	159	21923,718	10969,127	253,873	9590,951	19302,490
$t_{0,95}$ (einseitig)	2,353	2,353				
f	3,000	3,000				
n	6,000	6,000				
$t_{0,95}$ (zweiseitig)	2,306					
$x_{NG}$	4,6	mg/L				
$x_{EG}$	9,2	mg/L				
$x_{BG}$	13,8	mg/L	bei 33,3 % Präzision			

## 8.2 *Wissenschaftlicher Werdegang*

### Promotion

---

03/2005 – 06/2008	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
11.06.2010	Disputation

### Praktika

---

02/2004 - 08/2004	Institut für Lebensmittel- und Wasseruntersuchungen, Köln Abschluss: Zweites Staatsexamen
12/2003 – 01/2004	Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt, Erfstkreis
09/2003 – 11/2003	Fachlabor zur Qualitätssicherung und Kontrolle von Lebensmitteln, Herzogenrath-Kohlscheid

### Studium

---

11/2004	Erlaubnis der Berufsbezeichnung Lebensmittelchemiker
10/2004	Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Münster Abschluss: Zweites Staatsexamen-
10/1998 – 05/2003	Bergische Universität Wuppertal Studium der Lebensmittelchemie Abschluss: Erstes Staatsexamen

### Schule

---

08/1991 – 06/1996	Staatliches Gymnasium „Caroline Schlegel“, Jena Abschluss: Abitur
08/1984 – 06/1991	Polytechnische Oberschule „Otto Grotewohl“, Jena

## **Publikationen**

---

Jaekel T, Dautel K, Ternes W. 2008. Preserving functional properties of hen's egg yolk during freeze-drying. *Journal of Food Engineering*, 87:522-526.

Jaekel T, Ternes W. 2009. Changes in rheological behavior and functional properties of hen's egg yolk induced by processing and fermentation with phospholipases. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:567-573.

Ternes W, Jaekel T. 2010. Analysis of glycerophosphonolipids in egg yolk. *European Food Research and Technology*, 230 (4):559-570

