

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie
Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie

Zur Effizienz der Zerschäumungsanalyse bei der Anreicherung von Inhaltsstoffen aus pflanzlichen Lebensmitteln

Marlène Backleh

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. U. Kulozik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. agr. habil. Dr. h.c. H. Parlar
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. H. Frank, Universität Bayreuth
3. apl. Prof. Dr. rer. nat., Dr.-Ing. habil. S. Nitz

Die Dissertation wurde am 19.06.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt am 05.07.2001 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1997 bis Mai 2001 (mit Ausnahme eines Pflichtpraktikums vom Februar bis Juli 2000 am Landesuntersuchungsamt mit Abschluss des II. Staatsexamens für Lebensmittelchemiker) am Institut für Lebensmitteltechnologie und Analytische Chemie der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie, in Freising-Weihenstephan durchgeführt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. H. Parlar gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas und die Freiheit, meine eigenen Ideen zu verwirklichen, für die wissenschaftliche Betreuung und die großzügige Förderung der Arbeit sowie für das große mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Dr. G. Leupold, dem Leiter meiner Arbeitsgruppe, danke ich sehr herzlich für seine stets hilfreiche Unterstützung in allen fachlichen und technischen Angelegenheiten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Burhenne, Universität Kassel, für die Durchführung der HPLC-MS/MS-Messungen sowie Herrn K. Kollmannsberger und Frau B. Zimmermann für die Aufnahme der HRGC-FID und HRGC-MS-Spektren.

An Herrn K. Scholz richte ich meinen herzlichen Dank für die Anfertigung spezieller Glasapparaturen für die Zerschäumung.

Des weiteren bin ich Herrn Dr. Weinreich (Firma Raps in Kulmbach) zu Dank verpflichtet für die Bereitstellung von Gewürzen und Kräutern und für seine Diskussionsbereitschaft, Frau Dr. K. Schwarz (Uni Hannover) für die Bereitstellung von Carnosolsäure-Standard und der Firma Hoffman - La Roche, die Carotinoid-Standards zur Verfügung stellte..

Herrn I. K. Amajuoyi und allen anderen Lehrstuhl-Mitarbeitern danke ich herzlich für das gute Arbeitsklima und für die stete Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank ergeht an Herrn Wolfgang Sohrt, M.Sc. in Computer Science, und an Pastor i.R. Karsten Sohrt für die sprachliche und EDV-technische Unterstützung bei der

Anfertigung dieser Arbeit, für die sorgfältige grammatikalische Korrektur und die fortwährende Motivation.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern Suad and Faiek Backleh sowie meinen Brüdern Dr. George und Bassam Backleh für ihre Liebe, die großzügige Unterstützung und das Vertrauen, die mir im Leben und vor allem in der Studien- und Promotionszeit viel Kraft und Freude geschenkt und mich zum Erfolg begleitet haben.

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHER TEIL.....	5
2.1	Zerschäumungsanalyse	5
2.1.1	Einordnung der Zerschäumungsanalyse.....	5
2.1.2	Grundlagen der Zerschäumungsanalyse.....	7
2.1.2.1	Prinzip der Zerschäumungsanalyse.....	7
2.1.2.2	Oberflächenadsorption.....	8
2.1.2.3	Anreicherung im Schaum.....	9
2.1.3	Zerschäumungs-Techniken und –Parameter	13
2.1.4	Anwendungsgebiete der Zerschäumungsanalyse.....	15
2.2	Substanzgruppen	16
2.2.1	Die Hopfenbitterstoffe in Bier und der Bierschaum	16
2.2.2	Antioxidantien aus Rosmarin	25
2.2.3	Scharfstoffe aus Ingwer	30
2.2.4	Curcuminoide aus Kurkuma.....	31
2.2.5	Glykoalkaloide aus Kartoffeln.....	35
2.2.6	Flavokavine und Kavapyrone aus Kava-Kava.....	38
2.2.7	Carotinoide	42
2.2.8	Orangenaroma.....	46
2.2.9	Einige polare Substanzgruppen.....	47
3	EXPERIMENTELLER TEIL	54
3.1	Materialien und Geräte	54
3.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	54
3.1.2	Analytische Standards.....	56
3.1.3	Untersuchungsmaterial	59
3.1.4	Geräte	60
3.1.4.1	HPLC.....	60
3.1.4.2	HPLC-MS/MS-Kopplung.....	61
3.1.4.3	UV-VIS-Spektroskopie	61
3.1.4.4	HRGC.....	61
3.1.4.5	Zerschäumungsapparatur	61
3.1.4.6	Weitere Hilfsgeräte.....	63
3.2	Methoden	63
3.2.1	Extraktion	63
3.2.1.1	Extraktion der Untersuchungsmaterialien mit organischem Lösungsmittel.....	63
3.2.1.2	Wässrige Extraktion der Untersuchungsmaterialien.....	64
3.2.1.3	Säulenchromatographische Isolierung der Carnosolsäure aus dem Spumat des wässrigen Rosmarinextraktes.....	64
3.2.1.4	Sensorische Analyse von Orangensaft	65
3.2.2	Zerschäumung	66

3.2.2.1	Allgemeines zur Durchführung einer Zerschäumung:	66
3.2.2.2	Allgemeine Beschreibung der fraktionierten und der Mehrfach-Zerschäumung	67
3.2.2.3	Zerschäumung mit Hilfe der Schaumbildner Stärke und Saponin.....	68
3.2.3	Probenaufarbeitung.....	68
3.2.4	Analytik.....	72
3.2.4.1	HPLC-Bestimmungen.....	72
3.2.4.1.1	Mit dem elektrochemischen Detektor (ELCD-HPLC)	72
3.2.4.1.2	Mit dem Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD).....	73
3.2.4.1.3	Mit LC-MS/MS-Kopplung	76
3.2.4.2	Spektralphotometrische Analysen (UV-VIS).....	76
3.2.4.3	HRGC-Bestimmungen.....	77
3.2.4.3.1	GC-FID-Parameter.....	77
3.2.4.3.2	HRGC-MS-Parameter	77
3.2.5	Quantitative Auswertung	78
4	ERGEBNISSE.....	79
4.1	Einführung.....	79
4.2	Substanzgruppen	81
4.2.1	Gingerole aus Ingwer	81
4.2.1.1	Charakterisierung der Gingerole	82
4.2.1.2	Optimierung der wässrigen Extraktionsausbeute von Gingerolen aus Ingwerpulver durch alkalische Extraktion	88
4.2.1.3	Einfluss von Gasflussrate, Probenvolumen und Säulendimensionierung auf die Zerschäumung	89
4.2.1.4	Anreicherung der Gingerole aus Ingwerextrakt	91
4.2.1.5	Anreicherung der Gingerole aus der Standardlösung	95
4.2.1.6	Einfluss der Gingerole aufeinander bezüglich ihrer Anreicherung im Schaum bei der Zerschäumung.....	98
4.2.1.7	Einfluss der Konzentration von schaumaktiven Verbindungen (Gingerole) und Schaumbildnern (Saponin) auf die Zerschäumung.....	101
4.2.1.8	Einfluss der Gasflussrate auf die Zerschäumung	105
4.2.1.9	Einfluss des pH-Wertes auf die Zerschäumung	105
4.2.1.9.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Schaumbildung und Stabilität von Saponin.....	106
4.2.1.9.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Anreicherung von [6]-Gingerol.....	107
4.2.2	Antioxidantien aus Rosmarin	109
4.2.2.1	Charakterisierung der Carnosolsäure.....	109
4.2.2.2	Optimierung der wässrigen Extraktionsausbeute an Carnosolsäure aus Rosmarinpulver durch alkalische Extraktion.....	114
4.2.2.3	Untersuchung der Stabilität von Carnosolsäure im sauren und alkalischen Medium.....	115
4.2.2.4	Einfluss der Wassertemperatur auf den Carnosolsäureabbau während der wässrigen Extraktion	117
4.2.2.5	Untersuchung der Zerschäumbarkeit eines organischen Mediums und die Anreicherung von Carnosolsäure daraus im Schaum	119
4.2.2.6	Einfluss der Gasflussrate auf die Zerschäumung von wässrigem Rosmarinextrakt und auf die Anreicherung von Carnosolsäure	121

4.2.2.7	Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Anreicherung von Carnosolsäure im Schaum aus dem wässrigen Rosmarinextrakt mit Hilfe der Fraktionierten Zerschäumung	122
4.2.2.8	Untersuchung des Anreicherungsverhaltens der Carnosolsäure im Schaum mit Hilfe eines Carnosolsäurestandards	126
4.2.2.9	Anreicherungsgeschwindigkeit der Carnosolsäure aus verdünnten Proben	127
4.2.2.10	Beispiel für den praktischen Einsatz der Zerschäumungsanalyse: Isolierung der angereicherten Carnosolsäure aus der Schaumfraktion eines wässrigen Extraktes	127
4.2.2.11	Untersuchung der Möglichkeit einer Anreicherung der Rosmarinsäure im Schaum	128
4.2.3	Bitterstoffe aus Bier	129
4.2.3.1	Anreicherung der einzelnen Bitterstoffe	129
4.2.3.2	Zeitlicher Verlauf der Bitterstoffanreicherung bei der Zerschäumung von Pils-Bier	130
4.2.3.3	Zusammensetzung von festem Schaum und Spumat	131
4.2.3.4	Einfluss des pH-Wertes von Bier auf die Schaumbildung und die Anreicherung der Bitterstoffe im Schaum	131
4.2.3.5	Einfluss der Gasart auf die Schaumbildung und die Anreicherung der Bitterstoffe im Schaum	132
4.2.4	Carotinoide	133
4.2.4.1	Visuelle Beobachtungen der Carotinoidanreicherung	133
4.2.4.2	Spektralphotometrische Analyse zur Beurteilung der Anreicherung von Gesamtcarotinoiden aus Orangen-, Karotten- und Tomatensaft	134
4.2.4.3	Auswertung der Anreicherung von einzelnen Carotinoidkomponenten mit HPLC/UV-Analyse	134
4.2.4.3.1	β-Carotin-Standard	135
4.2.4.3.2	Tomatensaft	135
4.2.4.3.3	Karottensaft	136
4.2.4.3.4	Orangen- und Mandarinensaft	138
4.2.4.4	Untersuchung der Anreicherung von Crocin aus Safran „ <i>Crocus sativus</i> “	142
4.2.5	Curcuminoide und Turmerone aus Kurkuma	142
4.2.5.1	Quantifizierung der Curcuminoide	143
4.2.5.2	Wasserlöslichkeit der Curcuminoide aus dem Kurkumapulver	143
4.2.5.3	Anreicherung von Curcuminoiden durch Zerschäumung	144
4.2.5.4	Zeitlicher Anreicherungsverlauf der Curcuminoide im Schaum	145
4.2.5.5	Charakterisierung und Quantifizierung der Turmerone	146
4.2.5.6	Wasserlöslichkeit der Turmerone aus dem Kurkumapulver	146
4.2.5.7	Anreicherung von Turmeronen durch Zerschäumung	146
4.2.6	Glykoalkaloide aus Kartoffelpresssaft	148
4.2.6.1	Anreicherung von Glykoalkaloiden durch Zerschäumung	149
4.2.6.1.1	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	149
4.2.6.1.2	Anreicherung der Glykoalkaloide aus Kartoffelsaft	149
4.2.6.1.3	Anreicherung der Glykoalkaloide aus der Standardlösung:	150
4.2.7	Kavapyrone und Flavokavine in Kava-Kava	151
4.2.7.1	Untersuchung des Verhaltens von Kavain bei der Zerschäumung der wässrigen Kavain-Standardlösung unter Saponinzusatz	152
4.2.7.2	Untersuchung des Verhaltens von Kavapyronen und Flavokavinen bei der Zerschäumung von wässrigen Proben des Kava-Kava-HD-Extrakts	153

4.2.7.3	Untersuchung des Verhaltens von Kavapyronen und Flavokavin bei der Mehrfach-Zerschäumung von wässrigen Proben des Kava-Pulvers.....	155
4.2.8	Orangenaroma.....	157
4.2.8.1	Sensorische Analyse	157
4.2.8.2	Einfluss der Zerschäumung auf den Zuckergehalt und Säuregehalt	157
4.2.8.3	Verhalten von Aromastoffen bei der Zerschäumung von Orangensaft.....	158
4.2.9	Einige polare Substanzgruppen.....	159
4.2.9.1	Chlorogensäure und Coffein aus Kaffee	159
4.2.9.2	Hesperidin aus Orangensaft und Naringin aus Grapefruitsaft	160
4.2.9.3	Sesamol aus Sesam.....	160
4.2.9.4	Catechine aus grünem Tee.....	161
4.2.9.5	Anthocyane aus Rotwein und Blutorangensaft	161
5	DISKUSSION.....	162
5.1	Einfluss einiger Parameter auf die Zerschäumung und auf die Anreicherung von schaumaktiven Verbindungen	162
5.1.1	Zusammensetzung einer zu zerschäumenden Probe	163
5.1.1.1	Einfluß von Schaumbildnern in einer Probe.....	163
5.1.1.2	Einfluß von schaumaktiven Verbindungen in einer Probe	163
5.1.1.2.1	Einfluss der Konzentration einer Verbindung auf ihre Anreicherung im Schaum	164
5.1.1.2.2	Einfluss der Polarität einer Verbindung auf ihre Anreicherung im Schaum	165
5.1.1.2.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Anreicherung einer Verbindung im Schaum	165
5.1.2	Zerschäumungsparameter	166
5.1.2.1	Gasflussrate, Probenvolumen und Säulendimensionierung.....	166
5.1.3	Zusammenhang zwischen Zerschäumungsverlauf, Anreicherungsart und Zusammensetzung einzelner Schaumfraktionen	166
5.2	Substanzgruppen	169
5.2.1	Gingerole aus Ingwer	169
5.2.2	Antioxidantien aus Rosmarin	173
5.2.3	Bitterstoffe aus Bier.....	176
5.2.4	Carotinoide	178
5.2.5	Curcuminoide und Turmerone aus Kurkuma	178
5.2.6	Glykoalkaloide aus Kartoffelsaft.....	180
5.2.7	Kavapyrone und Flavokavine aus Kava-Kava.....	181
5.2.8	Orangenaroma.....	182
5.2.9	Einige polare Substanzgruppen.....	184
5.2.9.1	Chlorogensäure und Coffein aus Kaffee	184
5.2.9.2	Hesperidin aus Orangensaft und Naringin aus Grapefruitsaft	185
5.2.9.3	Sesamol, Catechine und Anthocyane.....	186
6	ZUSAMMENFASSUNG	187
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	191
8	ANHANG	203

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 2-1: Methoden der adsorptiven Trennung durch Gasblasen	5
Abb. 2-2: Adsorption oberflächenaktiver Moleküle an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase	8
Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Konzentrationserhöhung oberflächenaktiver Moleküle an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase durch: a. Drainage, b. angereichertes Kollabat	10
Abb. 2-4: Übergang vom Kugelschaum zum Polyederschaum in einer Zerschäumungssäule und schematische Darstellung des Gibbs-Kanals (Plateau's Border)	11
Abb. 2-5: Schematische Darstellung der verschiedenen Varianten für die Durchführung einer Zerschäumung.....	13
Abb. 2-6: Apparatur für Kreislaufzerschäumung nach Siehr	14
Abb. 2-7: Chemische Struktur der Bittersäuren	18
Abb. 2-8: Ein Modell der Lipid-Protein-Bindung	22
Abb. 2-9: Effekt des Protein-Polysaccharid-Komplexes in der Gasblasenwand auf die Schaumstabilität	23
Abb. 2-10: Die chemischen Strukturen von Carnosolsäure mit ihren Abbauprodukten, sowie die von Carnosolsäuremethylester und Rosmarinsäure.....	29
Abb. 2-11: Umwandlung von Gingerol in Shogaol	31
Abb. 2-12: Chemische Strukturen von Curcuminoiden	33
Abb. 2-13: Chemische Strukturen der Hauptkomponenten des Kurkumaöls	34
Abb. 2-14: Chemische Struktur von Solanidin.....	36
Abb. 2-15: Chemische Struktur von α -Chaconin.....	37
Abb. 2-16: Chemische Struktur von α -Solanin.....	37
Abb. 2-17: Kavapyron-Grundstruktur	39
Abb. 2-18: Die wichtigsten Kavapyrone	40
Abb. 2-19: Flavokavin-Grundstruktur	41
Abb. 2-20: Die wichtigsten Carotinoide	44
Abb. 2-21: Die chemische Struktur von Crocetin und Crocin	45
Abb. 2-22: Die wichtigsten Orangenaromastoffe	47
Abb. 2-23: Entstehung von Sesamol bei der Hydrolyse von Sesamolin	48
Abb. 2-24: Die Chemische Struktur von Pelargonidin und Cyanin	49
Abb. 2-25: Die Chemische Struktur von Catechin und Gallocatechin.....	50
Abb. 2-26: Die chemische Struktur von Naringin und Hesperidin	50
Abb. 2-27: Darstellung des Süßstoffs Hesperidin-dihydrochalcon durch Hydrierung von Hesperidin	51
Abb. 2-28: Die chemische Struktur der Chlorogensäure	52
Abb. 2-29: Die chemische Struktur von Coffein (1, 3, 7-Trimethylxanthin).....	53
Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Zerschäumungsapparatur.....	62
Abb. 4-1: HPLC-Chromatogramme und UV-Spektren der Gingerole	83
Abb. 4-2: Massenspektren von [6]-Gingerol aus dem Spumat des wässrigen Ingwerextraktes, gemessen mittels HPLC-MS/MS - APCI-positiv	85
Abb. 4-3: Massenspektren von [8]-Gingerol aus dem Spumat des wässrigen Ingwerextraktes, gemessen mittels HPLC-MS/MS -APCI-positiv	86
Abb. 4-4: Massenspektren von [10]-Gingerol aus dem Spumat des wässrigen Ingwerextraktes, gemessen mittels HPLC-MS/MS -APCI-positiv	87

Abb. 4-5: pH-Abhängigkeit der wässrigen Extraktionsausbeute an Scharfstoffen aus Ingwerpulver bezogen auf die methanolische Ausbeute.	89
Abb. 4-6: Anreicherung von Gingerolen aus wässrigem Ingwerpulver- Extrakt mittels Zerschäumung.	92
Abb. 4-7: Die zeitliche Anreicherung vom [6]-Gingerol aus dem wässrigen Extrakt von Ingwerpulver	93
Abb. 4-8: Die zeitliche Anreicherung vom [8]-Gingerol, [6]-Shogaol und [10]-Gingerol aus dem wässrigen Extrakt von Ingwerpulver	94
Abb. 4-9: Zeitlicher Verlauf der Anreicherung der Gingerole im Schaum aus der Gingerol-Standardlösung mittels Zerschäumung	97
Abb. 4-10: Anreicherung von [6]-Shogaol gegenüber [6]-Gingerol.....	98
Abb. 4-11: Abnahme der Gingerole im Rückstand während der Zerschäumung, wenn jede Verbindung einzeln in der Probe vorliegt.	99
Abb. 4-12: Abnahme der Gingerole im Rückstand während der Zerschäumung, wenn alle Verbindungen in gleicher Konzentration in der „G-„Mix“-Probe nebeneinander enthalten sind	99
Abb. 4-13: Abnahme von [8]-Gingerol im Rückstand während der Zerschäumung, wenn [8]-Gingerol einmal einzeln, einmal mit [10]-Gingerol und einmal mit [6]- und [10]-Gingerol („Mix“) in gleicher Konzentration in der Probe vorliegt.....	100
Abb. 4-14: Abnahme von [6]-Gingerol im Rückstand während der Zerschäumung, wenn [6]-Gingerol einmal einzeln und einmal mit [8]-Gingerol in gleicher Konzentration in der Probe vorliegt	100
Abb. 4-15: Zeitliche Anreicherung von [8]-Gingerol aus [6+8+10]-Gingerol- „Mix“, Proben mit verschiedenen Gingerol- und Saponin-Konzentrationen in der Probe.....	102
Abb. 4-16: Abbau von Saponin in wässriger Probe im stark Sauren und Stark alkalischen Milieu.....	106
Abb. 4-17: Konzentration in [%] von [6]-Gingerol im Rückstand in Abhängigkeit vom pH-Wert der Probe Saponin	108
Abb. 4-18: Konzentration der Rückstandsproben an [6]-Gingerol in [%] bei der Zerschäumung in Abhängigkeit von der Zeit	108
Abb. 4-19: Hydrodynamisches Voltagramm von Carnosolsäure im Spumat des wässrigen Extraktes aus Rosmarinpulver im Vergleich zur Carnosolsäure aus der Carnosolsäure-Standardlösung.....	109
Abb. 4-20: Massenspektren von Carnosol aus Spumat des wässrigen Rosmarinextrakts, gemessen mittels HPLC-MS/MS-APCI-negativ	111
Abb. 4-21: Massenspektren von Carnosolsäure aus Spumat des wässrigen Rosmarinextrakts, gemessen mittels HPLC-MS/MS-APCI-negativ	112
Abb. 4-22: Massenspektren von Carnosolsäuremethylester aus Spumat des wässrigen Rosmarinextrakts, gemessen mittels HPLC-MS/MS-APCI-negativ	113
Abb. 4-23: HPLC/ELCD-Chromatogramme von Antioxidantien im wässrigen Extrakt von Rosmarinpulver.....	123
Abb. 4-24: Anreicherung der Antioxidantien im Schaum aus wässrigem Extrakt von Rosmarinpulver	124
Abb. 4-25: Anreicherung der Antioxidantien im Schaum aus dem wässrigen Extrakt von Rosmarinpulver zu Beginn, Mitte und Ende einer Zerschäumung	125
Abb. 4-26: Abnahme der Carnosolsäure in den Rückstandsproben der Standardlösung und des Rosmarinextraktes im Verlauf einer Zerschäumung.	127
Abb. 4-27: HPLC/UV-Chromatogramm der Bitterstoffbestimmung bei der Zerschäumung von Pils-Bier	130

Abb. 4-28: Die mittels HPLC/UV-Analyse ermittelten Konzentrationen der Bitterstoffe, erhalten durch eine fraktionierte Zerschäumung von Pils-Bier	131
Abb. 4-29: HPLC/UV-Bestimmung der Bitterstoffe aus den Rückstandproben, erhalten durch Zerschäumung von Pils-Bier im sauren und alkalischen Melieu	132
Abb. 4-30: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren von Carotinoiden im Tomatensaft	136
Abb. 4-31: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren von Carotinoiden im Karottensaft	137
Abb. 4-32: Vergleich der Konzentrationen der Hauptcarotinoide des Karottensaftes (HPLC/DAD-Analyse) mit den Konzentrationen des Spumats und des Rückstandes	137
Abb. 4-33: HPLC/DAD-Chromatogramme von Carotinoiden in Orangensaft.....	139
Abb. 4-34: Vergrößerter Ausschnitt von Abb. 4-33	139
Abb. 4-35: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren einiger Carotinoide im Orangensaft	140
Abb. 4-36: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren von Carotinoide im Mandarinsaft.....	141
Abb. 4-37: HPLC/UV-Chromatogramme von Curcuminoiden im wässrigen Extrakt.....	144
Abb. 4-38: Vergleich der mittels GC/FID-Analyse gemessenen Konzentrationen der Ausgangs-, Spumat- und Rückstandsprobe des wässrigen Kurkuma-extraktes ..	148
Abb. 4-39: HPLC/UV-Chromatogramm der Glykoalkaloide.....	149
Abb. 4-40: Anreicherung der Glykoalkaloide aus Kartoffelpresssaft im Schaum	150
Abb. 4-41: HPLC/UV-Chromatogramme der Glykoalkaloide	150
Abb. 4-42: HPLC/UV-Chromatogramme der Kavapyrone und Flavokavine in einer wässriger Probe des Kava-HD-Extraktes	154
Abb. 4-43: HPLC/UV-Chromatogramme der Kavapyrone und Flavokavine in wässriger Probe des Kava-Pulvers.....	156
Abb. 8-1: Trennung der Farbstoffe Patentblau und Neucoccin voneinander durch Anreicherung von Patentblau im Schaum	202
Abb. 8-2: Austritt und Sammeln des mit Patentblau angereicherten Schaums (Spumat) aus der Zerschäumungskolonne	202
Abb. 8-3: Schaumzerfall aufgrund der Gasblasenkoaleszenz und Disproportionierung am oberen Teil der Schaumsäule gegen Ende der Zerschäumung.....	203
Abb. 8-4: Aufgenommenes Bild von Ausgangs-(mitte), Spumat-(rechts) und Rückstandsprobe (links) eines Orangensaftes	203
Abb. 8-5: Aufgenommenes Bild von Ausgangs- (mitte), Spumat- (rechts) und Rückstandsprobe (links) eines Mandarinsaftes	204
Abb. 8-6: Aufgenommenes Bild von Ausgangs- (mitte), Spumat- (rechts) und Rückstandsprobe (links) eines wässrigen Extraktes vom Kurkumapulver	204

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 2-1:	Die verwendeten Untersuchungsmaterialien und ihre Inhaltsstoffe	16
Tab. 2-2:	Einfluss von Ethanol auf den Lacing Index.....	24
Tab. 2-3:	Chlorogensäuren in Röstkaffee	52
Tab. 3-1:	Die Skalenwerte am Flowmeter und die gemessene Flussraten von Stickstoffgas.....	62
Tab. 3-2:	Absorptionsmaxima der wichtigsten Kavapyrone und Flavokavine und die Korrekturfaktoren der Kavapyrone gegen Kavain	74
Tab. 3-3:	HPLC/UV-Parameter und Elutionsmittel für die untersuchten Substanzgruppen	74
Tab. 3-4:	Gradienten-Programme der eingesetzten HPLC/UV-Methoden.....	75
Tab. 4-1:	Zerschäumbarkeit von wässrigen Extrakten einiger Gewürze und Genussmittel.....	79
Tab. 4-2:	Zerschäumbarkeit von frischer Obst- und Gemüsesäfte	80
Tab. 4-3:	pH-Abhängigkeit der wässrigen Extraktionsausbeute von Gingerolen aus Ingwerpulver.....	88
Tab. 4-4:	Abhängigkeit des Schaumaustritts und der Spumatmenge von der Gasflussrate, vom Probenvolumen und von der Säulendimensionierung.....	90
Tab. 4-5:	Die durchgeführten Zerschäumungsversuche mit wässrigen Ingwerpulverextrakten.....	91
Tab. 4-6:	Die Gehalte der Gingerole in den Rückstandsfraktionen der zerschäumten Standardlösungen.	96
Tab. 4-7:	Einfluss der Konzentration der Gingerole und des Saponins auf die Zerschäumung der Gingerole.	103
Tab. 4-8:	Die absoluten Gehalte der Schaumfraktionen an Gingerolen unter Einfluss der Konzentration der zerschäumten Probe an Gingerolen und Saponin	104
Tab. 4-9:	Zerschäumung von [6]-Gingerol-Standardlösung bei verschiedenen Gasflussraten.....	105
Tab. 4-10:	Anreicherung von [6]-Gingerol im sauren und alkalischen Melieu	107
Tab. 4-11:	pH-Abhängigkeit der wässrigen Extraktionsausbeute an Carnosolsäure.....	114
Tab. 4-12:	Die Extraktionsausbeute der Carnosolsäure bei verschiedenen pH-Werten und die Carnosolsäuregehalte in den entsprechenden Filtrationsrückständen.	116
Tab. 4-13:	Die Extraktionsausbeuten an Carnosolsäure bei Zugabe von heißem Wasser zum Rosmarinpulv	
Tab. 4-14:	Die Zerschäumbarkeit vom wässrigem, ethanolischen Medium.....	119
Tab. 4-15:	Einfluss der Flussrate auf die Zerschäumungsdauer und die erhaltene Spumatmenge.....	121
Tab. 4-16:	Zusammenfassung der durchgeführten Zerschäumungsversuche von Bier	126
Tab. 4-17:	Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen der Bitterstoffe bei der Zerschäumung von Bier.....	129
Tab. 4-18:	Die durchgeführten Zerschäumungsversuche zur Anreicherung von Carotinoiden:.....	133
Tab. 4-19:	Gesamtcarotinoide gemessen bei 450nm und berechnet als β -Carotin.....	134
Tab. 4-20:	Absorbtionsmaxima verschiedener Carotinoide	135
Tab. 4-21:	Die mit HPLC-DAD-Analyse erfassbaren Verbindungen des Orangensafts, die typische UV-VIS-Spektren für Carotinoide zeigen	140
Tab. 4-22:	Die mit HPLC-DAD-Analyse bestimmten Verbindungen des Mandarinensafts, die typische UV-VIS-Spektren von Carotinoiden aufweisen.	142

Tab. 4-23: Tabellarische Zusammenfassung der durchgeführten Zerschäumungsversuche von Kurkumapulver.....	143
Tab. 4-24: Die GC/FID- bzw. HRGC/MS-Messwerte der Ausgangs-, Schaum- und Rückstandsprobe des wässrigen Extraktes von Kurkumapulver.....	147
Tab. 4-25: Die durchgeführten Zerschäumungsversuche mit Kartoffelpresssaft und Glykoalkaloid-Standard.....	148
Tab. 4-26: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen und berechneten Absolutmengen der Glykoalkaloide bei der Zerschäumung von Glykoalkaloid-Standardlösung und Kartoffelpreßsaft, ihre Anreicherungsfaktoren im Schaum und ihre Wiederfindungsraten.	149
Tab. 4-27: Übersicht der Zerschäumungsversuche zur Anreicherung von Flavokavinen und Kavapyronen.....	151
Tab. 4-28: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen des Kavains bei der Zerschäumung von Kavain-Standardlösung.....	152
Tab.4-29: Die mit HPLC/UV-Analyse ermittelten Konzentrationen von Kavapyronen und Flavokavinen bei der Zerschäumung wässriger Proben des Kava-Kava-HD-Extraktes.	154
Tab. 4-30: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen von Kavapyronen und Flavokavinen bezogen auf die Konzentration der Ausgangsprobe bei der Mehrfach-Zerschäumung von wässrigen Proben des Kava-Kava-Pulvers.....	155
Tab. 4-31: Die mit GC/FID-Analyse ermittelten Aromastoffkonzentrationen.....	158
Tab. 4-32: Die durchgeführten Zerschäumungsversuch zur Anreicherung polarer Inhaltsstoffe.....	159
Tab. 4-33: Die mit HPLC/UV-Analyse ermittelten Naringin- und Hesperidin-Konzentrationen.....	160
Tab. 4-34: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Flächeneinheiten von Coffein und Catechinen bei der Zerschäumung von grünem Tee.....	161
Tab. 5-1: Polare Verbindungen, mittels Zerschäumungsanalyse nicht angereicherbar, und ihre Ausgangsmaterialien.	183

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AD	Außendurchmesser
ADI	Acceptable Daily Intake
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
BRD	Bundesrepublik Deutschland
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCHA	Dicyclohexylamin
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
DMF	Dimethylformamid
EBC	European Brewery Convention
ELCD	Elektrochemischer Detektor
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
GC	Gas Chromatography
HD	Hochdruck
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICE	Hopfen-HD-Extrakt
ID	Innendurchmesser
ISO	International Standardization Organisation
LC	Liquid Chromatography
LD ₅₀	Letale Dosis 50
LMBG	Lebensmittel- u. Bedarfsgegenstände-Gesetz
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
mAU	Milli-Ampere Unit
MEBAK	Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular Weight
n.n.	nicht nachweisbar

p.a.	pro analysi
PFK	Perfluorkerosin
PI	isoelektrischer Punkt
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
TBHQ	Butylhydrochinon
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultra Violet
VIS	visible
Wfr.	Wiederfindungs-Rate
ZNS	Zentral-Nervensystem

1 Einleitung

Die Zerschäumungsanalyse ist eine schonende, umweltfreundliche und kostengünstige Anreicherungsverfahren für oberflächenaktive Verbindungen aus stark verdünnten schaumfähigen Lösungen. Bei Einleitung von Gasen (Luft, Stickstoff, Sauerstoff, CO₂, Edelgase) adsorbieren die oberflächenaktiven Verbindungen bevorzugt an der hydrophoben Gasblasenoberfläche und werden mit dem gebildeten Schaum angereichert.

Auf die Zerschäumungsanalyse wurde schon Anfang des 20. Jahrhunderts hingewiesen. Bereits 1918 ließ Ostwald ein „Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten zum Zwecke der Anreicherung, Abscheidung oder Trocknung in ihnen gelöst oder emulgiert enthaltener Stoffe durch Zerschäumung gekennzeichnet“ patentieren [Ostwald, 1920]. Erste Anwendungsbeispiele zur Trennung von Stoffgemischen wurden von Ostwald anhand der Farbstoffe Patentblau und Neucoccin demonstriert [Ostwald und Siehr, 1936]. Die Trennung beider Farbstoffe aufgrund der Anreicherung von Patentblau im Schaum wird anhand der Farbfotos im Anhang (s. Abb. 8-1 und Abb. 8-2) demonstriert. Weiter hat Ostwald gezeigt, dass eine Anreicherung von Eiweiß aus Pflanzenrohsäften wie Kartoffelfruchtwasser und Zuckerrüben-Rohsaft [Ostwald und Siehr, 1937] oder Harn [Ostwald und Mischke, 1940] durch Zerschäumung möglich ist und durch Veränderung des pH-Wertes der Ausgangsprobe Proteine auch selektiv angereichert werden können.

Betrachtet man die weiteren Entwicklungsschritte der Zerschäumungsanalyse im Rückblick, so ist nur eine geringe Anzahl an neuen Aspekten erwähnenswert. Bei den in den letzten Jahren erschienenen Arbeiten beschränkt sich der Einsatz der Zerschäumungsanalyse auf die Anreicherung von Proteinen und Enzymen sowie auf die Abwasserreinigung mit Hilfe von Tensiden als Schaumbildner. Im Rahmen dieser Arbeit werden neue Einsatzgebiete der Zerschäumungsanalyse zur Anreicherung von Naturstoffen aufgezeigt.

Der Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie stößt auf ein immer größeres Interesse. Angestrebt wird hier sowohl eine einfache, schonende und kostengünstige Isolierung von pflanzlichen Inhaltsstoffen aus der Matrix als auch die Gewinnung von Wertstoffen aus Abfällen, die bei der Produktion anfallen.

Die klassische Methode zur Isolierung von pflanzlichen Inhaltsstoffen ist die Lösungsmittlextraktion. Als Lösungsmittel werden vorwiegend Ethanol, Aceton, Hexan und Dichlormethan verwendet. Problematisch sind mitunter die Lösungsmittelreste, die nach dem Abdestillieren im Produkt zurückbleiben. Die Lösungsmittlextraktion ist nicht nur teuer, sondern belastet auch die Umwelt. Eine Alternative für die Lösungsmittlextraktion stellt die CO₂-Hochdruckextraktion dar. Bei dieser Methode werden die gewünschten Extrakte mit überkritischem CO₂ unter Variation von Druck und Temperatur auf schonende Art und Weise erhalten. Diese Methode wird vor allem bei der Entkoffeinierung von Kaffee, der Hopfenextraktgewinnung und der Gewürzverarbeitung industriell eingesetzt. Sie stellt jedoch wegen ihrer aufwendigen Technologie hohe Anforderungen an Material, Personal und Sicherheit. Die Investitions- und Betriebskosten sind außerdem mehrfach höher als die der Lösungsmittlextraktion. Die bei der Hochdruckextraktion anfallenden Rückstände enthalten i.d.R. meist noch einen beträchtlichen Anteil an den extrahierten Wertstoffen. Die Zerschäumungsanalyse ist dagegen bei niedrigen Ausgangskonzentrationen am effektivsten und könnte hier zur Anreicherung von Inhaltsstoffen aus Pflanzen und aus ihren Rückständen, die z. B. bei der CO₂-Hochdruckextraktion anfallen, eingesetzt werden.

Die Zerschäumung wird unter Einleiten eines inerten Gases (z.B. Stickstoff) bei Raumtemperatur durchgeführt und ist somit für oxidationsempfindliche und hitzelabile Verbindungen eine schonende Methode. Durch den Verzicht auf Lösungsmittel ist die Methode umweltverträglich. Sie zeichnet sich auch durch einfache Apparaturen sowie geringe Energie-, Investitions- und Betriebskosten [Uraizee, 1990; Brown, 1999], hohe Anreicherung für verdünnte und hochverdünnte (z.T. 1:10¹⁰) wässrige Lösungen, besonders bei großen Flüssigkeitsmengen aus. Sie ist sehr selektiv, je nach Wahl der äußeren Bedingungen (pH-Wert, Gasflussrate, Gasblasengröße, etc.) [Loha, 1997; Uraizee, 1995; Timmons, 1992], und einfach durchführbar. Die Zerschäumungsanalyse ist außerdem zur Anreicherung in der Spurenanalytik sowie zur Abtrennung störender Begleitstoffe im analytischen Bereich anwendbar [Maas, 1974].

Vor diesem Hintergrund erscheint die Zerschäumungsanalyse prinzipiell als eine gute Alternative zu den bisherigen Techniken zur Anreicherung wertvoller Inhaltsstoffen aus Nutzpflanzen, Heilpflanzen, Gewürzen und Abfällen der Lebensmittelindustrie. Bereits aus früherer Zeit ist ein Patent zur Abtrennung von Weizenkleber aus Stärke mittels der Zerschäumungsanalyse bekannt [Rodger, 1972].

Da mittels der Zerschäumungsanalyse Proteine und Enzyme unter Auswahl von geeigneten Bedingungen (z.B. pH-Wert) auch selektiv aus Mehrkomponentensystemen getrennt bzw. angereichert werden können, stellt sie auch hier eine Alternative zu bisherigen Reinigungs- und Isolierungsmethoden (Ultrafiltration, Elektrodialyse, Umkehrosmose, Koagulation) von Proteinen dar [Griswell, 1976]. Unter Variation der Einflussparameter versucht man die Methode für einen großtechnischen Einsatz zu optimieren [Prokorp, 1993; Hossain, 1998]. Da allerdings Schaum eine äußerst komplexe Matrix ist, sind die Vorgänge während einer Zerschäumung noch nicht vollständig untersucht und aufgeklärt.

Die Zerschäumungsanalyse gehört zu den adsorptiven Gasblasen-Trennmethoden. Eine verwandte Methode, die auf der Adsorption an der Gasblase basiert, jedoch ohne Schaumbildung, stellt die Lösungsmittelsublation (engl.: solvent sublation) dar. Die wässrige Phase ist mit nicht mischbarem Lösungsmittel überschichtet, in dem an den Gasblasen angereicherte Verbindungen gelöst werden. Hier erfolgt die Anreicherung lediglich durch Adsorption an der Gasblase aufgrund der hydrophoben Eigenschaften einer Verbindung. Valsaraj zeigte die Anreicherung von hydrophoben chlorierten Komponenten aus wässrigen Lösungen [Valsaraj, 1986a, b, c und 1992] sowie die Entfernung von Geruchs- und Geschmackstoffen aus Trinkwasser [Valsaraj, 1988] mit Hilfe der Lösungsmittelsublation. Im Rahmen der Zerschäumungsanalyse ergibt sich theoretisch die Möglichkeit, neben der Anreicherung von polymolekularen schaubildenden Verbindungen wie Proteinen und Stärke auch nicht-schaumbildend, relativ unpolare monomolekulare Verbindungen aufgrund der Adsorption an den Gasblasen im Schaum anzureichern. Hier sind bei der Zerschäumung Fraktionierungen innerhalb einer Substanzgruppe, die in ihrer Molekülgröße und Polarität Unterschiede zeigen, zu erwarten, da das Schäumen/Entschäumen entlang einer Schaumsäule zu einem chromatographischen Effekt führt [Maas, 1974].

In dieser Arbeit werden selbst Verbindungen, die nicht Schaumbildner sind, jedoch an Gasblasen adsorbieren und im Schaum angereichert werden können, als oberflächenaktiv bzw. schaumaktiv bezeichnet.

Daraus ergaben sich für diese Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

Die Zerschäumbarkeit wässriger Extrakte von Nutz- und Heilpflanzen sowie Gewürzen und die Anreicherung ihrer wertvollen Inhaltsstoffe mittels der Zerschäumungsanalyse sollte überprüft werden, z.B. die Anreicherung von Antioxidantien (Carnosolsäure) aus Rosmarin, Scharfstoffen (Gingerole) aus Ingwer, Bitterstoffen (Isolumulone) aus Bier, Farbstoffen (z. B. Carotinoide) aus Karotten- und Orangensäften, Curcuminoiden aus Kurkuma sowie flüchtigen Aromastoffen, z.B. aus Orangensaft. Desweiteren soll demonstriert werden, dass die Zerschäumungsanalyse auch zur Eliminierung von Stoffen mit unerwünschter Wirkung anwendbar ist (z.B. Abreicherung von Glykoalkaloiden aus Kartoffelpreßsaft oder Flavokavinen aus wässrigen Extrakten der Kava-Kava-Wurzel-pflanze).

Da die Zerschäumungsanalyse i.d.R. im wässrigen Milieu erfolgt, soll anhand ausgesuchter Beispiele versucht werden, die wässrigen Extraktionsausbeuten zu optimieren, um Anwendungsmöglichkeiten für die Praxis zu eröffnen.

Da die Anreicherung einer Verbindung im Schaum von ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften abhängig ist, wird in dieser Arbeit die Anreicherung verschiedener Stoffklassen untersucht, um eine Korrelation zwischen der Anreicherung einer Verbindung im Schaum (Schaumaktivität) und ihren polaren Eigenschaften festzustellen. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie sich Verbindungen innerhalb einer Substanzgruppe bei der Zerschäumung verhalten und ob mittels der Zerschäumungsanalyse aufgrund des Polaritätsunterschieds ein chromatographischer Trenneffekt erzielbar ist. Dies wurde anhand der Anreicherung von Gingerolen und Isohumulonen näher betrachtet. Ein Überblick über das Verhalten der einzelnen Verbindungen im Laufe der Zerschäumung sollte mit Hilfe der „Fraktionierten Zerschäumung“ (Entnahme von Schaum- und Rückstandsfraktionen in definierten Zeitabständen während einer Zerschäumung) gewonnen werden.

Unter Berücksichtigung von weiteren Einflussparametern wie Konzentration der Schaumbildner und der anzureichernden Verbindungen, Gasflussrate, pH-Wert und Säulendimensionierung sollte schließlich die Anreicherung einer Verbindung im Schaum optimiert werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Zerschäumungsanalyse

2.1.1 Einordnung der Zerschäumungsanalyse

Die adsorptiven Gasblasen-Trennmethode(n) (engl.: Adsorptive Bubble Separation Methods) sind sehr wirkungsvolle Methoden zur Abtrennung und Aufkonzentrierung sowohl von oberflächenaktiven als auch - mit Hilfe von ionischen Tensiden - nicht oberflächenaktiven Verbindungen (Gegenionen) aus wässrigen Lösungen oder Suspensionen. Die oberflächenaktiven Verbindungen haben die Eigenschaft, sich verstärkt an hydrophoben Phasengrenzflächen (flüssig/gasförmig) anzureichern, wobei deren Trennung auf unterschiedlicher Oberflächenaktivität beruht. Die experimentelle Durchführung erfordert nur die Erzeugung von Gasblasen durch Dispersion eines Gases mittels einer porösen Fritte am unteren Ende der Flüssigphase. Des Weiteren muss eine Möglichkeit geschaffen werden, die Flüssigkeit (Konzentrat) unmittelbar an der Phasengrenze bzw. dem angereicherten Schaum zu sammeln. In der Literatur werden viele experimentelle Varianten der adsorptiven Gasblasen-Trennmethode(n) beschrieben [Lemlich, 1968; Karger, 1967; Grieves, 1982; Rubin und Gaden, 1962]. Dabei unterscheidet man zwischen schaumlosen Gasblasen-Trennmethode(n) (non-foaming adsorptive bubble separation) und Schaum-Trennmethode(n) (foam separation). Zu den schaumlosen Gasblasen-Trennmethode(n) gehören die Gasblasenfraktionierung (bubble fractionation) und Lösungsmittelsublation (solvent sublation). Zu den Schaum-Trennmethode(n) gehören die Flotation (foam flotation) und die Zerschäumungsanalyse (foam fractionation) (s. Abb. 2-1).

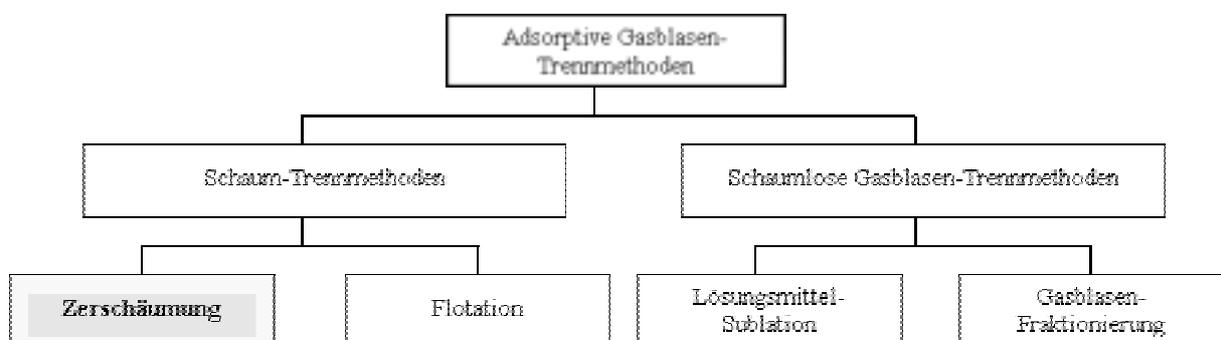


Abb. 2-1: Methoden der adsorptiven Trennung durch Gasblasen [Karger et. al., 1967]

Gasblasenfractionierung (bubble fractionation)

Gasblasenfractionierung wird nach Lemlich und Dorman nur durch Adsorption gelöster oberflächenaktiver Verbindungen an den aufsteigenden Gasblasen hervorgerufen. Es kommt zu einer relativ geringen Konzentrationsverschiebung. Die Verbindung wird mit den Gasblasen an das oberste Ende der Flüssigkeitssäule befördert, wo die Gasblasen zerplatzen. Aus dieser Oberphase wird das flüssige Konzentrat entnommen [Lemlich, 1968, 1972a, b; Maas, 1974].

Lösungsmittelsublation (solvent sublation)

Hier wird die wässrige Phase mit einer nicht mischbaren organischen Phase (Octanol, Anisol) überschichtet, die die an den Gasblasen adsorbierten Moleküle aufnimmt, sobald die Gasblasen die wässrige Phase verlassen. Mit Hilfe von ionischen Tensiden können auch nicht oberflächenaktive Gegenionen aus der wässrigen Lösung extrahiert werden.

Beispiele: Fraktionierung von Methylorange / Rhodamin B durch unterschiedliche Reaktion mit einem zugesetzten Kationentensid [Karger 1967], Trennung von hydrophoben chlorierten Komponenten in wässrigen Lösungen wie Pentachlorphenol [Valsaraj 1986a], Mono-, Di- und Tri-chlorobenzol sowie DDT [Valsaraj 1986c]. Die Effektivität dieser Methode ist proportional zu den hydrophoben Eigenschaften (niedrige Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Komponente).

Flotation (foam flotation)

Im Gegensatz zur Zerschäumungsanalyse ist bei der Flotation eine feste dritte Phase beteiligt. Hier erfolgt eine Trennung von grobdispersen Teilchen. In der Literatur erfolgt eine Unterteilung nach Größenordnung und Bildungsweise der suspendierten Stoffe [Karger und DeVivo, 1968; Mahne, 1971]. Bei der Ionen-Flotation erfolgt die Trennung von Ionen durch Zusatz von oberflächenaktiven Gegenionen (Beispiele: Anionische und kationische Farbstoffe [Karger, 1967; Horng, 1993], Phenole [Grieves, 1966 und 1974]). Weiter unterscheidet man zwischen Molekularflotation (z.B. Anreicherung von Albumin, γ -Globulin, Hämoglobin [Maas, 1974]) und Mikroflotation (z.B. Anreicherung von Mikroorganismen wie Bakterien oder Bakteriophagen [Panthasarathy, 1988; Palmieri, 1996]).

Weitere Flotationsformen sind die Kolloid-, Präzipitäts- und die adsorbierende Kolloid-Flotation.

Zerschäumungsanalyse (foam fractionation)

Im Gegensatz zur Flotation, bei der grobdisperse Teilchen getrennt bzw. angereichert werden, werden bei der Zerschäumungsanalyse oberflächenaktive, echt gelöste molekulare Verbindungen angereichert bzw. getrennt ohne Zusatz von Hilfsmitteln (Beispiele: Proteine und Enzyme aus Pflanzensäften sowie technische Tenside aus Abwasser).

2.1.2 Grundlagen der Zerschäumungsanalyse

2.1.2.1 Prinzip der Zerschäumungsanalyse

Von Zerschäumung oder vorübergehender Schaumbildung spricht man nach Ostwald und Siehr, wenn durch Gaseinleiten in eine Flüssigkeit ein Schaum entsteht, der in einer Säule emporsteigt und schließlich in ein seitlich davon stehendes Auffanggefäß überführt wird, wo er spontan zerfällt. Bei der Gaseinleitung in die Lösung stabilisieren die schaumbildenden Substanzen durch Bildung flexibler, kohäsiver Filme die eingeleiteten Gasblasen, die zur Oberfläche wandern und dort den Schaum erzeugen. Dabei werden schaumaktive Verbindungen aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften an der hydrophoben dünnen Wandung der Gasblase adsorbiert und damit aus der wässrigen Lösung angereichert. Die Aufkonzentrierung in der Schaumsäule erfolgt beim Hochsteigen des Schaums in der Zerschäumungskolonie einerseits durch das Zurückfließen der mitgerissenen Probelösung aufgrund der Gravitations- und Kapillarkräfte (Drainage), andererseits fließt durch die beim Zerfall der Gasblasen am oberen Ende der Kolonne entstehende angereicherte Flüssigkeit (Kollabat) im Gegenstrom zu den neu entstehenden Gasblasen nach unten. Dabei lagern sich die oberflächenaktiven Inhaltsstoffe an der Oberfläche der Gasblase an, während die nicht oberflächenaktiven Substanzen in die Lösung zurückfließen. Durch Bildung und Zerfall der Blasen entsteht nach kurzer Zeit eine stabile Schaumsäule, in der die Substanzen entlang der Säule nach ihren oberflächenaktiven Eigenschaften fraktioniert werden. Die aus dem Zerfall des Schaums erhaltene Flüssigkeit wird als **Spumat** und die nach Beendigung der Zerschäumung in der Zerschäumungskolonie zurückbleibende Flüssigkeit als **Rückstand** bezeichnet [Ostwald und Siehr, 1936] (s. Abb. 8-1 bis Abb. 8-3).

Zu berücksichtigen bei der Zerschäumung sind zwei Vorgänge: 1) Die Adsorption einer Verbindung an der Gasblase und 2) ihre Anreicherung im Schaum. Diese Vorgänge werden näher unter 2.1.2.2 und 2.1.2.3 beschrieben.

2.1.2.2 Oberflächenadsorption

Die maßgeblichen Parameter sind hier die Oberflächenspannung des Mediums und die Oberflächenaktivität der anzureichernden Verbindung. Nach Gibbs wird in Gleichung (1) (s.u.) die Adsorption in Abhängigkeit von der Konzentration gezeigt.

Besitzen gelöste Moleküle entsprechend der schematischen Darstellung in Abb. 2-2 einen polaren/wasserlöslichen und einen apolaren/wasserabstoßenden Teil, so bevorzugen sie gegebene Grenzflächen zwischen polarer flüssiger und apolarer flüssiger bzw. gasförmiger Phase. Das *Gibbssche Adsorptionstheorem* (1876) verknüpft die Anreicherung solcher oberflächenaktiver Verbindungen mit der Erniedrigung der Oberflächenspannung ihrer Lösungen. Der Quotient aus erhöhter Konzentration Γ in der Phasengrenzschicht und der Konzentration c einer gleich dicken Schicht im Innern der Lösung ist als Verteilungskoeffizient aufzufassen und kann für Trennungen genutzt werden (vgl. Abb. 2-2 und Gleichung (1)).

$$\frac{\Gamma}{c} = - \frac{1}{RT} * \frac{d\gamma}{dc} \quad (1)$$

- c : Konzentration der oberflächenaktiven Verbindung in der Lösung
 Γ : Konzentration der oberflächenaktiven Verbindung an der Grenzfläche flüssig/gasförmig
 γ : Oberflächenspannung.

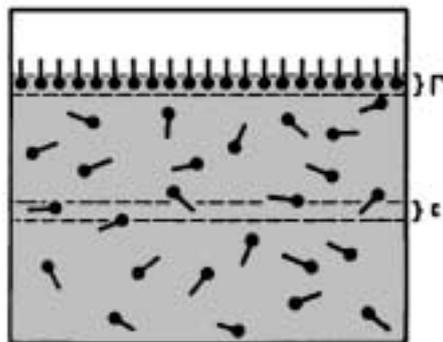


Abb. 2-2: Adsorption oberflächenaktiver Moleküle an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase (schematisch) [Maas, 1974]

Sind die Konstanten a [dyn cm^{-1}] und b (spezifische Kapillaraktivität, [l Mol^{-1}]) bekannt, so lässt sich Γ - z. B. für Fettsäuren - nach Gleichung (2) berechnen, die in ihrer Form der Langmuir'schen Adsorptionsisotherme entspricht.

$$\Gamma = \frac{0.4343}{RT} * \frac{a b c}{1 - bc} \quad (2)$$

(Grenzbereiche: $bc \ll 1$ bedeutet proportionales Anwachsen von Γ mit c ; $bc \sim 1$ bedeutet Sättigung der Oberfläche, d.h. Γ_{\max}).

Üblicherweise ist die Anreicherung oberflächenaktiver Verbindungen im Konzentrationsbereich 10^{-3} - 10^{-7} bei der Zerschäumung am effektivsten. Bei zu hoher Konzentration bilden sich Aggregate (Mizellen) mit nach außen gerichteten hydrophilen Gruppen. Bei sehr großer Verdünnung enthält die Grenzschicht nur wenige oberflächenaktive Moleküle; die Oberflächenspannung weicht kaum von der des reinen Lösungsmittels ab.

Der hydrophobe Teil der oberflächenaktiven Moleküle kann rein oder gemischt aliphatisch, cycloaliphatisch (z. B. bei Saponinen) und aromatisch sein. Fluorierung wirkt verstärkend, der Einbau von Stickstoff- und Sauerstoff-Atomen schwächend. Als Übergang zum hydrophilen Molekülbereich treten zwischengeschaltet polare Ether-, Ester- und Carbonamid-Gruppen auf.

Weiter beeinflusst der pH-Wert des wässrigen Mediums die hydrophoben Eigenschaften und deswegen auch die Oberflächenaktivität und Anreicherung einer Verbindung. So zeigen Proteine bei ihrem isoelektrischen Punkt ein Maximum an Hydrophobizität und somit ein Löslichkeitsminimum im wässrigen Medium. Deshalb lassen sich Proteine bei Einstellung des pH-Wertes an ihrem isoelektrischen Punkt am besten im Schaum anreichern und Proteine / Enzyme selektiv mittels der Zerschäumung voneinander trennen [Charm, 1966; Chai, 1998; Loha, 1997; Desouza und Tanner, 1991; Uriazee, 1995].

2.1.2.3 Anreicherung im Schaum

Mittels der Zerschäumungsanalyse können nach Abb. 2-3a dadurch Konzentrate geliefert werden, dass die verarmte Flüssigkeit innerhalb der Lamellen abfließt und sich die auf das Flüssigkeitsvolumen bezogene Grenzfläche erhöht (Drainage-Effekt). Viel wirkungsvoller aber ist nach Abb. 2-3b der Austausch von beweglicher Lamellenflüssigkeit durch ein angereichertes Kollabat (angereicherter flüssiger Rücklauf, der im oberen Bereich der Schaumsäule aus zerfallenden Lamellen gebildet wird) in einem Gegenstromprozess [Maas, 1974].