### 8.3 *Abbildungsverzeichnis*

ABB. 2-1: FRAKTIONIERUNG VON EIGELB MITTELS ZENTRIFUGATION UND CHROMATOGRAPHIE .....	12
ABB. 2-2: STRUKTURFORMELN DER PHOSPHOLIPIDE DES EIGELBS.....	14
ABB. 2-3: FLIEBSHEMA DER TECHNOLOGISCHEN VERFAHRENSCHRITTE FÜR DIE GEFRIERTROCKNUNG .....	20
ABB. 2-4: SCHNELLES DURCHSCHREITEN DES FÜR DIE GEFRIERINDUZIERTER GELBILDUNG KRITISCHEN TEMPERATURBE- .....	21
ABB. 2-5: ANGRIFFSORTE DER PHOSPHOLIPASEN A <sub>1</sub> UND A <sub>2</sub> BEIM PHOSPHATIDYLCHOLIN .....	22
ABB. 2-6: VISKOSITÄT/TEMPERATUR-KURVE VON NATIVEM EIGELB, AUSBILDUNG EINER FLIEBFÄHIGEN, GELARTI.....	27
ABB. 2-7: PRINZIPIELLER AUFBAU EINER ATR-MESSZELLE MIT ATR-KRISTALL UND MEHRFACHREFLEXION DES .....	30
ABB. 3-1: SCHEMA DER GRADIENTEN-ELUTION FÜR DIE HPLC-TRENNUNG DER PHOSPHOLIPIDE, ELUENT A: CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID (80:19,5:0,5, v/v/v), ELUENT B: CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID/WASSER (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v)....	55
ABB. 3-2: SCHEMA DER GRADIENTEN-ELUTION FÜR DIE LC-MS-TRENNUNG DER PHOSPHOLIPIDE, ELUENT A:.....	56
ABB. 4-1: MESSUNG DER SCHEINBAREN VISKOSITÄT VON VERDÜNNTEM EIGELB (40 %, v/v) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER TEMPERATUR BEI KONstanTER SCHERRATE VON 26 s <sup>-1</sup> , $\Delta\eta_1 =$ DIFFERENZ ZWISCHEN DEM MINIMUM UND DEM ERSTEM MAXIMUM DER SCHEINBAREN VISKOSITÄT (RELATIVES VISKOSITÄTSMAXIMUM), $\Delta\eta_2 =$ DIFFERENZ ZWISCHEN DEM MINIMUM UND DEM ZWEITEM MAXIMUM DER SCHEINBAREN VISKOSITÄT .....	61
ABB. 4-2: VERÄNDERUNGEN HINSICHTLICH DES RELATIVEN VISKOSITÄTSMAXIMUMS VON NATIVEM EIGELB, KONVENTIONELL TIEFGEFRORENEM/WIEDER AUFGETAUTEM EIGELB UND GEFRIERGETROCKNETEM EIGELB MIT n = 6 (JAEKEL ET AL., 2008).....	62
ABB. 4-3: VERÄNDERUNGEN HINSICHTLICH DES STABILITÄT DES HITZEINDUZIERTEN, DREIDIMENSIONAL VERNETZTEN GELS VON NATIVEM EIGELB, KONVENTIONELL TIEFGEFRORENEM UND WIEDER AUFGETAUTEM EIGELB UND GEFRIERGETROCKNETEM EIGELB, MIT n = 6 (JAEKEL ET AL., 2008).....	66
ABB. 4-4: LINEARE KORRELATION ZWISCHEN DEM REST-WASSERGEHALT NACH DER GEFRIERTROCKNUNG UND DER EINDRINGTIEFE DES PENETROMETERS MIT R <sup>2</sup> = 0,901 (JAEKEL ET AL., 2008).....	67
ABB. 4-5: VERÄNDERUNGEN IM TEMPERATURABHÄNGIGEN VISKOSITÄTSVERHALTEN VON NATIVEM EIGELB (NAT.) NACH BEHANDLUNG MIT LECITASE <sup>®</sup> ULTRA (PLA <sub>1</sub> ) UND STERNENZYM PLP (PLA <sub>2</sub> ) BEI KONstanTER SCHERRATE VON 26 s <sup>-1</sup> , MIT n = 6 (JAEKEL UND TERNES, 2009).....	70
ABB. 4-6: VERÄNDERUNGEN IM TEMPERATURABHÄNGIGEN VISKOSITÄTSVERHALTEN VON HANDELSÜBLICH PASTEURISIERTEM (PAST.) UND VERDÜNNTEM EIGELB (40 %, v/v) NACH BEHANDLUNG MIT LECITASE <sup>®</sup> ULTRA (PLA <sub>1</sub> ) UND STERNENZYM PLP (PLA <sub>2</sub> ) BEI KONstanTER SCHERRATE VON 26 s <sup>-1</sup> , MIT n = 6 (JAEKEL UND TERNES, 2009).....	72
ABB. 4-7: VERÄNDERUNGEN IM TEMPERATURABHÄNGIGEN VISKOSITÄTSVERHALTEN VON GEFRIERGETROCKNETEM EIGELB (GG) NACH BEHANDLUNG MIT LECITASE <sup>®</sup> ULTRA (PLA <sub>1</sub> ) UND STERNENZYM PLP (PLA <sub>2</sub> ), BEI KONstanTER SCHERRATE VON 26 s <sup>-1</sup> , MIT n = 6 (JAEKEL UND TERNES, 2009).....	74
ABB. 4-8: ZUM SCHUTZ DER AMINOGRUPPE WURDE DIE AMINOETHYLPHOSPHONSÄURE MIT EINER BENZYLOXYCARBONYL-GRUPPE VERSEHEN (MUCHA ET AL., 1995) .....	78
ABB. 4-9: SYNTHESE VON 1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT DURCH KONDENSATION VON N-BENZYLOXYCARBONYLAMINOETHYLPHOSPHONSÄURE MIT 1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCEROL UND ANSCHLIEßENDER ENTFERNUNG DER SCHUTZGRUPPE MITTELS KATALYTISCHER HYDROGENOLYSE, TPS-CL = 2,4,6-TRIISOPROPYLBENZOLSULFONYLCHLORID (YAMAUCHI ET AL., 1986).....	79
ABB. 4-10: AUFREINIGUNG VON 1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT (PNE) MITTELS FEST-PHASENEXTRAKTION (SI), DAG = DIACYLGLYCEROL (TERNES UND JAEKEL, 2010) .....	80
ABB. 4-11: : ESI-MS-SPEKTRUM VON PNE IM NEGATIVEN IONEN-MODUS (TERNES UND JAEKEL, 2010) .....	81
ABB. 4-12: ESI-MS <sup>2</sup> -SPEKTRUM DES [M – H] <sup>-</sup> IONS VON PNE MIT m/z 730 (TERNES UND JAEKEL, 2010) .....	81