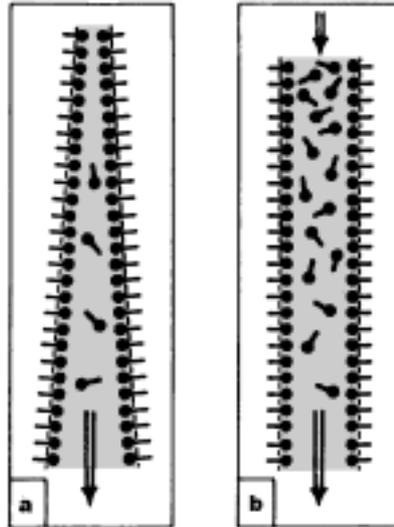


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Konzentrationserhöhung oberflächenaktiver Moleküle an der Grenze zwischen gasförmiger und flüssiger Phase durch: a. Drainage, b. angereichertes Kollab

Der Drainage-Effekt und die Kollab-Bildung, die auf der Gasblasenkoaleszenz und der Disproportionierung beruhen, sind beeinflusst von der Stabilität und der Konsistenz (nass/trocken) der Schaumsäule. Hier sind die Einflussfaktoren auf Bildung, Stabilisierung und Zerfall des Schaums zu berücksichtigen. Dazu gehören die Oberflächenspannung und Viskosität der Lösung, die Konzentration der Schaumbildner sowie einstellbare Parameter wie Gasflussrate, Gasblasengröße, Gasart, Säulendimension und Temperatur [Mangold, 1953; Uriazee, 1995; Lima, 1994; Lange, 1972; Kamm, 1966; Peters, 1952]. Um den Ablauf einer Anreicherung im Schaum bei der Zerschäumung verstehen und optimieren zu können, sind Kenntnisse über den Aufbau des Schaums notwendig, die nachfolgend näher verdeutlicht werden.

Schaumbildung:

Schäume sind Dispersionen von Gasen in Flüssigkeiten. In Abhängigkeit von der Größe und der Form der Gasblasen und dem relativen Volumenanteil der Flüssigkeit im Schaum unterscheidet man zwischen „Kugelschaum“ und „Polyederschaum“. Im Kugelschaum sind die Gasblasen kugelförmig und durch dickere Flüssigkeitsbereiche voneinander getrennt, so dass die Gasblasen nicht miteinander in Wechselwirkung stehen (selbständige Kugelblasen wie z.B. beim Sektschaum). Solche Schäume sind nur kurzfristig stabil (z.B. Sektschaum). Für ihre Entstehung sind grenzflächenaktive Stoffe nicht notwendig [Kamm, 1966]. Der Polyederschaum ist dagegen ein Verband polyedrisch geformter Blasen, die ihre

Selbstständigkeit verloren haben. Während der Kugelschaum aus Nacktblasen (ohne Umhüllung) besteht, sind an der Bildung von Polyederschaum Filmblasen, die von einer grenzflächenaktiven Substanz umgeben sind, und Lamellenblasen, die durch Aneinanderhaften mehrerer Filmblasen entstehen, beteiligt. Eine Lamelle besteht aus einer Flüssigkeitsschicht von 10 nm bis 1 μm Dicke, die auf beiden Seiten einen dünnen Film einer grenzflächenaktiven Substanz trägt.

Die Filmbildung an Grenzflächen durch oberflächenaktive Verbindungen beruht auf der Fähigkeit, die Grenzflächenspannung an den Phasengrenzen zwischen Gas und Flüssigkeit herabzusetzen. Ein bekanntes Beispiel dafür sind Proteine. Nur Kugelschaum aus Filmblasen kann zu Polyederschaum übergehen (s. Abb. 2-4 links). Dabei wird die flüssige Phase zwischen den Gasblasen verdrängt, bis diese nur noch durch Flüssigkeitslamellen voneinander getrennt sind. Die verbleibende dünne Flüssigkeitsschicht in den zusammenlaufenden Lamellen bildet ein System von spaltförmigen Dreieckskanälen [Mangold, 1953]. Diese Dreieckskanäle werden als Plateau's Border oder Gibbs-Kanal bezeichnet [Adamson, 1990]. Im Gleichgewichtszustand stoßen drei Lamellen eines Polyederschaumes in einer Kante zusammen. Der Flächenwinkel beträgt daher 120° . Abb. 2-4, rechts zeigt schematisch den Querschnitt eines Polyederschaums [Lima, 1994].

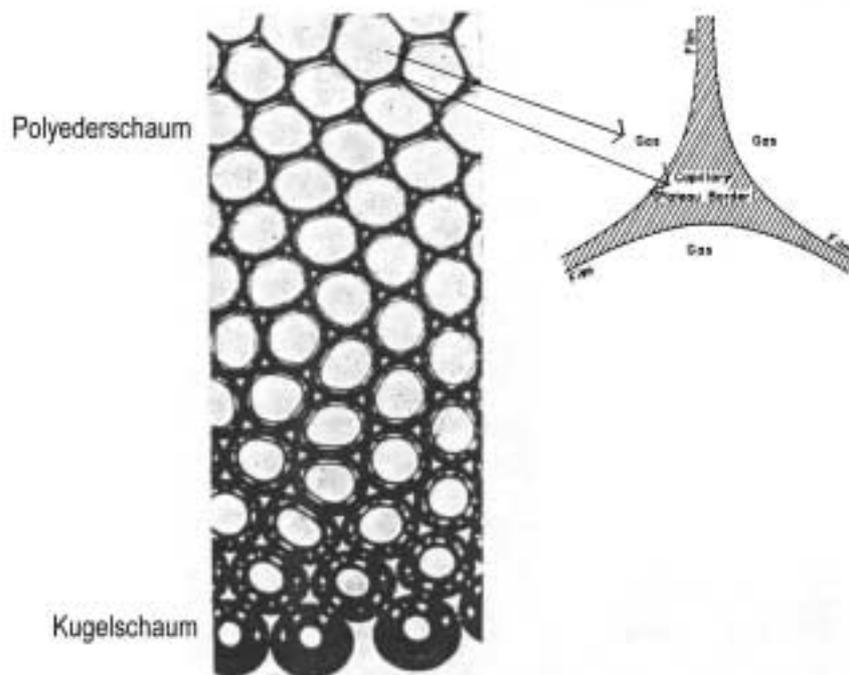


Abb. 2-4: Übergang vom Kugelschaum zum Polyederschaum in einer Zerschäumungssäule (links) [Mangold, 1953] und schematische Darstellung des Gibbs-Kanals (Plateau's Border) (rechts) [Lima, 1994]

Schaumzerfall:

In dem Plateau-Rand herrscht aufgrund der konkaven Krümmung ein Unterdruck gegenüber der Gasphase und somit auch gegenüber der in den Lamellen befindlichen Flüssigkeit. Der Plateau-Rand übt daher eine Saugwirkung auf die Lamellen aus. Die Flüssigkeit muss also aus den Lamellen spontan in den Plateau-Rand hineinströmen. Dadurch werden die Lamellen immer dünner und müssten schließlich, falls sie nicht vorher zerplatzen, völlig verschwinden, würden nicht noch andere Kräfte auftreten, die sich der Dickenabnahme entgegensetzen, wie der Marangoni-Effekt. An Stellen mit einer dünnen Flüssigkeitsschicht erhöht sich die Oberflächenspannung. Entsprechend dem Marangoni-Effekt wandert dann an der Oberfläche Flüssigkeit in diese Bereiche, so dass der Effekt der Dickenabnahme kompensiert wird. Die Schaumlamelle hat eine Dicke von einigen bis vielen Mikrometern. Sogleich nach ihrer Entstehung beginnt die Lamelle dünner zu werden, indem Flüssigkeit aus ihrem Inneren abströmt. Dieser Vorgang ist einmal auf die Saugwirkung des Plateu-Randes zurückzuführen, zum anderen auf die Gravitation. Die Geschwindigkeit des Auslaufens der Lamellenflüssigkeit ist bei gegebenen geometrischen Bedingungen abhängig von der Zusammensetzung der Lösung und von der Temperatur. Schnell auslaufende Lamellen werden von Flüssigkeiten mit niedriger, langsam auslaufende Lamellen von Flüssigkeiten mit hoher Oberflächenviskosität gebildet [Lange, 1972].

Ein weiterer Einfluss auf den Schaumzerfall kann durch ein Zusammentreffen der Gasblasen verursacht werden. Dies kann zur sog. Koaleszenz bzw. Disproportionierung führen. Koaleszenz ist das Zusammenschließen zweier ähnlich großer Gasblasen zu einer größeren Gasblase. Der Schaumzerfall durch Disproportionierung beruht auf Druckdifferenzen. Der Innendruck der Blasen verhält sich indirekt proportional zum Blasendurchmesser. Aus diesem Grund zeigen die kleineren Gasblasen das Bestreben, sich zu großen Blasen zu vereinigen [Ronteltap, 1991]. Salzzusatz verhindert die Blasen-Koaleszenz, weil Salz den dazu erforderlichen Energiebedarf erhöht. Alkoholzusatz dagegen wirkt positiv, da es zur Erniedrigung der Oberflächenspannung führt bzw. kleineren Gasblasengrößen.

Abbildung 8-3 (im Anhang) zeigt den Zerfall einer Schaumsäule im Laufe einer Zerschäumung. Während die Schaumsäule zu Beginn (unten) aus feinen Gasblasen besteht und der Schaum nass und cremig ist, ist die Schaumsäule oben trocken, und die Gasblasen sind dort aufgrund der Drainage und Blasenkoaleszenz grob.

2.1.3 Zerschäumungs-Techniken und -Parameter

Bei der Zerschäumung gibt es verschiedene Vorgehensweisen (s. Abb. 2-5). Die einfachste Methode ist das Batch-Verfahren, wobei die komplette Versuchslösung zu Beginn in die Säule eingefüllt und zerschäumt wird. Die Anreicherung ist hier zeitabhängig, d.h. die Konzentration der schaumaktiven Verbindung in der Flüssigkeit nimmt stetig ab und sie wird im Schaum angereichert. Diese Technik wurde in dieser Arbeit vornehmlich eingesetzt. Sie ist besonders für Proben im Labormaßstab und für die Untersuchung einer zeitlichen Anreicherung und Trennung von schaumaktiven Verbindungen geeignet [Ahmad, 1975a; Karger und DeVivo, 1968].

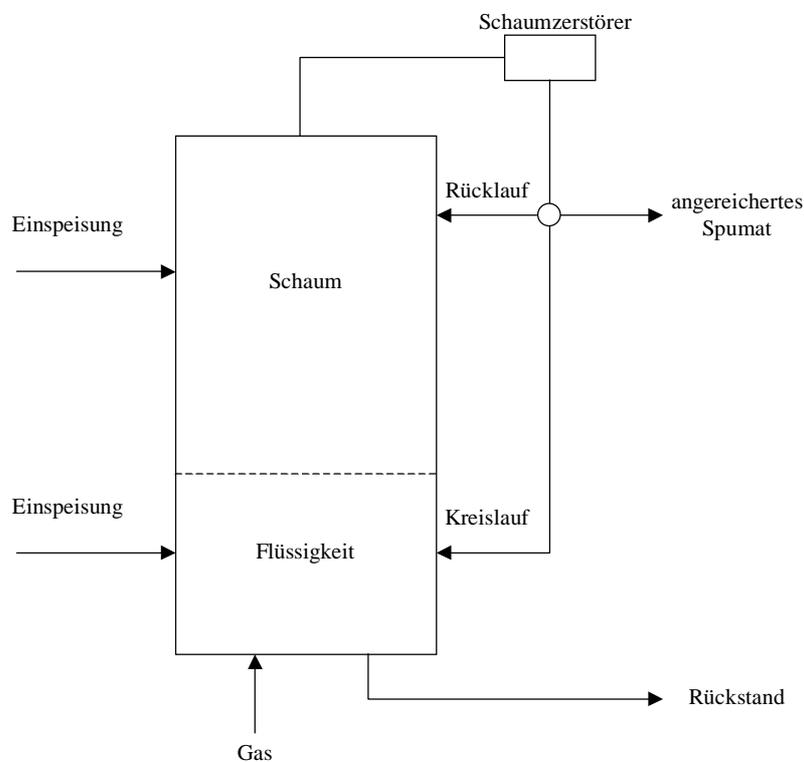


Abb. 2-5: Schematische Darstellung der verschiedenen Varianten für die Durchführung einer Zerschäumung [Karger und DeVivo, 1968]

Weiterhin gibt es ein kontinuierliches Verfahren. Bei dieser Methode wird während der Versuchsdurchführung stets neue Versuchslösung zugeführt und die Restflüssigkeit abgezogen. Es bestehen unterschiedliche Möglichkeiten der Flüssigkeitszugabe. Sie kann in den Schaum oder in die Versuchslösung gegeben werden. Diese Verfahren ermöglichen es, größere Probenmengen kontinuierlich zu zerschäumen. Wird die Flüssigkeit in den Schaum zugeführt, fördert sie den Drainage-Effekt. Durch die Schwerkraft fließt die Flüssigkeit nach unten und zieht die Flüssigkeit im Schaum mit nach unten. Eine stärkere Konzentrierung kann

erzielt werden, wenn man im Kreislauf zerschäumt, indem man den entstandenen Schaum wieder zurückführt und erneut zerschäumt. Abb. 2-6 zeigt eine Apparatur für Kreislaufzerschäumung nach Siehr [Ostwald und Siehr, 1937].

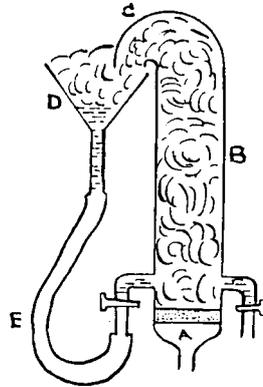


Abb. 2-6: Apparatur für Kreislaufzerschäumung nach Siehr: A. Glassinterplatte, B. Weites Glasrohr mit Vorstoß C, D. Auffanggefäß, das durch Gummischlauch E mit dem Zerschäumungsapparat verbunden ist [Ostwald und Siehr, 1937].

Für eine effiziente Anreicherung sind bei der Durchführung einer Zerschäumung folgende Parameter wichtig:

Gasflussrate: Diese bestimmt die Gasblasenzahl und -geschwindigkeit, die die wässrige Phase zu einem bestimmten Zeitpunkt passieren. Niedrige Flussraten ergeben bessere Trennungen und höhere Anreicherungen, da weniger Flüssigkeit in den Schaum mitgerissen wird, und die Kontaktzeit der Gasblasen in der Säule erhöht wird. Hohe Flussraten ergeben nasse Schäume und damit weniger Anreicherung [Ahmad, 1975a; Ko et al., 1998; Brown, 1999; Uriazee, 1995]

Säulendimensionierung: Die Säulenhöhe bestimmt die Zeit, in der der Schaum in der Säule hochsteigt und die Säule verlässt. Längere Säulen erhöhen die Anreicherung, da der gebildete Schaum mehr Zeit erhält, mitgerissene Flüssigkeit abfließen zu lassen (das begünstigt die Drainage). Allerdings muss man berücksichtigen, dass in sehr hohen Säulen der gebildete Schaum bereits in der Säule zerfällt und nicht erhalten werden kann [Brown, 1999; Uriazee, 1995; Ahmad, 1975a].

Höhe der Probenlösung: Bei konstanter Schaumhöhe und Gasflussrate erfährt die Gasblase bei steigendem Flüssigkeitspegel der Probenlösung eine längere Kontaktzeit mit der

Ausgangslösung. Dies wirkt sich positiv auf die Anreicherung aus [Uriazee, 1995; Ahmad, 1975a].

Blasengröße: Kleine Gasblasen erhöhen die Kontaktfläche der Blase zu der Lösung. Sie steigen langsamer in der Säule empor und verlängern auch die Kontaktzeit. Größere Blasen begünstigen jedoch die Blasenkoaleszenz und eine höhere Anreicherung durch die Kollabtbildung. Deshalb sind Gasblasen von mittlerer Größe, erzeugt mit Fritten der Porosität (G3), optimal [Desouza und Tanner, 1991; Ronteltap, 1991; Liu, 1998].

Gasart: Stickstoffgas wird wegen seiner inerten Eigenschaften und seines günstigen Preises bevorzugt. Die Gasart beeinflusst die Zerschäumung auch insofern, als die Gase verschiedene Gasblasengrößen liefern. So liefert Stickstoffgas einen cremigen Schaum mit viel kleineren Gasblasen als Kohlendioxid [Liu, 1998; Montero, 1993].

2.1.4 Anwendungsgebiete der Zerschäumungsanalyse

Die Zerschäumungsanalyse ist ein schonendes Anreicherungsverfahren für verdünnte und hochverdünnte (z.T. $1:10^{10}$) wässrige Lösungen und eignet sich besonders bei großen Flüssigkeitsmengen. Dabei können sowohl Wertstoffe gewonnen and angereichert werden, wie zahlreiche Publikationen anhand der Anreicherung von Proteinen zeigen, als auch störende Begleitstoffe abgetrennt werden, wie es anhand der Abwasserreinigung und der Reinigung von Fischkulturen gezeigt wird.

Proteinanreicherung:

Bereits aus früherer Zeit ist ein Patent zur Abtrennung von Weizenkleber aus Stärke mittels der Zerschäumungsanalyse bekannt [Patent Rodger]. Auf dem Gebiet der Proteingewinnung stellt die Zerschäumungsanalyse bereits eine Alternative zu bisherigen Methoden dar (Filtration, Koagulation, Umkehrosmose). Mittels der Zerschäumungsanalyse ist es möglich, neben einer Aufkonzentrierung von Proteinen und Enzymen auch eine selektive Trennung aus Mehrkomponentensystemen zu erzielen [Brown et al., 1999, Mohan und Lyddiatt, 1994; Uriazee, 1995; Ko und Loha, 1998; Chai, 1998; Griswell, 1976; Prokorp, 1993; Charm, 1966; Montero und Tanner, 1993; Ahmad, 1975b und 1975b].

Reinigung von Abwasser und Fischkulturen:

Timmons hat organische Säuren abgereichert und somit eine pH-Regulation für Fischkulturen erzielt. Dabei wurden auch Schwebstoffe abgetrennt [Timmons, 1992]. Auch organische Farbstoffe wurden aus Abwässern durch Zerschäumung - oder besser gesagt Ionen-Flotation (wegen des Zusatzes von Gegenionen) - getrennt [Hornig, 1993].

2.2 Substanzgruppen

Hier werden die Substanzgruppen im Rahmen einer Übersicht dargestellt, deren Anreicherung mittels der Zerschäumungsanalyse überprüft wurde (s. Tab. 2-1). Diese Inhaltsstoffe wurden nicht nur wegen ihrer Bedeutung für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie ausgewählt, sondern auch wegen ihrer unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften. Dadurch kann der Zusammenhang zwischen den schaumaktiven Eigenschaften einer Verbindung und ihrer chemischen Struktur näher betrachtet werden.

Tab. 2-1: Die verwendeten Untersuchungsmaterialien und ihre Inhaltsstoffe, die auf die Anreicherung mittels der Zerschäumungsanalyse untersucht wurden.

Untersuchungsmaterial	Substanzgruppe
Ingwer	Gingerole
Rosmarin	Antioxidantien
Bier	Bitterstoffe
Orangen, Mandarinen, Karotten, Tomaten, Safran	Carotinoide
Kurkuma	Curcuminoide und Turmerone
Kartoffel	Solanine
Kava-Kava	Kavapyrone und Flavokavine
Orangen	Aromaverbindungen
Kaffee	Coffein, Chlorogensäure, Farbstoffe
Orangen, Grapefruit	Hesperidin und Naringin
Sesam	Sesamol
Grüner Tee	Catechine
Rotwein, Blutorange	Anthocyane

2.2.1 Die Hopfenbitterstoffe in Bier und der Bierschaum

Hopfen:

Hopfen ist ein unentbehrlicher Rohstoff für die Bierbereitung. Er bewirkt als Klärmittel eine Fällung der Eiweißstoffe in der Würze, gibt der Würze ein spezifisches Aroma und einen bitteren Geschmack, trägt durch seinen Gehalt an antibiotisch wirksamen Substanzen neben

Alkohol und Kohlensäure zur Haltbarkeit des Bieres bei und unterstützt durch seinen Pektingehalt die Schaumbildung.

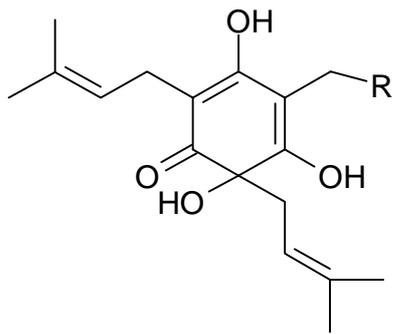
Hopfen (*Humulus lupulus*) ist eine winterharte, zweihäusige Kletterpflanze. In Hopfenkulturen baut man nur weibliche Pflanzen an und vermehrt sie vegetativ. Trotz fehlender Bestäubung wachsen die Blütenstände unter Verlängerung der Hoch- und Vorblätter zu sogenannten „Dolden“ heran, die im August/September gepflückt werden. Die becherförmigen Drüsenhaare der Hoch- und Vorblätter enthalten neben etherischen Ölen wie Myrcen, Humulen und anderen Terpenen (0,5 %) auch die Hopfenbitterstoffe (18,3 %) [Belitz und Grosch, 1992]. Heute werden vor allem CO₂- und Ethanol-Extrakte zur Hopfung bei der Bierherstellung eingesetzt.

Hopfenbitterstoffe:

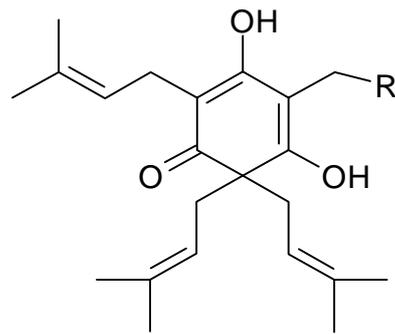
Die wichtigsten Bestandteile des Hopfens sind die Bitterstoffe. In frischem Hopfen liegen sie vorwiegend in Form der α -Bittersäuren (Humulon, I; Cohumulon, II; Adhululon, III) und der β -Bittersäuren (Lupulon, IV; Colupulon, V; Adlupulon, VI) vor. Es handelt sich um sehr reaktionsfähige Verbindungen, die während der Trocknung, Lagerung und Verarbeitung durch Isomerisierung, Oxidation und Polymerisation eine große Zahl von Folgeprodukten liefern. Qualität und Intensität des Bittergeschmacks dieser verschiedenen Folgeprodukte sind unterschiedlich. Die Bewertung eines Hopfens wird deshalb entscheidend von der Zusammensetzung der Bitterstofffraktion bestimmt, die sehr unterschiedlich sein kann.

Beim Würzekochen gehen die Humulone in Isohumulone (cis-Verbindungen: VII, trans-Verbindungen: VIII) über, die leichter löslich und bitterer als die Ausgangsverbindungen sind. Die Isohumulone können zu den Humulinsäuren (IX, X) weiterreagieren, deren Bitterkeit im Vergleich zu den Isohumulonen bei etwa 30 % liegt. Folgeprodukte der Lupulone, die Hupulone bzw. Luputrone, haben einen besonders angenehmen milden Bittergeschmack. Sie sind aber deutlich weniger bitter, so dass der Bittergeschmack des Bieres vorwiegend von der Isohumulonfraktion geprägt wird. In Abb. 2-7 sind die chemischen Strukturen der wichtigsten Bitterstoffe dargestellt [Belitz und Grosch, 1992].

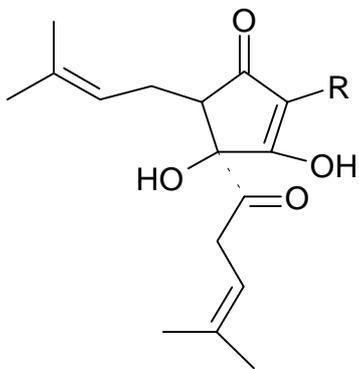
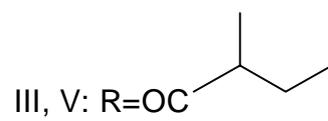
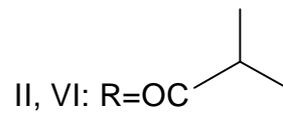
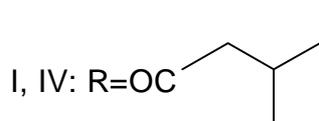
Isocohumulon und Cohumulon haben im Vergleich zu den entsprechenden n- und Ad-Homologen ein C-Atom weniger in der Seitenkette, sind somit etwas polarer und haben niedrigere pK_s-Werte, weshalb sie eine bessere Löslichkeit in Würze und Bier haben [Wackerbauer und Berlin, 1992, Teil 1].



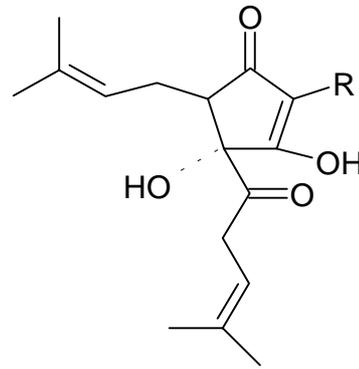
I-III



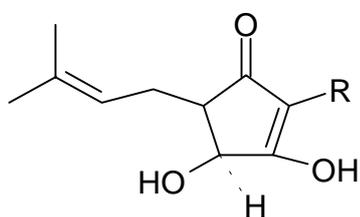
IV-VI



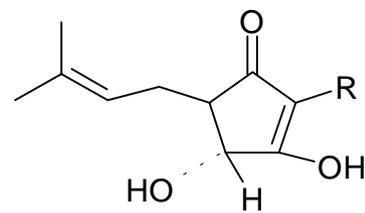
VII



VIII



IX



X

Abb. 2-7: Chemische Struktur der Bittersäuren [Belitz und Grosch, 1992]

I. Humulon, II Cohumulon, III Adhululon, IV. Lupulon, V. Colupulon, VI. Adlupulon

VII. cis- und VIII. trans-Isohumulone, IX. cis- und X. trans-Humulinsäuren.

Bierschaum:

Der Bierschaum ist ein wichtiges Kriterium für die Qualität eines Bieres, daher beschäftigen sich zahlreiche Arbeiten mit dem Bierschaum, seiner Bildung, Zusammensetzung, Stabilität sowie mit den Faktoren, die den Schaum fördern, und denen, die auf den Schaum eine negative Wirkung haben.

Bei Bier handelt es sich um eine Lösung, die gleichzeitig schaumfördernde und schaumzerstörende Stoffe enthält. Die schaumfördernden Substanzen sind zum größten Teil oberflächenaktiv, zu ihnen gehören z.B. Hopfenbitterstoffe, Melanoidine und hochmolekulare Eiweißabbauprodukte, denen auch die Fähigkeit der Häutchenbildung zugeschrieben wird [Narziß et al., 1982]. Verbessernd auf den Schaum wirken auch β -Lysolecithin, Melanoidine und β -Glucane [Kleber und Hums, 1975].

Zu den schaumzerstörenden Substanzen zählen Alkohole und andere Gärungsprodukte, ferner Aminosäuren, Mono- und Diglyceride, Sterine, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren [Kleber und Hums, 1975].

Der Bierschaum ist ein typischer Vertreter für Schäume, die aus niedrig-viskosen Flüssigkeiten gebildet werden. Beim Bierschaum unterscheidet man zwischen Schaumbildungsvermögen, Schaumhaltbarkeit und Schaumhaftvermögen. Nach diesen drei in sich verschiedenen Eigenschaften wird der Bierschaum beurteilt.

Einige Inhaltsstoffe des Bieres mit Einfluss auf den Schaum:**a) Proteine**

Im Bier liegen denaturierte und Abbau-Fragmente der Getreideproteine mit einem Molekulargewicht von über 100000 Daltons bis hin zu einfachen Aminosäuren vor. Die Fähigkeit eines Polypeptids, Schaum zu bilden, hängt von zwei Faktoren ab: Molekulare Größe und hydrophobe Eigenschaften. An der Schaumbildung sind in erster Linie hochmolekulare Eiweißverbindungen beteiligt.

Nur Polypeptide mit einem Molekulargewicht von mehr als 6000 Dalton stabilisieren den Schaum, da sie länger in den Schaumlamellen bleiben. Kleinere Polypeptide wirken nachteilig auf den Schaum, da sie zwar in den Schaum eindringen und Platz an der Gas/Flüssigkeits-Oberfläche einnehmen, jedoch ohne den Schaum selbst zu stabilisieren [Jackson, 1981; Roberts, 1977; Dale und Young, 1992; Wainwright, 1978]. Kleinere Polypeptide mit MW < 3000 Dalton, die zum Bier zugesetzt wurden, haben die Schaumhaltbarkeit deutlich reduziert

[Wainwright, 1978]. Da niedrigmolekulare Polypeptide auf den Schaum destabilisierend wirken, ist das Verhältnis der hochmolekularen zu niedrigmolekularen Polypeptiden viel wichtiger als die absolute Menge an hochmolekularen Polypeptiden [Bamforth, 1989]. Stabilisierend wirken vor allem hydrophobe Polypeptide (5000 bis 30000 Dalton) und weniger solche mit MW > 50000 Dalton [Slack und Bamforth, 1983].

Zerschäumungsversuche von Dale (1992) haben gezeigt, dass sich lediglich die hydrophoben Aminosäuren Valin, Isoleucin, Leucin und Phenylalanin im Schaum anreichern. Mögliche Ursache der Anreicherung von Lysin ist die Wechselwirkung von positiv geladener ϵ -Aminogruppe mit den negativ geladenen Isohumulonen. Nach [Furukubo et al., 1993] haben nur die im Bier vorhandenen basischen Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Histidin einen negativen Effekt auf das Schaumhaftungsvermögen an der Glaswand.

Hauptprotein in der hochmolekularen Fraktion ist ein Gerstealbumin mit 40000 Daltons. Dieses spielt die Hauptrolle beim Schaumhaltevermögen [Sorensen und Bech, 1993, Mohan, 1992]. Die zweite Hauptkomponente ist ein Antigen mit > 200000 Dalton und stammt aus der Hefe [Mohan, 1992]. Von den Bierproteinen hat das 40000 Dalton-Protein die höchste Aktivität auf die Oberflächenviskosität, die höchste Adsorptionsaffinität auf die Gasblase, die höchste Oberflächenaktivität und ein starkes Schaumbildungsvermögen. Die Tatsache, dass der pI des 40000 Dalton-Proteins nahe beim pH-Wert des Bieres liegt, fördert die hohe Oberflächenviskosität des Bieres [Madea et al., 1991].

Stabiler Schaum entsteht, wenn die Wechselwirkungen zwischen den Nachbarproteinen an der Gasblasenwand maximal sind. Für reine Proteine geschieht dies an ihrem isoelektrischen Punkt, bei dem die elektrostatischen repulsiven Kräfte zwischen den Molekülen minimal sind [Mohan, 1992]. Im Schaum bleiben vor allem hochmolekulare Proteine mit pI-Werten zwischen 4,55 und 5,20 zurück [Krüger et al., 1993].

b) Bitterstoffe

Die MengenkompONENTEN der Bitterstoffe im Bier sind sechs Iso- α -Säuren: *trans*- und *cis*-Isomere von Isohumulon, Isocohumulon und Isoadhumulon. Die Iso- α -Säuren sind zwar kein Schaumbildner, sind aber schaumaktive Verbindungen, die im Schaum an Proteine gebunden sind und den Schaum stabilisieren [Kleber und Hums, 1975; Clark et al., 1991; Yokoi et al., 1994; Roberts, 1977; Kamm, 1966]. Sich davon ableitende oxidierte Produkte wie die Abeo-

iso- α -Säuren findet man ebenfalls im Schaum. Sie verbessern entscheidend die Haftfähigkeit des Schaumes an der Glaswand [Kleber und Hums, 1975].

Asano und Hashimoto haben bestätigt, dass die Iso- α -Säuren kombiniert mit Polypeptiden im Bierschaum vorkommen [Asano und Hashimoto, 1976]. Dies erhöht die Viskosität in den flüssigen Regionen des Schaumes. So wird die Drainage (Zurückfließen von Flüssigkeit aus den Zwischenräumen der Gasblasen im Schaum) reduziert und die Schaumstabilität erhöht.

Es gibt zwei Arten der Wechselwirkung zwischen Hopfensäuren und Polypeptiden. Die erste ist eine Ion-Dipol-Bindung zwischen der Aminogruppe der Polypeptide und der Carbonylgruppe der Hopfenbittersäure. Die zweite stabilisiert den Schaum und ist eine hydrophobe Bindung zwischen der Seitenkette der Hopfensäure und dem hydrophoben Aminosäurerest der Peptide [Simpson und Huches, 1994].

Chemisch modifizierte Iso- α -Säuren wie Dihydro-, Tetrahydro- und Hexahydroisohumulone erhöhen die Schaumstabilität mehr als die Iso- α -Säuren [Todd et al., 1972]. Chemische Reduktion der Carbonylgruppen und / oder C-C-Doppelbindung an der Seitenkette führen zur Erhöhung der hydrophoben Eigenschaften der Seitenketten, was ihre Fähigkeit erhöht, an der hydrophoben-Wechselwirkung teilzunehmen [Simpson und Huches, 1994].

Die Iso- α -Säuren beeinflussen die Schaumhaltbarkeit unterschiedlich stark. So ergab ein Bier, das Isohumulone enthielt, einen besseren Schaum als ein Bier, das Isocohumulone enthielt. Dies ist mit der niedrigeren Löslichkeit der Isohumulone im Bier zu erklären, durch die das Isohumulon mehr dazu tendiert, sich mit den Schaumbildner-Komponenten zu assoziieren [Diffor et al., 1978]. Oxidationsprodukte von Humulonen und Lupulonen, sogenannte Nicht-Isohumulone-Bitterstoffe (NIBC), sind sensorisch nur von geringer Bedeutung, und sie üben auch anders als die Isohumulone keinen positiven Einfluss auf die Schaumhaltbarkeit aus [Wackerbauer und Berlin, 1992, Teil 3]

c) Lipide

Die im Bier vorhandenen Lipide kann man in drei Fraktionen teilen: Neutrale Lipide, freie Fettsäuren und Phospholipide. Auch in kleineren Konzentrationen wirken die neutralen Lipide und die freien Fettsäuren stark abbauend auf den Schaum des Bieres. Phospholipide dagegen haben keinen Effekt auf die Schaumstabilität [Holleman et al, 1991]. Die wichtigsten

hochmolekularen freien Fettsäuren im Bier stammen aus dem Hefemetabolismus. Langkettige Fettsäuren, meist in Form von Triglyceriden, stammen aus dem Malz und kommen bekanntlich auch in Hopfen vor [Fly und Chicoye, 1977].

Die zerstörende Wirkung von Lipiden ist von ihrem physikalischen Zustand abhängig. Im Bier liegen die Lipide am Anfang frei in Form von Micellen vor, die im Schaum die Eigenschaft der Gasblasenwand verändern und so zum schnellen Schaumzerfall führen. Ein längerer Aufenthalt im Bier führt zur Verbindung der Lipide mit Polypeptiden, was zur Verringerung des schaumzerstörenden Effektes führt [Jackson, 1981; Hollemans et al, 1991].

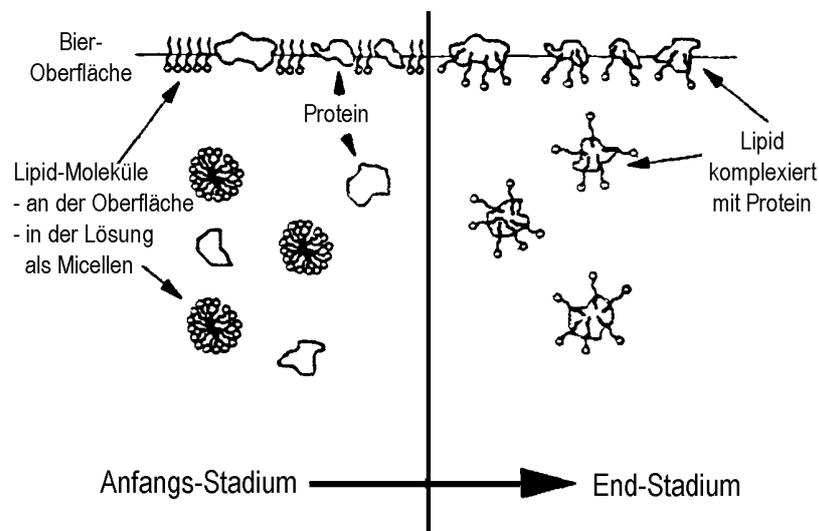


Abb. 2-8: Ein Modell der Lipid-Protein-Bindung [Roberts et al. 1978]

d) Schwermetalle

Durch Schwermetallsalze kann eine Steigerung der Schaumhaltbarkeit erreicht werden. Dies ist auf eine Vergrößerung der Kolloidteilchen in der interlamellaren Flüssigkeit zurückzuführen, die bis zu einer Gelierung oder Ausflockung führen kann [Kamm, 1966].

Ein Zusatz von Schwermetallspuren wie Eisen, Kobalt und Nickel zum Bier bringt verbesserte Schaumfraktionen, zurückzuführen auf Komplexbildung dieser Metallionen mit den Bitterstoffen und Eiweiß-Molekülen [Kleber und Hums, 1975].

e) Glykoproteine

Geladene Polysaccharide erhöhen die Schaumhaltbarkeit mehr als die Viskosität, die durch ihre polymere Struktur verursacht wird. Dies ist wahrscheinlich auf ihre Wechselwirkung mit Polypeptiden an der Oberfläche zurückzuführen, so dass ein Protein-Polysaccharid-Komplex

an der Oberfläche entsteht und den Schaum stabilisiert. Die Funktion eines derartigen Komplexes ist mit der von im Bier vorhandenen Glykoproteinen vergleichbar.

Abb. 2-9 zeigt, wie Glykoproteine im Schaum vorliegen. Das Protein ist mit dem hydrophoben Teil an die Gasoberfläche gebunden, während der hydrophile Teil der flüssigen Phase zugewandt ist. Das Polysaccharid, in Abb. 2-9 verzweigt dargestellt, bleibt in der flüssigen Phase.

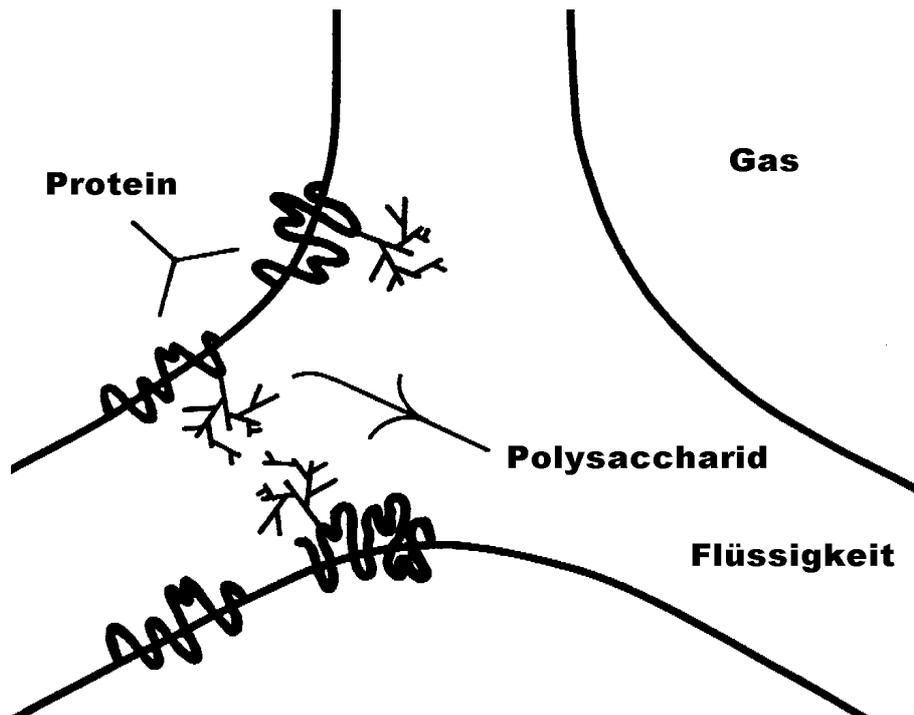


Abb. 2-9: Effekt des Protein-Polysaccharid-Komplexes in der Gasblasenwand auf die Schaumstabilität

Während die Polypeptide sich an die Oberfläche der Gasblase heften, verbleiben die Polysaccharide, da sie polar sind, in der Flüssigkeit in den Zwischenräumen der Gasblasen, die dadurch verengt werden. Die eingeschlossene Flüssigkeit muss beim Zurückfließen (Drainage) aufgrund der Schwerkraft diesen erhöhten Widerstand erst überwinden. Der Schaum wird dadurch haltbarer. Ein anderer Effekt der Polysaccharide ist, dass sie, da sie sich auf der Blasenoberfläche befinden, die Ablösung des oberflächenaktiven Materials von der Gaswand in die flüssige Phase verhindern. Diese Wirkung ist unabhängig von der Länge und Struktur der Polypeptide und Polysaccharide. Es muss aber die Oberflächenaktivität der Polypeptidhälfte groß genug sein, dass sie in den Blasenfilm gelangen und dort auch verbleiben können. Auch muss der Polysaccharidrest lang genug sein, um den Rückfluss der

Flüssigkeit zu verzögern. Jedes oberflächenaktive Molekül, gebunden an ein Polysaccharid, kann den gleichen Effekt erzielen. Der Fettsäureester eines Dextrins zu Stabilisierung von Bierschaum (patentiert) dringt in die Gasoberfläche ein, während der übrige Dextrinrest in der flüssigen Phase bleibt [Roberts, 1977].

f) Ethanol:

Alkoholfreie Biere schäumen weniger als Originalbiere. Ein Zusatz von 1 % Ethanol hebt diesen Unterschied auf. Die optimale Schaumbildung im Bier liegt bei einem Alkoholgehalt von 3-5 %. Höhere Alkoholkonzentrationen wirken sich nachteilig auf die Schaumqualität aus (s. Tab. 2-2). Die Schaumqualität ist umso höher, je höher der „Lacing Index“ ist [Bamforth, 1989]. Ethanol reduziert die Oberflächenaktivität, erniedrigt die Löslichkeit von Kohlendioxid und hat direkten Einfluss auf die Konformation der Polypeptide und auf ihre Wechselwirkung mit anderen oberflächenaktiven Substanzen im Bier.

Tab. 2-2: Einfluss von Ethanol auf den Lacing Index [Bamforth, 1989]:

Probe	Lacing Index	Probe	Lacing Index
Originalbier	3,7	AB + 3 % Ethanol	3,6
Alkoholfreies Bier (AB)	1,8	AB + 5 % Ethanol	3,2
AB + 1 % Ethanol	3,6	AB + 10 % Ethanol	1,5

g) Gasart:

Reiner CO₂-Schaum ist nicht so haltbar wie Luftschäum. Der Grund dafür liegt in der besseren Löslichkeit von Kohlendioxid in der interlamellaren Flüssigkeit. Daher ist man bestrebt, beim Zapfen von Bier auch Luft in den Schaum zu bekommen.

Biere, die Stickstoffgas enthalten, geben einen Schaum mit viel kleineren Gasblasen, die nicht nur den Schaum weißer erscheinen lassen, sondern auch seine Lebenszeit erhöhen. Kleinere Gasblasen steigen viel langsamer hoch, was die Chance für oberflächenaktive Moleküle, an ihrer Wand zu haften, erhöht [Bamforth, 1989].

Allgemein sagt man, je feiner ein Bierschaum sei, desto besser schmecke das Bier. Sensorische Untersuchungen von Bier, das einmal mit einem Verteiler (Gasspender) ausgeschenkt wurde, der feinen Schaum lieferte und ein anderes Mal ohne Verteiler, also mit

groben Schaum, haben gezeigt, dass das Bier mit grobem Schaum kohlen säurearm, schwach bitter, sehr mild und fade schmeckte. Dagegen wurde beim Bier mit dem feinen Schaum der Kohlen säuregehalt als optimal empfunden und sein Aroma als ausgewogen beurteilt. Der CO₂-Gehalt beeinflusst somit die Intensität der Bittere im Bier. So bekam ein Bier einen bittereren Geschmack, als man den CO₂-Gehalt erhöht hat, ohne den Gehalt an Bitterstoffen zu erhöhen [Ono und Hashimito, 1983].

h) Kolloidteilchen:

Bei kältetrüben Bieren ist oftmals eine Verbesserung der Schaumeigenschaften zu verzeichnen. Diese Erscheinung lässt sich mit dem Auftreten dreiphasiger Schäume erklären. Durch Einlagerung von festen Teilchen in die Filmhäutchen des Schaumes wird eine besondere Festigkeit erreicht.

Für die Beständigkeit des Bierschaumes sind Kolloide mit einer mittleren Teilchengröße in großem Maße beteiligt. Man hat sogar präzisiert, dass die Kolloide ein Molekulargewicht von über 15000 haben müssen, wenn eine schaumstabilisierende Wirkung erzielt werden soll [Kamm, 1966].

2.2.2 Antioxidantien aus Rosmarin

Rosmarin (*Rosmarinus officinalis* L., Familie *Lamiaceae*) ist ein im Mittelmeergebiet beheimateter, bis zu 2 m hoher, verholzender, immergrüner Strauch. Die Blätter sind 2 – 2,5 cm lang und breitnadelförmig. Die obere Seite der Blätter ist dunkelgrün, die untere Seite weißlich. Die Blüten der Rosmarinpflanze sind klein und blau. Die Pflanze enthält 5 % Eiweiß und ca. 0,5 % Stärke [Joul, 1993].

Der angenehme, aber durchdringende kampferartige Geruch der Blätter beruht auf ihrem Gehalt (1-2 %) an etherischem Öl. Seine Hauptbestandteile sind 1,8-Cineol, D-(+)-Campher, α-Pinen, Camphen, Borneol und Bornylacetat. Wegen des belebenden Aromas wird Rosmarin nicht nur zum Würzen vom Speisen, v.a. Fleisch- und Fischspeisen, verwendet, sondern auch in der Likör-, Seifen- und Kosmetikindustrie. Im Mittelalter wurde die Pflanze v.a. zu medizinischen Zwecken verwendet. Heute wird sie u.a. bei rheumatischen Erkrankungen als Heilbäderzusatz eingesetzt [Franke, 1989].

Die Rosmarinpflanze gewinnt durch ihre antioxidative Wirkung immer mehr an Bedeutung, weil der Verbraucher heutzutage bewusst immer mehr auf Lebensmittel mit synthetischen Zusatzstoffen verzichtet. Die Verwendung der bis jetzt weit verbreiteten synthetischen Antioxidantien Butylhydroxyanisol (BHA) und Butylhydroxytoluol (BHT) ist, trotz ihrer hohen Stabilität und niedrigen Kosten, eingeschränkt worden. Diesen Verbindungen wird eine krebserregende Wirkung zugeschrieben [Aruoma et al., 1992; Chen et al., 1992].

Antioxidantien sind bereits in kleinen Konzentrationen wirksam. Als Radikalfänger schützen sie oxidierbare Substanzen, wie Lipide mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, und verhindern oder verzögern die Autoxidation.

Zahlreiche Arbeiten beschreiben die antioxidative Kraft von Rosmarin und Salbei [Brieskorn et al., 1964; Collins und Charles, 1987; Cuvelier et al., 1994; Gonzales et al., 1987; Luis et al., 1994; Wenkert et al., 1964] . Beide Pflanzen enthalten phenolische Komponenten, die in drei Klassen eingeteilt werden [Cuvelier et al., 1996]:

- 1) Phenolische Säuren: Vanillin-, Kaffee-, Ferula- und Rosmarinsäure
- 2) Diterpene: Carnosol, Carnosolsäure, Carnosolsäuremethylester, Rosmanol, Epirosmanol, 7-me-Epiisorosmanol (s. Abb. 2-10).
- 3) Flavonoide: Hesperetin-, Apigenin-, Genkwanin-, Cirsimaritin- sowie andere Flavonoidglykoside

Die Flavonoide kommen hauptsächlich als Flavonoidglykoside in Rosmarin vor. Ihre antioxidative Wirkung wurde in der hydrophilen Fraktion von Rosmarin untersucht [Okamura und Haraguchi, 1994]. Rosmarinsäure ist neben ihrer antioxidativen vor allem wegen ihrer antibakteriellen Wirkung von großer Bedeutung [Cuvelier et al., 1996; Takenaka et al., 1997].

Die Diterpene haben gemeinsam Feruginol als Grundstruktur (tricyclische Diterpene). Schon in den 50er Jahren wurde die antioxidative Wirkung von Rosmarin nachgewiesen. Brieskorn [Brieskorn et al. 1964 und 1969] untersuchte erstmals die antioxidative Wirkung von Carnosolsäure und klärte ihre Struktur auf. Ihr antioxidatives Prinzip beruht auf der

Brenzkatechinstruktur des aromatischen Ringes mit einer o-ständigen elektronenliefernden Isopropylgruppe. So führt eine Derivatisierung an C₁₂ zum Verlust der antioxidativen Wirkung, wie bei 12-Methoxy-Carnosolsäure, wo die Hydroxylgruppe durch eine Methoxygruppe ersetzt wird [Reichheimer et al., 1996]. Brieskorn hat die antioxidative Wirkung der Carnosolsäure auf Linolsäure und deren Methylester untersucht. Beide wurden durch Zusatz von Carnosolsäure vor Autoxidation geschützt.

Carnosolsäure hat die höchste antioxidative Kraft aller Verbindungen im Rosmarin [Cuvelier et al. 1996]. Die Wirkung der Antioxidantien in Rosmarin ist allerdings vom Medium abhängig. Da Antioxidantien am häufigsten zum Schutz der Lipide eingesetzt werden, liegen zahlreiche Arbeiten darüber vor [Aruoma et al. 1992; Brieskorn und Dömling 1969; Cuvelier, 1996 und 1994; Frankel und Huang 1996; Hopia et al., 1996; Reichheimer et al., 1996; Schwarz und Ternes, III, 1992]. Es gibt aber auch Arbeiten, die die Wirkung der Antioxidantien, v.a. Carnosolsäure in Nicht-Lipidsystemen gegenüber Lipidsystemen untersuchten. In Nicht-Lipid-Systemen ist Carnosolsäure 10 mal effektiver als Carnosol [Aruoma et al. 1992]. Auch wurde die Wirkung der Antioxidantien in pflanzlichem Öl im Vergleich zu einer Öl / Wasser-Emulsion untersucht. Während im Öl die Carnosolsäure, Rosmarinsäure und α -Tocopherol aktiver als Carnosol waren, waren Carnosolsäure, Carnosol und α -Tocopherol in der Öl / Wasser-Emulsion aktiver als Rosmarinsäure. In der Öl / Wasser-Emulsion waren die Komponenten allerdings insgesamt weniger aktiv als im Medium Öl [Frankel et al., 1996]. Ebenso hängt die antioxidative Wirkung der Carnosolsäure vom pH-Wert des Mediums ab (Carnosol und Carnosolsäure in Öl / Wasser-Emulsion bei einer Pufferung auf pH 4 und pH 5 aktiver als bei pH 7 [Frankel et al., 1996]). Das beruht auf der Stabilität beider Verbindungen im sauren Milieu. Beim gemeinsamen Vorkommen mit α -Tocopherol in Samenölen übt die Carnosolsäure einen synergistischen Effekt auf α -Tocopherol aus und erhöht damit ihre antioxidative Kraft [Hopia et al., 1996]. Die Wirkung von Carnosolsäure ist natürlich auch konzentrationsabhängig [Brieskorn und Dömling, 1969]. Die antioxidative Kraft reiner Carnosolsäure wurde mit Butylhydroxytoluol (BHT), Butylhydroxyanisol (BHA) und Butylhydrochinon (TBHQ) verglichen [Reichheimer et al., 1996]. Sie war etwas niedriger als die von TBHQ, aber mehrfach höher als bei BHT und BHA.

Schon 1969 hat Brieskorn die Carnosolsäure als wichtigstes Antioxidans von Rosmarin betrachtet [Brieskorn und Dömling, 1969]. Bei den anderen Diterpenen handelt es sich um

Abbauprodukte der Carnosolsäure. So wurde die Carnosolsäure durch eine Luftoxidation zu Carnosol umgewandelt [Okamura und Fujimoto, 1994]. Die γ -Lactone Rosmanol, Epirosmanol und 7-Methylepirosmanol sind wiederum Abbauprodukte von Carnosol [Okamura und Fujimoto, 1994; Reichheimer et al., 1996; Schwarz und Ternes, II, 1992]. Schwarz [Schwarz und Ternes, II, 1992] erwähnt, dass 7-Methylrosmanol und 7-Methylepirosmanol aus Carnosolsäure beim Erhitzen mit Methanol entstehen. Ebenso zeigt Schwarz, dass die Carnosolsäure bis 110 °C hitzestabil ist. Erst beim Erhitzen auf höhere Temperaturen erfolgt ein drastischer Abbau der Säure. Carnosolsäure ist somit die Hauptverbindung für phenolische Diterpene mit δ - oder γ -Lacton- Struktur.

Carnosolsäuremethylester wurde erstmalig von Cuvelier [Cuvelier et al., 1994] als eine der Hauptkomponenten der Antioxidantienfraktion in Salbei und einigen Rosmarinextrakten nachgewiesen. Diese Verbindung kann sowohl ein Abbauprodukt der Carnosolsäure sein, da in einer methanolischen Lösung der Carnosolsäure, über ein paar Tage verfolgt, eine Abnahme der Carnosolsäure und u.a. eine Zunahme von Carnosol und Carnosolsäuremethylester beobachtet wurde. Carnosolsäuremethylester ist antioxidativ wirksam und könnte nicht nur ein Methylierungsprodukt von Carnosolsäure sein, sondern bereits originär als Inhaltsstoff in der Pflanze vorliegen [Cuvelier, 1994]. Doch zur Zeit liegen keine ausreichenden Untersuchungen darüber vor. Bei dieser Arbeit steht die Anreicherung der Carnosolsäure im Schaum im Mittelpunkt des Interesses.

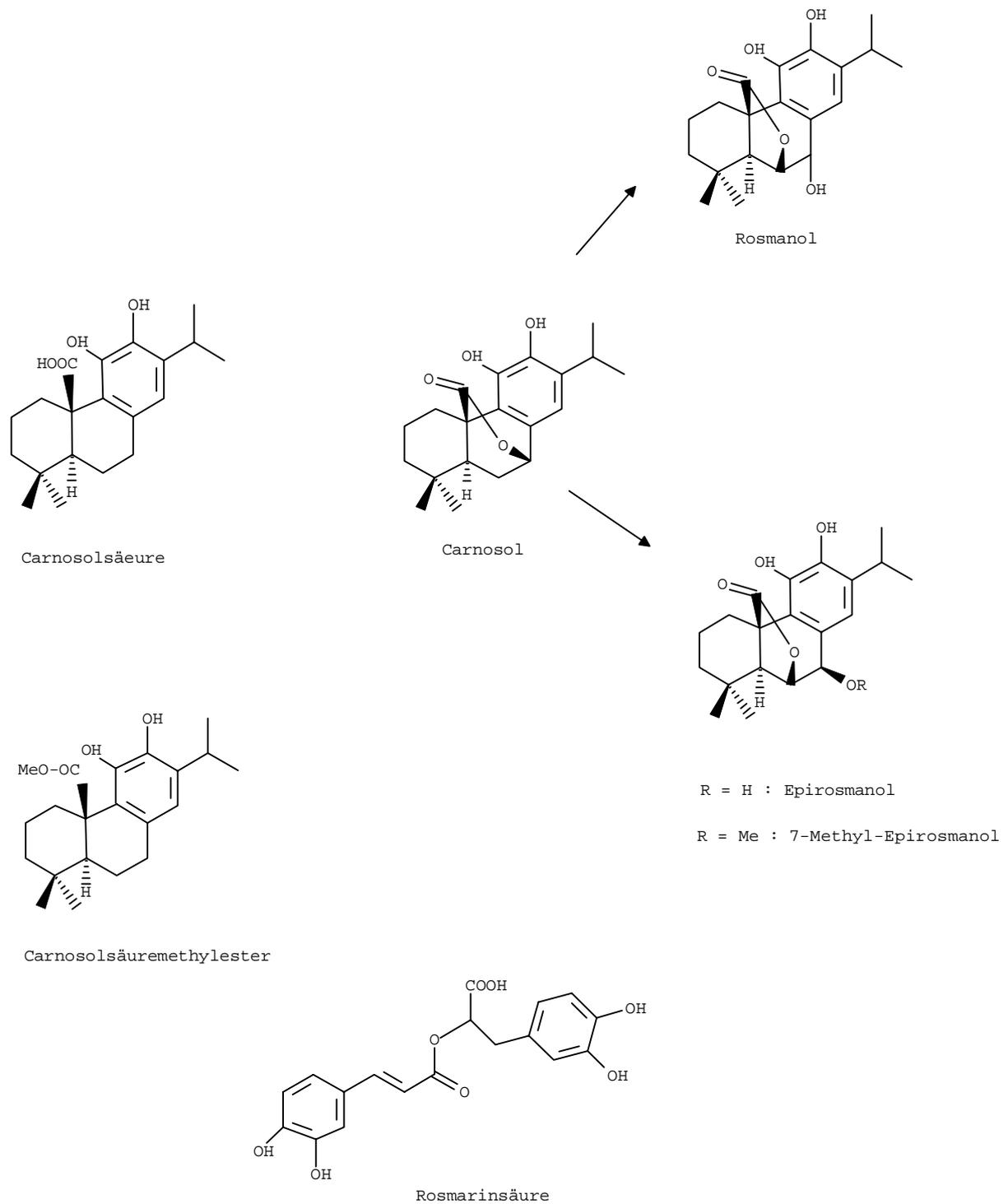


Abb. 2-10: Die chemischen Strukturen von Carnosolsäure mit ihren Abbauprodukten, sowie die von Carnosolsäuremethylester und Rosmarinsäure.