ABB. 4-13: FRAGMENTIERUNG VON PNE (1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT) MITTELS ESI-MS <sup>2</sup> IN CHARAKTERISTISCHE TOCHTER-IONEN IM NEGATIVEN IONEN-MODUS .....	83
ABB. 4-14: ESI-MS-SPEKTRUM VON PNE IM POSITIVEN IONEN-MODUS (TERNES UND JAEKEL, 2010) ..84	84
ABB. 4-15: ESI-MS <sup>2</sup> -SPEKTRUM DES [M + H] <sup>+</sup> IONS VON PNE MIT <i>m/z</i> 732 (TERNES UND JAEKEL, 2010) .....	84
ABB. 4-16: FRAGMENTIERUNG VON PNE (1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT) MITTELS ESI-MS <sup>2</sup> IN CHARAKTERISTISCHE TOCHTER-IONEN IM POSITIVEN IONEN-MODUS (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	85
ABB. 4-17: ESI-MS <sup>2</sup> -SPEKTRUM DES [M + H] <sup>+</sup> IONS VON PNE ( <i>m/z</i> 732) MIT ZUSATZ VON 1 % HAC (TERNES.....	86
ABB. 4-18: ATR/FT-IR-SPEKTRUM VON 33 µG PNE IM VERGLEICH ZU 22 µG LPE, DIE IN DER LITERATUR BESCHRIEBENEN CHARAKTERISTISCHEN WELLENLÄNGEN FÜR PHOSPHONOLIPIDE: 680 CM <sup>-1</sup> , 735 CM <sup>-1</sup> UND 1180 CM <sup>-1</sup> FÜR DIE (P-C)-BINDUNG (MUKHAMEDOVA ET AL., 1985; DEMBITSKII, 1988; HASEGAWA ET AL., 1976) WURDEN GESONDERT GEKENNZEICHNET (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	88
ABB. 4-19: IR-SPEKTRUM DES VON MOSCHIDIS ET AL. (1984) AUS EIGELB EXTRAHIERTEN PHOSPHONOLIPID-ANALOGS VON PE, KEINE HINWEISE AUF EINE FÜR (P-C)-BINDUNG CHARAKTERISTISCHE BANDE: 680 CM <sup>-1</sup> , 735 CM <sup>-1</sup> UND 1180 CM <sup>-1</sup> (MUKHAMEDOVA ET AL., 1985; DEMBITSKII, 1988; HASEGAWA ET AL., 1976) .....	89
ABB. 4-20: LINKS 81 µG PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN (PL) UND RECHTS 41 µG PNE ENTWICKELT MIT DER METHODE VON MOSCHIDIS ET AL. (1984) UND DETEKTIERT MIT DEM DITTMER & LESTER-SPRÜHREAGENZ.....	91
ABB. 4-21: LINKS 81 µG PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN (PL) UND RECHTS 41 µG PNE ENTWICKELT MIT DER METHODE VON MOSCHIDIS ET AL. (1984), DETEKTIERT MIT DITTMER & LESTER-SPRÜHREAGENZ UND ERHITZUNGSTEST VON STILLWAY ET AL. (1980). .....	91
ABB. 4-22: AUFSTOCKUNG VON EIGELBLIPID-PROBEN (JEWEILS 20 µL) MIT PNE, 0 = OHNE AUFSTOCKUNG, 1 = AUFSTOCKUNG MIT 21 µG PNE, 2 = AUFSTOCKUNG MIT 31 µG PNE, AUFSTOCKUNG MIT 41 µG PNE (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	92