2.2.3 Scharfstoffe aus Ingwer

Ingwer (*Zingiber officinale* ROSC.) ist das Rhizom der aus Südasien stammenden Kulturpflanze. Die bis 2 m hoch werdende Staude gehört zur Familie *Zingiberaceae*. Ingwer gelangt ungeschält als schwarzer, teilweise oder ganz geschälter als sogenannter „weißer Ingwer“ in den Handel. Geschälter Ingwer wird oft gebleicht und zum Schutz gegen Insektenbefall gekalkt [Franke, 1989]. Die Droge enthält 1,5 bis 4 % etherisches Öl mit, je nach Herkunft, stark wechselnder Zusammensetzung. Hauptbestandteile von Ingweröl können (-)-Zingiberen und α -Curcumen, β -Bisabolen und α -Curcumen, α -Farnesen, Neral und Geranial sein. Hauptgeruchskomponente ist Zingiberol, ein Gemisch aus cis- und trans- β -Eudesmol [Teuscher, 1997].

Für den scharfen Geschmack von Ingwer sind die nichtflüchtigen Gingerole verantwortlich. Ihre Biogenese erfolgt aus einem Phenylacryloyl-CoA-Molekül als Starter, je einem Molekül Malonyl-CoA und Phenylacrylsäure unter Eliminierung von 2 Molekülen CO₂. Zu den Hauptkomponenten der Scharfstoffe zählen [6]-Gingerol, [8]-Gingerol und [10]-Gingerol ([n] = Zahl der C-Atome der an der Biogenese beteiligten Fettsäure; bei der Retroaldolspaltung werden Aldehyde mit entsprechender Kettenlänge abgespalten). Gingerole werden u. a. von den homologen Shogaolen (5-Desoxy-4,5-dehydro-Gingerole, bes. [6]-, [8]- und [10]-Shogaol), Gingerdiolen (3-Desoxy-3,5-dihydroxy-gingerole) und von zahlreichen Diarylheptanoiden begleitet [Teuscher, 1997].

Der Gehalt an [6]-Shogaol, welches in Ingwer originär nicht enthalten ist und durch Dehydratisierung aus [6]-Gingerol hervorgeht, dient als wichtiger Parameter zur Beurteilung der Qualität des Gewürzes. Der Gehalt an [6]-Shogaol ist umso niedriger, je sorgfältiger das Erntegut verarbeitet wurde. Shogaole werden erst bei thermischer Belastung bzw. in saurem Milieu aus Gingerolen gemäß Abb. 2-11 gebildet und sind somit ein Indikator für unsachgemäße Rohstoffbehandlung im Verlauf der Trocknung und Lagerung (z. B. hohe Gehalte an [6]-Shogaol) [Lawrence, 1984; Govindarajan, 1982].

Weitere Inhaltsstoffe des grünen, frischen Ingwers sind Wasser (80,9 %), Protein (2,3 %), Fett (0,9 %), Kohlenhydrate (12,3 %), Rohfaser (2,4 %) und Mineralstoffe (1,2 %). Getrockneter Ingwer besitzt einen Endwassergehalt von 8-12 % [Govindarajan, 1982].

Ingwer wird als Gewürz, besonders in Süßwaren, beim Einwecken von Birnen, beim Einlegen von Kürbis oder Gurken, verwendet. Ingwerextrakte werden auch zur Herstellung von alkoholischen Getränken genutzt (z. B. Ingwer-Bier = Ginger-Ale, Ingwerlikör) [Franke,

1989]. Ingwer wird aber nicht nur als Gewürz eingesetzt, sondern besitzt auch wertvolle physiologische Eigenschaften. So wird das Ingwerrhizom bei dyspeptischen Beschwerden und zur Verhütung der Symptome der Reisekrankheit angewendet. Auch bei Appetitlosigkeit und dem sogenannten ROEMHELD-Syndrom wird die Droge eingesetzt. Die Scharfstoffe und das etherische Öl regen Speichel- und Magensaftsekretion sowie die Darmperistaltik an. Das Ingwerrhizom besitzt auch cardiotonische und antihepatotoxische Wirksamkeit. Gingerole und Shogaole haben, wie eine Reihe anderer Phenylpropanderivate mit Allylseitenkette, antemetische Wirksamkeit. Den Gingerolen werden außerdem blutverdünnende und herzstärkende Eigenschaften zugeschrieben [Teuscher, 1997].

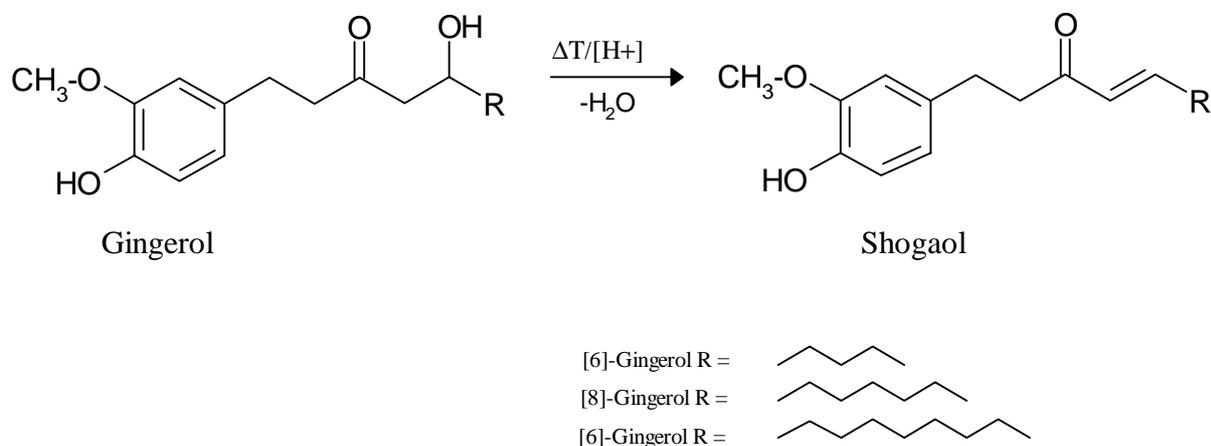


Abb. 2-11: Umwandlung von Gingerol in Shogaol [Lawrence, 1984; Govindarajan, 1982]

2.2.4 Curcuminoiden aus Kurkuma

Kurkuma allgemein

Kurkuma (*Curcuma longa* L., Familie *Zingiberaceae*), auch Gelbwurz genannt, ist das gebrühte und anschließend getrocknete Rhizom der echten Kurkuma „*Curcuma domestica*“, einer in Südasien und besonders in Indien kultivierten Staude [Franke, 1989].

Kurkuma liefert mit ihrem stärkereichen Rhizom ein Gewürz, dessen auffallend gelbe Farbe auf das Curcumin zurückzuführen ist. Die Wurzel enthält neben 2-5 % Curcumin auch geringe Mengen an Demethoxycurcumin, und Bisdemethoxycurcumin. Neben den Curcuminoiden enthält sie 3 bis 7 % etherisches Öl, das hauptsächlich aus Turmeron und α -Turmeron besteht (60-70 %). Weitere Bestandteile des Kurkumaöls sind Zingiberen, β -

Atlanton, Curlon, ∞ -Phellandren, Cineol, Sabinen, Borneol und ein C₁₅-Alkohol. Der Geruch von Kurkuma wird als ingwerartig und angenehm aromatisch bezeichnet; der Geschmack wird beschrieben von „leicht bitter über erdig-bitter bis hin zu brennend-würzig“ [Falbe und Regitz, 1990].

Die weiteren Bestandteile der Kurkuma variieren je nach Literaturangaben: Wasser 6-9 %, Stärke 50-64 %, Protein 6,5-9,7 %, Rohfaser 3-6,5 %, Asche 4,5-8 % und Fett 3,5-10 % [Govindarajan, 1980; Lewis, 1984; Siewek, 1990].

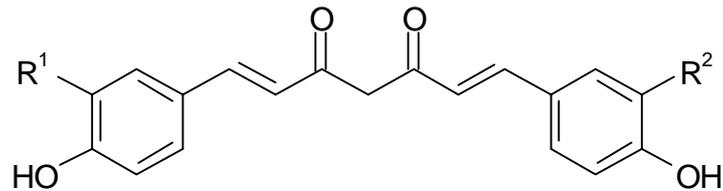
Curcuminoide

Die Curcuminoide kommen in *Zingiberaceae*-Gewächsen vor und gehören zu der Gruppe der Diarylheptanoide. Auch ihre Biogenese erfolgt aus einem Phenylacryloyl-CoA-Molekül als Starter, einem Molekül Malonyl-CoA und Phenylacrylsäure unter Elimination von 2 Molekülen CO₂ [Teuscher, 1997]. Ihre chemischen Strukturen sind in Abb. 2-12 dargestellt. Curcumin (C₂₁H₂₀O₆, MG 368,39) wurde identifiziert als [1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion]. Curcumin ist kristallin und von hellorange-gelber Farbe (Schmelzpunkt 183°, löslich in Alkohol und Eisessig, unlöslich in Wasser und Ether). Die Farbe von CurcumaLösung ist nicht konstant, sondern pH-abhängig. So löst sich Curcumin in alkalischer Lösung mit rotbrauner und in saurer Lösung mit hellgelber Farbe, der Umschlagspunkt liegt im Bereich von pH 8-9. Mit Kurkuma-Extrakt getränktes Fließpapier wird deshalb zum Nachweis von Alkalien benutzt. Mit Kurkuma-Papier kann auch ein Nachweis auf Borate geführt werden, da diese zusammen mit Oxalsäure in alkalischer Lösung eine grünschwarze Färbung verursachen [Franke, 1989; Falbe und Regitz; 1990]. Die ersten Abbauprodukte des Curcumins bei pH >7 sind Ferulasäure und Feruoylmethan [Tennesen und Karlsen, 1985].

Curcumin wird als Lebensmittelfarbstoff bei Curry, Senf, Gebäck, Käse, Likören, Limonaden und Ölen eingesetzt. Aber auch in Holz, Lack, Papier, Salben, Wachs etc. wird es verwendet. Früher diente es auch als Textilfarbstoff, ist jedoch wegen mangelnder Stabilität und der oben beschriebenen Braunfärbung in alkalischer Lösung (tritt beim Waschen auf) nicht mehr in Gebrauch [Franke, 1989, Teuscher, 1997].

Aus Kurkuma wird Curcumin folgenderweise gewonnen: Das Rhizom wird gekocht und getrocknet, die Rinde abgerieben und der verbliebene Zentralzylinder gemahlen. Das im Mehl enthaltene Pigment wird durch Wasserdampfdestillation kristallin gewonnen [Franke, 1989].

Bei der Gewinnung von Curcuminoiden kommen immer noch organische Lösungsmittel wie Hexan oder Methanol zum Einsatz. Eine andere Methode der Gewinnung ist die Auswaschung der Curcuminide mittels einer Seifenlösung, welche einen wasserlöslichen Extrakt liefert. Eine Nachbehandlung mit Essigsäure fällt die Curcuminoiden aus [Stansky, 1979].



	<u>R¹</u>	<u>R²</u>
Curcumin	-OCH ₃	-OCH ₃
Demethoxycurcumin	-OCH ₃	-H
Bisdemethoxycurcum	-H	-H

Abb. 2-12: Chemische Strukturen von Curcuminoiden

Turmerone

Turmerone sind schwerflüchtige Sesquiterpenketone (s. Abb. 2-13) und für das typische Aroma vom Kurkuma verantwortlich. Sie machen den Hauptbestandteil des etherischen Öls in Kurkuma aus (60-79 %). Aus der Droge werden sie durch Wasserdampfdestillation gewonnen. Bei Sniffing-Analysen wurden den Turmeronen folgende Geruchseindrücke zugeordnet [Kehrer, 1996]:

ar-Turmeron:	Dumpf, curcuma- und curryartig
Turmeron:	Blumig, süß
Turmerol:	Curcuma-artig, harzig

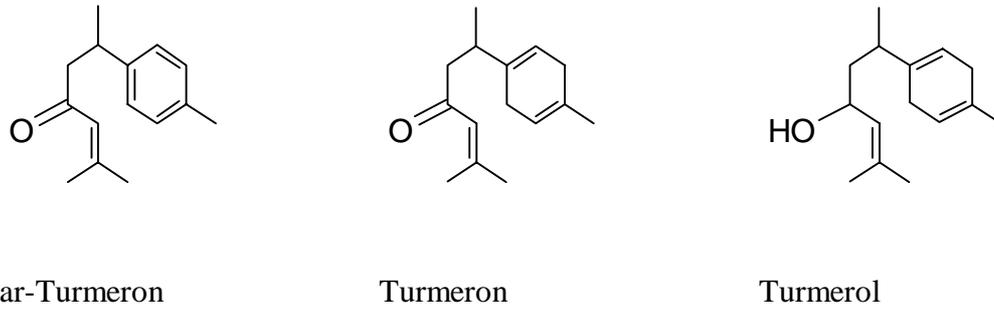


Abb. 2-13: Chemische Strukturen der Hauptkomponenten des Kurkumaöls

Pharmakologische Wirkung von Curcuminoiden und Turmeronen

Curcumin ist bekannt für seine antioxidative Wirkung, z.B. bei der Peroxidation von Lipiden. Seine anticarcinogene Wirkung basiert auf der Unterdrückung des Arachidonsäure-Metabolismus, dem Weg der Lipidperoxidation in lebenden Zellen. Diese Tatsache zeigt, dass Curcumin als Antioxidans sogar in lebenden Zellen wirkt. Vielen Herzkrankheiten und auch Krebserkrankungen wird die Peroxidation als mögliche Ursache zugeschrieben. Curcumin und seine verwandten Verbindungen können zum Schutz gegen solche Krankheiten Verwendung finden [Masuda et al., 1994]. Die Curcuminoiden besitzen als Hemmer der Cyclooxygenase und Lipoxygenase aber auch eine antibakterielle Wirkung, die der Acetylsalicylsäure vergleichbar ist [Teuscher, 1997]. Diese Wirkung gilt sowohl für Gram-negative (*St. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella aerogenes*, *B. coli*) als auch Gram-positive Bakterien (*Corynebacterium diphtheriae*). Kurkuma weist ausgesprochene Cholagoga-Eigenschaften auf (Anregung der Leberzelle zu vermehrter Sekretion von Gallensäuren) und besitzt somit eine verdauungsfördernde Wirkung [Falbe und Regitz, 1990].

Petroletherextrakte von Kurkuma zeigten eine insektizide Wirkung, die hauptsächlich auf ar-Turmeron und Turmeron zurückzuführen war. Aus Kurkuma und dessen Auszügen lassen sich vermutlich effektive und umweltschonende Pflanzenschutzmittel für Weizen, Reis und andere Getreidearten entwickeln [Su et al., 1989].

2.2.5 Glykoalkaloide aus Kartoffeln

Kartoffel

Die Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum* L.) stammt aus den Anden Südamerikas. Die krautige Pflanze trägt unterbrochen gefiederte Blätter und weiße oder violette Blüten in eigenartigen, durch Verwachsungen komplizierten Infloreszenzen. Die ungenießbaren, das Alkaloid Solanin enthaltenden, kirschgroßen Früchte sind Beeren mit zahlreichen Samen. Diese werden nur in der Züchtung verwendet, während die Vermehrung im Feldbau vegetativ durch Knollen erfolgt. Die Knollen speichern zu diesem Zweck Stärke.

Abgesehen von der Stärke als dem wichtigsten kalorienliefernden Inhaltsstoff ist die Kartoffel aufgrund ihres Proteingehaltes mit den essentiellen Aminosäuren sowie dem Vitamin-C-Gehalt ein wichtiges Nahrungsmittel für die Menschen. Außerdem werden erhebliche Anteile der Produktion in der Schweinemästerei verfüttert, zur Spiritfabrikation und zur Herstellung von reiner Stärke, Puddingpulver, Klebstoff, als Dickungsmittel, als Appreturmittel für Textilien und in der Papierfabrikation verwendet [Franke, 1989].

Glykoalkaloide und ihre pharmakologische Wirkung

Die in den Nachtschattengewächsen (Gattung *Solanaceae*) vorkommenden Alkaloide werden Solanum-Alkaloide genannt. Ihre Biogenese erfolgt aus Cholesterol. Sie besitzen einen Cholestangrundkörper, dessen Seitenkette mit einem N-Atom einen Heterocyclus bildet. Die wichtigsten Vertreter gehören zum Solanidan-Typ oder zum Spirosolan-Typ. Sie liegen mit wenigen Ausnahmen in den Pflanzen als Glycoside vor. Die Steroidalkaloide der Früchte (Tomate, Aubergine, Bittersüßer Nachtschatten, Schwarzer Nachtschatten) werden bei der Reife abgebaut. [Teuscher, 1997]. Bis jetzt wurden 20 strukturell verschiedene Alkaloide in Kartoffeln und Tomaten gefunden und etwa 300 in anderen Pflanzen der *Solanaceae*-Familie [Friedman und Deo; 1992, Schreiber, 1979].

In Kartoffeln machen α -Solanin und α -Chaconin etwa 95 % des Glykosidalkaloidgehaltes aus, wobei α -Chaconin meist höher konzentriert als α -Solanin vorliegt. Das Aglykon ist bei beiden Glykosiden das Steroid Solanidin. Während Solanin die Zucker Galactose, Rhamnose und Glucose enthält, sind im Chaconin zwei Rhamnose- und ein Glucosemolekül mit dem Aglykon verbunden. Die chemischen Strukturen von Solanin, α -Chaconin und α -Solanin sind in den Abb. 2-14 bis Abb. 2-16 dargestellt. Die Glykoalkaloide kommen besonders in unreifen Kartoffeln und in grün gewordenen, keimenden Kartoffelknollen vor, und zwar vor

allem in der Haut und in den Keimen. Kartoffeln mit über $14 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ sind bitter im Geschmack.

In der Kartoffel besitzen die Glykoalkaloide eine Schutzfunktion gegen den Befall durch bestimmte Schädlinge und Pilze, in der Knolle wird ihre Produktion durch Stressfaktoren wie z.B. Lichteinwirkung, Verletzungen oder Keimung angeregt.

Rohe Kartoffeln enthalten auf die ganze Knolle gerechnet ca. 0,009 % Solanin. Es bestehen aber erhebliche, genetisch bedingte Unterschiede bei den einzelnen Sorten. Die meisten Sorten enthalten zwischen $1,8$ und $9,4 \text{ mg Solanin} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Einzelne Sorten erreichen aber 10 - $13 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, gelegentlich sogar über $20 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ frischer Kartoffelknolle [Lindner, 1990].

Die Glykoalkaloide werden nach peroraler Aufnahme im Magen-Darm-Trakt teilweise hydrolysiert. Bei gesunder Darmschleimhaut werden sie nur schlecht resorbiert. Erst bei relativ hohen Dosen kommt es durch Schädigung der Darmschleimhaut zur Resorption größerer Alkaloidmengen [Teuscher, 1997]. Die toxische Dosis bei Menschen beträgt 25 mg , die tödliche Dosis über 400 mg [Lindner, 1990].

Die Wirkung der Steroidalkaloidglykoside erklärt sich größtenteils aus den saponinähnlichen Eigenschaften. Sie schädigen die Membranen menschlicher Zellen und wirken dadurch u.a. reizend auf die Haut und die Schleimhäute sowie nach Resorption cytolytisch. Bei parenteraler Gabe tritt Hämolyse auf. Auch Blutungen im Magen-Darm-Trakt und in der Netzhaut des Auges können auftreten. Die Glykoalkaloide hemmen auch die Cholinesterase. Am Herzen wirken sie positiv inotrop, am ZNS zunächst erregend, dann lähmend. Bei Ratten ruft Solanin mit 5 - $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p. eine Hyperglykämie hervor, die durch Glucosefütterung verstärkt wird. In Tierversuchen wurden teratogene und embryotoxische Effekte hoher Alkaloiddosen gefunden. Die Glykoalkaloide haben auch bakteriostatische, antivirale und fungizide Eigenschaften. Es ist allerdings nicht ganz geklärt, ob nicht auch andere Faktoren

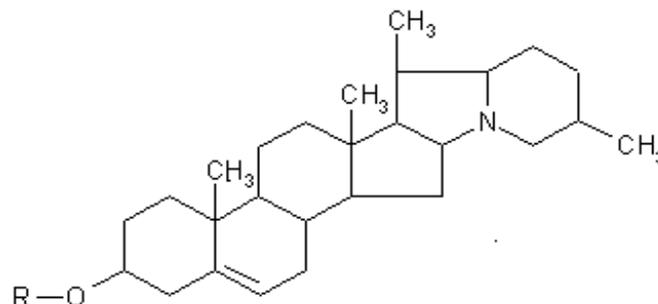


Abb. 2-14: Chemische Struktur von Solanidin ($R = H$)
in Chaconin und Solanin ($R = \text{Trisaccharid-Komponente}$)

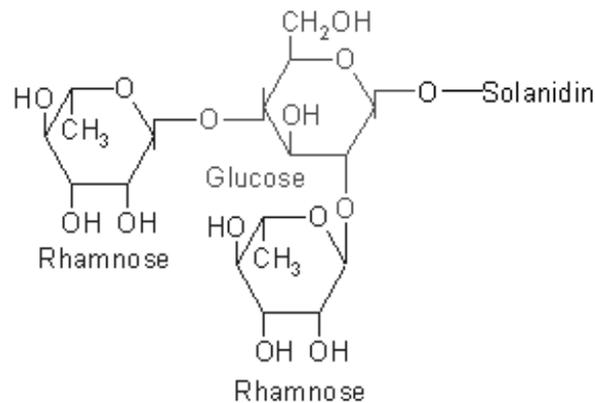


Abb. 2-15: Chemische Struktur von α -Chaconin

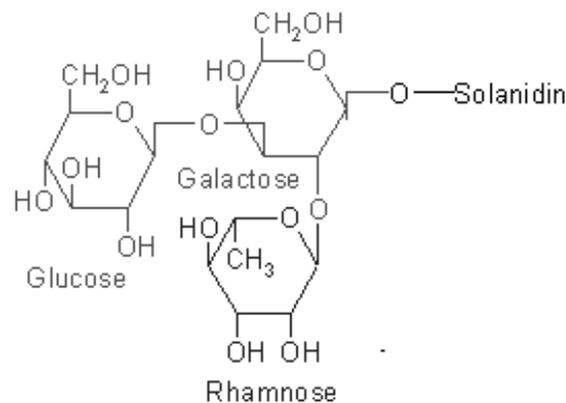


Abb. 2-16: Chemische Struktur von α -Solanin

bei der Toxizität der Glykoalkaloide mitwirken [Lindner, 1990, Teuscher, 1997, Morgan und Coxon, 1987]. Die Vergiftungserscheinungen äußern sich durch brennendes, kratzendes Gefühl im Hals, Kopfschmerzen, Mattigkeit, Erbrechen, Leibschmerzen und Durchfälle. In schweren Fällen kommt es durch Gehirnodembildung zu Benommenheit bis hin zu Koma, Krämpfen und Exitus. Vor allem Kleinkinder können an der Vergiftung sterben [Lindner, 1990].

Die Solanine sind stabil und werden beim Kochen, Backen oder in der Mikrowelle nicht inaktiviert. Erst beim Frittieren bei 170 °C tritt ein Teilabbau auf. Die Solanine sind auch beim Tiefgefrieren stabil [Bushway und Ponnampalam, 1981].

Auch die Tomate enthält ein Solanumalkaloid. Das Aglykon wird Tomatidin genannt. Die mit Zucker verbundene, in der Pflanze gebildete Form ist das Tomatin. Während die grünen Pflanzenteile und auch grüne Früchte beträchtliche Mengen enthalten, weist die reife Tomate nur noch wenig Tomatin auf. [Lindner, 1990].

Von [Friedman, 1993] wurden die Bedingungen für die Hydrolyse den Carbohydratanteil in α -Solanin und α -Chaconin untersucht. Aus jedem dieser zwei Triglykoside können zwei Diglykoside, ein Monoglykosid, die sogenannten β 1-, β 2-, und γ -Chaconine und -Solanine und das Aglykon Solanidin entstehen. Die Kartoffelpflanze enthält bekanntlich Enzyme, die die Hydrolyse von α -Solanin und α -Chaconin katalysieren. Die Hydrolyseprodukte können auch während der Verdauung entstehen. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Struktur der Glykoalkaloide und ihrer Wirkung. So nimmt die Embryotoxizität der Glykoalkaloide mit Abnahme der Anzahl der Zuckerbausteine ab. Beide Glykoalkaloide, α -Solanin und α -Chaconin, haben eine relativ ähnliche Wirkungsstärke, aber eine höhere als ihre β -Formen, und diese wiederum haben eine stärkere Wirkung als die γ -Form. Solanidin, das keine Zuckereinheit enthält, ist am wenigsten embryotoxisch [Friedman et al., 1993].

2.2.6 Flavokavine und Kavapyrone aus Kava-Kava

Kava-Kava-Pflanze

Die Kava-Kava-Pflanze (*Piper methysticum* G. FORST., Familie *Piperaceae*), auch Rauschpfeffer genannt, ist eine Heilpflanze, die für die Arzneimittelforschung von Bedeutung ist. Die Pflanze ist ein 2 bis 4 m hoher steriler, vegetativ vermehrter Strauch mit großen Blättern, der zahlreiche kleine Blüten in ährenähnlichen Blütenständen treibt. Der Rauschpfeffer wird auf den Inseln Melanesiens und Polynesiens kultiviert, insbesondere auf Hawaii. In den Anbaugebieten verwendet man die Droge zur Herstellung eines in geringen Mengen anregend wirkenden, in größeren Mengen schmerzlindernden, entspannenden und schlafbereitenden Trankes [Teuscher, 1997; Kretzschmar, 1995]. Der Ausgangsstoff für die Droge sind die mächtigen, 2 bis 10 kg schweren, verästelten, sehr saftigen Wurzelstöcke. Diese tragen über mehr als 5 fingerdicke, sich nach unten verjüngende, lange, außen graue, faserig brechende Wurzeln [Hänsel, 1993]. Die Droge riecht schwach aromatisch und eigenartig erdig. Sie schmeckt bitter, etwas seifenartig, kratzend; beim Kauen einer Probe kommt es zu einer länger anhaltenden Anästhesie der Zunge sowie zu erhöhtem Speichelfluss [Hänsel, 1993]. Weitere Bezeichnungen für Kava-Kava: Ava, Awa, Kava, Kawa oder Yangona [Madaus, 1976]. Die Kava-Wurzel enthält bekanntlich 43 % Stärke, 20 % Rohfaser, 12 % Wasser, 3,2 % Zucker, 3,6 % Proteine, 3,2 % Mineralstoffe und 3-20 % Kavalactone. Die Wurzel enthält außerdem Flavokavin A und B sowie in sehr geringen Mengen Sitosterol, Stigmastendion und Oxaporphinalkaloid (Cepharadion A) [Lopez-Avila und Benedicto, 1997; Hänsel, 1996]. Weiterhin sind geringe Mengen etherischer Öle sowie verschiedene organische

Säuren enthalten, wie z.B. Oxo-n-nonansäure, Phenylelessigsäure, p-Methoxyphenylelessigsäure, Zimtsäure und deren Derivate [Hänsel, 1993 und 1996].

Kavapyrone

Die pharmakologisch aktiven Komponenten der Wurzel Droge und damit die Wertstoffe sind die sogenannten Kavapyrone. Es handelt sich dabei um substituierte sechsgliedrige Lactone. Diese lassen sich, je nachdem ob der Lactonring ein oder zwei Doppelbindungen enthält, in die Gruppe der Enolidpyrone (Typus Kavain und Methysticin) und Dienolidpyrone (Typus Yangonin) unterteilen. Alle Kavalactone enthalten eine β -ständige Methoxygruppe im Lactonring. Eine weitere Variationsmöglichkeit ist dadurch gegeben, dass der Lactonring entweder mit einem Phenylethylrest (Einfachbindung) oder mit einem Styrylrest (Doppelbindung) substituiert (s. Abb. 2-17). Die Kavapyrone stellen in Wasser sehr schwer lösliche, in Lipoidlösungsmitteln leicht lösliche, kristalline Substanzen dar [Hänsel, 1961]. Die Inhaltsstoffe des Kava-Kava-Wurzelstockes sind chemisch eng verwandt und neigen zur Mischkristallbildung. Sie sind daher nur mit hohem Aufwand rein darzustellen.

Der Totalgehalt an Kavapyronen schwankt je nach Unterart und Standort der Pflanze und beträgt mindestens 3,5 % (berechnet als Kavain). Bis heute wurden 18 verschiedene Kavalactone identifiziert. Zur Herstellung pharmazeutisch eingesetzter Trockenextrakte werden Stengel, Wurzeln und Rhizome verwendet. Die Wurzeln enthalten bis 12 %, Rhizome und Stängel bis 6 % Kavalactone. Hauptbestandteile sind Kavain (1-2 %), Dihydrokavain (0,6-1 %), Methysticin (1,2-2 %), Dihydromethysticin (0,5-0,8 %), Yangonin (1,0 %) und Desmethoxyyangonin (1,0 %) (s. Abb. 2-18).

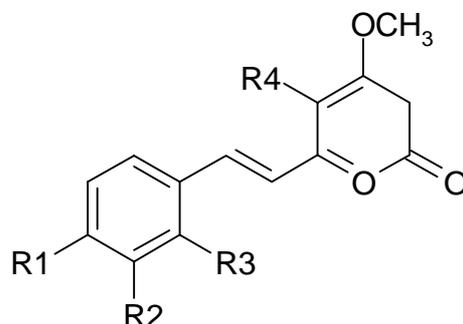
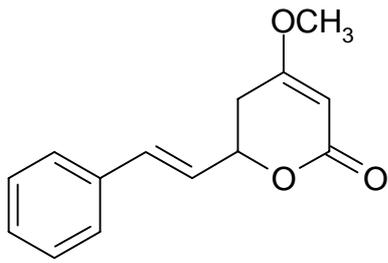
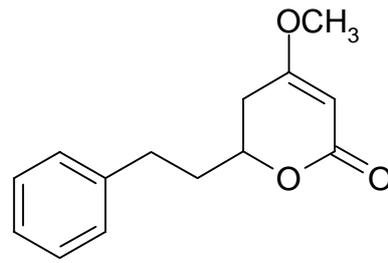


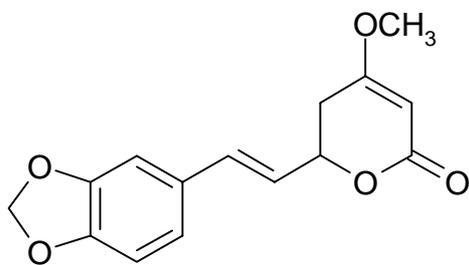
Abb. 2-17: Kavapyron-Grundstruktur



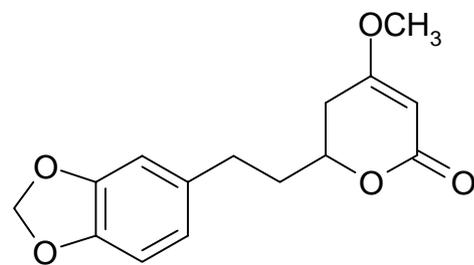
Kavain (K)



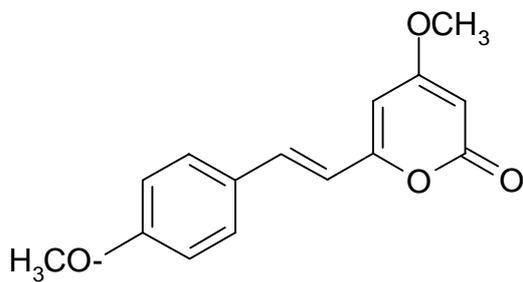
Dihydrokavain (DHK)



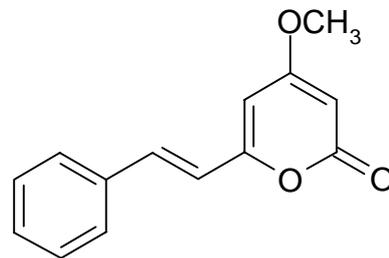
Methysticin (M)



Dihydromethysticin (DHM)



Yangonin (Y)



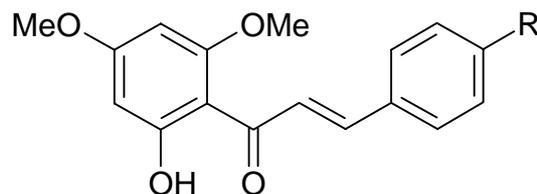
Desmethoxyyangonin (DMY)

Abb. 2-18: Die wichtigsten Kavapyrone [Schwabe, 1996]

2.3 Flavokavine:

Die Flavokavine (A, B und C) sind gelbe Pigmente und zählen zu den unerwünschten Komponenten der Wurzel Droge. Pharmakologisch sind die Flavokavine weitgehend inerte Substanzen. Sie verursachen bei länger dauernder Einnahme der Droge Gelbfärbung der Haut und Hautanhangsgebilde [Hänsel, 1993, 1989 und 1961; He et al., 1997; Schulz und Hänsel, 1996; Schulgin, 1975]. Die Gelbfärbung ist reversibel und verschwindet nach Absetzen des Medikamentes wieder vollständig. Die Hautverfärbung ist für die Betroffenen aufgrund der optischen Auffälligkeit gegenüber Mitmenschen jedoch äußerst unangenehm. Allerdings trat bei einem Präparat der Firma Schwabe (Karlsruhe), bei dem die Flavokavinkonzentration sehr stark abgesenkt wurde, diese Nebenwirkung nicht mehr auf [Schwabe, 1996].

Flavokavin A und B sind leicht löslich in Chloroform, n-Hexan und Benzol, schwerer in Methanol und Ethanol, unlöslich in Wasser [Hänsel, 1961]. Ihre chemische Struktur ist in Abb. 2-19 dargestellt.



Flavokavin A: R = OCH₃

Flavokavin B: R = H

Flavokavin C: R = OH

Abb. 2-19: Flavokavin-Grundstruktur

Wirkung und therapeutische Verwendung

Kava-Präparate besitzen psychotrope Wirkung. Sie werden unter anderem zur Therapie bei folgenden Beschwerden verwendet:

Antriebsarmut, Konzentrations- und Leistungsschwäche, Angst- und Spannungszustände, Schlafstörungen, Hyperthyreose und Neurodermatitis. Die Kava-Präparate sind eine „pflanzliche Alternative“ zu synthetischen Anxiolytika und Tranquilizern, also insbesondere zu den Benzodiazepinen.

Die Kavalactone passieren die Blut-Hirn-Schranke und wirken in niedrigen Dosen (unter 10 mg Kavalactone pro Tag (d)) zentral stimulierend und in höheren Dosen (ab 30 mg*d⁻¹) Wohlbehagen und Zufriedenheit auslösend. Ängste schwinden bis zur Sorglosigkeit, ohne aber die Willenskraft zu schwächen oder das Bewusstsein einzuengen. Sehr hohe Dosen führen zur Störung der Bewegungsabläufe bei ungetrübtem Bewusstsein, später zu Müdigkeit und Schlafneigung. Die Wirkung erfolgt vermutlich durch Erhöhung der Dichte der GABA-Rezeptoren (GABA = γ -Aminobutylsäure) im ZNS. Ebenso können Lähmungserscheinungen und Gleichgewichtsstörungen auftreten [Teuscher, 1997].

Zubereitung des Kava-Trankes bzw. -Extraktes

Die älteste bekannte Zubereitungsmethode der Droge ist wohl die Herstellung des Kava-Trankes durch die Südseeinsulaner. Hierbei werden Wurzelstücke zerkaut und in eine Schale gespuckt oder zermahlen, mit Wasser vermischt, abfiltriert und getrunken. Die Polynesier bereiten außerdem mit Wasser und Kokosmilch einen Kaltauszug zu, der entspannend und beruhigend wirkt, ohne dabei das Bewusstsein einzuengen.

Zur Gewinnung pharmazeutisch nutzbarer Extrakte wird die Droge entweder mit Ethanol/Wasser (Extrakte mit etwa 30 % Kavapyronen) oder mit Aceton/Wasser (Extrakte mit ca. 70 % Kavalactonen) extrahiert. Für die Flavokavine (A und B) gilt ein Grenzwert von maximal 0,5 %.

Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung von Trockenextrakt durch Extraktion mit Dichlormethan. Die Ausbeute beträgt 6 % einer öligen Masse, das sogenannte Kava-Resin.

2.2.7 Carotinoide

Carotinoide sind Polyen-Kohlenwasserstoffe, die aus acht Isopreneinheiten aufgebaut sind und deshalb 40 C-Atome enthalten. Carotinoide sind Farbstoffe, die vielen Pflanzen und Lebensmitteln eine intensive gelbe, orange oder rote Färbung verleihen. Sie werden ausschließlich von Pflanzen synthetisiert, gelangen aber über das Futter auch in tierisches Gewebe. Zur Zeit sind uns mehr als 560 Carotinoide bekannt. Im Jahre 1831 gelang Wachenroder erstmals eine Isolierung von β -Carotin aus der Karotte. Ullstädter ermittelte 1907 die Bruttoformel und Karrer um 1930 die Konstitutionsformel [Vesper, 1996].

Von der Grundstruktur der Carotinoide lassen sich die verschiedenen Carotinoide durch Hydrierung, Dehydrierung und / oder Cyclisierung ableiten. Es gibt zwei Hauptgruppen, in

die die Carotinoide eingeordnet werden: Carotine und Xanthophylle. Carotine entstehen durch fortschreitende Dehydrierung von Lycopin welches vor allem in Tomaten vorkommt und ihnen den roten Farbton verleiht. Lycopin hat krebshemmende Eigenschaften. Xanthophylle enthalten am Ende des Tetraterpensystems in der Regel eine oder mehrere Hydroxyl- und/oder Ketogruppen, welche mit der ungesättigten Kette in Konjugation stehen können. Außerdem gibt es noch Xanthophylle mit Epoxyverbindungen sowie Carbonsäuren und Estern. Meist treten in der Natur komplex zusammengesetzte Carotinoidgemische auf. In Orangen kommen z. B. mehr als 50 verschiedene Verbindungen vor. Die wichtigsten sind Luteoxanthin, Phytoen, Auroxanthin, Violaxanthin, Mutatoxanthin, Antheraxanthin, ζ -Carotin, Cryptoxanthin und Zeaxanthin. Die Hydroxycarotinoide liegen häufig verestert mit Fettsäuren vor, z. B. enthalten Mandarinen- und Orangensaft 3-Hydroxy- β -Carotin (Cryptoxanthin) verestert mit Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure [Belitz und Grosch, 1994; Biacs und Daood, 1994; Philip et al., 1989; Lin und Chen, 1995]. α -Carotin, β -Carotin und β -Cryptoxanthin besitzen eine Provitamin A-Aktivität. β -Carotin ist Hauptcarotin der Karotte. Carotinoide sind in apolaren Lösungsmitteln gut und in Wasser nicht löslich. Um Carotine zu extrahieren, verwendet man Petrolether, Ether oder Benzol, und für die Xanthophylle verwendet man Ethanol und Aceton. Zur analytischen Bestimmung von Carotinoiden sind die Elektronenanregungsspektren von großem Interesse. Im Spektrum des Carotinoids finden sich drei Maxima, deren Wellenlängen von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen abhängig sind. Carotinoide absorbieren nicht nur im sichtbaren Bereich (bis ca. 530 nm), sondern, abhängig von ihrer Struktur, auch im UV-Bereich von 300- 380 nm. In Abb. 2-20 sind die chemischen Strukturen der wichtigsten Carotinoide dargestellt [Belitz und Grosch, 1994].

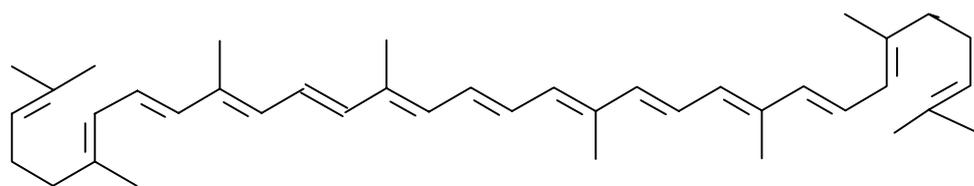
Hauptcarotinoide einiger Pflanzen:

Karotten (*Daucus carota* ssp. *sauivus*)

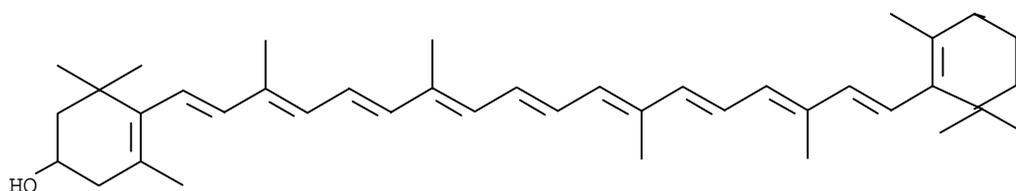
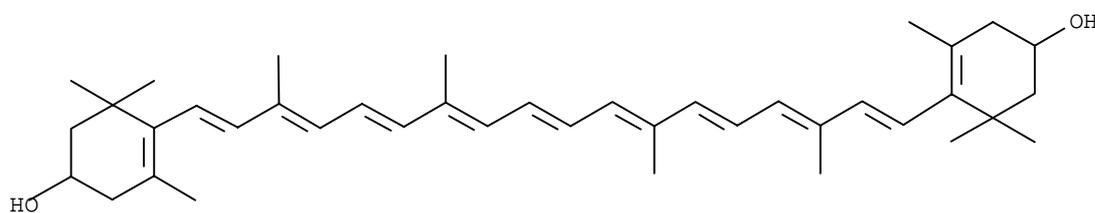
Hauptcarotinoide des Karottensaftes sind α -Carotin, β -Carotin und Lutein

Orangen (*Citrus sinensis*)

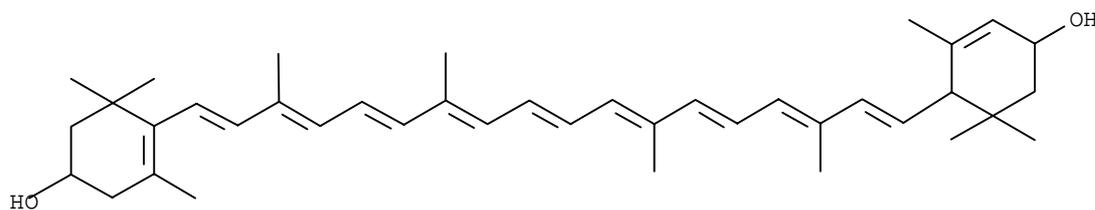
Hauptcarotinoide des Orangensaftes sind die Xanthophylle Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, Antheraxanthin und β -Cryptoxanthin, die zur gelborangen Farbe des Orangensaftes beitragen sowie α -Carotin und β -Carotin. Neben den freien Carotinoiden liegt ein Teil davon in veresteter Form (hauptsächlich als Palmitate) vor.



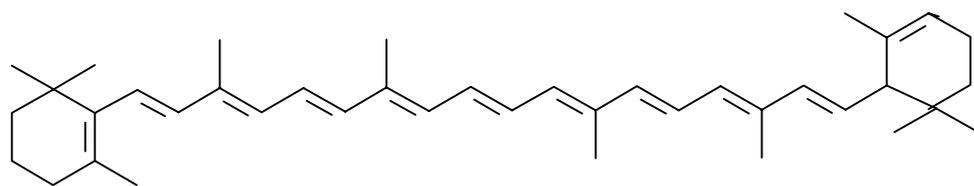
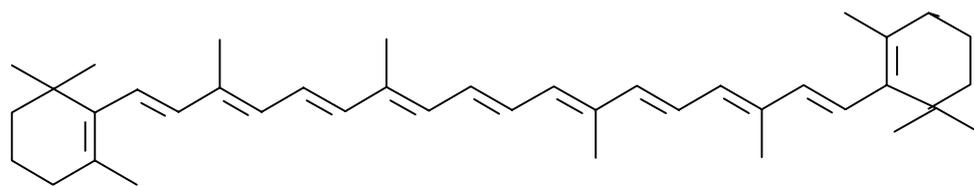
Lycopin

 β -Cryptoxanthin

Zeaxanthin



Lutein

 α -Carotin β -Carotin**Abb. 2-20:** Die wichtigsten Carotinoide

Mandarine (*Citrus deliciosa*)

Hauptcarotinoide des Mandarinensaftes sind die Xanthophylle Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, β -Cryptoxanthin, sowie α -Carotin und β -Carotin. Die typische dunkelorange Farbe des Mandarinensaftes wird von β -Cryptoxanthin und β -Carotin verursacht. Die Carotinoide liegen in Mandarinensaft hauptsächlich in veresterter Form vor (als Laurate und Myristate).

Tomaten (*L. lycopersicum*)

Die Hauptcarotinoide des Tomatensaftes sind Lycopin, β -Carotin und Lutein

Safran

Safran sind getrocknete aromatisch riechende Blütennarben der in Südeuropa verbreiteten Safranpflanze (*Crocus sativus* Iridaceae). Sie ist eine alte Gewürz- und Färbepflanze, deren Namen sich von arabisch „zafaran“ = Gelbsein ableitet. Safran enthält den gelben Farbstoff **Crocin** und den Bitterstoff Picrocrocin (Safranbitter), ein Glycosid des Dehydrocitral. Hauptaromastoffe sind Safranal (ca. 60 %) und 4-Hydroxy-2,6,6-Trimethyl-1-Cyclohexencarbaldehyd neben einer Reihe weiterer Trimethylcyclohexen-Derivate, die wahrscheinlich durch Hydrolyse aus Picrocrocin hervorgehen.

Im Safranfarbstoff **Crocin** [(Gardenin), braunrote Nadeln] sind die beiden Carboxylgruppen des Crocetin (s.u.) mit dem Disaccharid Gentiobiose verknüpft. Crocin ist deshalb in Wasser löslich. Crocin ist wenig löslich in Ethanol, Ether und auch organischen Lösemitteln. Der Gehalt an Crocin in Safran beträgt ca. 24-27 %. Crocin ist als Lebensmittelfarbstoff in der BRD nicht zugelassen.

Crocetin ist somit das Aglykon des Glycosids Crocin. Das Apocarotinoid ist löslich in Pyridin und anderen organischen Basen. Es wirkt photosensibilisierend, erhöht die Sauerstoffdiffusion im Plasma und beeinflusst die Bilirubin-Bildung. Es hat sich im Tierversuch als arteriosklerotisch wirksam erwiesen.

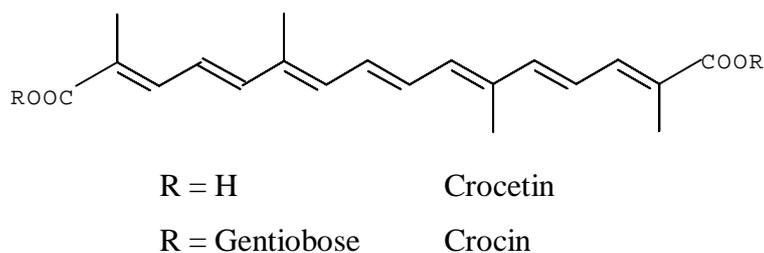


Abb. 2-21: Die chemische Struktur von Crocetin und Crocin

2.2.8 Orangenaroma

Der charakteristische Geruch der Orangen wird nicht durch eine einzelne Verbindung geprägt, vielmehr ist daran ein komplexes Gemisch ähnlich strukturierter Stoffwechselprodukte beteiligt, das der Terpenbiosynthese entstammt und sekundäre Metabolite höherer ungesättigter Fettsäuren enthält.

Limonen ist als gemeinsames Merkmal aller Agrumenöle anzusehen und prägt den sensorischen Grundcharakter aller Agrumenöle genauso wie die geradzahligen Fettaldehyde zwischen C₈ und C₁₂. Den wichtigsten sensorischen Beitrag unter den Aldehyden liefern Octanal und Decanal. Citral kommt im Gemisch seiner Stereoisomeren Geranial und Neral vor. Nootkaton verleiht Orangen neben der typischen Aromanote auch den bitteren Geschmack. Sein niedriger Geruchsschwellenwert von 1 ppb verleiht dem bicyclischen Sesquiterpenketon selbst in Konzentrationen unter 0,001 % einen hohen Aromawert.

Die Sinensale kommen ebenso wie die endständigen Aldehyde, die einen hohen Aromawert wegen ihrer enormen Geruchsstärke haben, vor. α -Sinensal weist einen niedrigen Geruchsschwellenwert von 0,05 ppb auf und prägt so den Apfelsinencharakter mit. Valencen, das wichtigste Sesquiterpen, unterscheidet Orangen- von Grapefruitaroma. Die wichtigsten Alkohole in Orangenölen sind α -Terpineol, Terpinen-4-ol und Linalool, die in überhöhter Konzentration allerdings zu einem Fehlromaeeindruck beitragen. α -Terpineol, das durch säurekatalysierte Hydratation oder mikrobiologische Transformation von Limonen entsteht, tritt relativ schnell als Alterungskomponente im Orangensaft auf. Kurzkettige Fettsäureester (Ethylhexanoat, Ethylbutanoat) geben dem Orangenaroma einen fruchtigen Grundton.

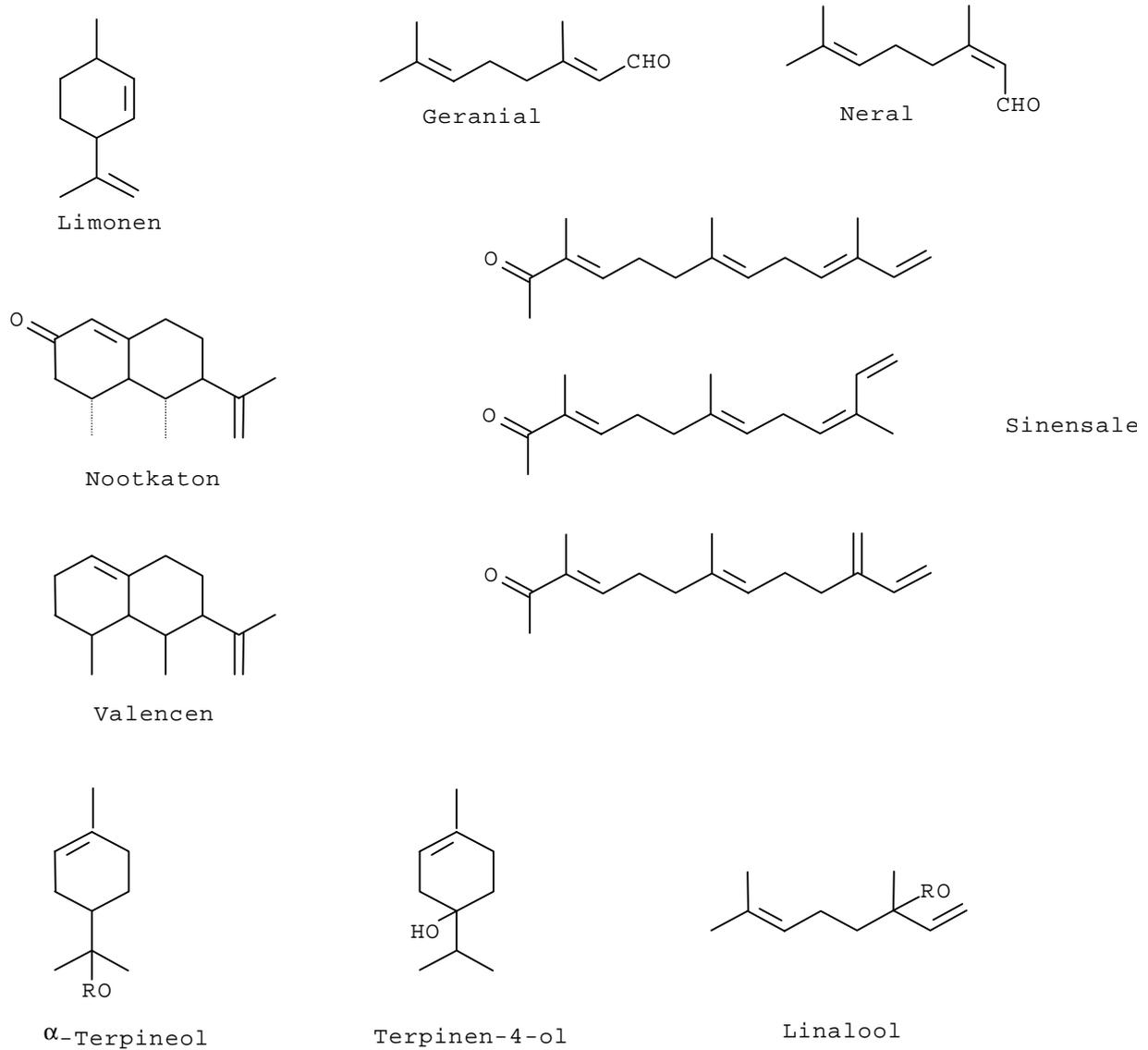


Abb. 2-22: Die wichtigsten Orangenaromastoffe

2.2.9 Einige polare Substanzgruppen

a) Sesamol aus Sesam

Sesamol, das in Sesamöl vorkommt, zählt zu den natürlichen Antioxidantien und entsteht durch Hydrolyse aus Sesamolin. Sesamol wird aus den Samen (Ölgehalt 50-55 %) der vermutlich ältesten Ölpflanze *Sesamun indicum* (Familie *Pedaliaceae*) gewonnen.

Sesamol reagiert mit Furfural und Salzsäure zu einem roten Farbstoff. Diese Reaktion wurde früher als Indikatorreaktion auf Margarine verwendet, die durch gesetzliche Regelung unter Mitverwendung von Sesamöl hergestellt werden musste [Baltes, 1992].