ABB. 4-23: TRENNUNG VON PHOSPHO- UND PHOSPHONOLIPIDEN MITTELS HPLC/ELSD, PNE = 1,2-DIOCTA-DECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT PE = PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN, PC = PHOSPHATIDYLCHOLIN, LPC = LYSOPHOSPHATIDYLCHOLIN; KIESELGEL-SÄULE: LiCHROSORB 60 – 5 (150 x 4 MM, 5 µM PARTIKELGRÖÙE), FLUSSRATE: 1 ML/MIN, ELUENT A: CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID (80:19,5:0,5, v/v/v), ELUENT B AUS CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID/WASSER (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v) .....	93
ABB. 4-24: EXTERNE KALIBRATION VON PNE IN LINEARER AUFTRAGUNG .....	94
ABB. 4-25: EXTERNE KALIBRATION VON PNE IN DOPPELT LOGARITHMISCHER AUFTRAGUNG.....	94
ABB. 4-26: AUFSTOCKUNG EIGELBLIPID-FRAKTION 14:1 MIT PNE AUF 37 MG/L, EINE UNBEKANNTE SUBSTANZ COELUIERT MIT PNE; KIESELGEL-SÄULE: LiCHROSORB 60 – 5 (150 x 4 MM, 5 µM PARTIKELGRÖÙE), FLUSSRATE: 1 ML/MIN, ELUENT A: CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID (80:19,5:0,5, v/v/v), ELUENT B AUS CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID/WASSER (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v) (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	95
ABB. 4-27: TRENNUNG VON PHOSPHO- UND PHOSPHONOLIPIDEN PER LC-MS IM POSITIVEN IONEN-MODUS [M + H] <sup>+</sup> AUFGESCHLÜÙSSELT NACH DEN HAUPTMASSEN, PNE = 1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT, PE = PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN, PC = PHOSPHATIDYLCHOLIN, LPC = LYSOPHOSPHATIDYLCHOLIN; HPLC-SÄULE: LiCHROSORB 60 – 5 (150 x 2 MM, 5 µM PARTIKELGRÖÙE), FLUSSRATE: 0,4 ML/MIN, ELUENT A: CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID (90:9,5:0,5, v/v/v), ELUENT B AUS CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID/WASSER (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v) .....	97
ABB. 4-28: TRENNUNG DER PHOSPHO- UND PHOSPHONOLIPIDE (REFERENZSUBSTANZEN) PER LC-MS IM POSITIVEN IONEN-MODUS [M + H] <sup>+</sup> MIT DAZUGEHÖRIGEN MASSENSPEKTREN, PNE = 1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT, PE = PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN, PC = PHOSPHATIDYLCHOLIN, LPC = LYSOPHOSPHATIDYLCHOLIN; HPLC-SÄULE: LiCHROSORB 60 – 5 (150 x 2 MM, 5 µM PARTIKELGRÖÙE), FLUSSRATE: 0,4 ML/MIN, ELUENT A: CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID (90:9,5:0,5, v/v/v), ELUENT B AUS CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID/WASSER (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v) .....	98
ABB. 4-29: ESI-MS CHROMATOGRAMM DER EIGELBLIPID-FRAKTION 14:1 IM POSITIVEN IONEN-MODUS [M + H] <sup>+</sup> MIT DAZUGEHÖRIGEN MASSENSPEKTREN, PNE = 1,2-DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-	

AMINOETHYLPHOSPHONAT, PE = PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN, PC = PHOSPHATIDYLCHOLIN, LPC = LYSOPHOSPHATIDYLCHOLIN; HPLC-SÄULE: LiCHROSORB 60 – 5 (150 x 2 MM, 5 µM PARTIKELGRÖßE), FLUSSRATE: 0,4 ML/MIN, ELUENT A: CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID (90:9,5:0,5, v/v/v), ELUENT B AUS CHLOROFORM/METHANOL/30 % AMMONIUMHYDROXID/WASSER (60:34:0,5:5,5, v/v/v/v) (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	100
ABB. 4-30: ESI-MS <sup>2</sup> SPEKTRUM DES [M + H] <sup>+</sup> IONS MIT M/Z 816 (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	101
ABB. 4-31: ESI-MS <sup>2</sup> SPEKTRUM DES [M + H] <sup>+</sup> IONS MIT M/Z 844 .....	101
ABB. 4-32: ESI-MS <sup>2</sup> SPEKTRUM DES [M + H] <sup>+</sup> IONS MIT M/Z 866 (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	102
ABB. 4-33: ESI-MS <sup>3</sup> SPEKTRUM DES [M – H] <sup>-</sup> IONS MIT M/Z 814 BZW. 756 (TERNES UND JAEKEL, 2010) .....	104
ABB. 4-34: ESI-MS <sup>3</sup> SPEKTRUM DES [M – H] <sup>-</sup> IONS MIT M/Z 842 BZW. 784 (TERNES UND JAEKEL, 2010) .....	104
ABB. 4-35: ESI-MS <sup>3</sup> SPEKTRUM DES [M – H] <sup>-</sup> IONS MIT M/Z 864 BZW. 806 (TERNES UND JAEKEL, 2010) .....	105
ABB. 4-36: FRAGMENTIERUNGSMUSTER DER UNBEKANNTEN SUBSTANZKLASSE AM BEISPIEL DES PROTONIERTEN BZW. DEPROTONIERTEN MOLEKÜL-IONS MIT M/Z 816 IM POSITIVEN UND 814 IM NEGATIVEN IONEN-MODUS (TERNES UND JAEKEL, 2010).....	107