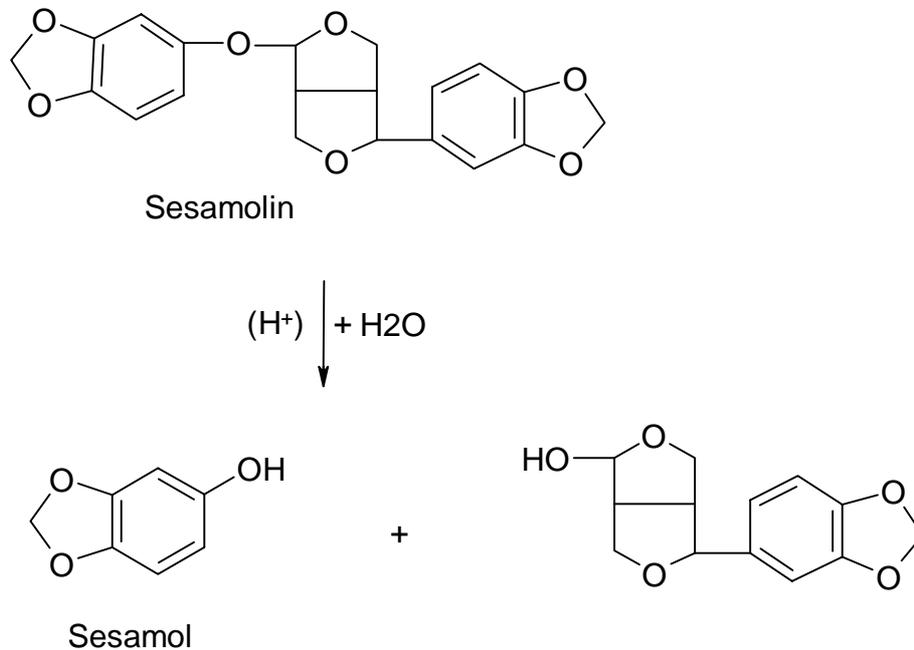


Abb. 2-23: Entstehung von Sesamol bei der Hydrolyse von Sesamolin
[Eisenbrand et al., 1995]

b) Anthocyane aus Rotwein

Anthocyane sind wichtige Pflanzenfarbstoffe (blau, rot, violett) und kommen vor allem in Obst vor. In der Weintraube kommen folgende Anthocyane und Anthocyanidine vor: Önin, Cyanin, Cyanidin, Pelargonin, Pelargonidin, Delphinidin und Malvidin. Allen diesen Verbindungen ist das Flavylium-System eigen, das ein Oxonium-Ion enthält. Meist liegen sie als Chloride vor und sind dann rot. Die Anthocyane sind mit heißem Wasser oder alkoholischer Salzsäure extrahierbar. Nach Laugenbehandlung nehmen sie blaue Farbtöne an. Alle Anthocyane sind in 3- oder 5-Stellung glykosidisch an Zucker gebunden. Als Beispiel ist die chemische Struktur von Pelargonidin und Anthocanidin Cyanin (Bis-monosaccharid-glykosid) in der Abb. 2-24 dargestellt.

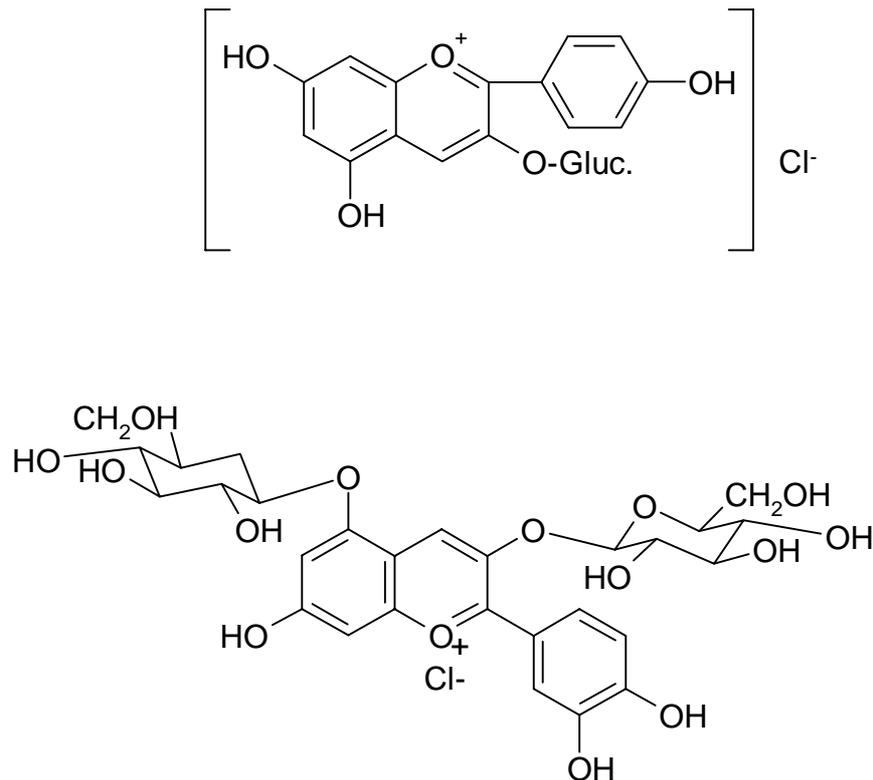


Abb. 2-24: Die Chemische Struktur von Pelargonidin (oben) und Cyanin (unten)
[Baltes, 1992]

c) Catechine aus grünem Tee

Grüner Tee

Bei grünem Tee unterbleibt im Gegensatz zum schwarzen Tee die Fermentierung. Die Blätter werden zunächst auf Matten über siedendem Wasser oder im eigenen Saft zur Inaktivierung der Oxidase gedämpft, wodurch die Oxidation der Gerbstoffe verhindert wird und das Chlorophyll erhalten bleibt. Anschließend bereitet man den Tee an der Sonne aus, rollt und trocknet ihn. 25-35 % der Trockenmasse von frischen jungen Teeblättern sind phenolische Verbindungen, 80 % davon Flavanole. Der Rest verteilt sich auf Proanthocyanidine, phenolische Säuren, Flavonole und Flavone. Während der Fermentation werden die Flavanole enzymatisch oxidiert.

Catechine:

Bei der Catechine handelt es sich um die Substanzgruppe 3-Hydroxyflavane. Sie sind kristalline Farbstoffen organischer Verbindungen, die als hydrierte Flavone od.

Anthocyanidine aufzufassen sind und als Zwischenstufen der Biosynthese anderer Flavonoide in vielen pflanzlichen Geweben zusammen mit weiteren Polyphenolen vorkommen. Sie bilden die Grundsubstanz einer Reihe natürlicher Gerbstoffe, z.B. im Tee und verschiedenen Obstarten [Eisenbrand und Schreier, 1995].

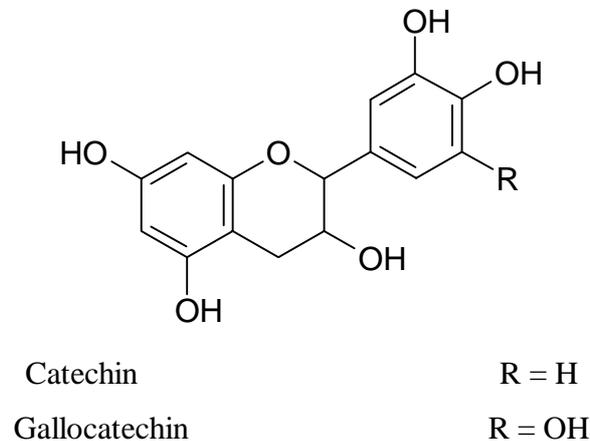


Abb. 2-25: Die Chemische Struktur von Catechin und Gallocatechin

d) Hesperidin und Naringin aus Orangen- und Grapefruitsaft

Naringin und Hesperidin sind glykosidische Verbindungen und kommen hauptsächlich in Citrusfrüchten vor. Ihre Aglykone, Naringenin und Hesperitin, gehören zu der Flavanone. Naringin ist ein Bitterstoff der Grapefruit und Hesperidin hat neutralen Geschmack und kommt in der Orange vor.

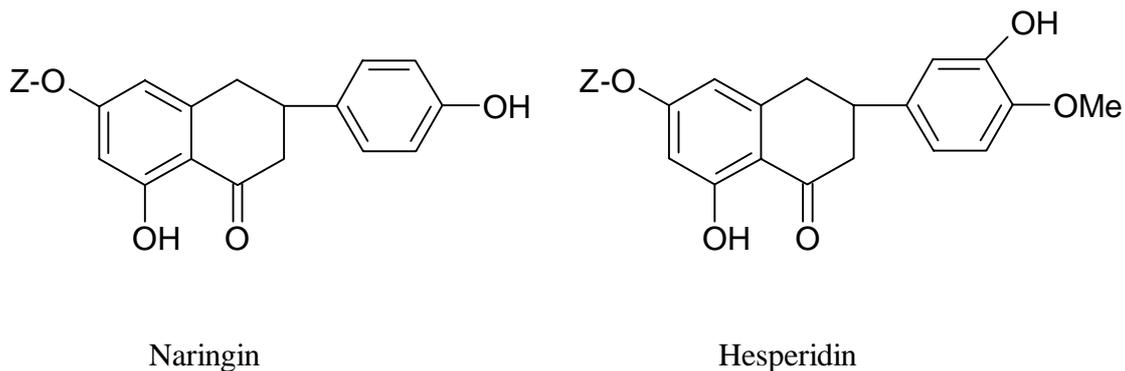
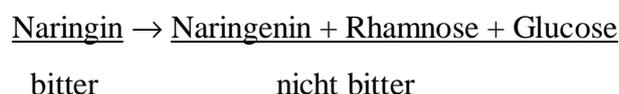


Abb. 2-26: Die chemische Struktur von Naringin und Hesperidin

Eine Entbitterung von Citrussäften und Citruspures ist durch enzymatische Abspaltung der Zuckerreste mit Hilfe von Naringinase (α -Rhamnosidase/ β -Glucosidase-Gemischen) möglich:



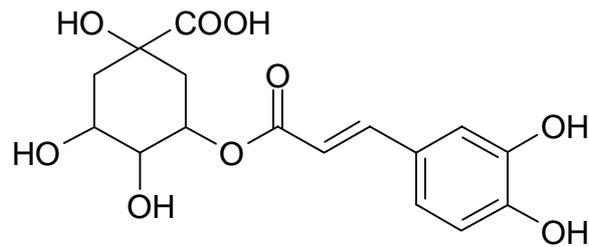


Abb. 2-28: Die chemische Struktur der Chlorogensäure

Tab. 2-3: Chlorogensäuren in Röstkaffee [Belitz, 1992]

Verbindung	Menge [%]
5-Caffeoylchinasäure (Chlorogensäure)	2,0
4- Caffeoylchinasäure (Kryptochlorogensäure)	0,2
3- Caffeoylchinasäure (Neochlorogensäure)	1,0
3,4-Dicaffeoylchinasäure (Isochlorogensäure a)	0,01
3,5-Dicaffeoylchinasäure (Isochlorogensäure b)	0,09
4,5-Dicaffeoylchinasäure (Isochlorogensäure c)	0,01

Coffein

Unter den Stickstoffsubstanzen am besten bekannt ist auf Grund seiner pharmakologischen Wirkungen das Coffein, 1,3,7-Trimethylxanthin. Es ist ein farb- und geruchloses, bitter schmeckendes Kristall (Schwellenwert in Wasser: $0,8-1,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), in Wasser und Chloroform gut, in Alkoholen mäßig löslich. Coffein ist ein zu den Purinen zählendes Alkaloid, es bildet mit Säuren in Wasser leichtlösliche Salze. Es schmilzt unter Druck bei $236,5 \text{ }^\circ\text{C}$ und sublimiert ab $178 \text{ }^\circ\text{C}$. Der Coffeingehalt des Rohkaffees liegt bei $0,8-2,5 \text{ } \%$ und kann bei der Sorte Robusta bis auf $4,0 \text{ } \%$ ansteigen. Coffein bildet teilweise einen hydrophoben π -Molekülkomplex mit Chlorogensäure im molaren Verhältnis 1:1. Im Kaffeegetränk liegen ca. $1 \text{ } \%$ des Coffeins und ca. $6 \text{ } \%$ der Chlorogensäure in dieser Form vor. Durch den Röstprozess verringert sich die Coffeinmenge nur geringfügig. Neben dem bei der Entcaffeinierung von Kaffee anfallenden Coffein wird in der Getränkeindustrie auch synthetisches Coffein verwendet, das durch Methylierung des aus Harnsäure und Formamid zugänglichen Xanthins erhalten wird. Coffein findet man außer im Kaffee auch in Tee, in Maté- oder Paraguay -Tee, in der Kolanuss, in der Kakao-Bohne sowie in Guarana-Paste.

Coffein wirkt erregend auf Großhirnrinde, Atem- und Kreislaufzentrum, bewirkt eine Erweiterung der Blutgefäße und Diurese (Harnausscheidung). Bei akuter Vergiftung (ab 300 mg aufwärts) treten Unruhe, zentrale Erregung, psych. Alterationen, Harndrang, Schlaflosigkeit, evtl. Herz- und Kreislaufkollaps auf. Die Letale Dosis für Menschen liegt bei etwa 10 g Coffein. Eine Tasse Kaffee enthält etwa 50-100 mg Coffein, eine Tasse schwarzen Tees etwa 20 mg und eine Tasse Kakao ca. 10 mg. In 100 ml Kolagetränk sind etwa 10-30 mg Coffein enthalten. Abb. 2-29 zeigt die Struktur von Coffein:

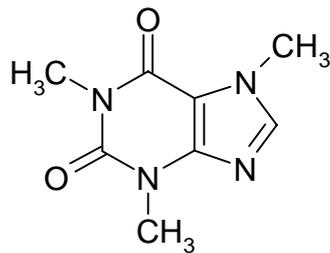


Abb. 2-29: Die chemische Struktur von Coffein (1, 3, 7-Trimethylxanthin)

Farbstoffe und Bitterstoffe

In der wasserlöslichen Fraktion von Röstkaffee kommen braunefärbte Verbindungen (Melanoidine) vor, die Molekulargewichte von 5000-10000 haben und aus der *Maillard*-Reaktion oder aus der Karamelisierung von Kohlenhydraten stammen. Über die Struktur dieser Pigmente ist noch wenig bekannt. Offensichtlich ist auch Chlorogensäure an solchen Bräunungsreaktionen beteiligt, da in alkalischen Hydrolysaten von Melanoidinen Kaffeesäure gefunden wurde.

Folgeprodukte der gemeinsamen Thermolyse von Kohlenhydraten und Proteinen sind wahrscheinlich auch maßgeblich am Bittergeschmack von Röstkaffee beteiligt (Röstbitterstoffe), wie Modellversuche mit Zucker-Aminosäure-Gemischen zeigen. Besonders intensiver Bittergeschmack tritt beim Erhitzen von Saccharose und Prolin auf.

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Aceton	p.a., Merck
Acetonitril	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck
Ameisensäure	f. d. Chromatographie, Merck
Ammoniumdihydrogensulfat	p.a., Merck, davon 20 mM Lösung
Carrez-I-Lösung	15 g $K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3 H_2O$ / 100 ml Wasser
Carrez-II-Lösung	30 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ / 100 ml Wasser
Citronensäure-Monohydrat	puriss. p.a., Fluka, davon 2M Lösung
Diammonium-Hydrogenphosphat	p.a., Merck, davon 20mM Lösung
Diammoniumoxalat-Monohydrat	p.a.; Merck, davon 25 mM Lösung
Dichlormethan	p.a.; Merck
Diethylether	reinst, Merck, über silberspiegelte Füllkörperkolonne dest.
Dimethylformamid (DMF)	f. d. Chromatographie, Merck
Eisessig	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck (0,1 u. 0,01 N Lösung)
Testkombination für Saccharose/D-Glucose/D-Fructose	Test Nr.716260, Boehringer
Ethanol	p.a.; Merck
Ethylacetat	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck
Ethylvanillin	p.a.; Merck
Extraktionskartusche	Sep-pack C18, f. d. Festphasenextraktion, Merck
Gase (He, Ar, N ₂ , CO ₂)	5.0 , Messer Griesheim GmbH
Glasfaserfilter	MN 85/70 BF (Ø 50mm), Macherey-Nagel
H ₃ PO ₄	o-Phosphorsäure 85 %, p. a., Riedel-de Haen (1 M u. 0,1 M Lösung)
HCl	p. a. , Baker (1 M und 3 M Lösung)
Heptan-1-Sulfonsäure-Na-Salz	f. d. Ionenpaarchromatographie, Merck
Hexan	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck

Isooctan	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck
Isopropanol	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck
Kaliumhexacyanoferrat	p. a.; Merck
Magnesiumoxid	p. a.; Merck
Membranfilter	0,45 µm Polypropylen-Kartusche, Ø 25mm, Whatman
Methanol	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck
Na ₂ SO ₄	wasserfrei, p.a.; Merck
NaCl	puriss p.a., Fluka
NaOH	p.a. Merck (0,1 und 0,25 M Lösung)
Natriumacetat.3 H ₂ O	p.a.; Merck
Natriumdihydrogenphosphat	p. a.; Merck
Natriumhydrogenphosphat	p. a.; Merck, davon 0,05 M Pufferlösung (pH 4,4)
Pentan	p. a.; Merck, über silberspiegelte Füllkörperkolonne dest.
Petrolether	(Siedepunkt 50- 70 °C), p. a.; Merck
Saponin	depur, Art. 4185.1; Carl Roth GmbH / Karlsruhe
Säulenmaterial	Lichrolut® RP-18 (40 - 63 µm); Merck (f. d. Säulenchromatographie von Carnosolsäure)
Saures Methanol	0,3 ml ortho-Phosphorsäure (85 %ig) / 1 l Methanol
Stärke	z. Analyse , Merck
Tetrahydrofuran (THF)	99,9 %, wasserfrei; Aldrich
Tetraethylammonium- hydroxid (TEAH)	wässrige Lösung , Sigma (20 %ig, w/w)
Toluol	f. d. Flüssigkeitschromatographie, Merck
Wasser	bidest. und ultrarein (Anlage Milli-Q 185 Plus, Millipore)
Zinksulfat	p.a.; Merck

3.1.2 Analytische Standards

- **Hopfenbitterstoffe**

Co-, n- + Ad-Humulone und Co-, n- + Ad-Lupulone

Ein Hopfen-Eichextrakt (Hopfen-HD-Extrakt mit der Bezeichnung ICE) mit definiertem Gehalt an α - und β -Säuren. Firma: Versuchsstation Schweizerischer Brauereien, Engimattstr. 11, CH-8059 Zürich 2, Schweiz. Zusammensetzung: Co-Humulon 17,9 %, n- + Ad-Humulon 41,49 %, Co-Lupulon 9,66 %, n- + Ad-Lupulon 8,46 %

Standardlösung:

0,5 g Extrakt ICE in 30 ml saurem Methanol ca. 30 min im Ultraschallbad homogenisieren und anschließend mit saurem Methanol auf 100 ml auffüllen und gut durchmischen. Zur HPLC/UV-Analyse wurde die Stammlösung 5-fach verdünnt.

Iso- α -Säuren (Co-, n- + Ad-Isohumulone)

Dicyclohexylamin(DCHA)-Iso- α -Säuren-Komplex: enthält 66,5 % Iso- α -Säuren. Firma: Versuchsstation Schweizerischer Brauereien, Engimattstr. 11, CH-8059 Zürich 2, Schweiz. Zusammensetzung: Co-Isohumulon 20,66 %, n-Isohumulon 41,04 %, n- + Ad-Isohumulon 4,78 %

Standardlösung:

0,05 g DCHA-Iso- α -Säuren-Komplex in 100 ml saurem Methanol lösen und zur HPLC/UV-Analyse diese Stammlösung 5-fach verdünnen.

- **Carnosolsäure**

Carnosolsäure wurde in reiner, gelber kristalliner Form freundlicherweise durch Frau Dr. K. Schwarz, Universität Hannover, zur Verfügung gestellt.

Carnosolsäure-Standardlösung:

2 mg Carnosolsäure wurden in 10 ml saurem Methanol gelöst (Stammlösung). Für die HPLC/ELCD-Bestimmung wurde die Stammlösung 50-fach verdünnt.

- **Rosmarinsäure**

Standardlösung:

Firma Carl Roth GmbH / Karlsruhe, Atr. A558.1

2 mg Rosmarinsäure wurden in 10 ml Wasser gelöst. Für die HPLC/ELCD-Bestimmung wurde die Stammlösung 50-fach verdünnt.

- **Gingerole**

Gingerole und Shogaole sind nicht im Handel erhältlich. Sie wurden im Rahmen einer Diplomarbeit [Vesper, 1995] aus Ingwer isoliert und für die Zerschäumung eingesetzt.

Die Isolate enthielten [6]-Gingerol als Hauptkomponente, [8]- und [10]-Gingerol als Nebenkomponten und / oder [6]-Shogaol in methanolischer Lösung.

- **Ethylvanillin**

Ethylvanillin wurde als externer Standard zur Quantifizierung von Gingerolen / Shogaolen unter Verwendung von Korrekturfaktoren eingesetzt.

Standardlösung:

15 mg Ethylvanillin in 100 ml Elutionsmittel A (Acetonitril : Wasser : Essigsäure 50 : 50 : 1) lösen.

- **Curcumin**

Techn., enthält neben Curcumin auch Demethoxy- und Bisdemethoxy-Curcumin. Firma: Aldrich

Standardlösungen:

1 g Curcumin wird in 1 l MeOH gelöst. Durch Verdünnung wurden Lösungen mit 100, 10, 1 und 0,1 mg*1⁻¹ Curcumin hergestellt.

- **Tetradecan**

Interner Standard für die HRGC-Analyse (0,62 mg*ml⁻¹ in Diethylether). Jeweils 1 ml wurde der jeweiligen Probe zugesetzt zur Quantifizierung der Turmerone aus wässrigem Kurkumaextrakt.

- **Glykoalkaloide**

α -Solanin: ≥ 95 %; Roth

α -Chaconin: p. a.; Roth

Standardlösung:

1,39 mg α -Solanin + 2,32 mg α -Chaconin + 10 ml HPLC-Elutionsmittel für Glykoalkaloide

- **Kavain**

≥ 98 %; Roth

Standardlösung:

40 mg Kavain in 20 ml Methanol lösen.

Kavain diente zur Quantifizierung aller 6 Kavapyrone unter Verwendung von Korrekturfaktoren.

- **Flavokavin A und B**

Stammlösung, erhalten vom Adalbert Raps-Forschungszentrum, diente lediglich zum qualitativen Nachweis von Flavokavinen. Die Quantifizierung erfolgte über eine methanolische Lösung eines Kava-HD-Extraktes, der einen definierten Gehalt an Flavokavin A enthielt.

- **Kava-Kava-HD-Extrakt**

Ein CO₂-Extrakt der Firma Raps in Kulmbach (schmierige, gelbe Masse), der 3,62 % Flavokavin A enthält. Er diente zur Quantifizierung von Flavokavin A und B, sowie als Ausgangsmaterial für die Zerschäumung.

Stammlösung:

100 mg HD-Extrakt in 50 ml Methanol. (72,3 mg \cdot l⁻¹ Flavokavin A)

- **Carotinoide**

β -Carotin: für biochemische Zwecke, Merck

Lutein (enthält ca. 7,5 % Zeaxanthin), **Zeaxanthin**, **β -Cryptoxanthin**, **all-E-Lycopin** (91 % Reinheit) und **Bixin** in kristalliner Form wurden freundlicherweise von der Firma Hoffman-La Roche (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Ferner wurde von der Firma Hoffman-La Roche eine wasserdispergierbare Form von β -Carotin mit der Bezeichnung „ **β -Carotin 10 % CWS**“ erhalten.

- **Naringin und Hesperidin**

p. a.; Merck

Naringin- und Hesperidin-Standardlösungen:

Jeweils 120 mg in 20 ml DMF gelöst und auf 100 ml mit 0,01M Essigsäure auffüllt. Die Stammösung wurde mit 0,01M Essigsäure - DMF-Lösung (8 : 2) 1:10 verdünnt.

- **Chlorogensäure und Coffein (wfr.)**

f. d. Analyse; Merck

Standardlösungen:

Vorbereitet gemäß der amtlichen Methoden [L46.00-2 Dez. 1992] und [L46.00-3, Jan. 1995].

- **Hexansäuremethylester**

p. a., Aldrich, zur Quantifizierung der Aromastoffe in Orangensaft.

3.1.3 Untersuchungsmaterial

⇒ Folgende Gewürze und Kräuter wurden von der Firma Raps in Kulmbach zur Verfügung gestellt. - für alle Versuche wurden gemahlene Proben aus derselben Charge mit dem gleichen Vermahlungsgrad verwendet:

Rosmarin, Ingwer, Kurkuma, Kava-Kava-Wurzel, Safran, Sesam (stark geröstet) und grüner Tee (getrocknet).

⇒ Frisch erworben aus dem Handel:

Kartoffeln:	kochfeste Kartoffeln der Sorte „Agria“ aus Deutschland
Orangen:	Saftorangen der Sorte „Valencia“
Mandarinen:	Spanische Sorte „Clementine“
Grapefruit:	aus Spanien
Karotten:	aus Deutschland
Tomaten:	aus Marokko
Rotwein:	Bordeaux aus Frankreich
Kaffeepulver:	Sorte „normal“ der Firma Melitta
Bier:	Edelpils, Staatsbrauerei Weihenstephan, Freising

Rosmarin-HD-Extrakt:

Ein CO₂-Extrakt der Firma Raps in Kulmbach (schmierige, dunkelgrüne Masse) mit der Bezeichnung Rosmarin-Extrakt C1 (hochkonzentrierter Rückstand aus Extraktor C1 nach der Desodorierung von Rosmarin-Extrakt rot I).

Stabiloton:

Stabiloton ist ein HD-Sprühextrakt aus Rosmarin, der 20 % Kieselsäure als inertes Trägermaterial und 21,2 % Carnosolsäure, gebunden an Kieselsäure, enthält. Pulverförmiges Stabiloton wurde von der Firma Raps in Kulmbach zur Verfügung gestellt (Bezeichnung: 7014 Stabiloton OS. Chargen Nr.: MO 2178).

Stabiloton wurde als Untersuchungsmaterial für Versuche auf Extraktionsausbeute von Carnosolsäure im wässrigen Medium verwendet.

Methanolische Stabiloton-Lösung:

250 mg Stabiloton wurden in 100 ml-Meßkolben mit saurem Methanol versetzt und gelöst (30 min im Ultraschallbad). Für die HPLC-Bestimmung wurde die Probe 100-fach verdünnt.

3.1.4 Geräte**3.1.4.1 HPLC****HPLC / ELCD:**

Pumpe:	Gynkotec Modell 480
Detektor:	Antec Decade, elektrochem. Detektor
Datensystem:	Gynkosoft Version 5.32
Entgasung:	He 5,0 - Messer Griesheim GmbH
Injektor:	Rheodyne 8125 mit 20 µl Probenschleife

HPLC / UV:

Pumpe:	Gynkotec Modell 480
Degasser:	DG-1310 - Uniflows
Detektor:	Gynkotec Typ UVD 340 S, DAD Detektor
Autosampler:	Gynkotec Typ GINA 50
Datensystem:	Gynkosoft Version 5.32

3.1.4.2 HPLC-MS/MS-Kopplung

LC-MS/MS:	Finnigan TSQ 7000
Ionenquelle:	APCI
HPLC:	
Degasser:	ERC 3822
Pumpe:	Gynkotec P580
Säulenofen:	ERC Crocodile
Detektor:	Gynkotek UVD 170 S

3.1.4.3 UV-VIS-Spektroskopie

Gerät:	Perkin Elmer, Lambda 16
Datensystem :	PECSS Data Software.

3.1.4.4 HRGC

GC / FID:	Siemens SICHROMAT 1-4 HP 5890 Series II
HRGC / MS:	HR-MS-NCI 8200er
MS:	Finnigan Mat, Modell 8200
GC:	HP 5890 Series II
Datensystem:	MASPEC für Windows (MSS, Manchester), Vers. 2.11, NIST-Library

3.1.4.5 Zerschäumungsapparatur

Säule:	Größe	AD* [mm]	ID* [mm]	Länge [cm]
	klein	16,8	14,4	130
	mittel	22,2	18,5	130
	groß	32,0	29,2	130
	extra groß	50,0	45,0	165

*AD und ID: Außen- und Innendurchmesser

Fritte: Porosität 3, ISO 4793-P40, Nennweite der Poren 16 – 40 μm , ROBU-Glas
 Flowmeter: B-25-20, Porter Instrument Company, 150 mm Skalenlänge
 Der Gasfluss wurde nach der Seifenblasen-Methode mit Stoppuhr gemessen.
 Aus Tab. 3-1 sind die Eichwerte für Stickstoffgas zu entnehmen.

Tab. 3-1: Die Skalenwerte am Flowmeter und die gemessene Flussraten v von Stickstoffgas (gemessen nach der Seifenblasen-Methode)

Skalenwert am Flowmeter	gemessene Flussrate [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]	Skalenwert am Flowmeter	gemessene Flussrate [$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$]
1	3	9	40
2	6	10	50
3	8	11	60
4	12	12	70
5	15	13	80
6	20	14	90
7	25	15	100
8	30		

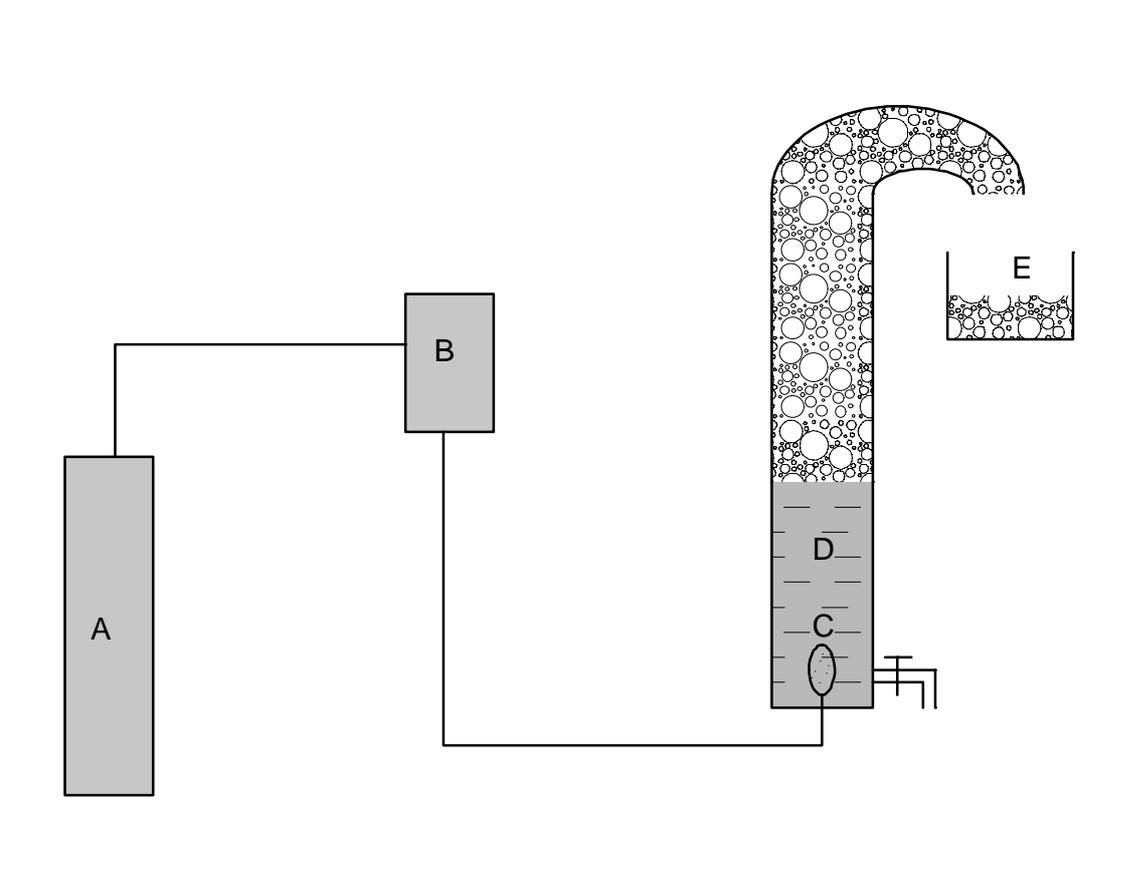


Abb. 3-1: Schematische Darstellung der Zerschäumungsapparatur A: Stickstoffgas, B: Flowmeter, C: Fritte, D: Ausgangsprobe E: Schaum (Spumat).

3.1.4.6 Weitere Hilfsgeräte

Elektrischer Entsafter: Firma Moulinex

Zentrifuge : Heraeus Sepatech; Megafuge 1.0 (mindestens 3000 U min⁻¹)

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion

3.2.1.1 Extraktion der Untersuchungsmaterialien mit organischem Lösungsmittel

Definierte Mengen an Pulver des jeweiligen Untersuchungsmaterials (Rosmarin, Ingwer, Kava-Kava, Kurkuma) wurden mit 100 ml organischem Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Hexan) 30 min im Ultraschallbad extrahiert und die Extrakte anschließend über Faltenfilter filtriert. Falls erforderlich, wurde die Probe vor dem Einspritzen in die HPLC zusätzlich über 0,45 µm Membranfilter filtriert und mit dem Lösungsmittel auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Rosmarin:

Einwaage: 0,8 g*100 ml⁻¹.

Für Rosmarin wurde saures Methanol zur Extraktion und Verdünnung verwendet.

Ingwer:

Einwaage: 1 g*100 ml⁻¹ Methanol.

Nach der Extraktion wurde Methanol anschließend bei 40 °C am Rotationsverdampfer abrotiert. Die Gingerole wurden anschließend in 5 ml Elutionsmittel A (Acetonitril : Wasser : Essigsäure 50 : 50 : 1), das ca. 150 mg*l⁻¹ Ethylvanillin enthält, aufgenommen und über einen Faltenfilter filtriert [Wechner, 1997].

Kurkuma

Einwaage: 0,1g *(10 ml)⁻¹ Methanol

Etherischer Extrakt der Turmerone:

1 g Kurkumapulver wurde in 150 ml Diethylether unter Zusatz von 1 ml Tetradecan-Standard-lösung (0,62 mg*ml⁻¹) 1 h am Magnetrührer homogenisiert und filtriert.

3.2.1.2 Wässrige Extraktion der Untersuchungsmaterialien

Eine definierte Menge Pulver des Untersuchungsmaterial (Rosmarin, Ingwer, Kava-Kava, Kurkuma) wurde mit 100 ml Wasser mit Siedesteinchen in einem 250-ml-Rundkolben unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und ab Siedebeginn 20 min lang extrahiert. Nach dem Abkühlen der Probe wurde sie über einen Büchner-Trichter mit einer Saugflasche, die an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, filtriert. Das Extraktionswasser wurde, je nach Versuch, zur Erhöhung der Ausbeute auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt. Der wässrige Extrakt wurde vor der Zerschäumung mit H_3PO_4 oder NaOH ebenfalls auf einen bestimmten pH-Wert gebracht. Zu Rosmarinpulver wurde Wasser, je nach Versuch, entweder kalt (Raumtemperatur) oder kochend heiß zugegeben.

Die Filtrationsrückstände wurden jeweils mit 100 ml Methanol für Ingwer bzw. saurem Methanol für Rosmarin extrahiert. Eine methanolische Extraktion des Untersuchungsmaterials (Rosmarin- bzw. Ingwerpulver), bei der die Extraktionsausbeute an Carnosolsäure bzw. an Gingerolen als 100 % betrachtet wurde, diente jeweils als Vergleichslösung.

Wässrige Extraktion von Carnosolsäure bei 40 °C aus Rosmarinpulver und Stabiloton:

0,8 g Rosmarinpulver bzw. 0,1 g Stabiloton wurden mit 1 M H_3PO_4 auf pH 4,5 eingestellt und auf einer Heizplatte mit einem Rührfisch 4 h bei 40 °C homogenisiert und anschließend filtriert.

Die Filtrationsrückstände wurden mit 100 ml saurem Methanol im Ultraschallbad extrahiert. Zur Kontrolle der Extraktionsausbeute bzw. der Stabilität von Carnosolsäure wurden Proben nach jeweils 20, 40, 60 min und 4 h entnommen und auf ihren Carnosolsäuregehalt untersucht.

3.2.1.3 Säulenchromatographische Isolierung der Carnosolsäure aus dem Spumat des wässrigen Rosmarinextraktes

1 l wässriger Extrakt des Rosmarinpulvers wurde in der extra großen Zerschäumungsapparatur bei einer Gasflussrate von $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ zerschäumt. Das erhaltene Spumat wurde für die Isolierung der Carnosolsäure säulenchromatographisch aufbereitet. Die Spumatprobe enthielt neben den angereicherten Antioxidantien Carnosolsäure, Carnosol und

Carnosolsäuremethylester auch Proteine. Die Reinigung der Antioxidantien und ihre Trennung erfolgte auf einer RP-18-Säule (Länge 20cm, Ø 2cm).

Reinigung:

Die Spumatprobe wurde zunächst mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt. Aus der trüben Lösung fiel ein flockiger Niederschlag aus, was auf eine Denaturierung der Proteine zurückzuführen ist. Die Lösung wurde abfiltriert und das Filtrat wurde auf die RP-18-Säule aufgegeben. Die Säule wurde solange mit Methanol / Wasser nachgespült, bis das Eluat wieder klar war. Mit diesem Schritt sollten unerwünschte Begleitstoffe von der Säule gewaschen werden.

Elution der Antioxidantien:

Die Elution begann mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (70 : 30). Das Eluat wurde mit einem UV-Spektralphotometer überwacht. Die Elutionsreihenfolge ist: Carnosol (λ_{\max} 284), Carnosolsäure (λ_{\max} 228, 284), Carnosolsäuremethylester (λ_{\max} 228, 282).

Carnosol konnte von Carnosolsäure gut getrennt werden. Carnosolsäure kommt zwar als zweite Substanz vor dem Methylester aus der Säule, kann jedoch z. T. mit ihm interferieren. Zur Absicherung, ob eine Probe nur Carnosolsäure oder bereits Methylesteranteil enthält, wurde die HPLC/UV-Analyse eingesetzt. Die Fraktionen, die reine Carnosolsäure enthielten, wurden gesammelt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in Methanol erneut aufgenommen und mit der HPLC analysiert.

3.2.1.4 Sensorische Analyse von Orangensaft

Testergruppe: 8 Personen (erfahrene Sensoriker).

Bedingungen: Die sensorischen Tests wurden in einem speziellen Sensorikraum durchgeführt. Die Verwendung von Klarglasgläsern ermöglichte die Mitbewertung von Farbe und Aussehen.

Sensorischer Test und Bewertung.: Pro Test erhielt jede Person je eine Saft-, Rückstands- und Spumatprobe. Es wurden die Merkmale Farbe/Aussehen, Geruch, Geschmack und Harmonie bewertet (DLG-Schema zur Bewertung von Fruchtsäften). Die Summe der Bewertungspunkte der Tester wurde durch die Summe der Gewichtungsfaktoren geteilt und lieferte die Qualitätszahl der Saftproben.

3.2.2 Zerschäumung

3.2.2.1 Allgemeines zur Durchführung einer Zerschäumung:

Probenvorbereitung: Nach der Extraktion wurde die Proben entweder direkt oder nach Zusatz von Schaumbildnern und einer Einstellung auf bestimmte pH-Werte zerschäumt.

Zerschäumungskolonne: Es wurden Glassäulen mit verschiedenen Durchmessern und Längen angefertigt. Für große Probenvolumina, z.B. 500 ml, wurde die extra große Apparatur verwendet. Für Probenvolumina von 200 ml wurde die große Säule, für 100 ml die mittlere und für 50 ml die kleine Säule verwendet. Die kleine Säule wurde vor allem für Proben verwendet, die nicht viel Schaum ergaben. Die Säule muss stets rückstandsfrei gereinigt sein. Auf das Fetten von Schliffen muss generell verzichtet werden, da Fett schaumzerstörend wirkt.

Fritte: Alle Zerschäumungsversuche wurden mit der gleichen Fritte P3 (Porosität 16-40 μm) durchgeführt.

Gasart: Alle Zerschäumungsversuche wurden mit Stickstoffgas durchgeführt. Es wurde wegen seiner inerten Eigenschaft und Kostengünstigkeit bevorzugt. Für die Untersuchung des Einflusses der Gasart wurden bei der Zerschäumung von Bier zusätzlich zu Stickstoff die Gase Argon, Helium und Kohlendioxid verwendet.

Gasflussrate: Die Gasgeschwindigkeit wurde mittels eines Flowmeters kontrolliert, das einen Schwebekörper enthält, der bei Gasfluss auf bestimmte Skalenwerte steigt. Die abgelesenen Skalenwerte sind gasartspezifisch. Für Stickstoffgas wurde eine Eichkurve ermittelt. Die Gasgeschwindigkeit wurde bei einem Vordruck von $0,8 \text{ bar} \cdot \text{cm}^{-2}$ in Abhängigkeit von den Skalenwerten nach der Seifenblase-Methode mit einer Stoppuhr gemessen. Damit konnte unter definierten Bedingungen zerschäumt werden.

Probenaufgabe: Ein bestimmtes Probevolumen wurde in die Zerschäumungsapparatur gegeben. Die Probenaufgabe erfolgte bei der extra großen Apparatur über ein Reservoir, das an die Säule angeschlossen ist, von unten nach oben. Bei der kleineren Säule wurde die Probe von der oberen Säulenöffnung mit Hilfe einer 50 ml-Spritze mit einem an der Kanüle angeschlossenen Teflonschlauch aufgegeben. Nach Aufgabe der Probe wurde das Gas durch

Öffnen des Flowmeterventils über einen konstanten Vordruck auf eine bestimmte Flussrate eingestellt.

Kontrolle der Zerschäumung: Mit einer Stoppuhr wurde der Verlauf einer Zerschäumung in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Gemessen wurde die Geschwindigkeit des Schaumanstiegs in der Säule sowie der Zeitpunkt und die Dauer des Schaumaustritts aus der Säule. Auch der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung wurde ermittelt. Eine Zerschäumung ist beendet, wenn der Schaum im Gleichgewicht steht, d.h. wenn soviel Schaum entsteht wie zerfällt. Dieser „Schaum im Gleichgewicht“ wurde zur Kontrolle auch mittels HPLC-Analyse auf den Gehalt der jeweiligen Substanzgruppen untersucht.

Schaumfang: Der Schaum wurde am Säulenausgang in einem gewogenen Becherglas aufgefangen; durch Differenzwägung wurde daraus die Spumatmenge ermittelt.

3.2.2.2 Allgemeine Beschreibung der fraktionierten und der Mehrfach-Zerschäumung

Entnahme von Fraktionen in konstanten Zeitabständen:

Während einer Zerschäumung wurde zu definierten Zeitpunkten jeweils eine Schaumprobe und eine Rückstandsprobe entnommen. Die Probennahme erfolgte kontinuierlich nach konstanten Zeitintervallen.

Entnahme von Fraktionen vor Änderung der Gasflussrate:

Bei einer bestimmten Gasflussrate wurde solange zerschäumt, bis kein neuer Schaum mehr entstand. Dem entstandenen verflüssigten Schaum (Spumat) und der zerschäumten Flüssigkeit (Rückstand) wurden Proben entnommen. Erst dann wurde die Gasflussrate erhöht, und dem eventuell neu entstandenen Schaum wurden ebenso wie dem entschäumten Rückstand erneut Proben entnommen, usw.

Mehrfach-Zerschäumung:

Bei einer bestimmten Gasflussrate wurde solange zerschäumt, bis sich selbst bei höchster Gasflussrate kein neuer Schaum entwickelte. Vom Schaum (Spumat) und dem Rückstand in der Säule wurden Proben gezogen. Dann wurde eine geeignete Menge an Stärkelösung oder Saponin als Schaumhilfsmittel zum Rückstand gegeben und erneut zerschäumt.

3.2.2.3 Zerschäumung mit Hilfe der Schaumbildner Stärke und Saponin

Durch Saponin- und Stärkezusatz konnten rein organische und organisch-wässrige Proben zerschäumt werden sowie einige Standardlösungen. Auch verdünnte wässrige Extrakte, die nicht ausreichend Schaumbildner enthielten, wurden mit Saponin versetzt.

Konzentration an Saponin bzw. Stärke zur Optimierung der Schaumbildung:

Proben mit verschiedenen Einwaagen von 2-5 g Stärke bzw. 0,01-0,5 g Saponin in 50 ml Wasser wurden zerschäumt. Die Steiggeschwindigkeit der Schäume in der Zerschäumungskolonie, die Spumatmenge und die Konsistenz der Schäume (nass oder trocken) wurden zur Ermittlung der optimalen Konzentration beobachtet.

Die Stärke wurde in Form einer gekochten farblosen Lösung zu der zu zerschäumenden Probe gegeben. Saponin wurde bei wässrigen Proben direkt zugegeben. Wenn die Probe rein organisch war, wurde Saponin erst in ca. 2 ml Wasser gelöst und dann zur Probe gegeben.

Da Stärke in höherer Konzentration die HPLC-Analytik erschwert, wurde ausschließlich Saponin als Schaumbildner für die Versuche mit anschließender HPLC-Analytik verwendet.

3.2.3 Probenaufarbeitung

Substanzgruppen, für die hier keine Aufarbeitung erwähnt ist, wurden direkt aus wässrigen Proben nach einer Membranfiltration für die Analytik eingesetzt.

- **Bitterstoffe**

Extraktion der Bitterstoffe aus Bier für die HPLC-UV/DAD-Messung [Barth, 1996]:

Die Probe (Bier und Rückstand: 30 ml, Spumat: 25 ml) wurde jeweils mit Isooctan (Bier und Rückstand: 60 ml, Spumat 50 ml) und 3 ml 3 M HCl 15 min am Schüttelapparat (Schüttelfrequenz 150 min^{-1}) vermischt. In einem Scheidetrichter wurde die Isooctanphase von der wässrigen Phase getrennt und 40 ml der Isooctanphase am Rotationsverdampfer bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zum Trockene abrotiert. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol aufgenommen, membranfiltriert und mittels HPLC/UV-Analyse untersucht.

- **Turmerone**

Extraktion der Turmerone aus Kurkuma für die Gaschromatographie:

Die Proben wurden jeweils mit 1 ml Tetradecan-Standardlösung ($0,62 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) dotiert und mit 3 x 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden über

Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonnen bei 40 °C im Spitzkolben auf ca. 1 ml eingengt. Zur Extraktion wurden 100 ml Rückstand, 30 ml Spumat und 100 ml wässrige Ausgangsprobe eingesetzt. Zum Vergleich der Ausbeuten an Aromastoffen aus wässrigen Extrakten diente ein Etherextrakt.

- **Glykoalkaloide**

Extraktion der Glykoalkaloide aus Kartoffelsaft für die HPLC-UV/DAD-Messung [Carman et. al, 1986]:

Prinzip:

Der Kartoffelsaft wurde mit einem aliquoten Volumen an angesäuertem Methanol-Ethylacetat-Gemisch extrahiert, anschließend wurden die organischen Lösungsmittel abrotiert und der Rückstand in n-Heptansulfonsäure auf einer RP-18-Kartusche aufgereinigt (Ionenpaarchromatographie). Die Auftrennung und Quantifizierung der Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin erfolgte mittels HPLC über eine RP-18-Säule und die Detektion bei 202 nm.

Reagentien:

Extraktionsmittel: Methanol : Ethylacetat : Eisessig = 670 : 330 : 10

Heptansulfonsäurelösung: 4,32 g Heptan-1-Sulfonsäure-Natriumsalz + 10 ml
Eisessig in 1 l Wasser.

Waschlösung: Wasser : Acetonitril = 80 : 20

Elutionslösung: 0,29 g $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ in 250 ml Wasser + 250 ml
Acetonitril

Extraktion:

Die Probe (Kartoffelsaft: 100 ml, Rückstand: 100 ml, Spumat: 35 ml) wurde jeweils mit einem Aliquot an Extraktionslösung 15 min am Magnetprüher vermischt, über Faltenfilter filtriert und am Rotationsverdampfer bei 80 °C bis zur Trockene abrotiert. Der Rückstand wurde in 20 ml Heptansulfonsäure aufgenommen und gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine Filtration der Probe über einen Glasfaserfilter.

Aufreinigung auf Sep-Pak-Säule C18 (Festphasenextraktion)

Nach der Konditionierung der C18-Kartusche mit 5 ml Methanol wurden 5 ml n-Heptansulfonsäurelösung, dann der Probenextrakt (20 ml) auf die Säule gegeben (3-6

Tropfen/s, Trockenlaufen der Packung vermeiden). Mit 5 ml Waschlösung wurde die Säule nachgewaschen und bis zur Trockene ausgeblasen. Die Elution der Glykoalkaloide erfolgte langsam mit 5 ml Elutionslösung in ein 2 ml-Messkölbchen genau bis zur Markierung. Die Probe wurde anschließend am HPLC/UV gemessen.

- **Carotinoide:**

Die Carotinoideextraktion aus Karotten- und Tomatensaft erfolgte durch Fällung mit Carrez-Lösung und Extraktion mit Aceton. Die Carotinoideextraktion aus Orangen- und Mandarinensaft erfolgte durch Flüssig/Flüssig-Extraktion mit dem Extraktionsmittel Hexan : Aceton : Ethanol abs. : Toluol (10: 7: 6: 7).

Extraktion der Carotinoide aus Karotten- und Tomatensaft [Walbrauch, 1984]:

Ausgangsmenge: je 50 ml Saft und Rückstand, das erhaltene Spumat wurde auf 50 ml mit H₂O dest. aufgefüllt (bei Karotten 15 ml Spumat, bei Tomaten 40 ml).

Die Proben wurden jeweils mit je 1 ml Carrez-I- und Carrez-II-Lösung versetzt, mit dem Glasstab gut vermischt, 2 min quellen gelassen und 5 min bei 3000 Umdrehungen min⁻¹ zentrifugiert. Die überstehende (farblose) Lösung wurde vorsichtig abdekantiert und verworfen. Niederschlag wurde mit 40 ml Aceton versehen, mit dem Glasstab kräftig aufgewirbelt, 3 min verrührt und erneut 5 min zentrifugiert. Die kräftig gelb gefärbte Acetonlösung wurde in einen 50-ml-Messkolben überführt. Diesen Vorgang wurde 2 bis 3-mal wiederholt, bis der Rückstand farblos wurde. Anschließend wurde der Kolben mit Aceton bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung diente zur HPLC/UV-Analyse. Für die photometrische Bestimmung wurden die Carotinoide folgendermaßen aus der Acetonphase in die Petroletherphase überführt:

In Aceton gelöste Carotinoide wurden in einen 250-ml-Schütteltrichter überführt und mit 50 ml Petrolether aufgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde verworfen und die Petroletherphase mehrmals mit 50 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Petroletherphase, die die Carotinoide enthält, mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert.

Extraktion der Carotinoide aus Orangen- und Mandarinensaft [Lin und Chen, 1995]:

Um auch die als Fettsäureester vorliegenden Carotinoide in der Probe zu erfassen, wurde auf eine Verseifung verzichtet. Somit wurde aus der Literatur [Lin und Chen, 1995] lediglich die Extraktionslösung übernommen.

100 ml Probe wurde zweimal mit je 100 ml Extraktionsmittel Hexan : Aceton : Ethanol abs. : Toluol (10: 7: 6: 7) im Schütteltrichter extrahiert und zweimal mit je 100 ml Hexan gewaschen. Die vereinigte Hexanphase wurde mit Natriumsulfat (wfr.) getrocknet und am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt. Der Rückstand wurde mit 2 bzw. 4 ml HPLC-Elutionsmittel Methanol : THF (95:5) aufgenommen und analysiert.

- **Coffein**

Die Extraktion und Bestimmung von Coffein aus Kaffeepulver bzw. Kaffeebrühe erfolgte nach der amtlichen Methode gemäß §35 LMBG L46.00-3 (1995). Es wurden jeweils direkt 10 ml Kaffeebrühe (Ausgangssprobe) und Rückstand aufgearbeitet. Die Spumatprobe wurde zunächst mit Wasser verdünnt (0,5 g Spumat auf 10 ml) und Coffein mittels HPLC/UV-Analyse bestimmt.

- **Aromastoffe**

Extraktion der Aromastoffe aus Orangensaft für die Gaschromatographie [Macarone et. al; 1998]:

Herstellung der externen Standardprobe:

0,05 g Hexansäuremethylester auf 100 ml Pentan/Dichlormethan (2:1) als externer Standard.

Herstellung der Proben unter Zusatz von Hexansäuremethylester als internem Standard:

- a) 100 ml Orangensaft + 100 ml ges. NaCl-Lösung + 0,05 g Standardlösung
- b) 100 ml Rückstand + 100 ml ges. NaCl-Lösung + 0,05 g Standardlösung
- c) 50 ml Spumat + 50 ml ges. NaCl-Lösung + 0,05 g Standardlösung

Die Proben wurden jeweils dreimal mit 90 ml, 60 ml und 50 ml Pentan / Dichlormethan (2:1) ausgeschüttelt. Die erhaltenen organischen Extrakte der jeweiligen Proben wurden zusammengemischt und über Na₂SO₄ (Wfr.) 15 min lang unter Rühren getrocknet, danach über Faltenfilter abfiltriert und mit jeweils 30 ml Lösungsmittel nachgespült. Die getrocknete wasserfreie Phase wurde danach schonend bei 40 °C im Wasserbad mittels Vigreux-Kolonnen auf ca. 1 ml eingengt.

3.2.4 Analytik

3.2.4.1 HPLC-Bestimmungen

Säule: Kromasil 100 C18, 5 μm ; 250 x 4,6 mm, Firma Knauer
 Säulentemperatur: 25 °C
 Probenschleife: 20 μl (für Gingerole und Carotinoide zusätzlich 100 μl)

3.2.4.1.1 Mit dem elektrochemischen Detektor (ELCD-HPLC)

Für Carnosolsäure aus Rosmarin und Sesamol aus Sesam gelten folgende Einstellungen:

Messpotential: +0,8 V
 Range: 50 nA
 Arbeitselektrode: Glassy Carbon
 Referenzelektrode: Ag/AgCl gefüllt mit gesättigter LiCl-Lsg. in
 MeOH / H₂O = 50 / 50

- **Carnosolsäure aus Rosmarin** [Schwarz, 1992-I]

Arbeitsweise: Gradientenelution
 Flussrate: 0,8 ml*min⁻¹
 Elutionsmittel A: Methanol / Wasser / 2 Mol Citronensäure / TEAH
 = 50 / 50 / 0,5 / 0,5
 Elutionsmittel B: Methanol / 2 Mol Citronensäure / TEAH = 100 / 1,0 / 0,2

Gradient (modifiziert)	Zeit [min]	Eluent A	Eluent B
	0	40	60
	1-6	35	65
	9	20	80
	10	10	90
	13	0	100
	14	5	95
	15	10	90
	16-23	40	60

Aufnahme von hydrodynamischen Voltagrammen von Carnosolsäure:

Die Aufnahme eines hydrodynamischen Voltagramms erfolgte durch wiederholte Messung der gleichen Probe mit der gleichen Konzentration bei gleicher Empfindlichkeit (Range 50 na) und einer Änderung des Potentials der Arbeitselektrode, jeweils um 0,1 V absteigend. Die ersten Messungen erfolgten bei 1V, die letzten bei 0,1V Arbeitspotential. Die gemessenen Peakflächen nahmen mit Abnahme des Arbeitspotentials ab. Bis zu 0,4 V konnte Carnosolsäure gerade noch detektiert werden.

- **Sesamol aus Sesam** [interne Methode der Firma Raps]

Arbeitsweise:	Gradientenelution
Flussrate:	1,2 ml*min ⁻¹
Elutionsmittel A:	Methanol / Wasser / Natriumdihydrogenphosphat / Phosphorsäure (85 %) = 500 ml / 500 ml / 1 g / 0,3 ml
Elutionsmittel B:	Methanol / Wasser / Phosphorsäure (85 %) = 900 ml / 100 ml / 0,3 ml

Gradient	Zeit [min]	Eluent A	Eluent B
	0,0	100	0
	10,0	100	0
	11,0	10	90
	16,0	10	90
	17,0	100	0
	22,0	100	0

3.2.4.1.2 Mit dem Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD)**Flavokavine neben den Kavapyronen**

Die HPLC-Methode zur Messung der Kavapyrone nach [Phenomenex Nutraceuticals] wurde vom Adalbert-Raps-Zentrum so modifiziert, dass die Elution von Flavokavinen nach der Elution der Kavapyrone erfolgt. So wurde mit 100 % Elutionsmittel B (Acetonitril : Isopropanol : Essigsäure (16:19:65)) gearbeitet, bis die Kavapyrone eluiert wurden, und anschließend wurden die Flavokavine mit 100 % Elutionsmittel A (Acetonitril) eluiert. Die Quantifizierung der Kavapyrone erfolgte über Kavain unter Verwendung der Korrekturfaktoren in Tab. 3-2.

Tab. 3-2: Absorptionsmaxima der wichtigsten Kavapyrone und Flavokavine [He et. al; 1997 und Hänsel et. al; 1967] und die Korrekturfaktoren der Kavapyrone gegen Kavain [Nutraceutical]:

Verbindung	Korrekturfaktor	Abs. max [nm]
Methysticin	0,663	202, 226 , 267, 305
Dihydromethysticin	1,65	234 , 287
Kavain	1,00	202, 245
Dihydrokavain	1,70	235 , 260
Desmethoxyyangonin	0,904	208, 230, 255, 344
Yangonin	0,878	217, 261, 361
<hr/>		
Flavokavin A		362
Flavokavin B		350
Flavokavin C		375

- **Chlorogensäuren**

Chlorogensäuren wurden direkt aus der Kaffeebrühe nach der amtlichen Methode gemäß §35 LMBG L46.00-2 (Dez. 1992) mittels HPLC/UV-Analyse bestimmt.

- **Naringin und Hesperidin**

Naringin und Hesperidin wurden direkt in Orangen- und Grapefruitsaftproben nach der amtlichen Methode gemäß §35 LMBG L31.00-19 (1997) durch HPLC/UV-Analyse gemessen.

Tab. 3-3: HPLC/UV-Parameter und Elutionsmittel für die untersuchten Substanzgruppen

Substanzgruppe	Detektion	Flussrate	Arbeitsweise	Elutionsmittel A	Elutionsmittel B
Bitterstoffe in Bier [Donley, 1992]	275 nm	1 ml*min ⁻¹	Gradient	MeOH :H ₂ O: H ₃ PO ₄ 725 ml : 275 ml : 17 g	MeOH
Carnosolsäure [Tena et al.; 1997]	K1: 230 nm, K2: 280 nm, 3D: 210- 390 nm	1 ml*min ⁻¹	Gradient	ACN	10 mM Essigsäure
Rosmarinsäure [Cuvelier, 1996]	K1: 230 nm, K2: 280 nm, 3D:210- 390 nm	1 ml*min ⁻¹	Gradient	ACN / H ₂ O / Essigsäure 15 / 84 / 0,85	10 mM Essigsäure
Gingerole [Vesper et al.; 1995 modif. nach Wechner, 1997]	K1: 230 nm, K2: 282 nm, 3D:210- 390 nm	1 ml*min ⁻¹	Gradient	ACN / H ₂ O / Essigsäure 50 / 50 / 1	ACN / MeOH / Essigsäure 80 / 19 / 1
Curcuminoid [Smith et al.; 1984]	K1: 254 nm, K 2: 428 nm, 3D:200-600 nm	0,8 ml*min ⁻¹	isokratisch	ACN: Phosphatpuffer pH 4,4 (60 : 40)	

Fortsetzung der Tab. 3-3

Glykoalkaloide [Carman, 1986]	K1: 202 nm, 3D: 200-260 nm	1 ml*min ⁻¹	isokratisch	450g 20 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ + 235g (NH ₄) ₂ HPO ₄ + 265g ACN	
Kavapyrone und Flavokavine [Phenomenex N.; modifiz. nach Adalbert-Raps- Institut]	245 nm (0-22 min), 360 nm (22- 40 min)	1 ml*min ⁻¹	Gradient	ACN	ACN:Iso- propanol: Essigsr. (16:19:65)
Carotinoide [Craft et al.; 1992]	K1:450 nm, K2:230nm, 3D: 210-390nm	1 ml*min ⁻¹	isokratisch	MeOH : THF (95 : 100)	
Polyphenole in grünem Tee [interne Methode der Firma Raps]	280 nm	1 ml*min ⁻¹	Gradient	Essigsäure 2 %	ACN

Tab. 3-4: Gradienten-Programme der eingesetzten HPLC/UV-Methoden in Tab. 3-3

Substanzgruppe	Zeit [min]	Elutionsmittel A [%]	Elutionsmittel B [%]
Bitterstoffe in Bier	0	90	10
	3-10	50	50
	16	0,1	99,9
	26-30	90	10
Carnosolsäure	0-8	70	100
	13	100	0
Rosmarinsäure	0	100	0
	90	0	100
Gingerole	0	100	0
	30	0	100
Kavapyrone und Flavokavine	0-22	0	100
	32	100	0
	35	100	0
	37	0	100
Polyphenole in Grünem Tee	42	0	100
	0	92	8
	20	77	23
	25	60	40
	30	50	50
40	92	8	
45	92	8	

3.2.4.1.3 Mit LC-MS/MS-Kopplung

- **HPLC-Parameter für die Antioxidantien in Rosmarin und die Gingerole in Ingwer:**

Eluent A:	Wasser (+ 1 ml HCOOH l ⁻¹)
Eluent B:	Acetonitril
Flow:	0,25 ml*min ⁻¹
Injektion:	Gina 50, 5 µl
Vorsäule:	MN C18 Nucleosil
Säule:	MN C18 Nucleosil 125 x 2 mm
Temperatur:	30 °C
Detektion:	282 nm / 210 nm
Gradientenprogramm:	Linear, B von 10 % auf 90 % innerhalb von 30 min

- **MS/MS-Parameter:**

Messmethode:	neg. Ionisation für die Antioxidantien pos. Ionisation für die Gingerole
Sheath Gas:	N ₂ , 60 psi
Hilfsgas:	N ₂ , 5 psi
Massenbereich:	150 - 500
Scan Time:	0,5
Strom/Spannung:	5 µA
Vaporizer:	400 °C
Transferline:	200 °C

3.2.4.2 Spektralphotometrische Analysen (UV-VIS)

- **Photometrische Messung der Gesamtcarotinoide** [Walbrauch, 1984]

Die Proben wurden gegebenenfalls verdünnt und in 1 cm Quarzküvetten bei 450 nm gegen Petrolether gemessen. Aus den Extinktionen der Proben konnte man die Gesamtcarotinoide als β-Carotin folgendermaßen berechnen:

$\text{Mg} \cdot \text{l}^{-1} \beta\text{-Carotin} = 400 * E_{450\text{nm}}$ unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

$E_{450\text{nm}}$: gemessene Extinktion bei 450 nm.

- **Photometrische Messung der Kaffeefarbe**

Die Proben wurden gegebenenfalls verdünnt und in 1 cm Quarzküvetten bei 405 nm gegen Wasser gemessen.

3.2.4.3 HRGC-Bestimmungen

- **Für Aromastoffe in Orangensaft und Turmerone in Kurkuma**

3.2.4.3.1 GC-FID-Parameter

Trennsäule:	J&W Scientific No. 122. 5032 DB5 ms, 30 m x 0,25 mm i.D. x 0,25 µm
Trärgas:	Helium 5.0
Flussrate:	1,15 ml*min ⁻¹
Split:	1 : 10
Injektortemperatur:	230 °C
Detektortemperatur:	250 °C
Temperaturprogramm:	Aromastoffe in Orangensaft: 55°C / 5 min, 3 °C*min ⁻¹ bis 220 °C Turmerone in Kurkuma: 60 °C / 5 min, 2 °C*min ⁻¹ bis 250 °C

3.2.4.3.2 HRGC-MS-Parameter

MS:	EI-Modus
Transferline:	230 °C
Trennsäule:	Fused Silica, quervernetzt SE 54; 30 m * 0,25 mm i.D., Filmdicke 0,25 µm
Injektortemperatur:	260 °C
Ionenquelle:	250 °C
Trärgas:	Helium, 1,5 ml*min ⁻¹ (bei 60 °C)
Splitverhältnis:	1:10
Ionenquellentemperatur:	240 °C
Ionisierungsenergie:	70 eV, 1 mA
Beschleunigungsspannung:	3 KV
Multiplayerspannung:	1,8 KV
Kalibrierung:	PFK (Perfluorkerosin)
Auflösung:	1000
Scan:	33-400 1,2 sec / dec

3.2.5 Quantitative Auswertung

Bei quantitativen Angaben von Inhaltsstoffen handelt es sich wegen der zahlreichen und zeitaufwendigen Experimente stets um den Mittelwert aus zwei Versuchen unter identischen experimentellen Bedingungen.

4 Ergebnisse

4.1 Einführung

Im Rahmen eines Screenings wurde überprüft, bei welchen Pflanzen die wässrigen Extrakte bzw. Säfte bei der Zerschäumung einen stabilen Schaum ohne Zusatz von Schaumbildnern bilden können (s. Tab. 4-1 und Tab. 4-2). Für diese Arbeit wurden gut schäumende Ausgangsmaterialien ausgesucht, die Wirkstoffe mit unterschiedlich chemischen Eigenschaften enthalten. Ausgangsmaterialien, die nicht gut schäumend sind, aber für diese Arbeit interessante Inhaltsstoffe enthielten, z.B. Safran und Rotwein, stark verdünnte Proben sowie Standardlösungen der untersuchten Substanzgruppen, wurden unter Zusatz des Schaumbildners Saponin zerschäumt.

Tab. 4-1: Zerschäumbarkeit von wässrigen Extrakten einiger Gewürze und Genussmittel (getrocknet)

gut	mäßig	schlecht
Birkenblätter	Basilikum	Anis
Dill	Bohnenkraut	Beifuß
Ingwer	Johanniskraut	Chili
Kaffee*	Kurkuma	Enzianwurzel
Kava-Kava	Lavendel	Estragon
Kreuzkümmel	Löwenzahnblätter	Kakao
Kümmel	Majoran	Kardamon
Rosmarin*	Nelken	Koriander
Salbei	Oregano	Lindenblätter
Sesam* (stark geröstet)	Pfefferminz	Lorbeerblätter
Tee (grün)	Safran	Macis
Zimt*	Schwarzkümmel	Muskatnuss
	Thymian	Paprikapulver
	Wacholderbeeren	Pestwurz
	Weißdornblüten	Piment
	Wermut	Rotbuschtee
		Schafgarbe
		Schwarzer Pfeffer
		Tabak
		Vanille-Schoten

* sehr gut zerschäumbar

Tab. 4-2: Zerschäumbarkeit von frischer Obst- und Gemüsesäfte

gut	mäßig	schlecht
Ananassaft	Apfelsaft	Aprikosen
Aubergine ohne Schale	Birnensaft	Banane
Auberginen-Schale*	Chicorée	Datteln
Blaukraut*	Fenchelfrucht	Erdbeeren
Blaubeeren*	Kürbis	Feldsalat
Bohnen (grün)	Orangen-Schale	Grapefruit-Schale
Brokkoli*	Paprika (gelb und rot)	Granatapfel
Grapefruitsaft	Radieschen ohne Schale	Kaki
Gurken*	Sojasprossen	Kirschen
Hagebuttentee		Kiwi
Honigmelone*		Knoblauch
Karottensaft		Kresse
Kartoffelsaft*		Litschi
Kohlrabi		Mango
Lauch*		Wassermelone
Leinsamen		Okraschote
Mangold		Radicchio
Meerrettich		Weintrauben (rot und weiß)
Orangensaft		Zwiebel
Paprika grün		
Petersilie*		
Pfirsich		
Quitten		
Radieschen-Schale		
Ricola		
Rosenkohl		
Rote Beete*		
Sellerie*		
Spargel*		
Spinat*		
Tomatensaft		
Wirsing*		
Zucchini*		

* sehr gut zerschäumbar

Zusätzlich zur Überprüfung der Anreicherung von Substanzgruppen wurden an ausgesuchten Verbindungen Zerschäumungsversuche unter variablen Parametern durchgeführt, um deren Einfluss auf die Anreicherung zu überprüfen. Unten sind diese Parameter und die dafür verwendeten Untersuchungsmaterialien aufgelistet. Die Ergebnisse sind dem jeweiligen Abschnitt zu entnehmen.

<u>Parameter</u>	<u>Untersuchungsmaterial</u>
Säulendimensionierung und Probenvolumen:	Ingwer, Bier
Gasflussrate:	Rosmarin, Gingerol-Standardlösung
Gasart:	Bier
Konzentration der schaumaktiven Inhaltsstoffe:	Ingwer, Standardlösungen von Gingerolen, Carnosolsäure, Curcuminoiden, Flavokavinen und Kavapyronen
Konzentration des Schaumbildners Saponin:	Standardlösungen von Gingerolen, Flavokavinen und Kavapyronen

4.2 Substanzgruppen

4.2.1 Gingerole aus Ingwer

Einführung

Ingwer wurde als Ausgangsmaterial für die Zerschäumung ausgesucht, da ein wässriger Extrakt des Ingwerpulvers gut zerschäumbar ist und Ingwer die Scharfstoffe (Gingerole bzw. Shogaole) enthält, die nicht nur wegen ihrer physiologischen Eigenschaften von Bedeutung sind, sondern auch weil sie chemisch eine Substanzgruppe mit unterschiedlichen polaren Eigenschaften darstellen und sich zur Überprüfung der Selektivität der Zerschäumungsanalyse eignen.

Nach Charakterisierung der im Schaum angereicherten Scharfstoffe (Gingerole/Shogaole) wurde die optimale Ausgangskonzentration (Einwaage) festgelegt und die Extraktionsbedingungen variiert, um die Ausbeute an Scharfstoffen bei einer wässrigen Extraktion des Ingwerpulvers zu erhöhen.

Nachdem eine Anreicherung der Scharfstoffe aus dem wässrigen Extrakt des Ingwerpulvers im Schaum mittels der einfachen Zerschäumung festgestellt war, wurde mittels der fraktionierten Zerschäumung festgestellt, dass sich [6]-Gingerol nur langsam und relativ spät gegenüber [8]-Gingerol, [10]-Gingerol und [6]-Shogaol im Schaum anreicherte.

Da Ingwer [6]-Gingerol als Hauptkomponente enthält, wurden zusätzlich Versuche mit Gingerol-Standardlösungen durchgeführt, in denen alle Gingerole in gleicher Konzentration enthalten waren, um zu überprüfen, ob das unterschiedliche Verhalten von [6]-Gingerol auf die höhere Konzentration und / oder auch auf andere Faktoren zurückzuführen ist.

Um festzustellen, ob die Gingerole sich gegenseitig während einer Zerschäumung beeinflussen, wurde eine Versuchsreihe unter identischen Bedingungen durchgeführt, in der die zu zerschäumende Probe alle Gingerole gemeinsam oder jeweils nur ein Gingerol in gleicher Konzentration enthielt. Schließlich wurde der Einfluss der Ausgangskonzentration der schaumaktiven Gingerole und des Schaumbildners Saponin, der Gasflussrate und des pH-Werts auf die Anreicherung der Gingerole untersucht.

Die Analyse der Gingerole erfolgte mittels HPLC/UV. Die Quantifizierung der Scharfstoffe erfolgte mit Ethylvanillin als externem Standard. Es gelten folgende Korrekturfaktoren der Scharfstoffe von Ingwer gegenüber Ethylvanillin (282nm): [6]-Gingerol: 6,55; [8]-Gingerol: 7,48; [6]-Shogaol: 7,83; [10]-Gingerol: 8,92.

4.2.1.1 Charakterisierung der Gingerole

- **Mit Hilfe der HPLC/UV-Spektren**

Mit Hilfe der HPLC/DAD-Analyse und der UV-Spektralphotometrie konnten alle drei Gingerole sowie [6]-Shogaol eindeutig anhand der Retentionszeiten und unter Vergleich mit Literaturangaben [Vesper et al., 1995] identifiziert werden. Die Scharfstoffe haben ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 282 nm, verursacht durch die 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-Gruppe. Das UV-Spektrum von [6]-Shogaol unterscheidet sich vom Spektrum des [6]-Gingerols durch eine vorhandene α -, β -ungesättigte Keto-Gruppe als zusätzliches Chromophor. Methanolische und wässrige Extrakte von Ingwerpulver sowie von Gingerol-Standards zeigten identische Retentionszeiten und Spektren. In Abb. 4-1 wird die Scharfstoffanalyse im wässrigen Ingwerextrakt gezeigt.

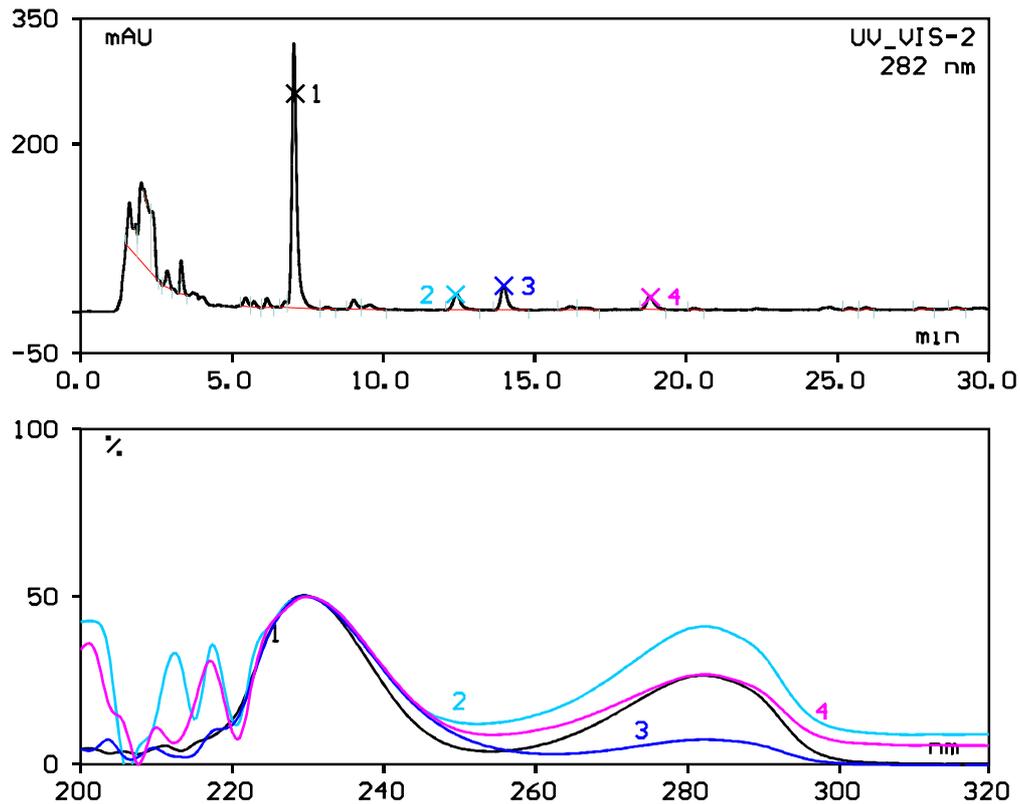


Abb. 4-1: HPLC-Chromatogramme und UV-Spektren der Gingerole aus wässrigem Extrakt von Ingwerpulver.
1. [6]-Gingerol, 2. [8]-Gingerol, 3. [6]-Shogaol, 4. [10]-Gingerol

- **Mit Hilfe der HPLC-MS/MS-Spektren**

Zur Identifizierung der Gingerole wurden Spumat und ein methanolischer Extrakt von Ingwerpulver mit Hilfe der HPLC-MS/MS-Kopplung analysiert. Die Trennung der Gingerole erfolgte an einer RP-18-Säule. Die Detektion erfolgte mit einem Triple-Quadrupole-Massenspektrometer. Bei dieser sanften Ionisierungsmethode erhält man im ersten MS (MS1) Informationen über die Molekülmasse (pos. Ionisation unter Abspaltung des Wassermoleküls). Für Informationen über strukturspezifische Fragmente wird im zweiten MS (MS2) das ausgesuchte Hauptmolekül $[M+H-H_2O]^+$ durch Anlegen eines bestimmten Potentials (hier 15 eV) fragmentiert. Anhand der MS- und MS/MS-Spektren konnten die Gingerole identifiziert werden. Es handelte sich bei den Hauptverbindungen in Spumatprobe und Methanolextrakt um [6]-Gingerol, [8]-Gingerol und [10]-Gingerol. Die MS- und MS/MS-Spektren der drei Gingerole sind in den Abb. 4-2 bis Abb. 4-4 dargestellt.

Durch die positive chemische Ionisation (APCI-Modus) wurden folgende MS-Werte erhalten:

[6]-Gingerol [MG 294]: $[M+H-H_2O]^+$ 277, weitere Fragmentierung bei 15 eV:
177 durch α -Spaltung in Nachbarschaft zur Ketobindung,
137 durch Abspaltung von Tropylium-Ion.

[8]-Gingerol [MG 322]: $[M+H-H_2O]^+$ 305, weitere Fragmentierung bei 15 eV:
177 und 137 analog [6]-Gingerol

[10]-Gingerol [MG 350]: $[M+H-H_2O]^+$ 333, weitere Fragmentierung bei 15 eV:
177 und 137 analog [6]-Gingerol

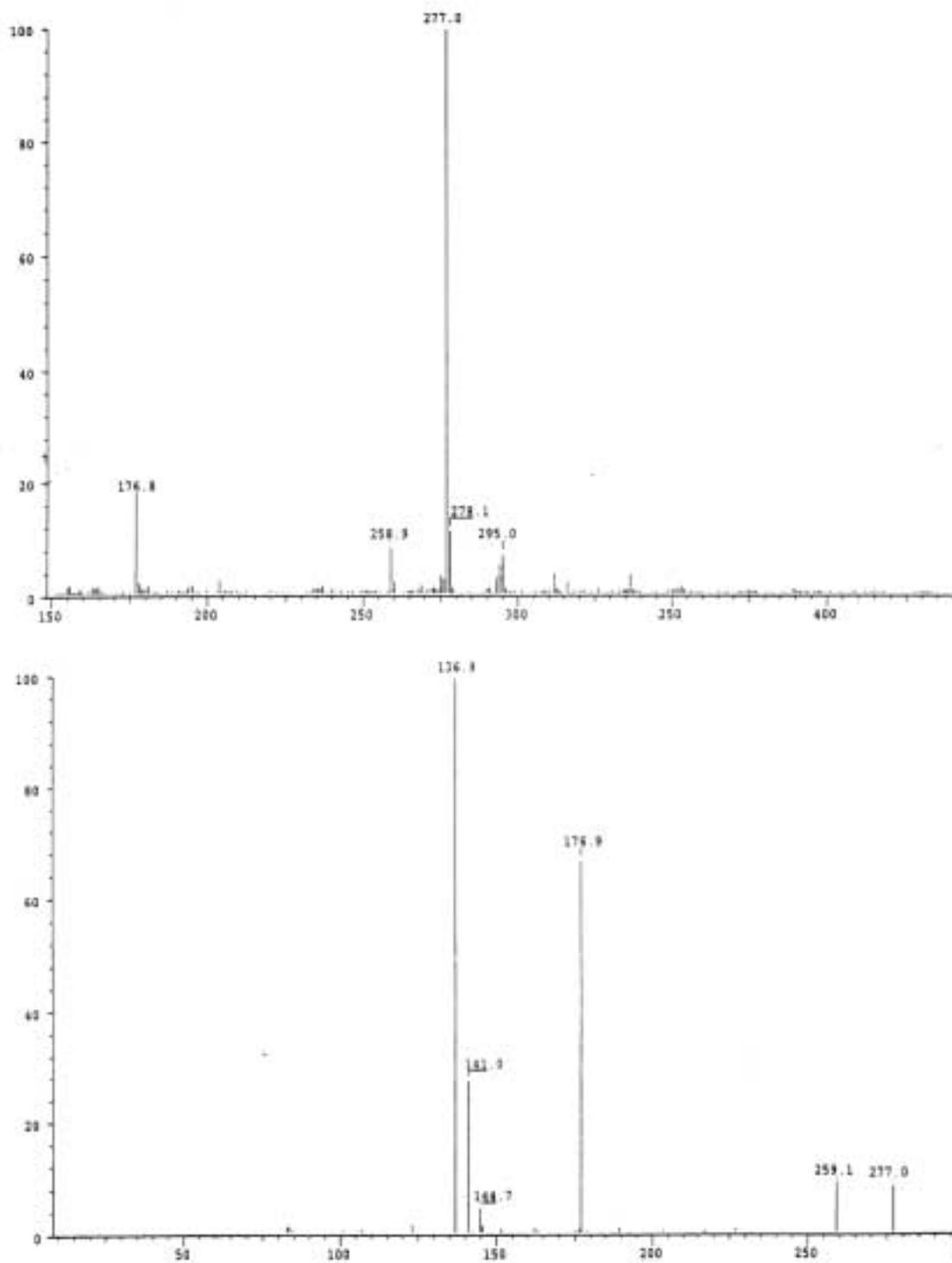


Abb. 4-2: Massenspektren von [6]-Gingerol aus dem Spumat des wässrigen Ingwerextraktes, gemessen mittels HPLC-MS/MS - APCI-positiv

a. MS-Spektrum; Basis-Peak $[M+H-H_2O]^+$ 277

b. MS/MS-Spektrum; Fragmentierung (277) bei 15 eV

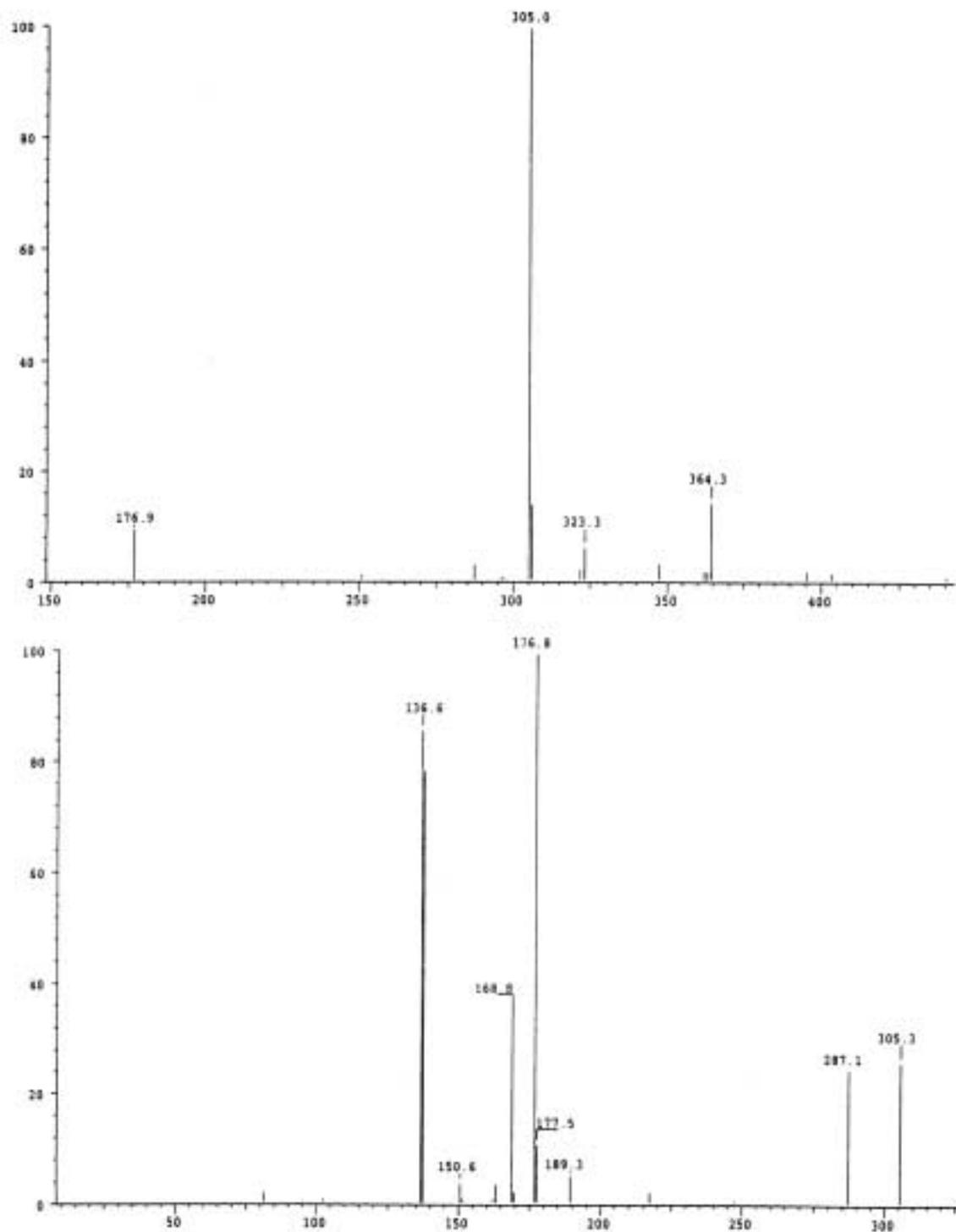


Abb. 4-3: Massenspektren von [8]-Gingerol aus dem Spumat des wässrigen Ingwerextraktes, gemessen mittels HPLC-MS/MS -APCI-positiv

- MS-Spektrum; Basis-Peak $[M+H-H_2O]^+$ 305
- MS/MS-Spektrum; Fragmentierung (305) bei 15 eV

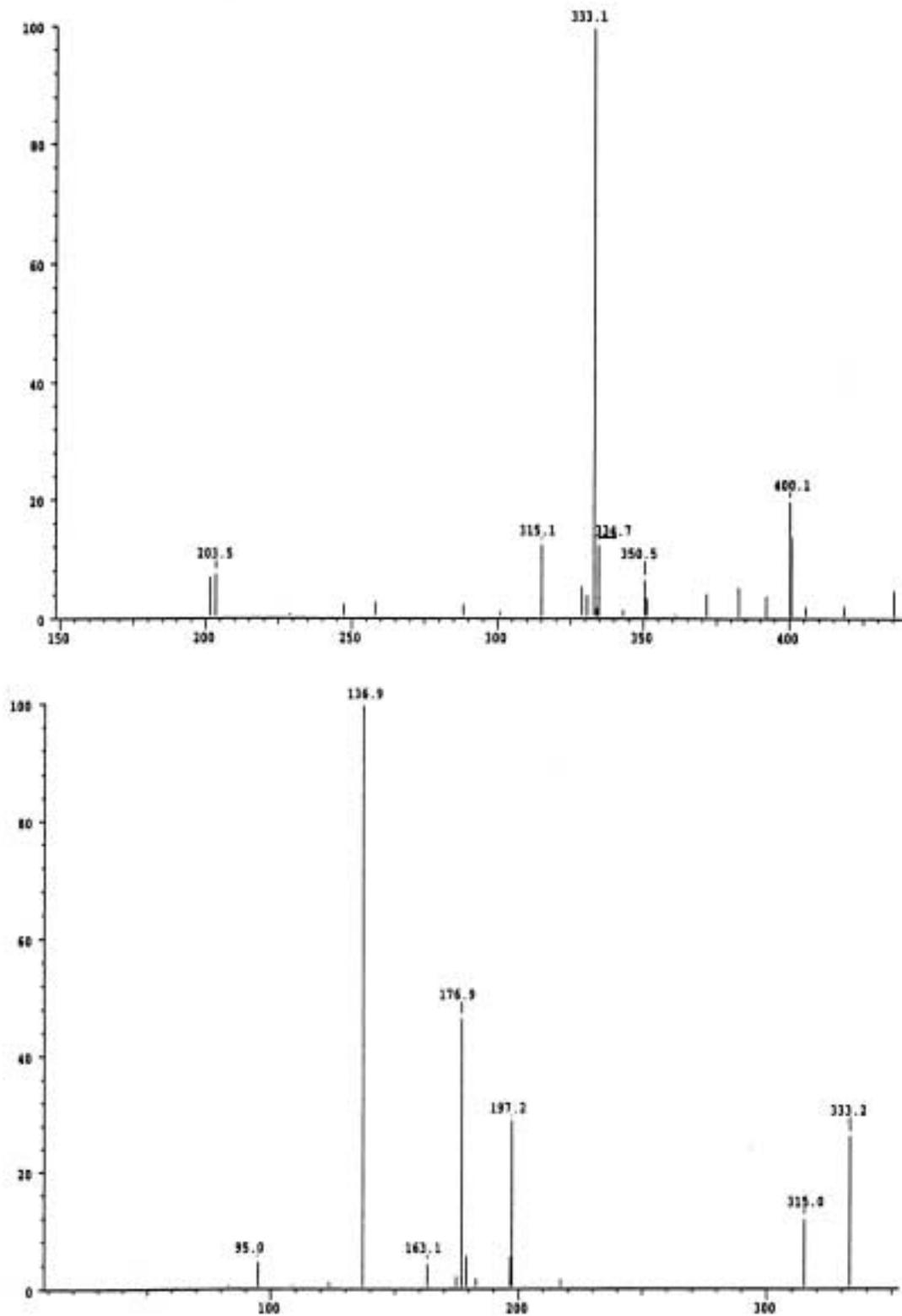


Abb. 4-4: Massenspektren von [10]-Gingerol aus dem Spumat des wässrigen Ingwerextraktes, gemessen mittels HPLC-MS/MS -APCI-positiv

a. MS -Spektrum; Basis-Peak $[M+H-H_2O]^+$ 333

b. MS/MS-Spektrum; Fragmentierung (333) bei 15 eV

4.2.1.2 Optimierung der wässrigen Extraktionsausbeute von Gingerolen aus Ingwerpulver durch alkalische Extraktion

1-3 g Ingwerpulver pro 100 ml Wasser wurden für die Extraktionsausbeute als optimaler Ausgangskonzentrationsbereich festgestellt.

Da eine Zerschäumung im wässrigen Medium optimal verläuft, sollten die Scharfstoffe auch mittels einer wässrigen Extraktion gewonnen werden. Während [6]-Gingerol zum größten Teil mit Wasser extrahierbar war, wurden die anderen Scharfstoffe aber nur zum Teil extrahiert. Ihre Ausbeute konnte jedoch durch Extraktion im alkalischen Milieu erhöht werden. Die höchste Ausbeute konnte bei pH-Wert 11 erreicht werden und somit die Ausbeute für [6]-Gingerol auf das 1,1-, für [8]-Gingerol auf das 2,3-, für [6]-Shogaol auf das 4- und für [10]-Gingerol auf das 11-Fache erhöht werden im Vergleich zur Extraktion bei pH 6 (keine Änderung des pH-Wertes im Extraktionswasser). Die berechneten Konzentrationen sind in Tab. 4-3 aufgelistet. Bezogen auf die methanolische Extraktionsausbeute (100 %) sind die Extraktionsausbeuten bzw. Wiederfindungsraten (Wfr.) der Verbindungen in Abb. 4-5 dargestellt.

Tab. 4-3: pH-Abhängigkeit der wässrigen Extraktionsausbeute von Gingerolen aus Ingwerpulver.

pH des Extraktionswassers	pH-Wert des Mediums nach der Extraktion	[6]-Gingerol [g*kg ⁻¹]	[8]-Gingerol [g*kg ⁻¹]	[6]-Shogaol [g*kg ⁻¹]	[10]-Gingerol [g*kg ⁻¹]	Σ Gingerole [g*kg ⁻¹]
6	5,7	6,85	0,39	0,36	0,09	7,7
9	5,8	7,16	0,44	0,40	0,09	8,09
10	6	7,25	0,55	0,57	0,21	8,58
11	8	7,47	0,9	1,46	0,93	10,75
Methanol-Extrakt		7,57	1,56	1,63	2,46	13,31

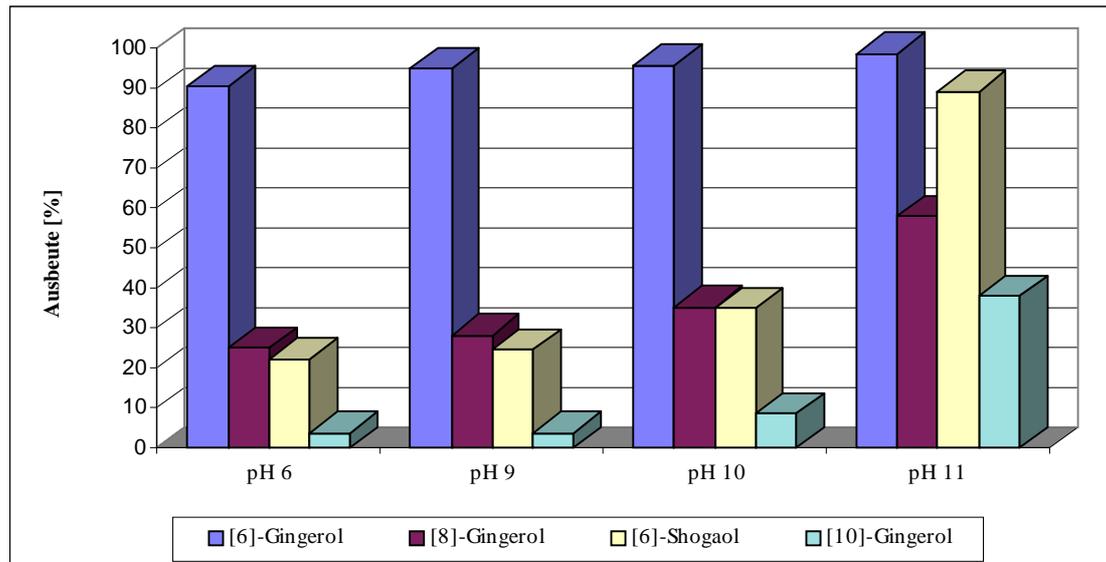


Abb. 4-5: pH-Abhängigkeit der wässrigen Extraktionsausbeute an Scharfstoffen aus Ingwerpulver bezogen auf die methanolische Ausbeute.

Mit einer methanolischen Extraktion von Ingwerpulver wurden $13,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Gingerole/Shogaole erhalten. Die Ausbeute der Gingerole bei pH 6 des Extraktionswassers betrug dagegen nur $7,7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ bzw. 57 % der methanolischen Extraktionsausbeute. Die alkalische Extraktion bei pH 11 hat die Extraktionsausbeute, vor allem von [10]-Gingerol, aber auch von [6]-Shogaol und [8]-Gingerol, um ein Vielfaches erhöht. Die Gesamtausbeute der Scharfstoffe konnte auf 81 % gesteigert werden.

Die Scharfstoffe bleiben bei der wässrigen Extraktion stabil. Dies wurde überprüft, indem die Filtrationsrückstände der neutralen wässrigen Extrakte einer methanolischen Nachextraktion unterzogen und auf ihren Gehalt an Gingerolen/Shogaolen untersucht wurden. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Gingerole, die im wässrigen Milieu nicht vollständig extrahiert wurden, in den jeweiligen Rückständen unverändert nachweisbar waren.

4.2.1.3 Einfluss von Gasflussrate, Probenvolumen und Säulendimensionierung auf die Zerschäumung

50 bzw. 200 ml Probe eines wässrigen Ingwerextraktes ($1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$) wurden in der kleinen bzw. großen Säule dreimal, jeweils unter identischen Bedingungen, jedoch bei verschiedenen Flussraten, zerschäumt. Tab. 4-4 zeigt den Zusammenhang zwischen Flussrate und der Zeit des Schaumaustritts sowie die erzielte Spumatmenge in % des Ausgangsvolumens.

Tab. 4-4: Abhängigkeit des Schaumaustritts und der Spumatmenge von der Gasflussrate, vom Probenvolumen und von der Säulendimensionierung

Probe	Probenvolumen [ml]	Säule	Flussrate [ml*min ⁻¹]	Schaumaustritt [min]	Spumat-/Probenvolumen [%]
1	50	klein	15----> 0-50 min	16-50	19
2	50	klein	15----> 0-16 min 30---->16-33 min	16 – 33	33
3	50	klein	30----> 0-13 min 20----> 13-45 min	13 – 45	17
4	200	groß	15---->0-148 min	45 - 148	20
5	200	groß	30----> 0-25 min 80----> 25-50 min	25 - 50	30
6	200	groß	70----> 0-12 min 30----> 12-70 min	12 - 70	21

Den jeweiligen Probenvolumen wurde die passende Säule verwendet, so dass der Abstand zwischen Probenoberfläche und Säulenende optimal blieb. Diese Wegstrecke ist für die Zerschäumung wichtig. Je länger sie ist, desto trockener wird der Schaum, beeinflusst durch den Drainage-Effekt. Allerdings soll er auch nicht übermäßig lang sein, weil dann die Koaleszenz der Gasblasen gefördert und der Austritt des Schaumes erschwert wird. Proben 1 und 4 zeigen, dass in beiden Fällen etwa die gleiche Spumatmenge entstanden ist. Die Zerschäumung von Probe 4 dauerte länger, da das Probenvolumen größer ist und entsprechend mehr Schaum entsteht.

Die Flussrate beeinflusst offensichtlich sowohl die Zerschäumungsdauer als auch die Spumatmenge. Beginnt man mit einer niedrigeren Flussrate, so erreicht der Schaum den Säulenausgang langsamer. Erhöht man aber die Flussrate, so verläuft die Zerschäumung schneller und wird früher beendet. Die entstandene Spumatmenge ist jedoch höher (Vergleich von Probe 2 mit 3 bzw. 5 mit 6). Beginnt man mit einer höheren Flussrate, die dann erniedrigt wird, so tritt der Schaum schneller aus, die Zerschäumung insgesamt aber verläuft schonender und langsamer und das Spumat ist entsprechend trockener und somit weniger voluminös.

Proben, die zu Beginn keinen stabilen Schaum ergaben, wurden zunächst bei höheren Flussraten kurz zerschäumt und dann bei niedriger Flussrate weiter geschäumt, um einen stabilen Schaum zu erzielen.

4.2.1.4 Anreicherung der Gingerole aus Ingwerextrakt

In der Regel waren die wässrigen Ingwerextrakte ($2-3 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$) ohne Zusatz von Schaumbildnern (Saponin) gut zerschäumbar. Lediglich wässrige Ingwerextrakte mit $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ wurden zur Unterstützung ihrer Schaumbildung mit Saponin versetzt. In Tab. 4-5 sind die durchgeführten Zerschäumungsversuche mit den wässrigen Extrakten des Ingwerpulvers aufgelistet.

Tab. 4-5: Die durchgeführten Zerschäumungsversuche mit wässrigen Ingwerpulverextrakten

Probe	Saponin [g]	Volumen [ml]	Säule	Schaumaustritt [min]	Gasflussrate [ml*min ⁻¹]
Versuch A					
Wässriger Extrakt von Ingwerpulver $1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	0,05	200	groß	25-40	70 - 100
Versuch B					
Wässriger Extrakt von Ingwerpulver $2 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	0	200	groß	20-50	50 - 90
Versuch C					
50 ml Rückstand von Versuch A + 150 ml Wasser	0,05	200	groß	30-70	20 - 40

A. Einfache Zerschäumung

Die Ergebnisse der Zerschäumung von wässrigen Ingwerpulverextrakten haben gezeigt, dass alle Gingerole und [6]-Schogaol im Schaum angereichert werden. Bezüglich ihrer zeitlichen Anreicherung im Schaum gab es zwischen [6]-Gingerol und den restlichen Scharfstoffen Unterschiede. Abb. 4-6 (Versuch A) zeigt die Anreicherung aller Verbindungen im Schaum. Im Rückstand verblieb jedoch noch ein Teil von [6]-Gingerol als einzige Verbindung. Mittels einer Mehrfach-Zerschäumung (Zusatz vom Saponin zum Rückstand und erneute Zerschäumung) konnte auch [6]-Gingerol quantitativ angereichert werden.

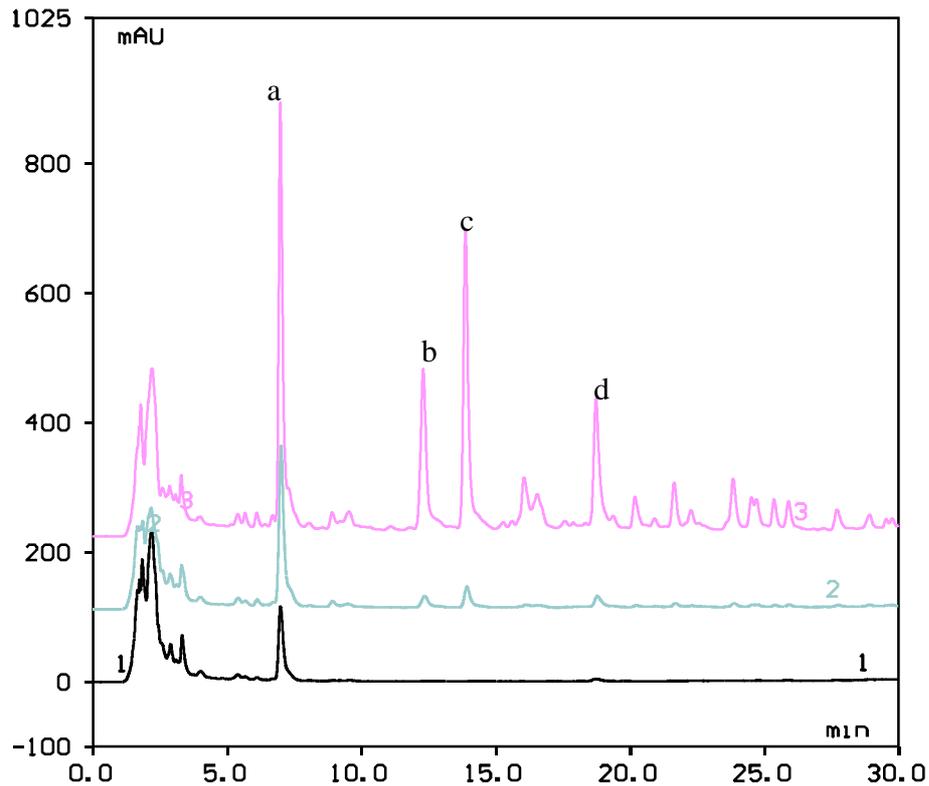


Abb. 4-6: Anreicherung von Gingerolen aus wässrigem Ingwerpulver-Extrakt mittels Zerschäumung.

1. Rückstand, 2. Ausgangsprobe, 3. Spumat (jeweils 100 μ l)
- a. [6]-Gingerol, b. [8]-Gingerol, c. [6]-Shogaol, d. [10]-Gingerol

B. Fraktionierte Zerschäumung

Um festzustellen, wie unterschiedlich schnell die einzelnen Gingerole im Schaum angereichert werden, wurde eine fraktionierte Zerschäumung durchgeführt.

Durch Koaleszenz der Schaumblasen während der Zerschäumung stellt sich ein Gleichgewicht entlang der Schaumsäule ein. Dies und der Drainage-Effekt, der von der eingestellten Flussrate abhängig ist, beeinflussen die Konzentration der Gingerole im Spumat. Daher wird mittels Kontrolle der Rückstandsproben in konstanten Zeitabständen der Einfluss dieser Faktoren ausgeschlossen. Die Kontrolle der Schaumfraktionen ergibt eine Aussage über die Anreicherung der Verbindungen im Zusammenhang mit dem Schaumverlauf bzw. der Konzentrierungsart.

- **Vergleich der zeitlichen Anreicherung der untersuchten Gingerole**

Bei Zerschäumungsversuch zeigten die nach 20, 40 und 50 min erhaltenen Schaum- und Rückstandsfraktionen folgende Ergebnisse:

Wie Abb. 4-7 zeigt, wiesen die Rückstandsproben im Verlauf der Zerschäumung nahezu identische Konzentrationen an [6]-Gingerol auf. Der Schaum wies während der ersten 40 min Zerschäumung mit einem Anreicherungsfaktor von ca. 2 ebenfalls eine gleichbleibende Konzentration an [6]-Gingerol auf. Erst gegen Ende der Zerschäumung (Spumat 3, nach 50 min) nahm die Konzentration an [6]-Gingerol im Schaum um 10 % ab (Spumat 3). Im Gegensatz zum [6]-Gingerol ließen sich [8]-, [10]-Gingerol und [6]-Shogaol rasch quantitativ anreichern. Schon der erste Rückstand (20 min) enthielt keines dieser drei Gingerole. Die erste Schaumfraktion (20 min) war am höchsten konzentriert (Anreicherungsfaktor ca. 12 für [8]-Gingerol und [6]-Shogaol). Diese Konzentration nahm dann im Verlauf der Zerschäumung ab (s. Abb. 4-8). Erst durch weitere Zerschäumung unter Saponinzusatz erfolgte die quantitative Anreicherung von [6]-Gingerol.

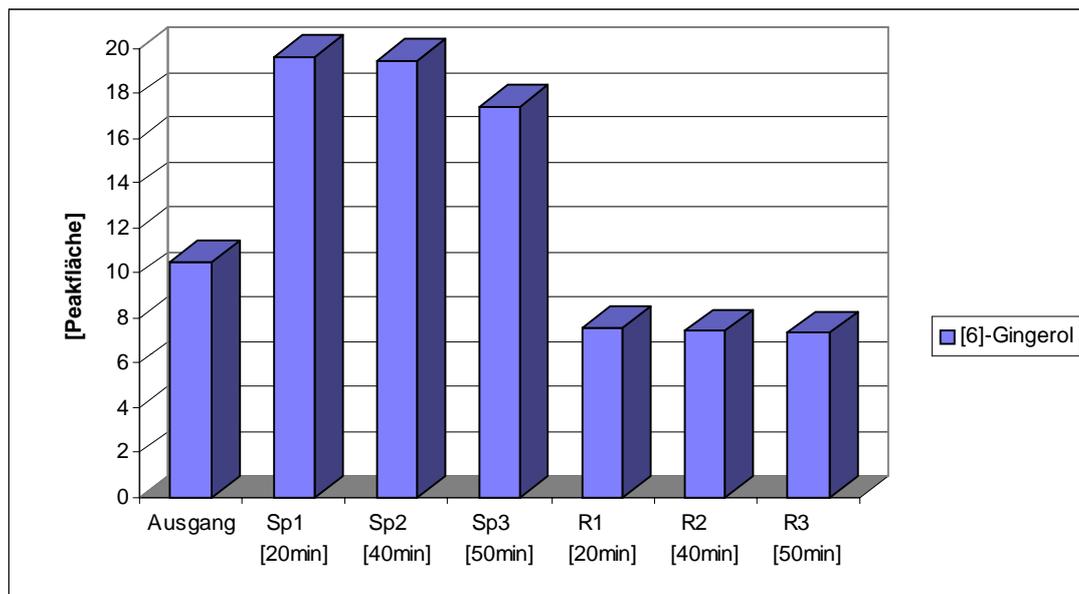


Abb. 4-7: Die zeitliche Anreicherung vom [6]-Gingerol aus dem wässrigen Extrakt von Ingwerpulver (Sp = Spumat, R = Rückstand).

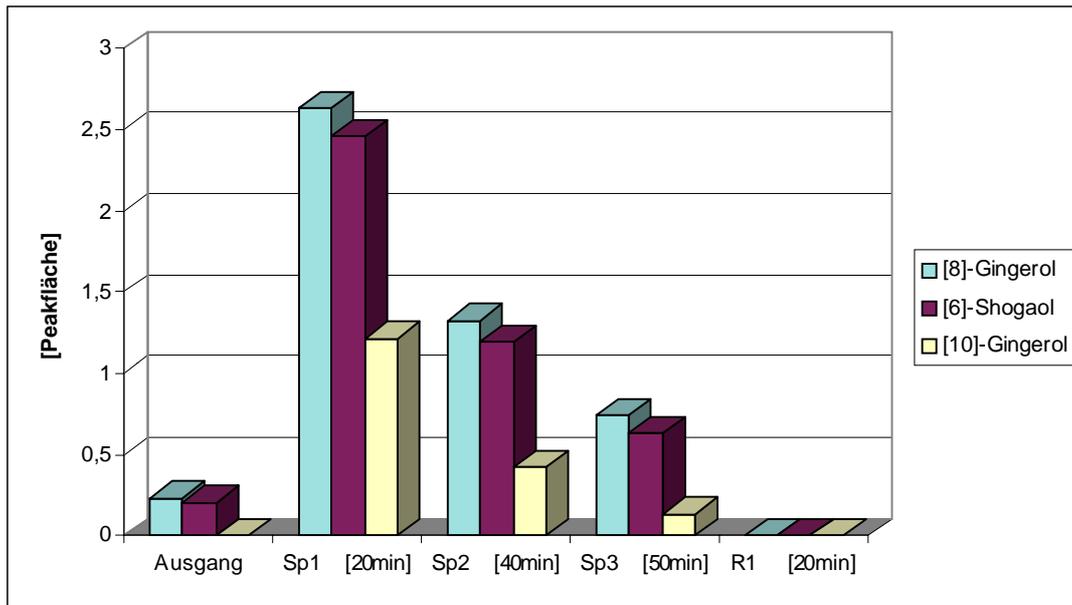


Abb. 4-8: Die zeitliche Anreicherung vom [8]-Gingerol, [6]-Shogaol und [10]-Gingerol aus dem wässrigen Extrakt von Ingwerpulver. Sp: Spumat, R: Rückstand

- **Anreicherung von [6]-Gingerol aus einer verdünnten Probe:**

Die Probe in Versuch C ist der Rückstand eines wässrigen Extraktes von Ingwerpulver, der als Scharfstoff nach der Zerschäumung nur noch [6]-Gingerol enthielt. Um in verdünnter Probe die Zerschäumung durchführen zu können, wurde dieser Rückstand 4-fach mit Wasser verdünnt und anschließend unter Saponinzusatz zerschäumt. Während bei den bisher durchgeführten Versuchen die Spumatproben im Verlaufe der Zerschäumung etwa gleich konzentriert waren und ebenso der Rückstand (s. Abb. 4-7), erfolgte in der verdünnten Probe die Anreicherung vor allem zu Beginn der Zerschäumung, um dann kontinuierlich abzunehmen.

Bei der Zerschäumung einer sehr verdünnten Probe müsste die Konzentration der Scharfstoffe im Spumat 1 > Spumat 2 sein, wenn der Konzentrierungseffekt aufgrund der Kollat-Bildung im Gegenstromprinzip unberücksichtigt bleibt. Bei der Zerschäumung von konzentrierten Proben dagegen sollte Spumat 1 = Spumat 2 sein. Ergebnisse dieses Versuchs aber ist, dass die Konzentration Sp 4 > Sp 3 > Sp 2 > Sp 1 ist. Das Spumatvolumen (Sp 1: 3,61 g; Sp 2: 2,53 g; Sp 3: 1,68 g und Sp 4: 1,62 g) nahm bei unveränderter Gasflussrate im Verlauf der Zerschäumung ab, da der Schaumzerfall immer stärker wurde und die Schaumsäule immer langsamer stieg. Der Drainageeffekt wurde hier begünstigt, der Schaum wurde immer trockener und somit auch angereicherter, was eine Erhöhung der Konzentration an Scharfstoffen im Spumat zur Folge hatte.

4.2.1.5 Anreicherung der Gingerole aus der Standardlösung

Die Zerschäumungsversuche mit den wässrigen Extrakten von Ingwerpulver zeigten, dass [6]-, [8]- und [10]-Gingerol sowie [6]-Shogaol schaumaktive Verbindungen sind und sich im Schaum anreichern lassen. Bemerkenswert war jedoch das unterschiedliche Verhalten von [6]-Gingerol gegenüber den anderen Scharfstoffen. Im Ingwerextrakt war [6]-Gingerol um ein Vielfaches höher konzentriert als die anderen Scharfstoffe, was einen Einfluss auf sein Anreicherungsverhalten ausübte, wie unter 4.2.1.4 gezeigt wurde. Dass aber dieses Verhalten nicht alleine auf die höhere Konzentration zurückzuführen ist, konnte erst durch Versuche mit Standardlösungen festgestellt werden, bei denen alle Gingerole in gleicher Konzentration in der Probe vorlagen und unter den gleichen Bedingungen zerschäumt wurden.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Konzentration des zugesetzten Schaumhilfsmittels Saponin näher untersucht. In Tab. 4-6 sind die Gehalte der Gingerole in den Rückstandsproben der Versuche A bis J prozentual, bezogen auf den jeweiligen Gehalt der Ausgangsprobe, angegeben.

Auch der Einfluss der Gasflussrate und des pH-Wertes auf die Zerschäumung und die Anreicherung der Scharfstoffe wurde untersucht. Die Versuche mit den Ergebnissen sind in den jeweiligen Abschnitten beschrieben.

Zerschäumungsbedingungen der Versuche A bis J (s. Tab. 4-6):

Säule: mittel

Probenvolumen: 100 ml

Gasflussrate: 20 ml*min⁻¹, am Ende der Zerschäumung: 100 ml*min⁻¹

Proben, die alle drei Gingerole enthalten, werden mit „**Mix**“ bezeichnet. Ihre Gingerole sind in den Abbildungen mit „G-mix“ bezeichnet, z.B. 6G-mix, 8G-mix oder 10G-mix.