## 8.4 Tabellenverzeichnis

TAB. 3-1: MESSPARAMETEREINSTELLUNGEN FÜR DIE RHEOLOGIE.....	53
TAB. 3-2: ELSD-GERÄTEEINSTELLUNG.....	54
TAB. 3-3: MS-GERÄTEEINSTELLUNG.....	56
TAB. 3-4: ATR/FT-IR GERÄTEEINSTELLUNG.....	57
TAB. 3-5: EINWAAGEN DER ZUR SYNTHESE VON N-BENZYLOXYCARBONYLAMINOETHYLPHOSPHONAT EINGESetzten CHEMIKALIEN.....	58
TAB. 3-6: EINWAAGEN DER ZUR SYNTHESE VON PNE VERWENDETEN CHEMIKALIEN.....	59
TAB. 4-1: VERÄNDERUNGEN HINSICHTLICH DES RELATIVEN VISKOSITÄTSMAXIMUMS (RVM) VON NATIVEM UND PASTEURISIERTEM EIGELB IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORKRISTALLISATION MIT N = 6 (JAEKEL ET AL., 2008).....	63
TAB. 4-2: VERÄNDERUNGEN DES FLIEßVERHALTENS VON NATIVEM UND HANDELSÜBLICH PASTEURISIERTEM EIGELB IM HINBLICK AUF DIE VORKRISTALLISATION MIT N = 6 (JAEKEL ET AL., 2008).....	64
TAB. 4-3: VERÄNDERUNGEN IM FLIEßVERHALTEN VON NATIVEM UND PASTEURISIERTEM EIGELB IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GEFRIERMETHODE (GEFRIERGETROCKNET/REHYDRATISIERT UND KONVENTIONELL TIEFGEFROREN/AUFGETAUT), MIT N = 6 (JAEKEL ET AL., 2008).....	64
TAB. 4-4: VERÄNDERUNGEN HINSICHTLICH DER STABILITÄT DES HITZEINDUZIERTEN, DREIDIMENSIONAL VERNETZTEN GELS VON NATIVEM UND PASTEURISIERTEM EIGELB IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORKRISTALLISATION, MIT N = 6 (JAEKEL ET AL., 2008).....	67
TAB. 4-5: RHEOLOGISCHE UND PHYSIKALISCHE VERÄNDERUNGEN VON GEFRIERGETROCKNETEM EIGELB DURCH BEHANDLUNG MIT LECITASE® ULTRA (PLA <sub>1</sub> ) UND STERNENZYM PLP (PLA <sub>2</sub> ), MIT N = 6 (JAEKEL UND TERNES, 2009).....	75
TAB. 4-6: CHEMISCHE VERÄNDERUNGEN INNERHALB DER GRUPPE DER PHOSPHOLIPIDE VON GEFRIERGETROCKNETEM EIGELB DURCH BEHANDLUNG MIT LECITASE® ULTRA (PLA <sub>1</sub> ) UND STERNENZYM PLP (PLA <sub>2</sub> ), MIT N = 6 (JAEKEL UND TERNES, 2009).....	77
TAB. 4-7: MAssEN DER FRAGMENTE VON [M - H] <sup>-</sup> NACH ESI-MS <sup>2</sup> IM NEGATIVEN IONEN-MODUS.....	82
TAB. 4-8: MAssEN DER FRAGMENTE VON [M - H] <sup>-</sup> NACH ESI-MS <sup>2</sup> IM POSITIVEN IONEN-MODUS.....	86
TAB. 4-9: ESI-MS <sup>2</sup> FRAGMENTIERUNGSMUSTER VON PNE.....	87
TAB. 4-10: FTIR-BANDEN VON PNE UND LPE.....	88
TAB. 4-11: RF-WERTE DER PHOSPHO- UND PHOSPHONOLIPIDE NACH DER METHODE VON KAPOULAS (1969) MIT N = 7 (SIEHE AUCH ANHANG 10.1.3).....	91
TAB. 4-12: ZUSAMMENFASSUNG DER VERFAHRENSKENNDATEN FÜR DIE BESTIMMUNG VON 1,2- DIOCTADECANOYL-GLYCERO-3-AMINOETHYLPHOSPHONAT MITTELS HPLC/ELSD (SIEHE ANHANG 10.1.4).....	94
TAB. 4-13: ZUSAMMENFASSUNG DER MÖGLICHEN MOLEKULAREN SPEZIES DER PHOSPHOLIPIDE.....	99
TAB. 4-14: MAssEN DER FRAGMENTE VON [M + H] <sup>+</sup> DER UNBEKANNTEN SUBSTANZKLASSE MITTELS ESI-MS <sup>2</sup> IM POSITIVEN IONEN-MODUS.....	103
TAB. 4-15: ESI-MS <sup>3</sup> ANALYSE DER UNBEKANNTEN SUBSTANZKLASSE AUS DER EIGELBLIPID-FRAKTION 14:1 (IM NEGATIVEN IONEN-MODUS).....	105
TAB. 4-16: SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS DEN ERGEBNISSEN DER ESI-MS <sup>3</sup> ANALYSE DER UNBEKANNTEN SUBSTANZKLASSE AUS DER EIGELBLIPID-FRAKTION 14:1.....	106