Die erhaltenen Schaumfraktionen aus Versuch D, bei dem alle drei Gingerole in gleicher Konzentration in der Ausgangsprobe enthalten waren, zeigten unterschiedliche Gehalte an einzelnen Gingerolen (s. Abb. 4-9). So reicherte sich [10]-Gingerol schon in der ersten Schaumfraktion quantitativ an, erhalten in den ersten 5 min nach dem Schaumaustritt aus der Säule. [8]-Gingerol reicherte sich dagegen kontinuierlich im Schaum an. Erst in den letzten Schaumfraktionen erfolgte die Anreicherung von [6]-Gingerol. Besonders die letzte Schaumfraktion war stark angereichert mit [6]-Gingerol und enthielt keines der bereits angereicherten, anderen Gingerole mehr. Diese starke Anreicherung von [6]-Gingerol in der letzten Fraktion ist damit zu begründen, dass sich [6]-Gingerol relativ spät im Schaum

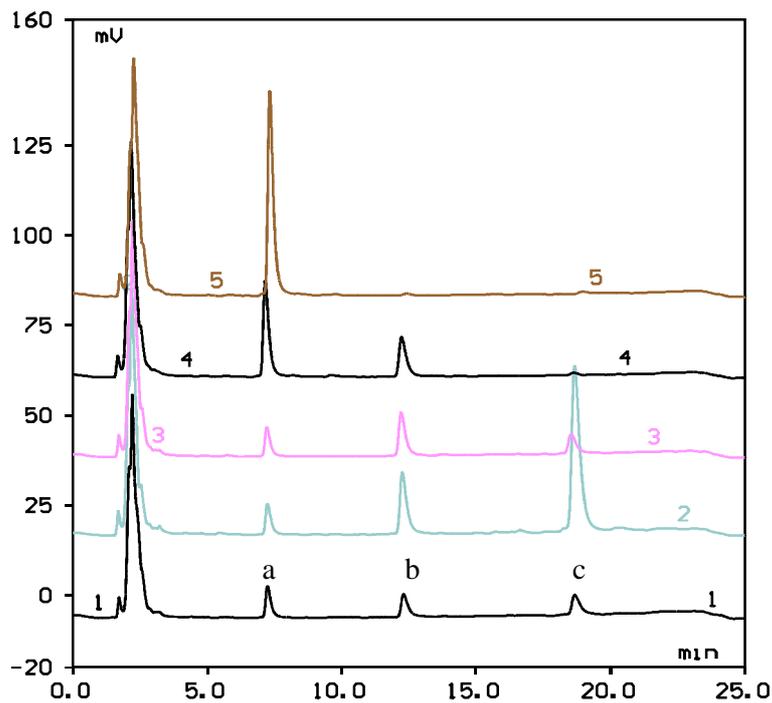


Abb. 4-9: Zeitlicher Verlauf der Anreicherung der Gingerole im Schaum aus der Gingerol-Standardlösung mittels Zerschäumung

a. [6]-Gingerol, b. [8]-Gingerol, c. [10]-Gingerol
 1. Ausgangsprobe, 2. Sp 1 (17-20 min), 3. Sp 3 (50-68 min),
 4. Sp 6 (105-115 min) 5. Sp 7 (115-125 min). Sp = Spumatfraktion

Vergleich der Anreicherung von [6]-Gingerol und [6]-Shogaol

Eine wässrige Probe mit ca. $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [6]-Gingerol und [6]-Shogaol wurde unter Zusatz von Saponin zerschäumt. In Abb. 4-10 wird der zeitliche Verlauf der Anreicherung von [6]-Gingerol und [6]-Shogaol anhand der Rückstandsfraktionen verglichen. [6]-Shogaol nimmt im Gegensatz zu [6]-Gingerol im Rückstand rasch innerhalb der ersten 20 min ab. Auch die Spumatproben zeigten eine höhere Anreicherung von [6]-Shogaol gegenüber [6]-Gingerol.

Im Rahmen eines weiteren Versuches, bei dem [6]-Shogaol in gleicher Konzentration wie [10]-Gingerol in der Probe enthalten war, reicherte sich [10]-Gingerol schneller als [6]-Shogaol an. Das Verhalten von [6]-Shogaol war bei den durchgeführten Versuchen mit Ingwerpulver und Standardproben ähnlich wie das von [8]-Gingerol. Aus Mangel an [6]-Shogaol als Referenzsubstanz konnten keine weiteren Versuche damit durchgeführt werden.

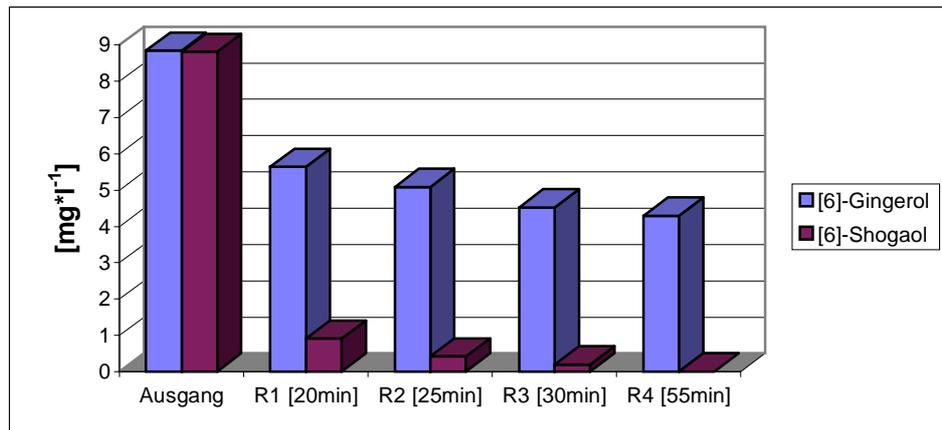


Abb. 4-10: Anreicherung von [6]-Shogaol gegenüber [6]-Gingerol aus der Standardlösung mit gleicher Ausgangskonzentration. (R = Rückstand)

4.2.1.6 Einfluss der Gingerole aufeinander bezüglich ihrer Anreicherung im Schaum bei der Zerschäumung

Anhand der Versuche A, B, C, D, I und J wurde überprüft, ob die Gingerole sich bei der Zerschäumung gegenseitig beeinflussen. Die drei Gingerole wurden jeweils einzeln (Versuche A, B und C), gemeinsam (Versuch D) bzw. paarweise (Versuche I und J) in der Probe vorliegend, zerschäumt (s. Tab. 4-6 und Abb. 4-11 bis Abb. 4-14).

Wie unterschiedlich die drei Gingerole sich im Schaum bei der Zerschäumung anreichern, zeigen besonders die Abb. 4-11 und Abb. 4-12 deutlich. Die Versuche, in denen die Gingerole jeweils einzeln in der Probe vorlagen, zeigen, dass [10]-Gingerol sich schneller als [8]-Gingerol im Schaum anreichern lässt und dieses sich wiederum schneller als [6]-Gingerol (s. Abb. 4-11).

Sind [8]-Gingerol und [6]-Gingerol neben [10]-Gingerol in einer Probe („mix-G“) enthalten, so reichern sich [6]-Gingerol und [8]-Gingerol nicht nur langsamer an als [10]-Gingerol (s. Abb. 4-12), sondern auch langsamer, als wenn sie in der Probe einzeln vorliegen. [10]-Gingerol dagegen verhält sich hier ähnlich, wie in der Einzelprobe (Vergleich Abb. 4-11 mit Abb. 4-12). Dies zeigt, dass [10]-Gingerol die Anreicherung von [6]-Gingerol und [8]-Gingerol beeinflusst, und zwar verzögert.

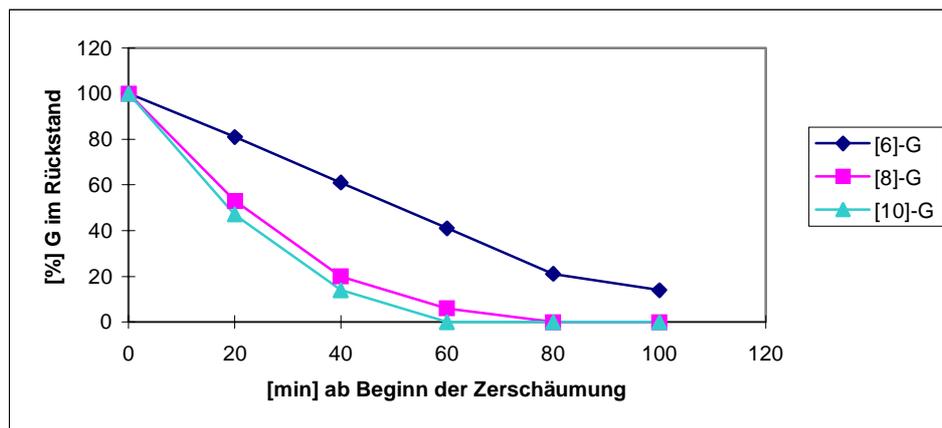


Abb. 4-11: Abnahme der Gingerole im Rückstand während der Zerschäumung, wenn jede Verbindung einzeln in der Probe vorliegt. (Versuch A, B, C)

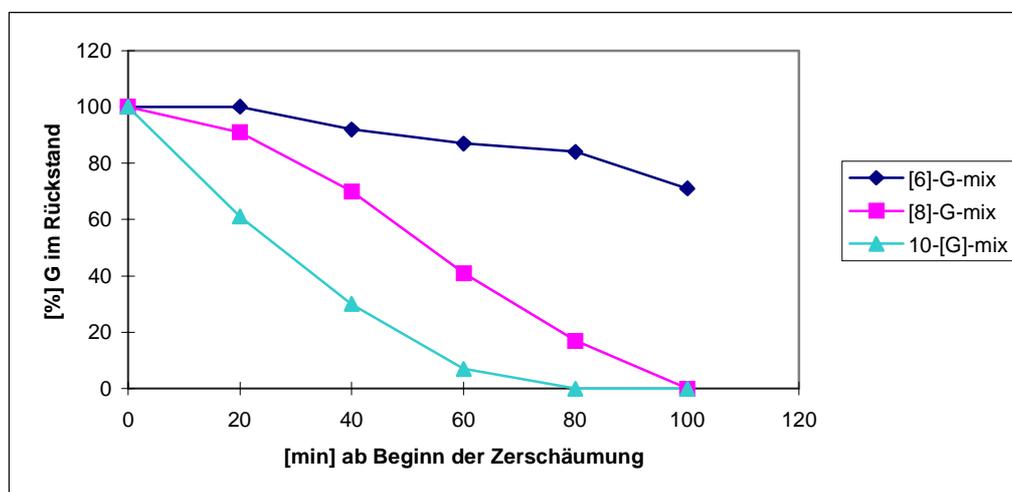


Abb. 4-12: Abnahme der Gingerole im Rückstand während der Zerschäumung, wenn alle Verbindungen in gleicher Konzentration in der „G-,„Mix“-Probe nebeneinander enthalten sind (Versuch D).

Wenn man davon ausgeht, dass die weniger polaren Verbindungen mit den stärker polaren konkurrieren, so müsste auch [8]-Gingerol mit dem polareren [6]-Gingerol konkurrieren und seine Anreicherung verzögern. So wurde in dem Versuch J, in dem [8+10]-Gingerol in der Probe enthalten sind, der Einfluss von [10]-Gingerol auf [8]-Gingerol und in dem Versuch I, in dem [8+6]-Gingerol in der Probe enthalten sind, der Einfluss von [8]-Gingerol auf [6]-Gingerol beobachtet (s. Abb. 4-13 und Abb. 4-14). Daraus folgt, dass [10]-Gingerol die Anreicherung von [8]-Gingerol und [6]-Gingerol verzögert und [8]-Gingerol die Anreicherung von [6]-Gingerol verzögert. [6]-Gingerol hat keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Anreicherung der beiden anderen Gingerole.

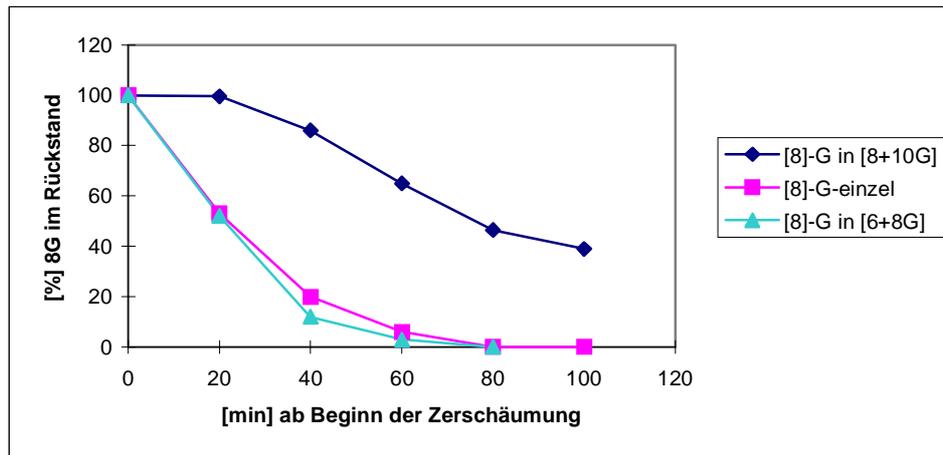


Abb. 4-13: Abnahme von [8]-Gingerol im Rückstand während der Zerschäumung, wenn [8]-Gingerol einmal einzeln, einmal mit [10]-Gingerol und einmal mit [6]- und [10]-Gingerol („Mix“) in gleicher Konzentration in der Probe vorliegt (Versuche B, J und D)

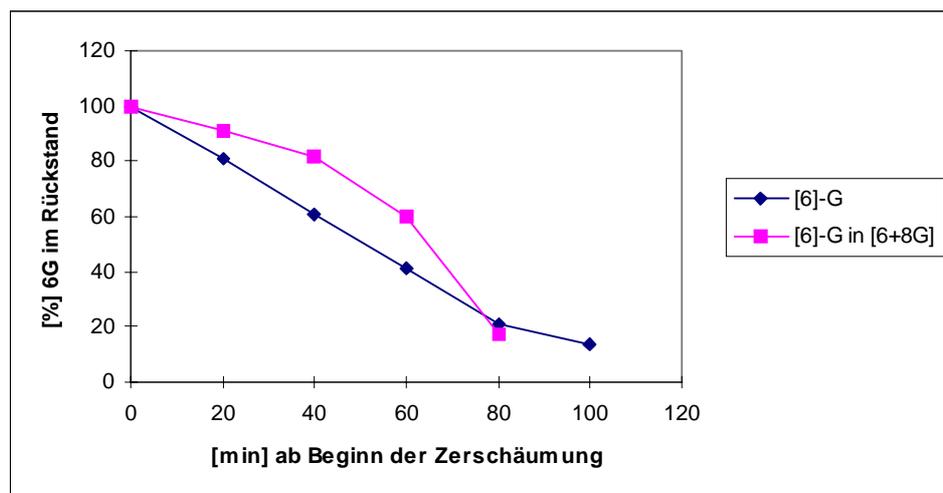


Abb. 4-14: Abnahme von [6]-Gingerol im Rückstand während der Zerschäumung, wenn [6]-Gingerol einmal einzeln und einmal mit [8]-Gingerol in gleicher Konzentration in der Probe vorliegt (Versuche A und I)

Weiter wurde beobachtet, dass in einer [6+8+10]-Gingerol-„Mix“-Probe das [10]-Gingerol sich relativ rasch zu Beginn der Zerschäumung anreichert, [8]-Gingerol dagegen kontinuierlich und [6]-Gingerol erst gegen Ende einer Zerschäumung. Eine stärkere Abnahme von [8]-Gingerol war i.d.R. zu beobachten, wenn [10]-Gingerol nicht mehr in der Probe vorhanden war, und ebenso nahm [6]-Gingerol am stärksten im Rückstand ab, wenn [8]-Gingerol nicht mehr in der Probe vorlag.

4.2.1.7 Einfluss der Konzentration von schaumaktiven Verbindungen (Gingerole) und Schaumbildnern (Saponin) auf die Zerschäumung

Um den Einfluss der Gingerol-Konzentration auf die Anreicherung der Gingerole zu überprüfen, wurden sowohl Proben mit jeweils einer der drei Gingerole („einzeln“; Tab. 4-7 Teil I und II) als auch Proben mit allen drei Gingerolen („mix“; Tab. 4-7 Teil III und IV) in denen sie in gleicher Konzentration vorlagen, herangezogen und unter Variation der Gingerol-Konzentration zerschäumt. Die Probenkonzentration von $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ konnte aus Mangel an [8]- und [10]-Gingerol-Standardsubstanz nur mit [6]-Gingerol erfolgen.

Um den Einfluss der Saponin-Konzentration auf die Anreicherung der Gingerole zu überprüfen, wurden Proben mit gleicher Zusammensetzung und Konzentration an Gingerolen, jedoch unterschiedlicher Saponin-Konzentration, zerschäumt und miteinander verglichen (Vergleich Tab. 4-7 Teil I mit II bzw. Teil III mit IV). Es wurden die Zerschäumungsdauer, die Spumatmenge, der zeitliche Anreicherungsverlauf der Gingerole und die Konzentration der Gingerole im Rückstand am Ende der Zerschäumung beobachtet.

A. Einfluss der Konzentration der Gingerole auf:

- Zerschäumungsdauer:

Es konnte kein eindeutiger Einfluss der Konzentration der Gingerole auf die Zerschäumungsdauer festgestellt werden.

- Spumatmenge:

Sie war leicht erhöht mit Erhöhung der Konzentration an Gingerolen.

- Zeitlicher Verlauf der Anreicherung:

Die Proben mit $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ und $13 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [6]-Gingerol zeigten schnellere Anreicherung für [6]-Gingerol als die Probe mit $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [6]-Gingerol. Ebenso erfolgte bei „mix“-Proben [6+8+10]-Gingerol die Anreicherung schneller bei Proben mit niedrigerer Konzentration ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) als bei Proben mit höherer Konzentration ($12\text{-}15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

- Prozentuale Anreicherungsausbeute:

Sie war niedriger bei höheren Konzentrationen. Bei der Zerschäumung von $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [6]-Gingerol-Proben waren am Ende noch 75 % des [6]-Gingerols im Rückstand enthalten. Bei der Zerschäumung von [6+8+10]-Gingerol „mix“-Proben mit der Ausgangskonzentration $12\text{-}15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zu einer geringeren Anreicherung von [6]-Gingerol im Vergleich zu der Probe mit der Konzentration $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

B. Einfluss der Konzentration des zugesetzten Schaumbildners Saponin auf die Anreicherung der Gingerole:

Höhere Saponin-Konzentrationen führten zu längerer Zerschäumungsdauer, höheren Spumatmengen und einer höheren Anreicherung der Gingerole (Tab. 4-1). Ein eindeutigen Einfluss der Saponin-Konzentration auf den zeitlichen Anreicherungsverlauf der Gingerole war nicht feststellbar (s. Abb. 4-15)

Abb. 4-15 zeigt beispielhaft die zeitliche Anreicherung von [8]-Gingerol aus [6+8+10]-Gingerol-„Mix“-Proben. Die Proben enthielten verschiedene Gingerol- und Saponin-Konzentrationen (s. Tab. 4-6, Versuche D-H). Man kann eindeutig erkennen, wie die Anreicherung des [8]-Gingerols bei der Zerschäumung der verdünnten Proben F und H ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) schneller erfolgt als bei der Zerschäumung von höher konzentrierten Proben: D ($15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), E ($12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) und G ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Auch hier kann man keinen Einfluss der Saponin-Konzentration auf die zeitliche Anreicherung der Gingerole feststellen. Die Saponin-Konzentration ist in der Probe F mit $0,04 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ niedriger als in der Probe H mit $0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$. Beide Proben jedoch zeigen einen ähnlichen zeitlichen Kurvenverlauf in Abb. 4-15.

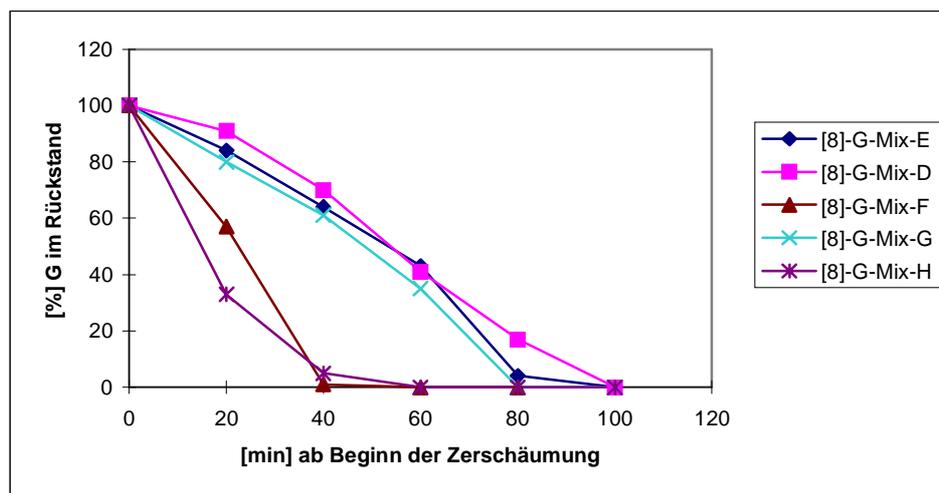


Abb. 4-15: Zeitliche Anreicherung von [8]-Gingerol aus [6+8+10]-Gingerol-„Mix“-Proben mit verschiedenen Gingerol- und Saponin-Konzentrationen in der Probe (s. Tab. 4-6, Versuche D-H)

Tab. 4-7: Einfluss der Konzentration der Gingerole und des Saponins auf die Zerschäumung der Gingerole.

(Probenvolumen: 100 ml, Säule: mittel, Gasflussrate: 20 ml*min⁻¹, gegen Zerschäumungsende: 100 ml*min⁻¹. Die Konzentration im Rückstand in % bezieht sich auf die Konzentration der Ausgangsprobe)

I
[6]-Gingerol, 0,035 g Saponinzusatz

Probenkonzentration	4 mg*l ⁻¹	12 mg*l ⁻¹	100 mg*l ⁻¹
Dauer der Zerschäumung [min]	45	45	50
Spumat [g]	5	7	7,5
	[6]-G	[6]-G	[6]-G
Konzentration im Rückstand [%]			
nach 20 min	73	75	92
40 min	43	46	90
50 min	21	32	75
% im Rückstand am Ende	21	32	75

II
[6]-Gingerol, 0,1 g Saponinzusatz

Probenkonzentration	4 mg*l ⁻¹	16 mg*l ⁻¹	100 mg*l ⁻¹
Dauer der Zerschäumung [min]	90	95	100
Spumat [g]	20	20	25
	[6]-G	[6]-G	[6]-G
Konzentration im Rückstand [%]			
nach 20 min	78	81	88
40 min	40	61	76
60 min	13	41	60
% im Rückstand am Ende	7	14	60

III
[6+8+10]-Gingerol, 0,04 g Saponinzusatz

Probenkonzentration	4 mg*l ⁻¹			12-13 mg*l ⁻¹		
Dauer der Zerschäumung [min]	75			90		
Spumat [g]	9			16		
	[6]-G	[8]-G	[10]-G	[6]-G	[8]-G	[10]-G
Konzentration im Rückstand [%]						
nach 20 min	94	57	24	96	84	49
40 min	73	0,7	0	94	64	14
60 min	51	0	0	84	28	0
80 min				78	4	0
90 min				80	0	0
% im Rückstand am Ende	43	0	0	80	0	0

IV
[6+8+10]-Gingerol, 0,1g Saponinzusatz

Probenkonzentration	4 mg*l ⁻¹			15 mg*l ⁻¹		
Dauer der Zerschäumung [min]	70			104		
Spumat [g]	23			26		
	[6]-G	[8]-G	[10]-G	[6]-G	[8]-G	[10]-G
Konzentration im Rückstand [%]						
nach 20 min	90	33	0	100	91	61
40 min	65	0	0	92	70	30
60 min	30	0	0	87	41	7
80 min				84	17	0
100 min				71	0	0
% im Rückstand am Ende	22	0	0	71	0	0

Tab. 4-8: Die absoluten Gehalte der Schaumfraktionen an Gingerolen unter Einfluss der Konzentration der zerschäumten Probe an Gingerolen und Saponin

(A)

	[6]-Gingerol einzeln		[6]-Gingerol in [6+8]-G	
	Saponinzusatz			
[6]G [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	$0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	$0,035 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	$0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	$0,035 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$
	mg [6]-Gingerol / 5 g Spumat			
4	0,1	0,16		
15	1,17	0,21	0,14	0,19
100	0,6	0,8		

(B)

	[8]-Gingerol einzeln		[8]-Gingerol in [6+8]-G	
	Saponinzusatz			
6G [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	$0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	$0,035 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	$0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$	$0,035 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$
	mg [8]-Gingerol / 5g Spumat			
15	0,5	0,52	0,5	0,51

(C)

[6+8+10]-Gingerole „mix“ je $12-13 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$					
$0,15 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ Saponinzusatz			$0,04 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ Saponinzusatz		
mg Gingerol / 5 g Spumat					
[6]-G	[8]-G	[10]-G	[6]-G	[8]-G	[10]-G
0,05	0,20	0,75	0,04	0,24	0,8

Tab. 4-8 zeigt, dass der absolute Gehalt eines Gingerols im Schaum stoffspezifisch und von der Gingerol-Konzentration in der Ausgangsprobe abhängig ist. [10]-Gingerol mit einer höheren „stoffspezifischen Konstante“ beeinflusst den Gehalt des Spumats an [8]- und [6]-Gingerol. So ist der Gehalt an [8]-Gingerol in der Schaumfraktion, erhalten durch Zerschäumung der Probe, in der [8]- neben [10]-Gingerol vorliegt, niedriger als in der Schaumfraktion, erhalten bei der Zerschäumung der Probe, in der [8]-Gingerol einzeln vorliegt. Das gleiche gilt für [6]-Gingerol.

Der absolute Gehalt eines Gingerols im Schaum ist nicht direkt abhängig von dem Schaumbildner (Saponin). Niedrigere Saponin-Konzentrationen erhöhen den absoluten Gehalt einer Verbindung im Schaum insofern, als sie trockenen Schaum liefern.

Wiederfindungsrate der Gingerole nach der Zerschäumung

Die Gingerole sind bei der Zerschäumung stabil. Dies ist aus ihrer Wiederfindungsrate nach der Zerschäumung erkennbar. So betrug sie für [6]-Gingerol 97 %, [8]-Gingerol 82 %, [10]-Gingerol 95 % und [6]-Shogaol 86 %.

4.2.1.8 Einfluss der Gasflussrate auf die Zerschäumung

Tab. 4-9: Zerschäumung von [6]-Gingerol-Standardlösung (ca. $12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$; 0,035g Saponinzusatz bei verschiedenen Gasflussraten (Säule: mittel, Probenvolumen: 100 ml)):

Gasflussrate [$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$]	40	70	100
Dauer der Zerschäumung [min]	30	15	12
Spumat [g]	13	23	29
Konzentration im Rückstand [%]			
nach 20 min	82	50	25
am Ende der Zerschäumung	38	50	25

Eine Erhöhung der Gasflussrate bewirkt:

- Verkürzung der Zerschäumungsdauer (d.h. Ende der Schaumbildung trat früher ein)
- Schnellere Anreicherung
- Höhere prozentuale Anreicherungsausbeute
- Erhöhung des Spumatvolumens und Erniedrigung des Anreicherungsfaktors

Die länger dauernde Zerschäumung (Flussrate $40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) führte zu einer höher quantitativen Anreicherung als die Zerschäumung bei $70 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Bei einer Gasflussrate von $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ jedoch erfolgte in kürzerer Zeit eine Anreicherung von 75 % des [6]-Gingerols vor Abbruch der Zerschäumung. Durch Erhöhung der Gasflussrate von 20 auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ gegen Ende der Zerschäumung aller Gingerole-Proben erfolgte i.d.R. eine immer stärkere Anreicherung der Gingerole, was an der Abnahme in den Rückstandsproben zu beobachten war.

Somit ist eine Erhöhung der Gasflussrate zwar günstig für eine hohe Ausbeute und schnelle Anreicherung, nicht aber für den Anreicherungsfaktor, der mit Erhöhung der Spumatmenge proportional abnimmt.

4.2.1.9 Einfluss des pH-Wertes auf die Zerschäumung

100 ml Wasser + 0,04 g bzw. 0,1 g Saponin (pH-Wert ca. 5) wurde mit HCl bzw. NaOH auf einen pH-Wert von 1 bis 12 eingestellt und mit [6]-Gingerol-Standard versetzt (ca. $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Zerschäumung erfolgte in der mittleren Säule bei einer Gasflussrate von $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bis zum Abbruch der Schaumbildung und Zerfall der Schaumsäule (Spumatfraktion 1), dann wurde die Gasflussrate auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ erhöht und die Probe weiter bis zum Ende der Schaumentstehung zerschäumt (Spumatfraktion 2).

4.2.1.9.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Schaumbildung und Stabilität von Saponin

Die Stabilität von Saponin im sauren und alkalischen Milieu:

Die HPLC/UV-Analysen zeigen, dass Saponin innerhalb eines breiten pH-Spektrums (pH 3 bis pH 11) stabil bleibt. Erst im stark sauren Medium (bei pH 1) und im stark alkalischen Medium (bei pH 12) wurden Abbauprodukte von Saponin beobachtet (s. Abb. 4-16).

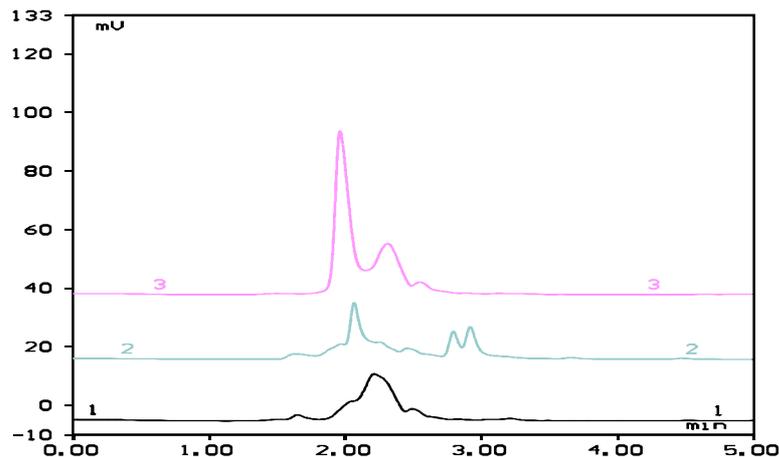


Abb. 4-16: Abbau von Saponin ($0,04\text{g}\cdot(100\text{ ml})^{-1}$, $\text{pH} = 5,2$) in wässriger Probe im stark sauren und stark alkalischen Milieu:

1. pH 5,2 2. pH 12,2 3. pH 1

Einfluss des pH-Wertes der Probe auf die Schaumbildung:

Beobachtet wurde bei den einzelnen Versuchen die Schaumbildung, -stabilität und -geschwindigkeit, die Zerschäumungsdauer sowie die Spumatmenge.

Wässrige Proben von [6]-Gingerol mit einer Konzentration von $0,04\text{ g}\cdot(100\text{ ml})^{-1}$ Saponin wurden bei pH-Werten von 1 bis 13 zerschäumt. Während Saponin bei pH 3 bis pH 11 stabil blieb und die Zerschäumung ähnlich verlief, konnte bei pH 1 und pH 12 wesentlich schlechter bzw. bei pH 13 überhaupt nicht mehr zerschäumt werden, was auf den Abbau von Saponin (s. Abb. 4-16) zurückzuführen ist. So war die Schaumsäule bei pH 1 sehr dünn und erlitt schon nach 20 min einen Abbruch. Bei pH 12 war die Schaumsäule ebenso dünn, und bereits 16 min verlief sie unregelmäßig und insgesamt schlechter als bei pH 1.

Die Erhöhung der Saponinkonzentration von $0,04\text{g}$ auf $0,1\text{ g}\cdot(100\text{ ml})^{-1}$ und die Zerschäumung bei pH 1, 12 und 5 zeigten, dass bei pH 1 die Zerschäumung trotz des

Teilabbaus von Saponin gut und stabil verlief, jedoch kürzer als bei pH 5. Die Zerschäumung bei pH 12 verlief zwar besser und stabiler als mit $0,04 \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ Saponin, aber schlechter als die bei pH 1 und 5.

Dies wird mit der unterschiedlichen Art des Abbaus (saure und alkalische Hydrolyse) von Saponin bei pH 1 und 12 zu erklären sein (s. Abb. 4-16).

4.2.1.9.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Anreicherung von [6]-Gingerol

[6]-Gingerol wurde unter Zusatz von $0,04 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ bzw. $0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ im alkalischen und sauren Melieu zerschäumt. Die Anreicherung von [6]-Gingerol wurde über den prozentualen Gehalt in den Rückstandsproben bezogen auf die Ausgangsprobe, untersucht. Tab. 4-10 zeigt die Werte im Rückstand nach der Zerschäumung bei Gasflussrate von $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ und nach Erhöhung der Gasflussrate auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tab. 4-10: Anreicherung von [6]-Gingerol im sauren und alkalischen Melieu

pH-Wert	0,04 g*(100 ml) ⁻¹ Saponinzusatz							0,1 g*(100 ml) ⁻¹ Saponinzusatz		
	1	3	5	7	9	11	12	1	5	12
[6]-Gingerol im Rückstand [%]										
Gasflussrate* 20 ml*min ⁻¹	82	30	39	57	56	72	98	45	14	92
Gasflussrate 100 ml*min ⁻¹	46	-	-	37	21	58	86,5	0	2	80

* Die Gasflussrate wurde gegen Ende der Schaumbildung auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ erhöht.

Die Konzentration von [6]-Gingerol nahm im Rückstand der Zerschäumung bei einer Gasflussrate von $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ von pH 3 bis pH 12 kontinuierlich zu (s. Abb. 4-17). Bei pH 1 und $0,04 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ Saponinzusatz betrug die Konzentration im Rückstand der Probe mit einer Gasflussrate von $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 82 %. Dies hängt mit der schlechten Zerschäumbarkeit und dem frühzeitigen Ende der Zerschäumung zusammen. Unter Erhöhung der Gasflussrate auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ wurde die Zerschäumung fortgesetzt und die Rückstandskonzentration von [6]-Gingerol konnte auf 46 % reduziert werden. Die Zerschäumung bei pH 12 mit einer Gasflussrate von $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ führte zu keiner Anreicherung (99,5 % im Rückstand). Eine Erhöhung der Gasflussrate auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ konnte die Anreicherung nur unwesentlich verbessern (86,5 % [6]-Gingerol im Rückstand).

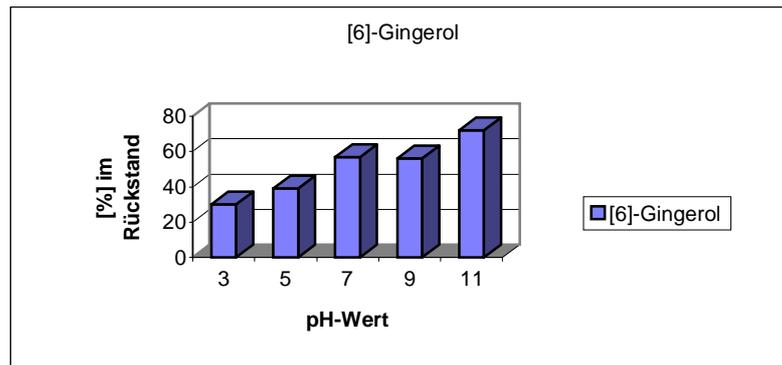


Abb. 4-17: Konzentration in [%] von [6]-Gingerol im Rückstand in Abhängigkeit vom pH-Wert der Probe ($0,04 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ Saponin, Gasflussrate $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

Sehr deutlich wird der Unterschied beim Vergleich der Zerschäumung bei den pH-Werten 1, 5 und 12 und $0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ Saponinzusatz. Während nach 60 min die Konzentration von [6]-Gingerol im Rückstand der Zerschäumung bei pH 1 und pH 5 nur 46 % bzw. 41 % betrug, lag sie bei pH 12 sehr hoch (92 %). Der zeitliche Anreicherungsverlauf von [6]-Gingerol war bei pH 1 und pH 5 sehr ähnlich (s. Abb. 4-18). Da die Zerschäumung mit der Gasflussrate von $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bei pH 5 länger dauerte (100 min) als bei pH 1 (60 min), erfolgte bei pH 5 mit 14 % [6]-Gingerol im Endrückstand eine höhere Anreicherung als bei pH 1 mit 45 %. Bei Erhöhung der Gasflussrate auf $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ erfolgte eine Anreicherungsverbesserung des [6]-Gingerols in beiden Fällen (pH 1 und 5). Bei pH 12 und einer Gasflussrate von $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ verblieben 80 % [6]-Gingerol im Rückstand der Zerschäumung.

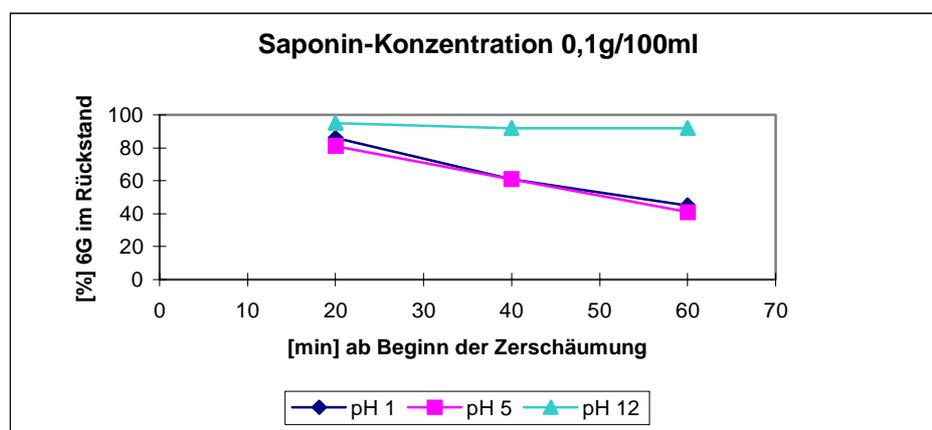


Abb. 4-18: Konzentration der Rückstandsproben an [6]-Gingerol in [%] bei der Zerschäumung in Abhängigkeit von der Zeit (20-60 min). ($0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ Saponinzusatz, Gasflussrate $100 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

4.2.2 Antioxidantien aus Rosmarin

Nach Charakterisierung der im Schaum angereicherten Antioxidantien wurden zunächst die Extraktionsbedingungen untersucht, um die Ausbeute an Carnosolsäure bei der wässrigen Extraktion von Rosmarinpulver zu erhöhen. Dazu wurde die Stabilität der Carnosolsäure im sauren und alkalischen, wässrigen Medium untersucht und daraus der optimale pH-Wert für die Zerschäumung bestimmt. Ferner wurde der zeitliche Anreicherungsverlauf der Carnosolsäure durch fraktionierte Zerschäumung bestimmt. Zuletzt wurde überprüft, ob der wertgebende Inhaltsstoff Rosmarinsäure ebenfalls im Schaum angereichert werden kann.

4.2.2.1 Charakterisierung der Carnosolsäure

- **Aufnahme eines hydrodynamischen Voltagramms**

Da ein hydrodynamisches Voltagramm substanzspezifisch ist, wurde sowohl von der Carnosolsäure aus der Carnosolsäure-Standardlösung sowie von der angereicherten Hauptverbindung im Spumat eines wässrigen Extraktes von Rosmarinpulver ein Voltagramm aufgenommen. Die Verbindungen in beiden Proben ergaben identische Voltagramme (s. Abb. 4-19).

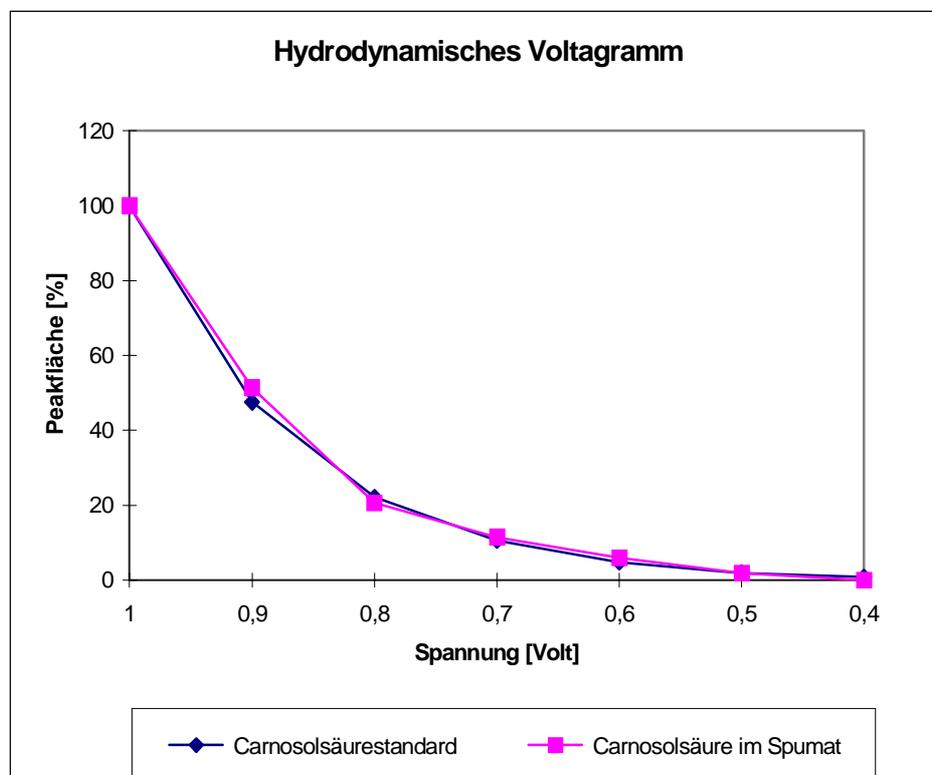


Abb. 4-19: Hydrodynamisches Voltagramm von Carnosolsäure im Spumat des wässrigen Extraktes aus Rosmarinpulver im Vergleich zur Carnosolsäure aus der Carnosolsäure-Standardlösung

- **HPLC-MS/MS-Messung**

Zur Identifizierung der Carnosolsäure sowie von Carnosol (Abbauprodukt der Carnosolsäure) und Carnosolsäuremethylester wurden das Spumat, erhalten bei die Zerschäumung eines wässrigen Rosmarinpulverextrakts, und eine methanolische Lösung von Stabiloton (ein Rosmarin-HD-Extrakt mit einem definierten Gehalt an Carnosolsäure) mit Hilfe der HPLC-MS/MS-Kopplung analysiert.

Die Trennung der Antioxidantien erfolgte an einer RP-18-Säule. Die Detektion erfolgte mit einem Triple-Quadrupole Massenspektrometer. Bei dieser sanften Ionisierungsmethode erhält man im ersten MS (MS1) Informationen über die Molekülmasse (neg. Ionisation). Für Informationen über struktur-spezifische Fragmente wird im zweiten MS das ausgesuchte Hauptmolekül (M-1) durch Anlegen eines bestimmten Potentials (hier 35 eV) fragmentiert.

Anhand der MS- und MS/MS-Spektren konnten die Antioxidantien eindeutig identifiziert werden. Es handelte sich bei der Hauptverbindung in Spumat- und Stabilotonprobe um Carnosolsäure. Als Nebenverbindungen, die im Schaum mitangereichert werden, wurden Carnosol und Carnosolsäuremethylester identifiziert. Die MS- und MS/MS Spektren der drei Verbindungen sind in den Abb. 4-20 bis Abb. 4-22 dargestellt.

Durch die negative chemische Ionisation (APCI-Modus) wurden folgende MS-Werte erhalten:

Carnosol [MG 330]:	[M-1] 329, weitere Fragmentierung bei 35 eV (285) durch CO ₂ -Abspaltung
Carnosolsäure [MG 332]:	[M-1] 331, weitere Fragmentierung bei 35 eV (287) durch CO ₂ -Abspaltung
Carnosolsäure- methylester [MG 346]:	[M-1] 345, weitere Fragmentierung bei 35 eV (301) durch CO ₂ -Abspaltung, sowie (286) durch Abspaltung von -CH ₃

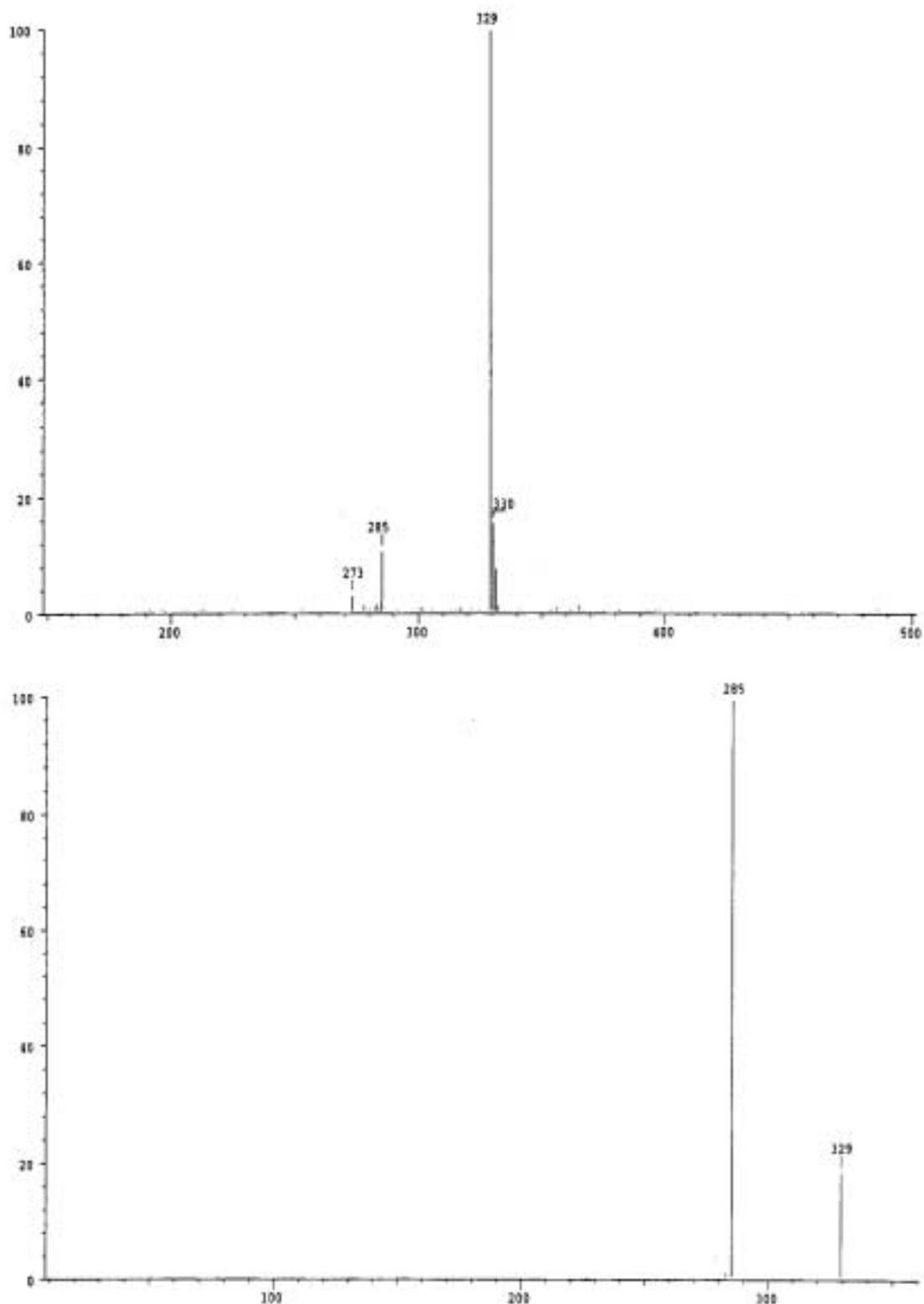


Abb. 4-20: Massenspektren von Carnosol aus Spumat des wässrigen Rosmarinextrakts, gemessen mittels HPLC-MS/MS-APCI-negativ

- MS-Spektrum; Basis Peak [M-1] 329
- MS/MS-Spektrum; Fragmentierung (329) bei 35V

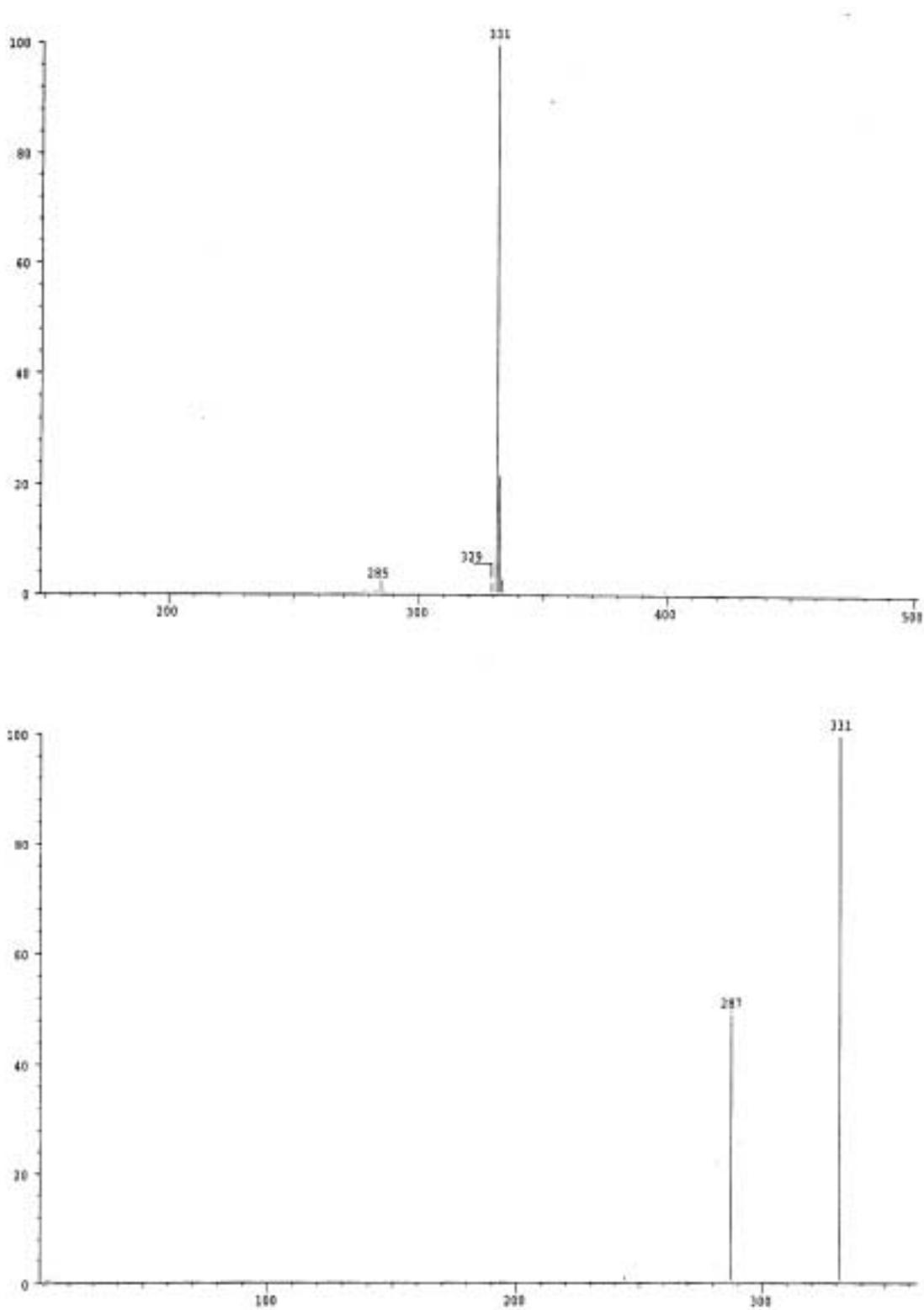


Abb. 4-21: Massenspektren von Carnosolsäure aus Spumat des wässrigen Rosmarinextrakts, gemessen mittels HPLC-MS/MS-APCI-negativ
a. MS-Spektrum; Basis Peak [M-1] 331
b. MS/MS-Spektrum; Fragmentierung (331) bei 35 eV

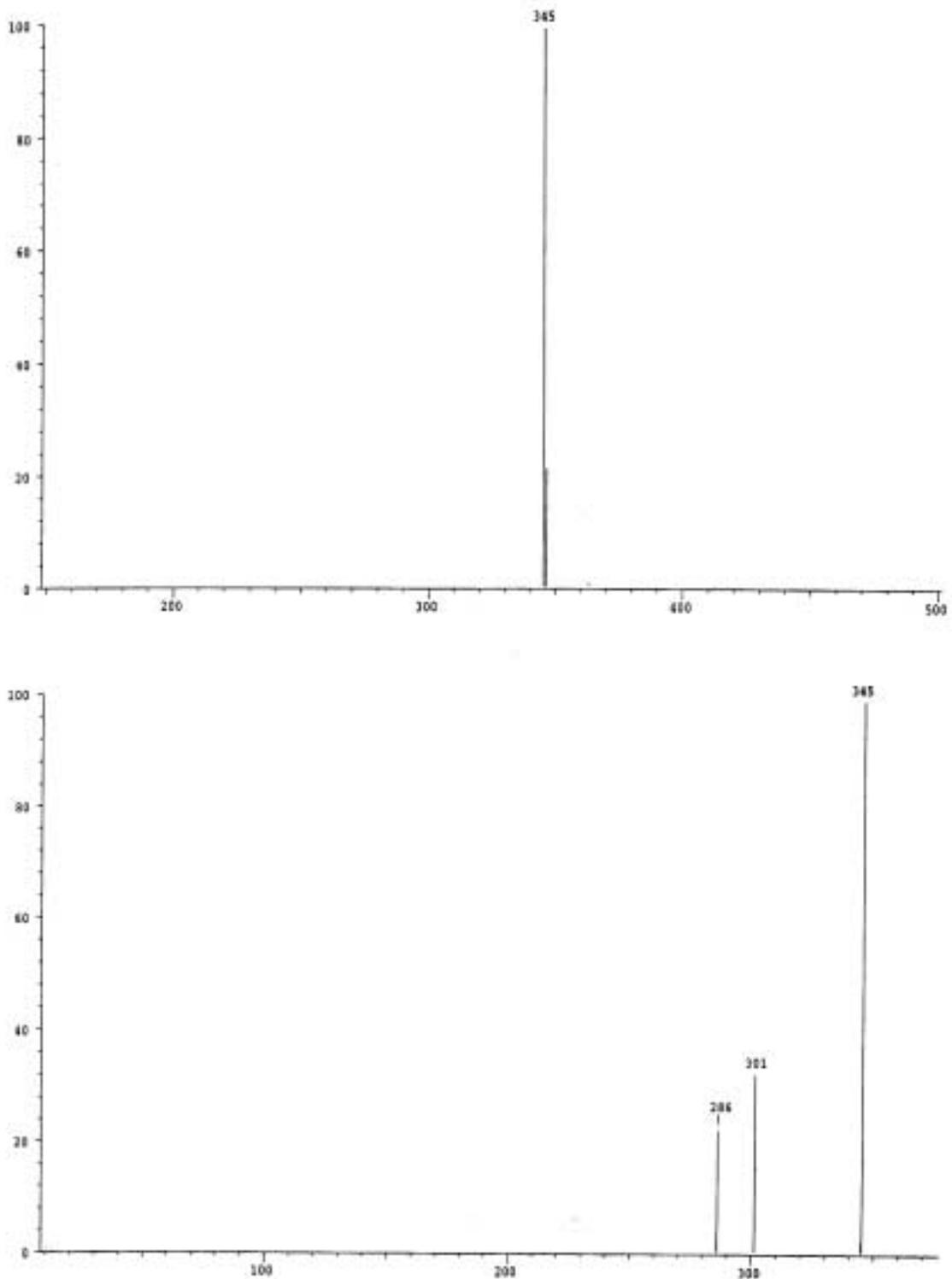


Abb. 4-22: Massenspektren von Carnosolsäuremethylester aus Spumat des wässrigen Rosmarinextrakts, gemessen mittels HPLC-MS/MS-APCI-negativ

- MS- Spektrum; Basis Peak [M-1] 345
- MS/MS-Spektrum; Fragmentierung (345) bei 35V

4.2.2.2 Optimierung der wässrigen Extraktionsausbeute an Carnosolsäure aus Rosmarinpulver durch alkalische Extraktion

Der pH-Wert des Wassers wurde mit H_3PO_4 bzw. NaOH bei der wässrigen Extraktion variiert, um die Ausbeute an Carnosolsäure zu verbessern (s. Tab. 4-11).

Tab. 4-11: pH-Abhängigkeit der wässrigen Extraktionsausbeute an Carnosolsäure aus Rosmarinpulver.

pH des Extraktionswassers	pH-Wert des Mediums nach der Extraktion	Carnosolsäure [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Carnosolsäure [$\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$]
2	2,7	4,68	0,6
3	5,8	21,11	2,64
6	6	25,78	3,22
7	5,9	23,15	2,89
8	6	21,91	2,74
9	5,8	21,23	2,65
10	6,3	32,98	4,12
10,5	6,5	40,38	5,05
11	7,4	52,80	6,6
11,5	8,4	36,04	4,5
12	9,7	4,89	0,61

Die Werte in Tab. 4-11 zeigen deutlich, dass die Extraktionsausbeute der Carnosolsäure aus dem wässrigen Medium pH-abhängig ist. Carnosolsäure ist im Sauren schlecht wasserlöslich, und die Extraktionsausbeute nahm ab, je saurer das Medium wurde. Im Alkalischen dagegen war die Carnosolsäure gut wasserlöslich.

Dass eine Pufferung des Extraktionsmediums durch Inhaltsstoffe in der Rosmarinpflanze erfolgt, merkt man an den pH-Werten des Mediums (des Filtrates) nach Beendigung der Extraktion. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde das Extraktionswasser vor der Zugabe von Rosmarinpulver auf den gewünschten pH-Wert mit 1M NaOH eingestellt.

Das mit NaOH vom Ausgangswert pH 6 auf pH 7, 8 oder 9 eingestellte Extraktionswasser unterliegt während der Extraktion einer Pufferung, und der pH-Wert des Mediums nach der Extraktion lag bei 5,8 - 6. Somit erfolgte bei pH 7, 8 und 9 keine Verbesserung, sondern sogar eine leichte Abnahme der Extraktionsausbeute. Die Carnosolsäure ist nämlich im alkalischen Milieu im Gegensatz zum sauren Medium nicht stabil. Wahrscheinlich wurde ein Teil der Carnosolsäure abgebaut, bis das Medium den günstigen Pufferungsgrad der Pflanze von pH 6 erreichte.

Erst bei der Extraktion ab pH-Wert 10 stieg der pH-Wert des Mediums nach der Extraktion trotz Pufferung der Pflanze und damit stieg die Ausbeute an Carnosolsäure. Durch die bessere Löslichkeit im Alkalischen wurde Carnosolsäure gelöst als abgebaut. Die höchste Extraktionsausbeute wurde bei pH 11 erzielt. Das Medium hatte nach der Extraktion einen pH-Wert von 7,4. Dank der Pufferung wurde der gleichzeitige Abbau der Carnosolsäure im alkalischen Extraktionswasser verringert. Ab pH 11,5 nahm die Extraktionsausbeute wieder ab, da hier die Carnosolsäure durch die steigende Alkalität des Mediums stärker abgebaut wurde. Trotz Pufferung blieb das Medium hier mit pH 8,4 stärker alkalisch.

Bei der Extraktion von Rosmarinpulver mit Methanol wurden $14,6 \text{ g*Kg}^{-1}$ Carnosolsäure erhalten. Die Ausbeute an Carnosolsäure bei pH 6 (ohne Änderung des pH-Wertes des Extraktionswassers) betrug nur $3,2 \text{ g*Kg}^{-1}$ bzw. 22,1 % der methanolischen Extraktionsausbeute. Bei Erhöhung des pH-Wertes im Extraktionswasser auf pH 11 stieg die Extraktionsausbeute an Carnosolsäure auf $6,6 \text{ g*Kg}^{-1}$ bzw. 45,3 % der methanolischen Extraktion. Normalerweise enthält die Rosmarinpflanze ca. 3 – 3,5 % Carnosolsäure. Bei der verwendeten Rosmarinpflanze handelte es sich um eine Sorte mit niedrigem Carnosolsäuregehalt von ca. 1,5 %.

4.2.2.3 Untersuchung der Stabilität von Carnosolsäure im sauren und alkalischen Medium

A. Während der wässrigen Extraktion

Im Verlauf einer 60-minütigen wässrigen Extraktion von Rosmarinpulver unter Rückfluss (bei pH-Wert 6) wurden nach 10, 20, 30 und 60 min Extraktionsdauer Proben entnommen und auf ihren Gehalt an Carnosolsäure untersucht. Die Versuche haben gezeigt, dass eine längere Extraktionsdauer den Abbau von Carnosolsäure begünstigt, was zeigt, dass sie im wässrigen Medium nicht stabil ist. Um eine Aussage über den Abbau der Carnosolsäure während der Extraktion machen zu können, wurden die Filtrationsrückstände ausgewählter Proben einer methanolischen Nachextraktion unterzogen und auf ihren Gehalt an Carnosolsäure untersucht (s. Tab. 4-12). Es wurde angenommen, dass die Ausbeute an Carnosolsäure, die mittels einer methanolischen Extraktion erhalten wurde, 100 % Carnosolsäure im Rosmarinpulver entspricht. Darauf bezogen wurden die Wiederfindungsraten (Wfr.) in [%] ausgerechnet.

Tab. 4-12: Die Extraktionsausbeute der Carnosolsäure bei verschiedenen pH-Werten und die Carnosolsäuregehalte in den entsprechenden Filtrationsrückständen.

Probe	pH-Wert des Mediums nach der Extraktion	Carnosolsäure-Ausbeute [%]	Carnosolsäure-Wfr.* [%]
Methanolextrakt		100	100
Wässriger Extrakt pH 2,0 Rückstand	2,7	4,1 77,1	 81,2
Wässriger Extrakt pH 3,0 Rückstand	5,8	18,1 31,7	 49,8
Wässriger Extrakt pH 6 Rückstand	6	22,1 22,8	 44,9
Wässriger Extrakt pH 11 Rückstand	7,4	45,2 20,3	 65,5

* Wfr. = Wiederfindungsrate

Aus Tab. 4-12 sieht man, wie das Extraktionsmedium, auf pH 3 eingestellt, durch die Pflanze auf pH 5,8 gepuffert wurde. Deshalb war die Ausbeute ähnlich wie bei der Extraktion bei pH 6. Das Extraktionsmedium bei pH 2 wurde nur auf pH 2,7 gepuffert. Dieser Wert ist zu sauer und das Ergebnis der Extraktion entsprechend niedrig (4,1 %). Aus dem Extraktionsrückstand dieser Probe wurde jedoch die höchste Ausbeute an Carnosolsäure von 77,1 % erhalten und somit bei pH 2 die summarisch höchste Wiederfindungsrate von 81,2 % erzielt. Das zeigt, wie schlecht löslich und gleichzeitig wie stabil Carnosolsäure aus Rosmarinpulver im sauren Milieu ist.

B. Während der Zerschäumung

Um den pH-Effekt auf den Schaumverlauf und die Stabilität der Carnosolsäure zu überprüfen, wurde bei einem breiten pH-Spektrum von 2 - 9 zerschäumt. Also wurde ein wässriger Rosmarinextrakt bei pH 11 vorbereitet und anschließend mit 0,1 M H₃PO₄ oder 0,1 M NaOH auf die gewünschten pH-Werte (2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 7,6 / 8 / 9) eingestellt. Jeweils 50 ml Probe zerschäumt. Es wurde untersucht, inwieweit der pH-Wert der Ausgangsprobe die Stabilität der Carnosolsäure beeinflusst. Dafür wurden jeweils die gleichen Proben unter

identischen Bedingungen bei pH-Werten von 2 bis 9 im Abstand von jeweils 1 pH-Einheit zerschäumt.

Bei der Zerschäumung des wässrigen Rosmarinextrakts ohne Veränderung des pH-Wertes, d.h. bei pH 6, wurden neben Carnosolsäure in den Schaumproben auch unregelmäßig Carnosol und andere Abbauprodukte von Carnosolsäure gefunden. Ihre Konzentration in den Schaumproben war teilweise recht hoch, wogegen sie in der Ausgangsprobe entweder in Spuren oder gar nicht nachweisbar waren. Diese Befunde wurden ebenso im Spumat der alkalischen Zerschäumung bei pH 7,7 (pH-Wert des wässrigen Extrakts nach der alkalischen Extraktion bei pH 11) festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde im Spumat der sauren Zerschäumung bei pH 4 kaum Carnosol gefunden, was auf die Stabilität der Carnosolsäure im Sauren zurückzuführen ist. Die absolute Carnosolsäuremenge im Spumat und im Rückstand entsprach der der Ausgangsprobe, d.h. beim Ansäuern der Ausgangsprobe ist es möglich, mittels der Zerschäumung die Carnosolsäure ohne Verluste anzureichern. Somit ist es schonender für Carnosolsäure bei einem pH-Wert von 4 zu zerschäumen.

4.2.2.4 Einfluss der Wassertemperatur auf den Carnosolsäureabbau während der wässrigen Extraktion

Es wurde festgestellt, dass eine wässrige Extraktion von Rosmarinpulver bei 40 °C zu einem massiven Abbau der Carnosolsäure führt. Im Gegensatz dazu wurde bei den wässrigen Extraktionsversuchen von Stabilton fast genauso viel Carnosolsäure bei 40 °C gefunden wie bei 100 °C erhaltenen Extrakt. Carnosolsäure aus Stabilton ist im wässrigen Milieu schlecht extrahierbar. Anders aber als bei den entsprechenden Versuchen mit Rosmarinpulver wurde die schlecht extrahierbare Carnosolsäure aber in den dazugehörigen Filtrationsrückständen wiedergefunden. Dies ist ein Hinweis dafür, dass an dem Abbau von Carnosolsäure die Aktivierung von Enzymen der Rosmarinpflanze bei 40 °C verantwortlich sein könnte, die im Stabilton nicht vorhanden sind. Für den Nachweis einer Enzymaktivität in Rosmarinpulver, die zum Teil den Abbau von Carnosolsäure bewirken können, sind weitere Untersuchungen erforderlich, die den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

Desaktivierung der Enzyme durch Zusatz von heißem Wasser zur Erhöhung der Extraktionsausbeute an Carnosolsäure:

Zur Desaktivierung der Carnosolsäure-abbauenden Enzyme wurde das Extraktionswasser **heiß** zum Rosmarinpulver gegeben und dann sofort weiter unter Rückfluss 20 min wie üblich extrahiert. Wenn während der Aufheizzeit nach Zugabe von kaltem Wasser (RT) zum Rosmarinpulver bis zum Kochen des Wassers die Enzyme schon einen großen Teil der Carnosolsäure abbauen, ist hier eine Erhöhung der Ausbeute zu erwarten (s. Tab. 4-13).

Tab. 4-13: Die Extraktionsausbeuten an Carnosolsäure bei Zugabe von heißem Wasser zum Rosmarinpulver vor Beginn der Extraktion im Vergleich zur Zugabe von kaltem Wasser bei RT im neutralen sowie im alkalischen Medium.

Probe	Ausbeute [%]*	Wiederfindungsrate [%]**
Methanolextrakt	100	100
kalt-neutral***	20,94	49,32
Rückstand	28,38	
heiß-neutral****	29,73	85,83
Rückstand	56,1	
kalt-pH11	43,92	65,54
Rückstand	21,62	
heiß-pH11	51,35	71,62
Rückstand	20,27	

* Es wird angenommen, dass die Extraktionsausbeute mit Methanol von $1,48 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ einer 100 %igen Ausbeute entspricht.

** Die Wiederfindungsrate an Carnosolsäure, summiert aus den Ausbeuten des wässrigen Extraktes und des Rückstandes.

*** Das Wasser wurde vor Beginn der Extraktion bei Raumtemperatur (RT) zum Rosmarinpulver gegeben

**** Das Wasser wurde vor Beginn der Extraktion kochend zum Rosmarinpulver gegeben.

Wie erwartet, wurde durch direkte Zugabe von heißem Wasser zum Rosmarinpulver vor Beginn der Extraktion mehr Carnosolsäure extrahiert als bei der direkten Zugabe von kaltem bzw. raumtemperiertem Wasser. Vor allem kann man sehen, dass im Rückstand des „heißen“ Extrakts die Ausbeute an Carnosolsäure am höchsten lag im Vergleich zu den anderen Rückständen. Die Wiederfindungsrate, d.h. die Extraktionsausbeute für Carnosolsäure im wässrigen Extrakt und in dem zugehörigen Rückstand, war für die neutrale „Heißwasser“-Extraktion mit 85,8 % die höchste.

Hier wurde somit weniger Carnosolsäure abgebaut, was auf eine Inaktivierung der wahrscheinlich „pflanzeneigenen abbauenden Enzyme“ hindeutet.

Bei Alkalisierung des heißen Wassers auf pH 11 wurde im wässrigen Extrakt die höchste Ausbeute an Carnosolsäure erhalten. Im zugehörigen Filtrationsrückstand wurde, wie theoretisch erwartet, aufgrund der Instabilität der Carnosolsäure im alkalischen Milieu weniger Carnosolsäure extrahiert als bei der Extraktion im neutralen und heißen Medium.

Wie unter 4.2.2.2 gezeigt, ist auch hier die Extraktionsausbeute im alkalischen Milieu (kalt) um das Doppelte (2,09-Fache) erhöht im Vergleich zum neutralen Bereich (kalt). Eine Zugabe von heißem Wasser zum Rosmarinpulver, kombiniert mit einer alkalischen Extraktion bei pH 11, erhöht die Extraktionsausbeute von 21 % auf 51,4 %, also um das 2,5-Fache.

4.2.2.5 Untersuchung der Zerschäumbarkeit eines organischen Mediums und die Anreicherung von Carnosolsäure daraus im Schaum

Hier wurde untersucht, inwieweit die Zerschäumungsanalyse für organische oder organisch-wässrige Extrakte einsetzbar ist, und ob der organische Anteil in der wässrigen Phase einen Einfluss auf die Anreicherung der Carnosolsäure hat.

Zunächst wurde der maximal mögliche, prozentuale Zusatz von Ethanol zum wässrigen Extrakt ermittelt, bei dem anschließend eine Zerschäumung durchgeführt werden kann. Dazu wurde ein wässriger Rosmarinextrakt mit verschiedenen Konzentrationen an Ethanol versetzt (5, 10, 20, und 30 %ige ethanolische Lösung) und zerschäumt.

Tab. 4-14: Die Zerschäumbarkeit vom wässrigem, ethanolischen Medium

Ethanol [%]	Spumat [g]	Zerschäumbarkeit
5	1,40	sehr gut
10	1,64	sehr gut
20	0,19	noch zerschäumbar
30	-----	nicht möglich

Bis zu 20 % Ethanolgehalt konnte noch gut zerschäumt werden. Bei der 20 %igen Probe entstand aber eindeutig weniger Schaum als bei den 5- und 10-%igen Proben. Erst durch

1:1-Verdünnung der Probe mit Wasser war die Probe gut zerschäumbar. Die 30 %ige Probe war überhaupt nicht mehr zerschäumbar (s. Tab. 4-14). Es ist also möglich, einen organisch-wässrigen Extrakt durch Verdünnung mit Wasser und ohne Zusätze von Schaumbildnern wie Saponin zu zerschäumen. Allgemein kann man jedoch sagen, dass ein organisch-wässriges Medium begrenzt zerschäumbar ist.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde ein ethanolischer Rosmarinextrakt mit Wasser verdünnt (10, 20, 30, 50 %ige ethanolische Lösung) und zerschäumt. Alle Proben waren nicht zerschäumbar. Im Gegensatz zum wässrigen Rosmarinextrakt fehlen im ethanolischen Extrakt die natürlich vorhandenen Schaumbildner Proteine und Stärke. Deshalb blieb die Probe auch nach einer Verdünnung mit Wasser nicht zerschäumbar. Erst durch Zusatz von 80 mg Saponin zu 100 ml 20 %igem Ethanolextrakt konnte die Probe gut zerschäumt werden. Saponinzusatz ermöglicht es also, nicht zerschäumbare Proben zu zerschäumen, da Saponin als Schaumbildner wirkt. Saponinschäume sind so stabil, dass sie den schaumzerstörenden Effekt organischer Lösungsmittel aufheben.

Der Einfluss des Ethanolanteils ethanolisch-wässriger Extrakte auf die Anreicherung der Carnosolsäure im Schaum wurde untersucht, indem die Carnosolsäuregehalte in den Schaum-, Rückstands- und Ausgangsproben des 10 %igen ethanolisch-wässrigen Extraktes bestimmt wurden. In der entschäumten Rückstandprobe wurde keine Carnosolsäure gefunden, d.h. sie wurde quantitativ in den Schaum überführt. Somit ist es möglich, auch aus organisch-wässrigen Medien die Carnosolsäure mittels Zerschäumung anzureichern. Der geringe organische Lösungsmittelanteil der Probe hat keinen negativen Einfluss auf die Anreicherung der Carnosolsäure im Schaum.

Ziel war es, mehr Carnosolsäure durch Zusatz von organischem Lösungsmittel aus Rosmarinpulver zu extrahieren und anschließend zu zerschäumen. Da ein 100 %iger ethanolischer Rosmarinextrakt ohne Zusatz von Saponin nicht zerschäumbar ist und ein 10 %iger bzw. 20 %iger Ethanolzusatz den Carnosolsäuregehalt im Vergleich zum 100 %igen wässrigen Rosmarinextrakt nicht erhöht, ist eine Steigerung der Ausbeute an Carnosolsäure mittels Zusatz von organischem Lösungsmittel bei der Zerschäumung nicht möglich.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind auf jeden Fall bei der Zerschäumung alkoholhaltiger Getränke oder anderer organisch-wässriger Proben hilfreich.

4.2.2.6 Einfluss der Gasflussrate auf die Zerschäumung von wässrigem Rosmarinextrakt und auf die Anreicherung von Carnosolsäure

Die optimale Gasflussrate für eine effektive Zerschäumung eines wässrigen Extrakts wurde bestimmt mit Hilfe des Anreicherungsfaktors der Carnosolsäure im Spumat. Der wässrige Extrakt wurde aus 0,8 g Rosmarinpulver in 100ml Wasser (pH 11) hergestellt und auf pH 4 für die Zerschäumung eingestellt. 50 ml Probe wurden jeweils in der kleinen Säule bei verschiedenen Gasflussraten unter gleichen Bedingungen zerschäumt.

Die Zerschäumung wurde jeweils mit einer bestimmten Flussrate begonnen. Bei dieser Flussrate wurde solange zerschäumt, bis die Schaumentstehung sehr schwach wurde. Dann wurde die Flussrate erhöht und weiter zerschäumt. Die Merkmalseigenschaften des Schaumes und seine Konsistenz wurden beobachtet, z.B. ob der Schaum relativ trocken oder nass war. Der Schaum wurde als nass angesehen, wenn viel Flüssigkeit der Ausgangsprobe mitgeschleppt wurde. Wichtig war es dabei zu bestimmen, wann der Schaumaustritt aus der Säule beginnt und wie lange sowie v.a. wieviel Spumat insgesamt entsteht (s. Tab. 4-15).

Tab. 4-15: Einfluss der Flussrate auf die Zerschäumungsdauer und die erhaltene Spumatmenge

Probe	Gasflussrate [ml*min ⁻¹]	Schaumaustritt [min]	Spumatmenge [g]	Kommentar
A	12	28 - 57	0,55	kaum neuer Schaum
	20	57 - 110	4,08	
	30	110 - 120		
B	15	15 - 90	4,97	Schaum gut und konz.
	30			kein neuer Schaum
C	20	12,5 - 55	13,91	leicht cremig, aber gut
	30			kein Spumat
D	30	7 - 25	21,44	Schaum sehr nass

Bei Beginn der Zerschäumung von Probe A mit einer Flussrate 12 ml*min⁻¹ war es noch notwendig, gegen Ende der Schaumbildung die Flussrate zu erhöhen und weiter zu zerschäumen. Die Zerschäumung wurde bei Flussrate einer 20 ml*min⁻¹ fortgesetzt. Aus der Untersuchung der Schaum- und Rückstandproben, die vor Erhöhung der Flussrate auf 20 ml*min⁻¹ entnommen wurden, erkennt man, dass der Rückstand noch etwas 30 % Carnosolsäure enthält und somit die Zerschäumung bei einer Flussrate von nur 12 ml*min⁻¹ noch nicht abgeschlossen war, sondern erst nach Ende der Schaumbildung nach Erhöhung der

Flussrate auf $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Der Rückstand enthielt am Schluss der Zerschäumung nur noch Spuren an Carnosolsäure.

Die Zerschäumung der Probe C, die mit Flussrate $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ begonnen wurde, verlief zwar schneller als die der Proben A und B bei Flussraten von 12 und $15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, die Spumatmenge war aber dreimal so groß. Die Zerschäumung der Probe D bei Flussrate $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ verlief nicht schonend genug, da der Schaum zu nass war und viel Ausgangsprobe mitgeschleppt wurde. Die Spumatmenge ($21,44 \text{ g}$) war nicht mit Carnosolsäure angereichert und somit auch nicht wesentlich konzentrierter als die Ausgangsprobe. Die Zerschäumung der Probe B mit einer Flussrate von $15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ wurde als optimal betrachtet. Die Zeitdauer lag zwischen der Zerschäumung der Proben A und C bei den Flussraten 12 und $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Spumatmenge mit ca. 5 g betrug etwa ein Drittel der Spumatmenge der Probe C bei Flussrate $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, und der Anreicherungsfaktor wurde deutlich erhöht. Die Steigerung der Flussraten auf $30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bewirkte keine neue Schaumbildung. Die Zerschäumung wurde beendet. Die Rückstandsprobe enthielt auch hier nur Spuren an Carnosolsäure.

4.2.2.7 Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Anreicherung von Carnosolsäure im Schaum aus dem wässrigen Rosmarinextrakt mit Hilfe der Fraktionierten Zerschäumung

Zusätzlich zu Versuchen mit der einfachen Zerschäumung wurde die fraktionierte Zerschäumung eingesetzt, um das Verhalten der Carnosolsäure während der Zerschäumung zu überprüfen und festzustellen, wie schnell die Verbindung sich im Schaum anreichert.

In den folgenden Versuchen (A-C) wurde der pH-Wert der Ausgangsprobe (pH-Wert des wässrigen Extraktes von 6) nicht verändert. Deshalb liegt auch Carnosol neben Carnosolsäure in relativ hohen Konzentrationen vor. In Versuch B stellt Carnosol in der Ausgangsprobe die Hauptverbindung dar. Wie schon erwähnt, kann ein Abbau der Carnosolsäure zu Carnosol weitgehend verhindert werden, wenn der wässrige Rosmarinextrakt unmittelbar nach der Extraktion auf pH 4 angesäuert wird.

A. Einfache Zerschäumung

Mit einfacher Zerschäumung ist gemeint, dass Spumat und Rückstand nach Beendigung einer Zerschäumung jeweils als Gesamtfractionen, unabhängig von der Zeit, erhalten werden. Die Probe wird lediglich einmal kontinuierlich zerschäumt.

Der wässrige Rosmarinextrakt wurde bei einer Gasflussrate von $15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ zerschäumt, bis kein neuer Schaum mehr entstand. Der Schaum, der in der Säule über der flüssigen Probe im

Gleichgewicht steht (d. h. Schaumentstehung = Schaumzerfall), wird als Gleichgewicht-Schaum bezeichnet. Dieser Gleichgewicht-Schaum wurde zusätzlich zu den Gesamtfractionen Spumat, Ausgangs- und Rückstandsprobe auf seine Carnosolsäuregehalt mittels HPLC/ELCD-Analyse nach entsprechender Verdünnung untersucht.

Anhand der HPLC-Chromatogramme (s. Abb. 4-23) wird die quantitative Anreicherung von Carnosol, Carnosolsäure und Carnosolsäuremethylester im Schaum dargestellt durch Vergleich der gemessenen Integrationsflächen.

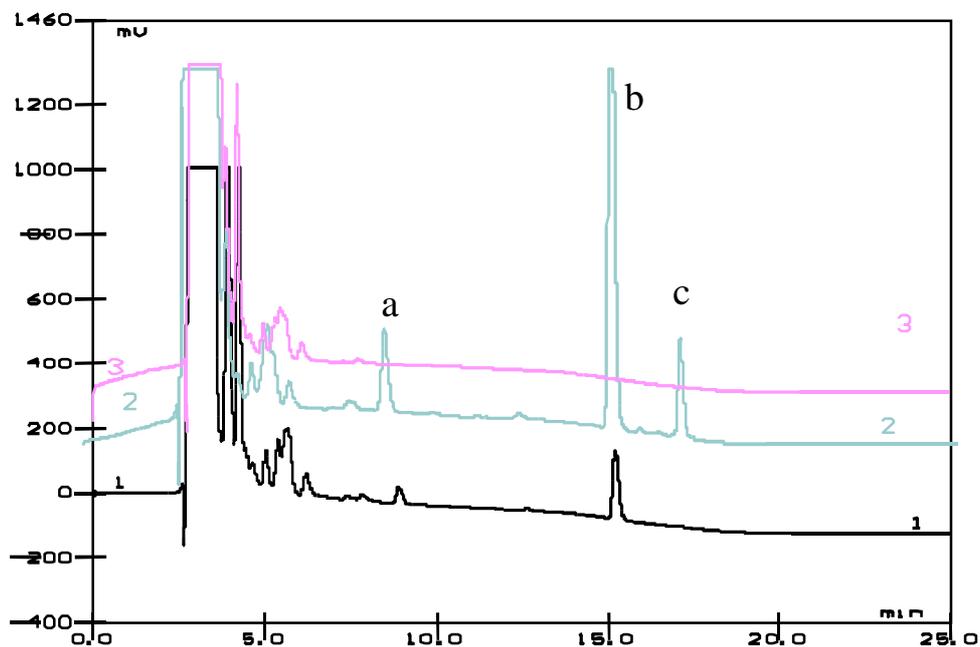


Abb. 4-23: HPLC/ELCD-Chromatogramme von Antioxidantien im wässrigen Extrakt von Rosmarinpulver.

(a) Carnosol (b) Carnosolsäure (c) Carnosolsäuremethylester
(1) Ausgangsprobe (2) Spumatprobe (3) Rückstandsprobe

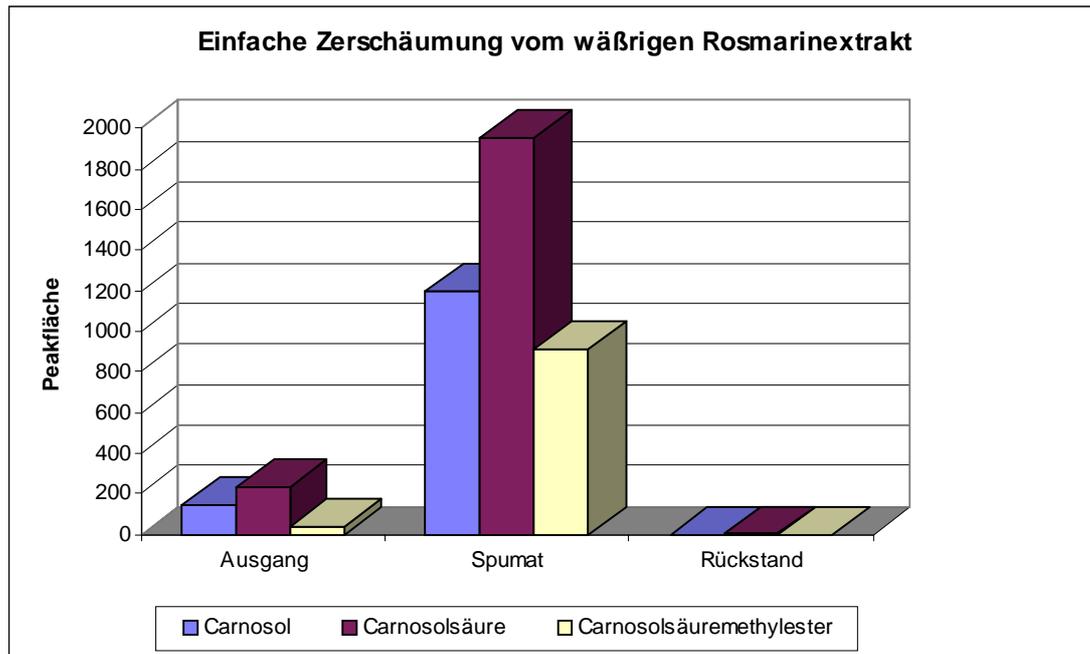


Abb. 4-24: Anreicherung der Antioxidantien im Schaum aus wässrigem Extrakt von Rosmarinpulver (graph. Darstellung der Abb. 4-23).

Die Abb. 4-23 bzw. Abb. 4-24 zeigen, dass alle drei Verbindungen im Schaum angereichert werden. Die Rückstandsprobe enthielt praktisch keines der drei Antioxidantien mehr. Auch die Schaumprobe im Gleichgewicht enthielt keine der drei Verbindungen. Ein Abbruch der Zerschäumung zu diesem Zeitpunkt ist daher berechtigt.

Carnosolsäure und Carnosol waren im Schaum im gleichen Verhältnis angereichert (Spumat : Ausgangsprobe = 8,37 für Carnosol und 8,33 für Carnosolsäure). Beide Verbindungen wurden gleichmäßig angereichert, zum Teil bedingt durch den Abbau von Carnosolsäure zu Carnosol.

B. Fraktionierte Zerschäumung

Der aus der Zerschäumungskolonne in der ersten Minute nach Zerschäumungsbeginn austretende Schaum wurde entnommen (Anfangsfraktion) und mit den Schaumproben, die zu Mitte und Ende des Schaumaustrittes entnommen wurden, sowie mit der Rückstandsprobe bezüglich der Anreicherung der Antioxidantien verglichen.

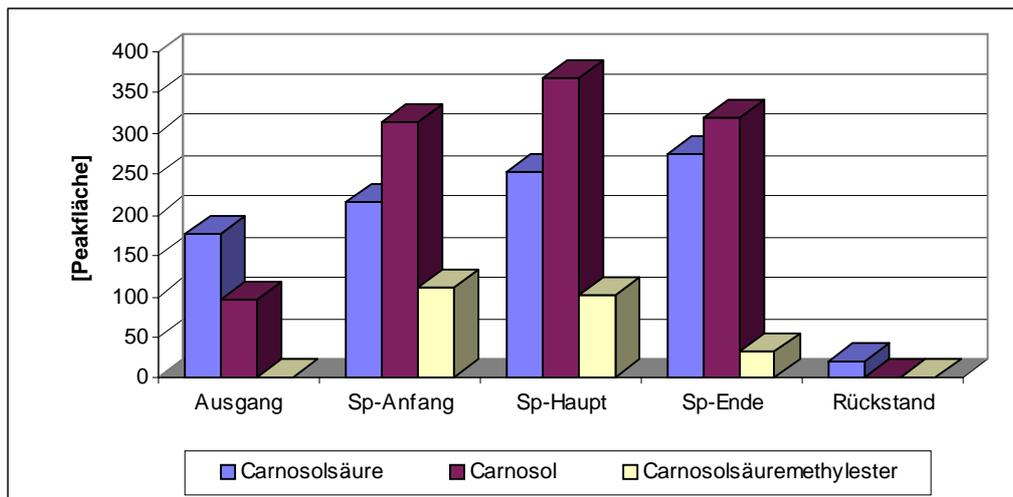


Abb. 4-25: Anreicherung der Antioxidantien im Schaum aus dem wässrigen Extrakt von Rosmarinpulver zu Beginn, Mitte und Ende einer Zerschäumung

Aus Abb. 4-25 ist folgendes zu erkennen:

- 1) Die drei erhaltenen Schaumfraktionen wiesen ähnliche Konzentrationen an Carnosol und Carnosolsäure auf, d.h. für eine quantitative Anreicherung der Antioxidantien muss die Zerschäumung auf jeden Fall bis zum Ende der Schaumbildung durchgeführt werden.
- 2) In der Ausgangsprobe war die Konzentration von Carnosolsäure höher als die von Carnosol. Im Spumat jedoch überwog Carnosol, was wiederum auf einen Carnosolsäureabbau zu Carnosol hindeutet. Die gleichen Verhältnisse zueinander in beiden Schaumfraktionen zeigen jedoch, dass Carnosolsäure gleichmäßig und kontinuierlich zu Carnosol umgewandelt wird.
- 3) Das Verhältnis Carnosolsäure : Carnosol war in der Anfangs- und Hauptfraktion des Schaumes gleich.
- 4) Wegen der fortlaufenden Umwandlung von Carnosolsäure zu Carnosol ist es schwierig, festzustellen, welche Verbindung schneller als die andere im Schaum angereichert wird. Auch hier kann durch Ansäuern der Probe auf pH 4 vor Zerschäumungsbeginn ein Abbau der Carnosolsäure verhindert werden.

4.2.2.8 Untersuchung des Anreicherungsverhaltens der Carnosolsäure im Schaum mit Hilfe eines Carnosolsäurestandards

Vergleich des Anreicherungsverhaltens der Carnosolsäure im Schaum in Abhängigkeit von der Zeit bei der Zerschäumung eines Carnosolsäure-Standards und eines wässrigen Rosmarinextraktes:

Um die Einflussparameter aus der Rosmarinpflanze selbst, die evtl. eine Rolle bei der Anreicherung der Carnosolsäure im Schaum als Funktion der Zeit spielen, auszuschließen, wurde eine Standard-Lösung von Carnosolsäure unter Zusatz von Saponin zerschäumt. Unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Saponinzusatz, wurde ein wässriger Rosmarinextrakt zerschäumt (s. Tab. 4-16).

Tab. 4-16: Zusammenfassung der durchgeführten Zerschäumungsversuche
(Rückstandfraktionen, erhalten alle 2 min. Schaumfraktionen, erhalten alle 5 min)

Saponin [g]	Volumen [ml]	Säule	Schaumaustritt [min]	Spumatmenge [g]	Gasflussrate [ml*min ⁻¹]
Versuch A: Carnosolsäure-Standard					
3,5 mg Carnosolsäure + 2 ml saures Methanol + 0,03 g Saponin + 48 ml Wasser (70 mg*l ⁻¹ Carnosolsäure)					
0,03 g	50 ml	klein	15 - 60	6,0	15
Versuch B: Rosmarinpulver-Extrakt					
0,8 g / 100 ml wässriger Rosmarinpulverextrakt, pH 4 (70 mg*l ⁻¹ Carnosolsäure)					
-	50 ml	klein	17 - 35	7,6	15

Der Anreicherungsverlauf von Carnosolsäure aus Standardlösung und Rosmarinextrakt unterscheidet sich unwesentlich und war kontinuierlich. Zu Anfang der Zerschäumung erfolgte die Anreicherung schnell. Bereits nach 2-minütiger Zerschäumung waren schon 37,3 % Carnosolsäure des wässrigen Rosmarinextraktes in den Schaum gewandert und nach 4 min 68 %. Die restlichen 32 % wanderten kontinuierlich in den Schaum. In Abb. 4-26 kann man die Ähnlichkeit im Verlauf beider Anreicherungskurven feststellen.

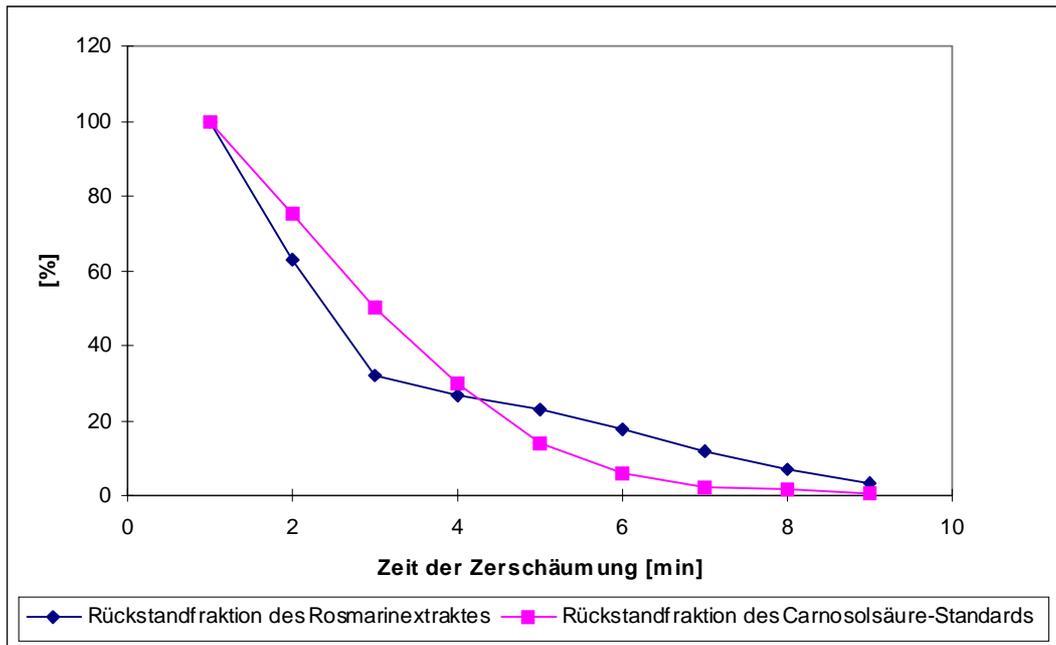


Abb. 4-26: Abnahme der Carnosolsäure in den Rückstandsproben der Standardlösung und des Rosmarinextraktes im Verlauf einer Zerschäumung.

4.2.2.9 Anreicherungsgeschwindigkeit der Carnosolsäure aus verdünnten Proben

Die Zerschäumung einer verdünnten Carnosolsäure-Standardlösung ($7 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) zeigte, wie erstaunlich schnell eine Anreicherung der Carnosolsäure erfolgt. Schon nach 2-minütiger Zerschäumung waren nur noch 40 % Carnosolsäure in der Rückstandsprobe vorhanden und nach 4 min nur noch 4 %. Nach 6 min war die Carnosolsäure nur noch im Spurenbereich nachweisbar.

4.2.2.10 Beispiel für den praktischen Einsatz der Zerschäumungsanalyse: Isolierung der angereicherten Carnosolsäure aus der Schaumfraktion eines wässrigen Extraktes

Ein wässriger Extrakt vom Rosmarinpulver wurde vorbereitet, zerschäumt und die Carnosolsäure aus dem erhaltenen Spumat isoliert. Nach einer methanolischen Fällung der Proteine aus der Spumatprobe konnte die Carnosolsäure mittels Säulenchromatographie an einer RP-18-Phase von den anderen Antioxidantien (z.B. Carnosol, Carnosolsäuremethylester) getrennt und isoliert werden. Mit Hilfe der HPLC/UV-Analyse [Tena et al., 1997] konnten die isolierten Fraktionen auf ihre Reinheit kontrolliert werden.

Die Carnosolsäure wird üblicherweise aus einem methanolischen Rosmarinextrakt gewonnen. Da solch ein Extrakt neben Carnosolsäure auch Chlorophyll enthält, muss dieses abgetrennt werden. Zur Abtrennung von Fetten und Chlorophyll muss die Probe erst auf der Normalphase (Kieselgel Si 60) durch geeignete Elution mit Hexan : Ethanol gereinigt werden. Erst danach können die dabei eluierten Antioxidantien an der Umkehrphase RP-18 säulenchromatographisch voneinander getrennt werden.

Die Spumatprobe besteht hauptsächlich aus Wasser und Schaumbildnern (Proteinen). Da die Ausgangsprobe ein wässriger Extrakt ist, ist sie frei von Fett und Chlorophyll. Somit entfällt hier der Reinigungsschritt an der Normalphase. Der Einsatz von teurem und umweltbelastenden Methanol entfällt.

Die Ausbeute an Carnosolsäure ist bei der wässrigen Extraktion zwar niedriger, doch mittels der Zerschäumung konnte die Carnosolsäure deutlich angereichert werden. Da für eine Zerschäumung lediglich billiges Stickstoffgas verbraucht wird und der Reinigungsschritt zur Chlorophyllabtrennung entfällt, scheint die Anreicherung der Carnosolsäure aus einem wässrigen Rosmarinextrakt unter Einsatz der Zerschäumung durchaus wirtschaftlich.

4.2.2.11 Untersuchung der Möglichkeit einer Anreicherung der Rosmarinsäure im Schaum

50 ml wässrige Standardlösung von Rosmarinsäure ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 4,8) wurde mit 0,01 g Saponin versetzt und in der kleinen Säule bei $15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ Gasflussrate zerschäumt. Unter identischen Bedingungen wurden Versuche bei pH 1, 2 und 3 durchgeführt, um festzustellen, ob pH-Wertänderungen die Anreicherung der Rosmarinsäure beeinflussen. Die Proben wurden mit HPLC / ELCD-Analyse auf Rosmarinsäure untersucht.

Rosmarinsäure lag in Spumat und Rückstand des Rosmarinextrakts sowie in der Standardlösung in gleicher Konzentration vor. Eine Änderung des pH-Wertes hat das Anreicherungsverhalten der Rosmarinsäure im Schaum nicht verändert:

Spumat : Ausgangsprobe: 0,89

Rückstand : Ausgangsprobe: 0,91

Spumat : Rückstand: 0,97

Auch mit Hilfe der Mehrfach-Zerschäumung von Rosmarinextrakt durch Zusatz von Saponin zur Rückstandsprobe blieb eine Anreicherung der schauminaktiven Rosmarinsäure aufgrund ihrer polaren Eigenschaften im Schaum erfolglos.

4.2.3 Bitterstoffe aus Bier

Bei der Zerschäumung von entkohlensäuertem Pilsbier wurden Co-, Ad- und n-Isohumulone und -Humulone im Schaum angereichert. Zunächst wurde mit Hilfe der fraktionierten Zerschäumung der zeitliche Verlauf der Bitterstoffanreicherung näher betrachtet. Danach wurde der Einfluss des pH-Wertes vom Bier auf die Schaumbildung und die Anreicherung der Bitterstoffe im Schaum untersucht. Anschließend wurde der Einfluss der Gasart auf die Zerschäumung bzw. Anreicherung der Bitterstoffe untersucht.

4.2.3.1 Anreicherung der einzelnen Bitterstoffe

Die Anreicherung der einzelnen Iso- und Humulone im Schaum verläuft unterschiedlich. Bezogen auf die Ausgangsprobe Bier (100 ml) wies die Rückstandsprobe folgende Anteile an Bitterstoffen auf: Co-Humulon 0 %, n+Ad-Humulon 0 %, n-Isohumulon 8 %, Ad-Isohumulon 12 % und Co-Isohumulon 40 % (s. Tab. 4-17 bzw. Abb. 4-27).

Tab. 4-17: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen der Bitterstoffe bei der Zerschäumung von Bier in $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bzw. in % bezogen auf die Ausgangsprobe (100 %)

Gasflussrate: 20 + 30 + 70 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ Schaumaustritt: 3 h Säule: groß						
Zerschäumung von 200 ml Bier						
Verbindung	Ausgangsprobe		Spumat		Rückstand	
	$[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	[%]	$[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	[%]	$[\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	[%]
Co-Isohumulon	8,81	100	53,43	606	1,5	17,4
n-Isohumulon	10,7	100	78,04	729	0	0
n+Ad-Isohumulon	4,13	100	38,5	932	0	0
Co-Humulon	0,85	100	5,99	705	0	0
n+Ad-Humulon	0,74	100	4,44	600	0	0

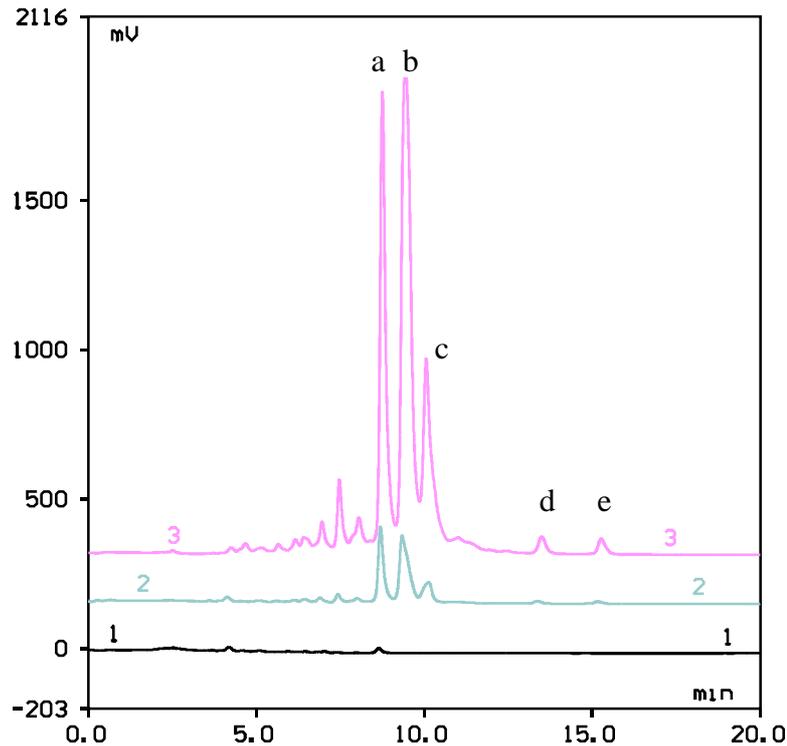


Abb. 4-27: HPLC/UV-Chromatogramm der Bitterstoffbestimmung bei der Zerschäumung von Pils-Bier

1: Rückstand 2: Ausgangsprobe 3: Spumat
 a: Co-Isohumulon b: n-Isohumulon c: n-+ Ad-Isohumulon
 d: Co-Humulon e: n+Ad-Humulon

4.2.3.2 Zeitlicher Verlauf der Bitterstoffanreicherung bei der Zerschäumung von Pils-Bier

Mittels der fraktionierten Zerschäumung konnte beobachtet werden, wie sich die Bitterstoffe zeitlich im Schaum anreichern und wie sie sich dabei von einander unterscheiden.

50 ml Bier wurden in der Dimensionierung mittlerer Säule mit $25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \text{ N}_2$ fraktioniert zerschäumt. Es entstanden insgesamt 10 g Spumat. Der Schaumaustritt erfolgte im Zeitraum 14 bis 63 min. Die ersten 5 Schaumfraktionen wurden alle min aufgefangen, die letzten 4 Schaumfraktionen jeweils nach 10 min.

Bereits in der ersten Schaumfraktion waren Co-Humulon und n+ad-Humulone (mittels HPLC als Summenpeak bestimmt) fast zu 100 % angereichert. Die isomerisierten Bitterstoffe verhielten sich als Mengenkomponenten unterschiedlich. So reicherte sich Co-Isohumulon hauptsächlich gegen Ende der Zerschäumung an, während die Anreicherung von n+Ad-Isohumulon bereits in den frühen Schaumfraktionen erfolgte (s. Abb. 4-28).

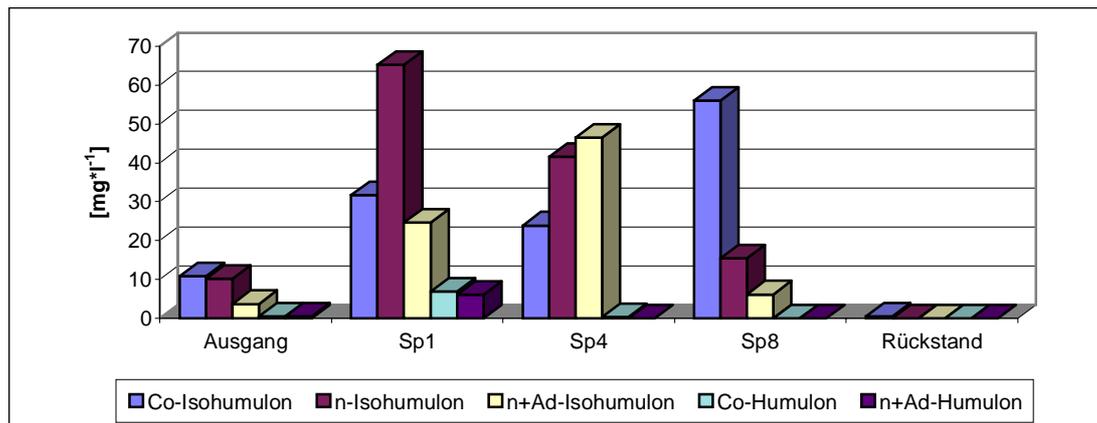


Abb. 4-28: Die mittels HPLC/UV-Analyse ermittelten Konzentrationen der Bitterstoffe ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), erhalten durch eine fraktionierte Zerschäumung von Pils-Bier (Sp = Spumat).

4.2.3.3 Zusammensetzung von festem Schaum und Spumat

Die bei der Verflüssigung von Schaum entstandene Flüssigkeit wird als Spumat bezeichnet. Der Teil des Schaumes, der an der Glasinnenwand der Zerschäumungssäule haftet und einen trockenen Schaum liefert, wird hier als fester Schaum bezeichnet.

Es wurde festgestellt, dass die Humulone in erster Linie am festen Schaum beteiligt sind, während die Isohumulone hauptsächlich im Spumat zu finden sind. Die Humulone sind unpolarer als die Isohumulone und stabilisieren den Schaum am stärksten, weil sie am längsten an im Schaum vorhandenen Proteinen haften bleiben.

4.2.3.4 Einfluss des pH-Wertes von Bier auf die Schaumbildung und die Anreicherung der Bitterstoffe im Schaum

50 ml Bier wurden mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf definierte pH-Werte eingestellt und in der mittleren Säule bei Gasflussrate $70 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ zerschäumt. In Abb. 4-29 sind die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Werte der Bitterstoffe in den Rückstandsproben der einzelnen Versuche dargestellt:

Bei der Zerschäumung von angesäuerten Bier (pH-Wert 2) enthielt der Rückstand fast keine Bitterstoffe mehr. Es erfolgte eine fast 100 %ige Anreicherung der Bitterstoffe im Schaum ohne Verluste. Bei Erhöhung des pH-Wertes erhöhte sich der Anteil an Bitterstoffen im Rückstand, insbesondere von Co-Isohumulon. Im stark alkalischen Medium bei pH-Wert 13 war die Schaumbildung wegen der seifenartigen Konsistenz der Probe schlecht. Aufgrund der

Abnahme der Oberflächenaktivität der Bitterstoffe im Alkalischen enthielt der Rückstand bei pH 13 einen beachtlichen Anteil. Dass der Rückstand bei pH 13 weniger Co-Isohumulon enthielt als der Rückstand bei pH 12, liegt an der zunehmenden Instabilität der Isohumulone im stark Alkalischen. Die Korrespondierenden Ausgangs- und Spumatproben enthielten daher ebenfalls nur noch einen kleinen Anteil der originär vorhandener Bitterstoffe. Dagegen war der Schaum im sauren Melieu stabil, die Bitterstoffe ließen sich besser anreichern und die Spumatmenge war höher als im Alkalischen, was auf die Stabilität des Schaumes zurückzuführen ist, da weniger Gasblasenkoaleszenz erfolgte. Somit blieb der Schaum insgesamt nasser und wies daher einen niedrigeren Anreicherungsfaktor auf als Schäume der alkalischen Proben (Ausnahme: stark alkalische Probe wegen Bitterstoffeabbau).

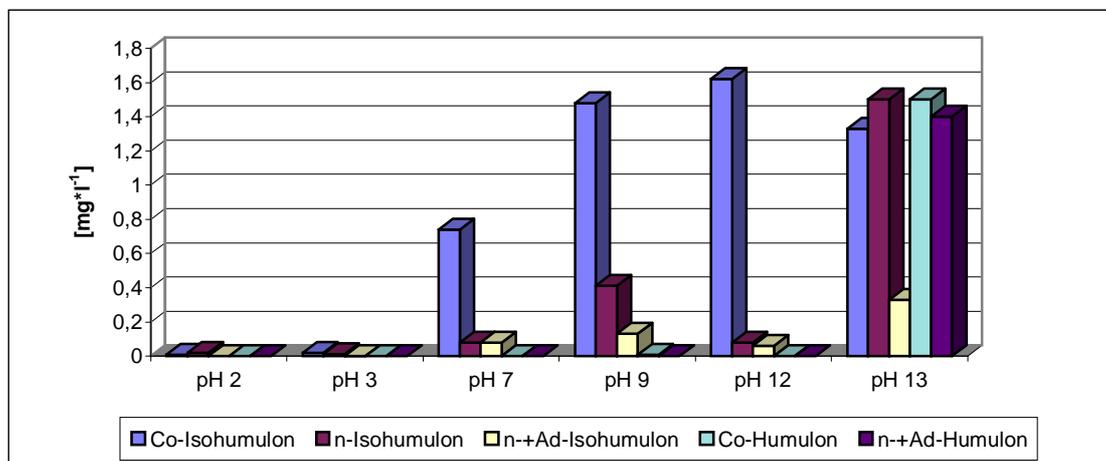


Abb. 4-29: HPLC/UV-Bestimmung der Bitterstoffe ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) aus den Rückstandproben, erhalten durch Zerschäumen von Pils-Bier im sauren und alkalischen Melieu

4.2.3.5 Einfluss der Gasart auf die Schaumbildung und die Anreicherung der Bitterstoffe im Schaum

Dazu wurden die Gase Stickstoff, Kohlendioxid, Helium und Argon verwendet. Der Schaum bei der Zerschäumung mit Stickstoffgas war deutlich feinporiger und somit cremiger als der von Kohlendioxid. Am feinsten war der Schaum mit Argon und es wurde am meisten Spumat erhalten. Die Gasart hat somit einen Einfluss auf die Schaumstruktur sowie die entstandene Spumatmenge und den Anreicherungsfaktor. Die Verhältnisse der einzelnen Bitterstoffe zueinander in den Spumatfraktionen und im Rückstand wurden von der Gasart nicht beeinflusst.

4.2.4 Carotinoide

Die Anreicherung von Carotinoiden war visuell feststellbar und konnte mittels spektralphotometrischer Messungen anhand des Gesamtcarotinoidgehaltes bestimmt werden. Mittels HPLC/UV-Analyse der Einzelkomponenten konnte die Carotinoid-Zusammensetzung einer Probe bestimmt werden und somit festgestellt werden, welche Carotinoide sich im Schaum anreichern. In Tab. 4-18 sind die durchgeführten Zerschäumungsversuche zusammengefasst.

Tab. 4-18: Die durchgeführten Zerschäumungsversuche zur Anreicherung von Carotinoiden:

Versuch	Probe	Saponin	Volumen	Säule	Spumat	Gasflussrate [ml*min ⁻¹]
1	Karottensaft	-	100 ml	mittel	15,1 g	30 - 100
2	Karottensaft	-	150 ml	groß	22,6 g	30 - 100
3	β-Carotin 10 % CWS* 12 mg*ml ⁻¹ in Wasser	0,3 g	200 ml	groß	52,3 g	20
4	Tomatensaft 1:1 verd. mit Wasser	-	100 ml	mittel	40 g	30 - 100
5	Orangensaft	-	100 ml	mittel	15,3 g	30 - 70
6	Orangensaft	-	150 ml	groß	21,61 g	30 - 70
7	Mandarinen-saft	-	200 ml	groß	26 g	30 - 70
8	Safran 0,2 g in 100 ml Wasser	0,1 g	100 ml	mittel	15 g	30 - 100

* CWS: Eine wasserdispergierbare Form von β-Carotin

Die Zerschäumungsdauer betrug 60 bis 90 min bzw. 120 min bei Probenvolumina von 100 ml bzw. 150-200 ml. Um die Schaumbildung und den Schaumaustritt zu fördern, wurde die N₂-Flussrate stufenweise erhöht, bis kein neuer Schaum mehr gebildet wurde.

4.2.4.1 Visuelle Beobachtungen der Carotinoidanreicherung

Bei der Zerschäumung von Karotten-, Tomaten-, Orangen- und Mandarinen-saft erfolgte eine mehr oder weniger deutliche Entfärbung des Ausgangssaftes, während sich das Spumat intensiver färbte, was auf die Anreicherung der Carotinoide zurückzuführen ist. Besonders deutlich wurde dies beim Tomatensaft, weil der Rückstand fast vollständig entfärbt wurde. Die Farbstoffanteile gingen in das Auffanggefäß über, oder setzten sich zum Teil an der Wand des Steigrohres ab. Bei den Orangensäften konnte man ebenfalls eine eindeutige Entfärbung

feststellen, bis zum Erreichen einer grapefruitsaftähnlichen Endfarbe im Ausgangssaft. Das Spumat war dunkelorange gefärbt (s. Abb. 8-4, Anhang), ebenso bei Mandarinsaft (s. Abb. 8-5, Anhang). Die Zerschäumung des Karottensafts verlief ähnlich wie die des Tomatensafts, allerdings, was die Entfärbung betrifft, weniger vollständig. Das liegt offenbar an der hohen Carotinoidkonzentration des Karottensafts. Bei der Zerschäumung von verdünntem Karottensaft war die Entfärbung der Probe bei der Zerschäumung deutlicher erkennbar. Der wässrige Extrakt des Safrans konnte mittels Zerschäumung nicht entfärbt werden. Es gab keinen Farbunterschied zwischen Ausgangsprobe, Spumat und Rückstand.

4.2.4.2 Spektralphotometrische Analyse zur Beurteilung der Anreicherung von Gesamtcarotinoiden aus Orangen-, Karotten- und Tomatensaft

Tab. 4-19: Gesamtcarotinoide ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) gemessen bei 450nm und berechnet als β -Carotin

Probe	Karottensaft	Orangensaft	Tomatensaft
Ausgangsprobe	55,6	7,0	16,58
Spumat	238,3	25,9	30,12
Rückstand	16,4	2,0	1,48
Saft : Spumat : Rückstand	1 : 4,3 : 0,3	1 : 3,7 : 0,3	1 : 1,8 : 0,1
Wiederfindungsrate [%]	90	82	78

4.2.4.3 Auswertung der Anreicherung von einzelnen Carotinoidkomponenten mit HPLC/UV-Analyse

Die Ausgangs-, Spumat- und Rückstandsproben der Zerschäumungsversuche mit Tomaten-, Karotten-, Orangen- und Mandarinsaft sowie einer wässrigen Probe eines dispergierbaren β -Carotinoid-Standards „ β -Carotin 10 % CWS“ wurden mittels HPLC/UV-Analyse auf ihren Carotinoid-zusammensetzung und -gehalt untersucht.

Zur Verfügung standen folgende Standards: Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, all-E-Lycopin und β -Carotin. Die Identifizierung der Carotinoide erfolgte anhand der Referenzsubstanzen (Standards) und der DAD-Spektren der Verbindungen. Tab. 4-20 zeigt die wichtigsten Carotinoide mit ihren Absorptionsmaxima nach [Wingerath et al., 1996].

Tab. 4-20: Absorptionsmaxima verschiedener Carotinoide in Methanol /Acetonitril / Dichlormethan / n-Hexan (Lycopin in Hexan) [Wingerath et al., 1996]

Verbindung	λ max	Verbindung	λ max
Violaxantin	414/439/468	Lycopin	478
Luteoxantin	399/420/447	Zeaxantin	426/451/478
Neoxanthin	411/434/463	β -Carotin	426/450/482
Taraxanthin	421/445/472	α -Carotin	442
Antheraxanthin	421/445/470	β -Cryptoxanthin	429/451/478
Mutatoxanthin	404/427/452	α -Cryptoxanthin	421/446/475
Lutein	422/445/474		

4.2.4.3.1 β -Carotin-Standard

Da ein Großteil der Carotinoide in Naturproben an Trübstoffen haftet, war es wichtig, die Anreicherung eines β -Carotin-Standards zu überprüfen, in dem β -Carotin gelöst in der Probe vorliegt. Dazu wurde die „ β -Carotin 10 % CWS“ –Probe verwendet. Sie enthält 10 % einer wasserdispergierbaren Form von β -Carotin. Dadurch konnte β -Carotin, das sonst nicht wasserlöslich ist, in wässriger Probe erhalten und nach Zusatz von Saponin zerschäumt werden (s. Versuch Nr. 3). Die Ausgangsprobe enthielt $12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ β -Carotin. Die Spumat-Probe war mit $60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ β -Carotin 5-fach angereichert. Die Rückstandsprobe enthielt nur noch $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ β -Carotin. Dadurch wird bestätigt, dass die Carotinoide (hier am Beispiel von β -Carotin) schaumaktive Verbindungen sind, die sich im Schaum anreichern lassen, unabhängig von der Art der Probe. So lag β -Carotin hier gelöst in Wasser vor, während in Naturproben die Carotinoide zum Teil auch an Trübstoffe gebunden vorliegen, was ihre Anreicherung erleichtert. Tomatensaft ist z.B. keine homogene Lösung, sondern die Carotinoide haften überwiegend an den Trübbanteilen des Safts, weswegen auch die Entfärbung des Saftes relativ schnell erfolgte im Gegensatz zu den anderen Säften, in denen die Carotinoide zum größten Teil gelöst vorlagen.

4.2.4.3.2 Tomatensaft

Das aufgenommene HPLC/UV-Chromatogramm (Abb. 4-30) zeigt die Carotinoid-Zusammensetzung vom Tomatensaft mit Lycopin und β -Carotin als Hauptkomponenten. Bei der Zerschäumung von Tomatensaft wurden sowohl Lycopin als auch β -Carotin im Schaum angereichert.

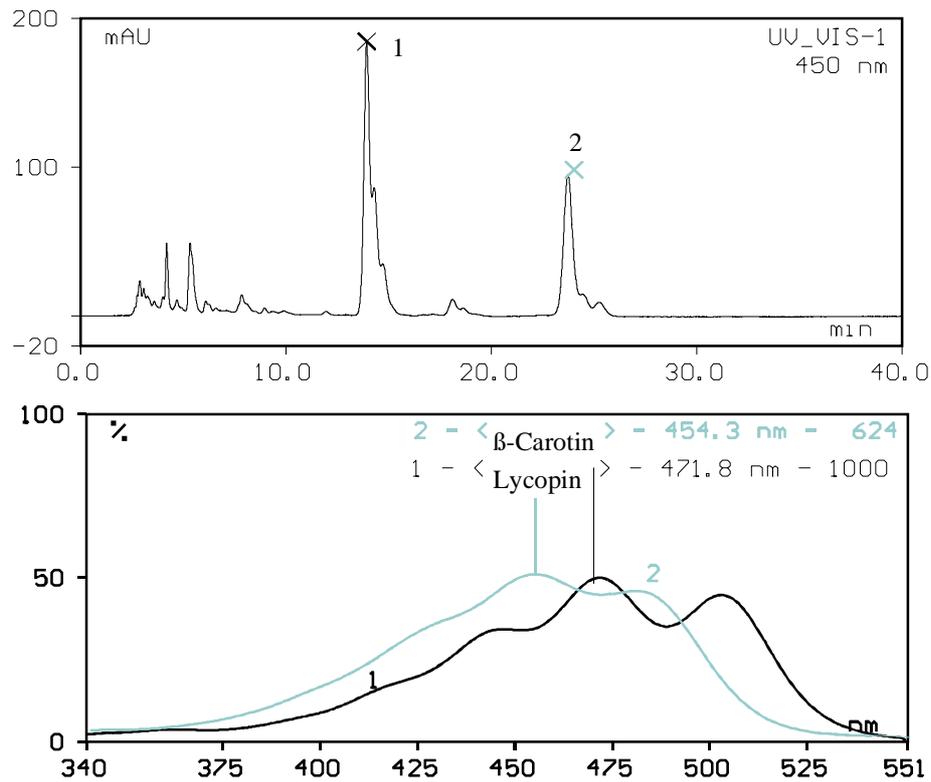


Abb. 4-30: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren von Carotinoiden im Tomatensaft (1: Lycopin, 2: β -Carotin)

4.2.4.3.3 Karottensaft

Abb. 4-31 zeigt das HPLC/DAD-Chromatogramm von Karottensaft mit den Carotinoiden Lutein, α -Carotin, und β -Carotin als Hauptverbindungen. Aus den gemessenen Konzentrationen (s. Abb. 4-32) erkennt man eine Anreicherung aller drei Carotinoide im Schaum.

	<u>Lutein</u>	<u>α-Carotin</u>	<u>β-Carotin</u>
Ausgang : Spumat : Rückstand	1 : 2,8 : 0,5	1 : 3,7 : 0,3	1 : 3,7 : 0,3

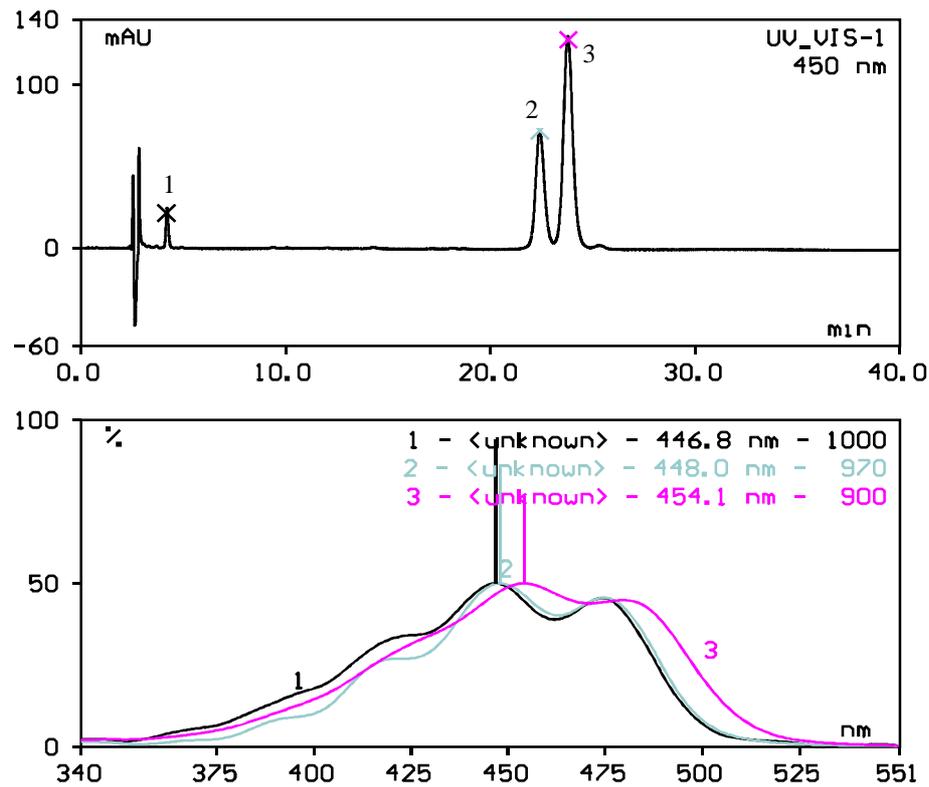


Abb. 4-31: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren von Carotinoiden im Karottensaft (1. Lutein; 2. α -Carotin; 3. β -Carotin)

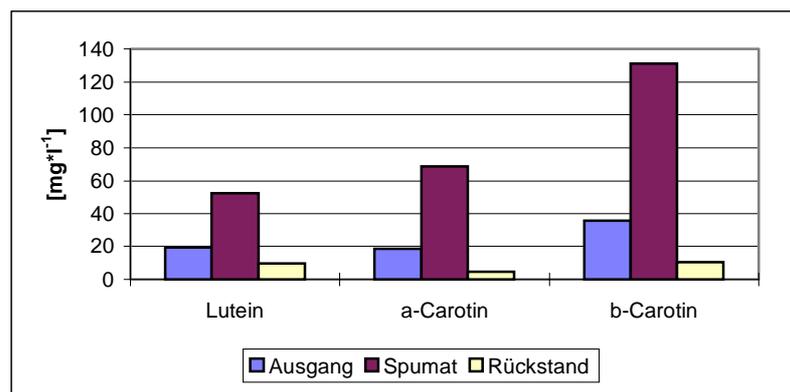


Abb. 4-32: Vergleich der Konzentrationen der Hauptcarotinoide des Karottensaftes (HPLC/DAD-Analyse) mit den Konzentrationen des Spumats und des Rückstandes

4.2.4.3.4 Orangen- und Mandarinenensaft

Einführung

Orangensaft und Mandarinenensaft enthalten ein komplexes Gemisch an Carotinoiden. Da nur einige Referenzcarotinoide zur Verfügung standen, konnten nicht alle Verbindungen, die HPLC/DAD-detektiert wurden, quantifiziert werden. In den folgenden Ergebnissen werden deshalb die Ausgangs-, Rückstands- und Spumat-Proben jeweils über die gemessenen Peakflächen nach Berücksichtigung von Verdünnungsfaktoren miteinander verglichen. Tabellarisch werden die Retentionszeiten und die Peakflächen der Hauptverbindungen aufgelistet.

Bei den später eluierenden Verbindungen handelt es sich um Carotinoid-Fettsäureester (z. B. β -Cryptoxanthin-Laurat, -Myristat und -Palmitat [Lin und Chen, 1995]). Der Vergleich der UV/VIS-Spektren spät eluierender Verbindungen mit dem UV/VIS-Spektrum des β -Cryptoxanthinstandards zeigt, dass es sich dabei u. a. um β -Cryptoxanthin-Fettsäureester handelt.

Bei Orangensaft bilden die Xanthophylle (am HPLC relativ früh eluierende Verbindungen) den Hauptanteil der Carotinoide. Mandarinenensaft enthält als Hauptcarotinoid β -Cryptoxanthin, wobei ein großer Teil davon in veresterter Form vorliegt.

a) Orangensaft

Orangensaft war ohne Zusatz von Schaumbildnern gut zerschäumbar. Aufgrund der Carotinoidanreicherung im Schaum war die Farbe des trüben Spumats dunkel-orange. Der Rückstand erinnerte sowohl farblich als auch geschmacklich an Grapefruit. Abb. 4-33 zeigt die HPLC/DAD-Chromatogramme von Ausgangsprobe (Orangensaft), Rückstand und Spumat (Abb. 4-34 zeigt übersichtshalber nur einen Ausschnitt davon). Die Spumatprobe wurde vor der Analyse um das 4,6-Fache verdünnt. Die dargestellten UV-VIS-Spektren (Abb. 4-35) zeigen die typischen Spektren für β -Cryptoxanthin und Violaxanthin.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich alle Xanthophylle, Carotinoide und Carotinoidefettsäureester des Orangensafts im Schaum durch Zerschäumung anreichern lassen.

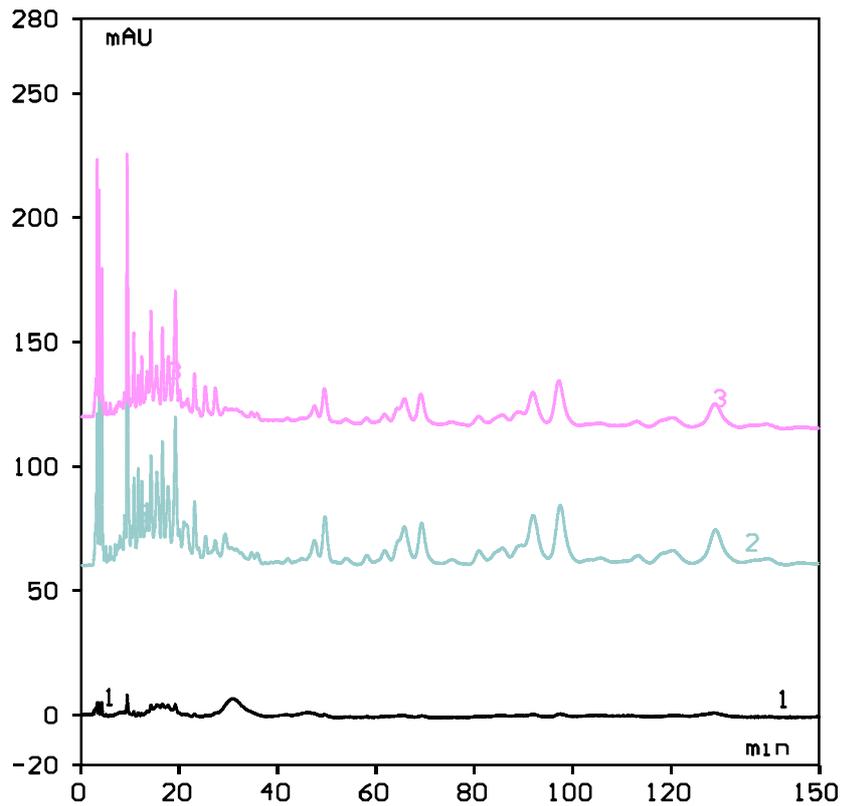


Abb. 4-33: HPLC/DAD-Chromatogramme von Carotinoiden in Orangensaft
(1. Rückstand, 2. Spumat, 3. Ausgangsprobe; Verdünnungsfaktor von Spumat = 4,6)

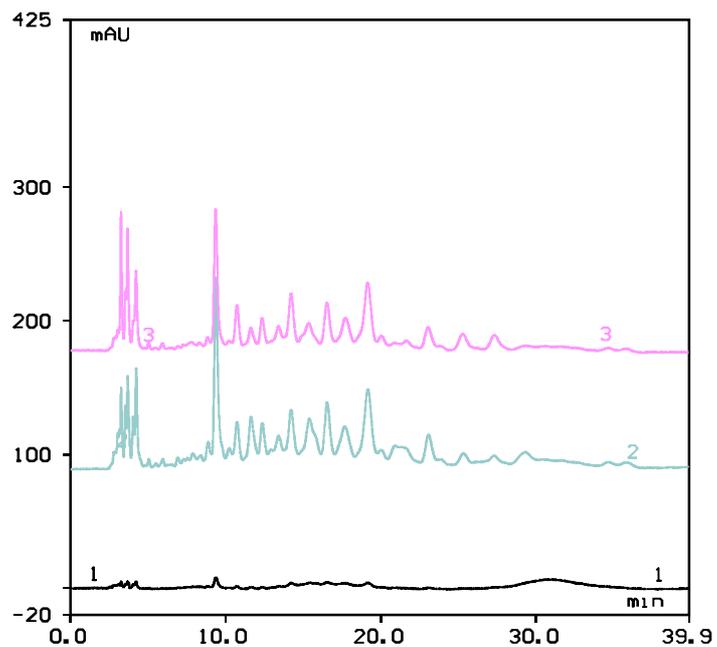


Abb. 4-34: Vergrößerter Ausschnitt von Abb. 4-33

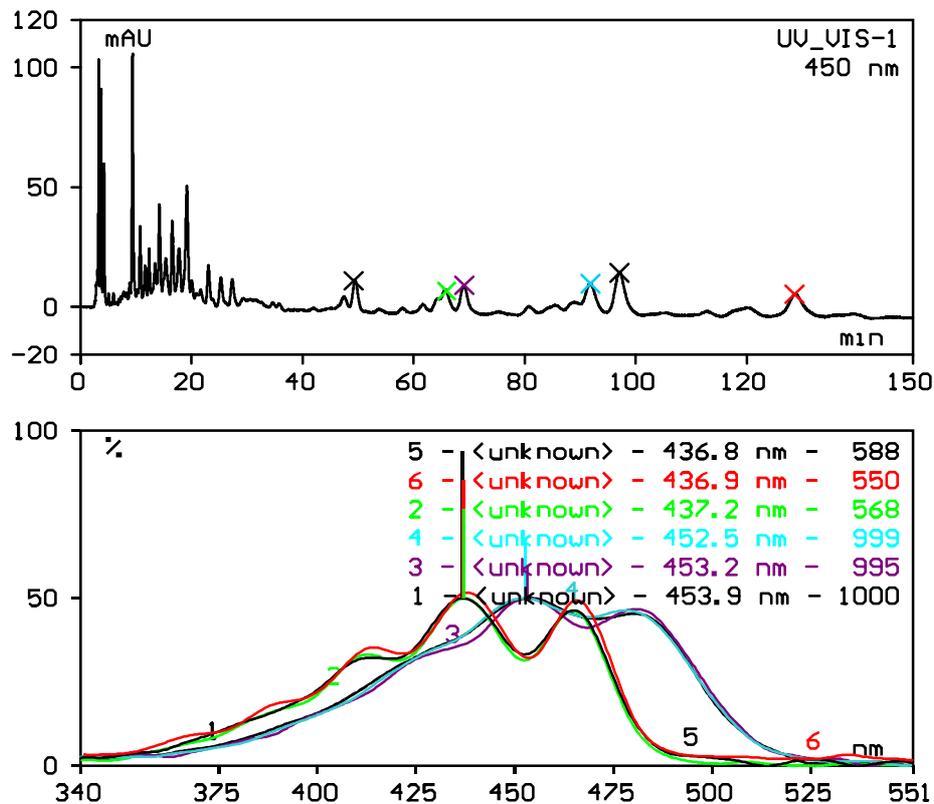


Abb. 4-35: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren einiger Carotinoide im Orangensaft.

Tab. 4-21: Die mit HPLC-DAD-Analyse erfassbaren Verbindungen des Orangensafts, die typische UV-VIS-Spektren für Carotinoide zeigen

Retentionszeit [min]	Ausgangsprobe FE*	Spumat FE	Anreicherungs-Faktor**	Rückstand FE	Verbindung***
4,24	9,17	58,85	6,4	0,7	Zeaxanthin
9,5	26,72	177	6,6	1,7	β -Cryptoxanthin
14,2	13,4	76,86	5,8	0	
19,16	23,72	149,6	6,5	1	
49,5	11,63	67,6	5,8	0	
65,7	13,74	126,91	9,2	2,7	
69	15,25	94,3	6,1	0	
91,77	30,3	206,9	6,8	0	
97,15	36,80	218,3	5,9	2,3	
120,08	13,86	96,7	7	1,6	
128,75	28,86	193,6	6,7	5	

* FE: die am HPLC/DAD gemessene Flächeneinheit [mAU]

** Anreicherungs-faktor = Flächeneinheit Spumat : Flächeneinheit Ausgangsprobe

*** Identifizierung anhand der Referenzsubstanzen und der UV/VIS -Spektren

b) Mandarinensaft

Mandarinensaft war wie Orangensaft ohne Zusatz von Schaumbildnern gut zerschäumbar. Auch hier war wegen der Anreicherung der Carotinoide im Schaum das trübe Spumat dunkelorange eingefärbt, die Farbe des Rückstands dagegen hell-gelb. Abb. 4-36 zeigt die HPLC/DAD-Chromatogramme des Mandarinensafts mit den zugehörigen UV-VIS-Spektren. Die UV-VIS-Spektren zeigen typische Carotinoidspektren.

Auch hier lassen sich alle Xanthophylle, Carotinoide und Carotinoidfettsäureester des Mandarinensafts im Schaum anreichern.

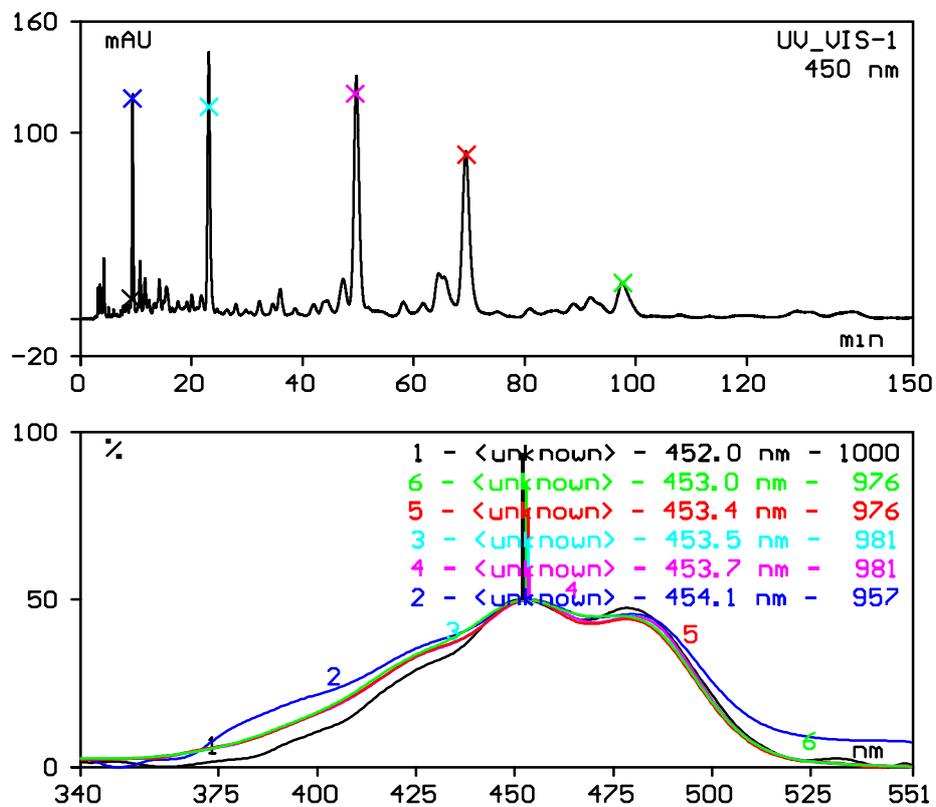


Abb. 4-36: HPLC/DAD-Chromatogramm und UV-VIS-Spektren von Carotinoiden im Mandarinensaft.

Tab. 4-22: Die mit HPLC-DAD-Analyse bestimmten Verbindungen des Mandarinensafts, die typische UV-VIS-Spektren von Carotinoiden aufweisen.

Retentionszeit [min]	Ausgangsprobe FE*	Spumat FE	Anreicherungs- Faktor**	Rückstand FE	Verbindung***
9,5	70,1	462	6,6	2,6	β-Cryptoxanthin
12,9	16,1	63,9	4	0	Violaxanthin
17,3	12,5	45,3	3,6	0	
23,7	12,3	51,6	4,2	0	β-Carotin
27,3	46,1	388,9	8,4	2,4	
49,5	34,2	306,5	9	0	
69	269	2364	8,8	0	
91,77	79,7	723	9,1	0	
97,15	311,9	2784	8,9	0	
120,1	60,7	592,1	9,8	0	
128,8	149,3	775,4	5,2	0	

* FE: die am HPLC/DAD gemessene Flächeneinheit [mAU]

** Anreicherungsfaktor = Flächeneinheit Spumat : Flächeneinheit Ausgangsprobe

*** Identifizierung anhand der Referenzsubstanzen und UV/VIS-Spektren

4.2.4.4 Untersuchung der Anreicherung von Crocin aus Safran „*Crocus sativus*“

Wässriger Safranpulverextrakt war ohne Saponinzugabe nicht zerschäumbar. Der wässrige Extrakt des Safrans wurde bei der Zerschäumung auch nicht entfärbt (keine Farbunterschied zwischen Ausgangsprobe, Spumat und den Rückstand).

4.2.5 Curcuminoide und Turmerone aus Kurkuma

Einleitung:

Sowohl die Curcuminoide (Bisdemethoxycurcumin, Demethoxycurcumin und Curcumin) als auch die Turmerone (Hauptaromaverbindungen der Kurkuma: ar-Turmeron, Turmeron und Turmerol) ließen sich im Schaum quantitativ anreichern. Die Curcuminoide wurden mittels HPLC/UV-Analyse anhand von Curcumin-Standard identifiziert. Die Identifizierung der Turmerone, die ebenfalls am HPLC-UV detektiert wurden, erfolgte durch HRGC/MS-Analyse.

Neben den Anreicherungsfaktoren wurde die Stabilität der Verbindungen während der Zerschäumung über die Wiederfindungsraten untersucht. Die Anreicherung der Curcuminoide aus verdünnten Standardproben und konzentrierten Proben wurde verglichen. Die Wasserlöslichkeit der Verbindungen wurde ebenfalls bestimmt.

Tab. 4-23: Tabellarische Zusammenfassung der durchgeführten Zerschäumungsversuche

Saponin [g]	Volumen [ml]	Säule	Schaumaustritt [min]	Spumatmenge [g]	Gasflussrate [ml*min ⁻¹]
Versuch A: wässriger Kurkumaextrakt (1 g*(100 ml) ⁻¹):					
-	200	groß	15 - 90	32	100
Versuch B: methanolische Curcumin-Standardlösung					
10 ml Probe (1 g*l ⁻¹) mit Wasser auf 200 ml (50 mg*l ⁻¹)					
0,03	200	groß	15 - 90	6,6	30 (0-5 min) 20 (5-95 min)
Versuch C: 1ml methanolische Curcumin-Standardlösung (1 g*l ⁻¹) mit Wasser auf 200ml verdünnt, Rückstandsproben alle 10 min entnommen					
0,3	200	groß	15-70	20	30 (0-33 min) 50 (25-33 min) 70 (33-40 min) 100 (40-70 min)
Versuch D: 1ml methanolische Curcumin-Standardlösung 10 g*l ⁻¹ mit Wasser auf 200ml verdünnt, Rückstandsproben alle 10 min entnommen					
0,3	200	groß	15-80	13,6 (20-40 min) 3,6 (33-80 min)	30 (0-60 min) 50 (60-80 min)

4.2.5.1 Quantifizierung der Curcuminoide

Da der verwendete Standard (techn.) neben Curcumin als Hauptkomponente auch unbekannte Mengen an Bisdemethoxy- und Demethoxycurcumin enthielt, sind die Konzentrationsangaben für Curcumin lediglich semiquantitativ. Eine quantitative Auswertung von Curcumin, Bisdemethoxy- und Demethoxycurcumin wurde zusätzlich dadurch erschwert, dass die molare Extinktion von Bisdemethoxycurcumin 3,5-fach höher als die von Curcumin ist [Kehrer, 1996] und eine Basislinientrennung der drei Verbindungen unter den angewandten HPLC-Bedingungen nicht möglich war. Deshalb wurden die Verhältnisse der gemessenen Peakflächen der oben genannten Curcuminoide in den verschiedenen Proben zueinander ausgewertet. Trotzdem ist eine deutliche Anreicherung der Verbindungen im Schaum (Abb. 4-37) erkennbar. Die Nachweisgrenze der Curcuminoide unter den angewandten analytischen Bedingungen betrug 1 mg*l⁻¹.

4.2.5.2 Wasserlöslichkeit der Curcuminoide aus dem Kurkumapulver

Die mit Hilfe von Curcumin techn. (Einwaage 0,1 g*(100 ml)⁻¹) berechnete Konzentration für Curcumin im methanolischen Extrakt des Kurkumapulvers ergibt einen Gehalt von **1,7 %** im verwendeten Kurkumapulver.

Curcumin-Standard-Lösung: 0,01g Curcumin in 100 ml Methanol

Kurkumapulver-Extrakte: 1g Kurkuma in 100 ml Methanol bzw. Wasser

Die Wiederfindungsrate der Verbindungen im wässrigen Extrakt des Kurkumapulvers, bezogen auf die methanolische Extraktion (100 %) betrug für Bisdemethoxycurcumin 14 %, für Demethoxycurcumin 6,7 % und für Curcumin 2,6 %.

Ein Zusatz von 10 % Ethanol zum Extraktionswasser bewirkte keine Erhöhung der Ausbeute. Bisdemethoxycurcumin ist somit wesentlich besser wasserlöslich als Curcumin. Es bildet daher die Hauptverbindung der Curcuminoid-Fraktion bei der HPLC-Analyse wässriger Extrakte. Im methanolischen Extrakt dagegen ist Curcumin die Hauptkomponente. Die Verbindungen wurden über Elutionsreihenfolge, Retentionszeit und UV/VIS-Spektren identifiziert.

4.2.5.3 Anreicherung von Curcuminoiden durch Zerschäumung

Die Entfärbung der wässrigen Kurkumaextrakte bei der Zerschäumung und damit die Anreicherung der gelben Farbstoffe im Schaum war optisch eindeutig erkennbar. (vgl. Abb. 8-6, Anhang). Der Rückstand entfärbte sich nach hellgelb. Die Spumatprobe dagegen war dunkelgelb und trüb (Anreicherung von Proteinen und Curcuminoiden; Spumat: 16 % des Ausgangsvolumens). Abb. 4-37 zeigt die aufgenommenen HPLC-Chromatogramme der Ausgangs-, Spumat- und Rückstandsprobe des wässrigen Kurkumaextraktes. Die Messwerte zeigten eine deutliche Anreicherung im Spumat. Der Rückstand enthielt nur noch Spuren an Farbstoffen.

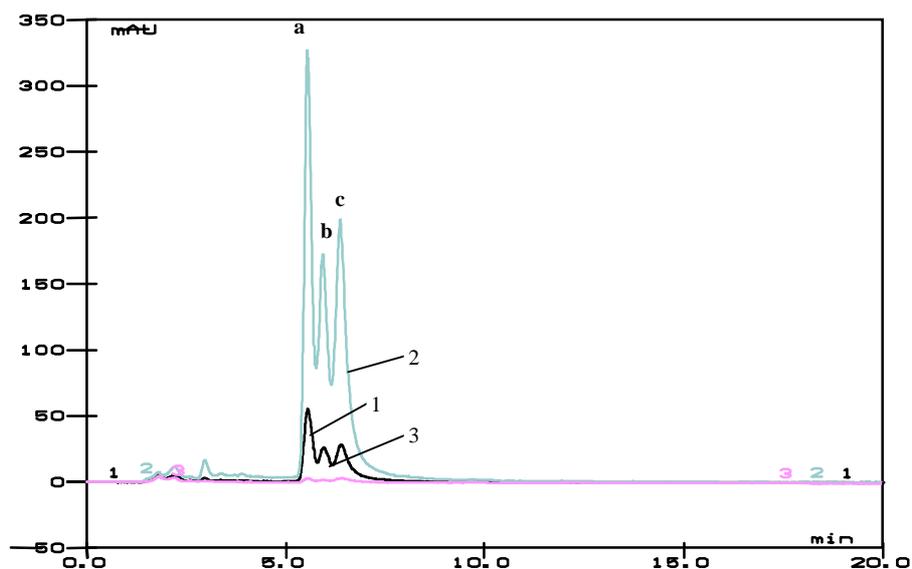


Abb. 4-37: HPLC/UV-Chromatogramme von Curcuminoiden im wässrigen Extrakt von Kurkumapulver (a. Bisdemethoxycurcumin, b. Demethoxycurcumin, c. Curcumin; Chromatogramm Nr. 1. Ausgangsprobe, 2. Spumatprobe, 3. Rückstand)

Die Anreicherung der Curcuminoide aus dem wässrigen Extrakt des techn. Curcumin-Standards erfolgte unter Saponinzusatz. Auch hier waren Rückstand hellgelb und Spumatprobe dunkelgelb gefärbt.

Anreicherungsfaktor:

Der Anreicherungsfaktor (gemessen über die Peakflächen) gibt das Verhältnis der Konzentration der Spumatprobe zur Ausgangsprobe an und betrug für Bisdemethoxycurcumin 5,64; Demethoxycurcumin 6,47 und Curcumin 7,25.

Verhältnisse der Curcuminoide zueinander:

	<u>Bisdemethoxycurcumin : Demethoxycurcumin : Curcumin</u>				
Ausgangsprobe	1	:	0,53	:	0,75
Spumat	1	:	0,61	:	0,97

In Ausgangs- und Spumatprobe sind die Verhältnisse der Curcuminoide zueinander ähnlich. Dies deutet auf ähnliches Verhalten der Komponenten bezüglich der Anreicherung im Schaum hin.

Wiederfindungsrate:

Bezogen auf die berechnete Konzentration von Curcumin im wässrigen Extrakt von Kurkumapulver ergibt sich im Spumat eine Wiederfindungsrate von ca. 111 % (zu hohe Wiederfindungsrate in erster Linie auf unzureichende chromatographische Trennung der Curcuminoide zurückzuführen). Demnach erfolgt kein Abbau der Curcuminoide während der Zerschäumung und sie ist deshalb als schonende Methode für die Anreicherung von Curcuminoiden aus wässrigen Extrakten von Kurkumapulver geeignet.

4.2.5.4 Zeitlicher Anreicherungsverlauf der Curcuminoide im Schaum

Nach definierten Zeitabständen wurden aliquote Rückstandsproben gezogen, um den zeitlichen Anreicherungsverlauf der Curcuminoide im Schaum zu überprüfen. Die aufgenommenen HPLC/UV-Chromatogramme zeigen, dass auch die Nebenkomponten Bisdemethoxycurcumin und Demethoxycurcumin wie Curcumin kontinuierlich bis zum Ende der Zerschäumung angereichert werden, auch wenn beide in viel niedrigerer Konzentration als Curcumin vorliegen. Dies liegt offensichtlich daran, dass Curcumin, wegen seiner niedrigeren Polarität, bevorzugt im Schaum angereichert wird.

Während bei der Zerschäumung von konzentrierten Proben eine Entfärbung erst nach 80 min sichtbar wurde (s. Versuch C), erfolgte bei 10-fach verdünnten Proben (Versuch D) eine Entfärbung bereits nach 10 min Zerschäumung. Die zweite Rückstandsprobe (nach 20 min) war bereits vollständig entfärbt.

Aus beiden Proben erfolgte die Anreicherung aller drei Curcuminoide kontinuierlich und gleichmäßig, unabhängig von der Konzentration der Verbindungen in der Probe.

4.2.5.5 Charakterisierung und Quantifizierung der Turmerone

Untersucht wurden die Hauptkomponenten *ar*-Turmeron, Turmeron und Turmerol. Die Turmerone machen 60-70 % des etherischen Extraktes der Kurkuma aus und verleihen dem Kurkuma-Aroma den typischen Charakter. Der Gesamtgehalt des untersuchten Kurkumapulvers an Turmeronen betrug 1,2 %.

Die HPLC/UV-Analyse wurde bei 428 nm und 254 nm durchgeführt. Bei 254 nm war es möglich, die Turmerone neben den Curcuminoiden zu detektieren [Smith and Witowska, 1984]. Mit Hilfe der GC/FID- sowie HRGC/MS-Analyse der Ausgangs-, Spumat- und Rückstandsproben nach deren Extraktion mit Ether konnte abgesichert werden, dass es sich bei den Verbindungen tatsächlich um die Turmerone handelt.

4.2.5.6 Wasserlöslichkeit der Turmerone aus dem Kurkumapulver

Im wässrigen Extrakt von Kurkumapulver waren überwiegend Turmerone (Sesquiterpenketone) zu finden. Bezogen auf den Gehalt an Turmeronen im etherischen Extrakt von Kurkumapulver (1,2 %) betrug die Ausbeute im wässrigen Extrakt ca. 10 %. Die im Kurkumaöl enthaltenen Monoterpene und Sesquiterpene waren mit Wasser nicht extrahierbar. In der Auswertung wurde lediglich auf die Hauptkomponenten des Kurkuma-Aromas (Turmerone) eingegangen.

4.2.5.7 Anreicherung von Turmeronen durch Zerschäumung

Neben den Curcuminoiden wurden auch Turmerone im Schaum angereichert. Am Ende der Zerschäumung enthielt der Rückstand keine Turmerone mehr. Die ermittelten Konzentrationen der Turmerone sind in Tab. 4-24 zusammen mit den m/z-Werten

(HRGC/MS-Analyse) aufgelistet. Für die Analysen wurden jeweils 100 ml Ausgangs- und Rückstandsprobe sowie 30 ml Spumatprobe eingesetzt.

Tab. 4-24: Die GC/FID- bzw. HRGC/MS-Messwerte der Ausgangs-, Schaum- und Rückstandsprobe des wässrigen Extraktes von Kurkumapulver (Probenvolumen: Ausgangs- und Rückstandsprobe 100ml, Spumat 30ml)

Verbindung	m/z	Ausgangsprobe [mg·l ⁻¹]	Spumatprobe [mg·l ⁻¹]	Rückstandsprobe [mg·l ⁻¹]
ar-Turmeron	83-119-216	632	935	7
Turmeron	83-105-120-218	193	270	13
Turmerol	120-83-218	259	363	8

Anreicherungsfaktor:

Der Anreicherungsfaktor gibt das Verhältnis der Konzentration der Spumatprobe zur Ausgangsprobe an einzelnen Turmeronen an. Da von Spumat lediglich 30 ml zur Aufarbeitung, von der Ausgangsprobe jedoch 100 ml eingesetzt wurden, wird die Spumatprobe mit dem Faktor 3,33 multipliziert. Dann ist es möglich, die Konzentrationen beider Proben direkt miteinander zu vergleichen. Damit ergibt sich für ar-Turmeron ein Anreicherungsfaktor von 4,9; Turmeron von 4,7 und Turmerol von 3,3. Die gaschromatographisch gemessenen Konzentrationen der Ausgangs- und Spumatprobe des wässrigen Kurkumaextraktes (berechnet jeweils auf 100 ml Probenvolumen) sind in Abb. 4-38 dargestellt.

Wiederfindungsrate:

Bezogen auf den Gehalt an Turmeronen in der Ausgangsprobe (2,16 mg) betrug die Wiederfindungsrate der relativ schwerflüchtigen Turmerone nach der Zerschäumung 80 %. Verluste an Turmeronen können weiter verringert werden, wenn unter schonenden Bedingungen gearbeitet wird (direktes Einleiten des Schaumes in eine vorgelegte Lösung unter Inertgas).

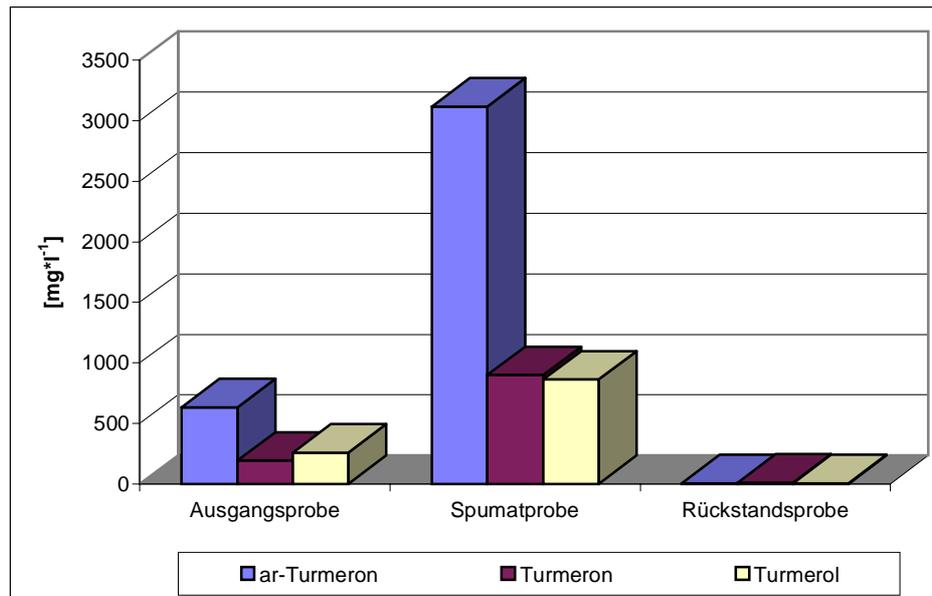


Abb. 4-38: Vergleich der mittels GC/FID-Analyse gemessenen Konzentrationen der Ausgangs-, Spumat- und Rückstandsprobe des wässrigen Kurkumaextraktes (berechnet jeweils auf 100ml Probenausgangsvolumen)

4.2.6 Glykoalkaloide aus Kartoffelpresssaft

Frisch gepresster Kartoffelsaft wurde nach Verdünnung mit Wasser zerschäumt. Er bildete einen sehr stabilen Schaum. Ebenso wurde die wässrige Standardlösung der Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin mit Hilfe von Saponin zerschäumt. Die Versuche sind in Tab. 4-25 aufgelistet. Die Bestimmung der Glykoalkaloide erfolgte mittels der HPLC/UV-Analyse.

Tab. 4-25: Die durchgeführten Zerschäumungsversuche mit Kartoffelpresssaft und Glykoalkaloid-Standard

Probe	Saponinzusatz	Volumen	Säule	Spumat	Gasflußrate	Schaumaustritt
5ml Glykoalkaloid-Standardlösung mit Wasser auf 100ml	0,03 g	100 ml	mittel	7,2 g	20 ml*min ⁻¹ (0-60 min)	17,5 - 60 min
1:10 verdünnter Kartoffelsaft	-	200 ml	groß	36,5 g	20 ml*min ⁻¹ (0-3 h) ml*min ⁻¹ 40 (3-3,5 h)	20 min – 3,5 h

4.2.6.1 Anreicherung von Glykoalkaloiden durch Zerschäumung

4.2.6.1.1 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

Tab. 4-26: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen und berechneten Absolutmengen der Glykoalkaloide bei der Zerschäumung von Glykoalkaloid-Standardlösung und Kartoffelpreßsaft, ihre Anreicherungsfaktoren im Schaum und ihre Wiederfindungsraten.

Probe	Glykoalkaloid-Standard-lösung		Kartoffelsaft	
	α -Solanin [mg·l ⁻¹]	α -Chaconin [mg·l ⁻¹]	α -Solanin [mg·l ⁻¹]	α -Chaconin [mg·l ⁻¹]
Ausgang	6,0	13,2	1,0	1,6
Spumat	85,0	141,8	5,0	7,2
Rückstand	0	0	0	0
Anreicherungsfaktoren (Konz. Spumat/Konz. Ausgangslösung)	14,2	10,7	5,0	4,5
Absolutmengen [mg]				
Ausgangslösung	0,6*(100 ml) ⁻¹	1,32*(100 ml) ⁻¹	0,20*(200 ml) ⁻¹	0,32*(200 ml) ⁻¹
Spumat	0,6*(7,2 ml) ⁻¹	1,02*(7,2 ml) ⁻¹	0,18*(36,5 ml) ⁻¹	0,26*(36,5 ml) ⁻¹
Rückstand	0,0*(92,8 ml) ⁻¹	0,0*(92,8 ml) ⁻¹	0,0*(163,5 ml) ⁻¹	0,0*(163,5 ml) ⁻¹
Wiederfindungsraten [%]	100	77	91	82

4.2.6.1.2 Anreicherung der Glykoalkaloide aus Kartoffelsaft

Abb. 4-39 zeigt das HPLC/UV-Chromatogramm von Kartoffelsaft. Die detektierten Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin wurden mit Hilfe der Messung der Standards identifiziert.

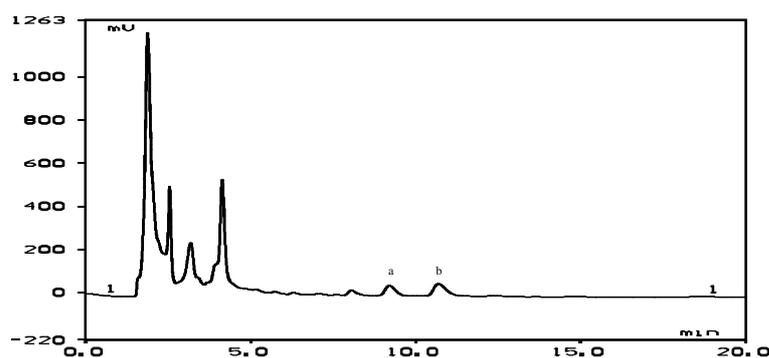


Abb. 4-39: HPLC/UV-Chromatogramm der Glykoalkaloide in Kartoffelsaft [(a) α -Solanin, (b) α -Chaconin]

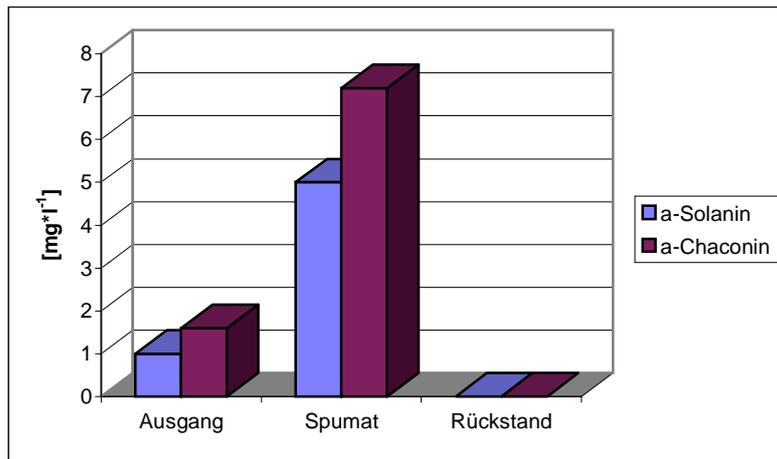


Abb. 4-40: Anreicherung der Glykoalkaloide aus Kartoffelpresssaft im Schaum

4.2.6.1.3 Anreicherung der Glykoalkaloide aus der Standardlösung:

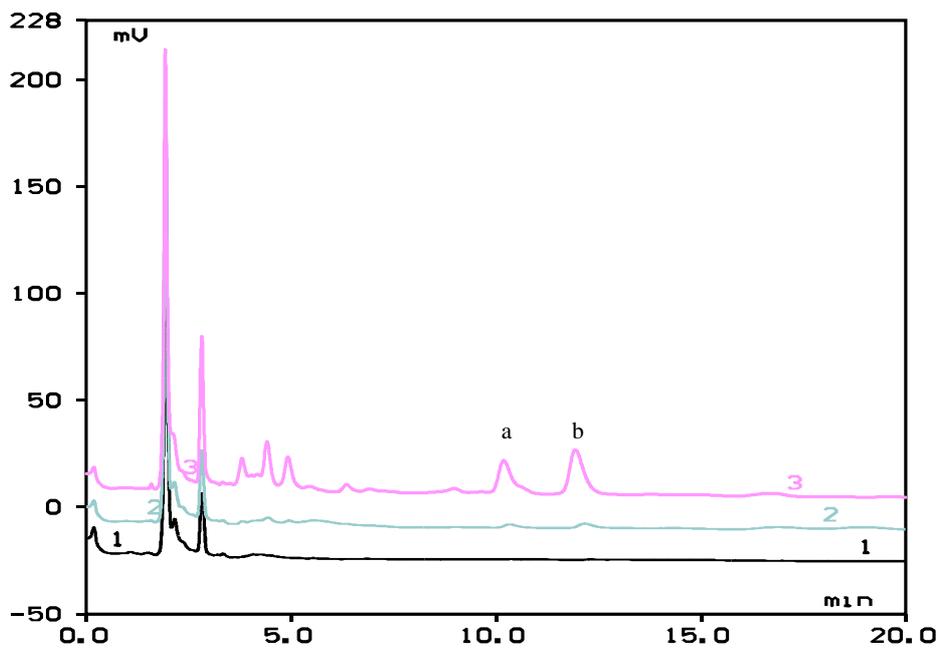


Abb. 4-41: HPLC/UV-Chromatogramme der Glykoalkaloide in der Standardlösung [(a) α -Solanin, (b) α -Chaconin; (1) Rückstand, (2) Ausgangsprobe, (3) Spumat]

Die Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin sind schaumaktiv und mittels Zerschäumung im Schaum praktisch quantitativ angereichert worden. Anhand dieses Anwendungsbeispiels präsentiert sich die Zerschäumungsanalyse nicht als Anreicherungsmethode wertvoller Pflanzeninhaltsstoffe, sondern als Eliminierungsmethode unerwünschter toxischer Inhaltsstoffe.

4.2.7 Kavapyrone und Flavokavine in Kava-Kava

Einleitung:

Bei der Zerschäumung von wässrigen Kava-Kava-Pulverextrakten ließen sich in erster Linie die NebenkompONENTEN Flavokavine im Schaum anreichern. Bei den Kavapyronen dagegen war entweder keine oder eine nur teilweise Anreicherung feststellbar. Um zu überprüfen, welchen Einfluss die unterschiedliche Konzentration einzelner Flavokavine und Kavapyrone auf die Anreicherung hat, wurden Zerschäumungsversuche mit wässrigen Proben von Kavain-Standard und Kava-Kava-HD-Extrakten mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen unter Saponinzusatz durchgeführt. Durch Variation der Saponin-Konzentration wurde zusätzlich deren Einfluss überprüft.

Tab. 4-27: Übersicht der Zerschäumungsversuche zur Anreicherung von Flavokavinen und Kavapyronen

Ausgangsmaterial	Probe	Saponinzusatz	Volumen	Säule	Spumat	Gasflussrate [ml*min ⁻¹]	Schaumaustritt
Kavain-Standard							
Stammlösung (SL): 40 mg Kavain / 20 ml Methanol							
1	10,5 mg* l ⁻¹ (1 ml SL auf 100 ml H ₂ O)	0,03 g	100 ml	mittel	9,37 g	20 (0-38 min) 100 (38-40 min)	17-40 min
2	2,10 mg* l ⁻¹ (0,2 ml SL auf 100 ml H ₂ O)	0,03 g	100 ml	mittel	5,98 g	20 (0-33 min) 100 (33-35 min)	17-35 min
3	1,05 mg* l ⁻¹ (0,1 ml SL auf 100 ml H ₂ O)	0,03 g	100 ml	mittel	5,35 g	20 (0-38 min) 100 (38-40 min)	17-40 min
4	2,10 mg* l ⁻¹ (0,2 ml SL auf 100 ml H ₂ O)	0,06 g	100 ml	mittel	12,26 g	20 (0-78 min) 100 (78-80 min)	17-80 min
5	2,10 mg* l ⁻¹ (0,2 ml SL auf 100 ml H ₂ O)	0,1 g	100 ml	mittel	22,31 g	20 (0-117 min) 15 (117-120 min)	17-120 min
Kava-Kava-HD-Extrakt							
Stammlösung (SL): 100 mg HD-Extrakt / 50 ml Methanol							
1	10 ml SL auf 100 ml H ₂ O	0,1 g	100 ml	mittel	19,45 g	20 + 100	17-90 min
2	10 ml SL auf 100 ml H ₂ O	0,03 g	100 ml	mittel	11,14 g	20 + 100	17-50 min
3	2 ml SL auf 100 ml H ₂ O	0,03 g	100 ml	mittel	6,23 g	20 + 100	17-50 min
Kava-Kava-Pulver							
wässriger Extrakt: 0,5 g / 100 ml bides. H₂O							
1	100 ml wässriger Extrakt	0,05 g	100 ml	mittel	10,05 g	12 (0-60 min) 20 (60-80 min) 100 (80-82 min)	25-82 min
2	Rückstand von Versuch 1 (Kava-Pulver)	0,05 g	70 ml	mittel	7,45 g	12 (0-60 min) 20 (60-100 min) 100 (100-103 min)	25-103 min

Die Bestimmung von Kavapyronen neben Flavokavinen erfolgte mittels HPLC/UV-Analyse. Die Quantifizierung von Kavapyronen erfolgte über Kavain unter Verwendung von Korrekturfaktoren. Die Quantifizierung von Flavokavinen erfolgte über einen Kava-Kava-HD-Extrakt, der einen definierten Gehalt an Flavokavin A enthält.

4.2.7.1 Untersuchung des Verhaltens von Kavain bei der Zerschäumung der wässrigen Kavain-Standardlösung unter Saponinzusatz

Der Einfluss der Kavain- und Saponinkonzentrationen auf das Anreicherungsverhalten wurde untersucht.

Tab. 4-28: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen des Kavains bei der Zerschäumung von Kavain-Standardlösung.

Versuch Nr.	Saponin-Konzentration	Ausgangssprobe [mg*l ⁻¹]	Spumat [mg*l ⁻¹]	Rückstand [mg*l ⁻¹]
1	0,03 g*(100 ml) ⁻¹	10	17,7	8,8
2	0,03 g*(100 ml) ⁻¹	2	7,5	1,7
3	0,03 g*(100 ml) ⁻¹	1	4,4	0,7
4	0,06 g*(100 ml) ⁻¹	2	5,9	1,2
5	0,10 g*(100 ml) ⁻¹	2	5,2	0,9

A. Einfluss der Kavain-Konzentration auf seine Anreicherung

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Kavain-Konzentration auf ihre Anreicherung im Schaum hat, wurden die Versuche 1, 2 und 3 mit Kavain-Standardlösung bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (s.Tab. 4-27). Die Kavain-Konzentrationen der Proben sind in Tab.4-29 dargestellt. Die prozentualen Konzentrationen des Kavains im Rückstand bezogen auf die jeweiligen Ausgangskonzentrationen von 10 (Versuch 1), 2 (Versuch 2) und 1 mg*l⁻¹ (Versuch 3) betragen 84, 81 und 70 %. Dies zeigt, dass Kavain auch aus sehr verdünnten Proben nur zum Teil anzureichern ist. So konnte eine 10-fache Verdünnung die Konzentration im Rückstand lediglich von 84 % auf 70 % herabsetzen.

Dass Kavain potentiell schaumaktiv ist, kann man an seiner Konzentration in den Schaumfraktionen feststellen. Der Anreicherungsfaktor war bei den am stärksten verdünnten Proben am höchsten. So betrug der Anreicherungsfaktor der Spumatprobe, erhalten durch Zerschäumung der Probe mit einer Kavain-Ausgangskonzentration von 10 mg*l⁻¹ 1,7 und der Anreicherungsfaktor, erhalten durch Zerschäumung der Probe mit 2 mg*l⁻¹ Kavain 3,6. Am höchsten lag der Anreicherungsfaktor mit 4,2 bei der Zerschäumung der Probe mit einer Kavain-Ausgangskonzentration von 1 mg*l⁻¹. Dass der Anreicherungsfaktor im Versuch 1 besonders niedrig ist, liegt zusätzlich an der hohen Spumatmenge.

B. Einfluss der Saponin-Konzentration auf die Anreicherung von Kavain

Um den Einfluss der Saponin-Konzentration auf die Anreicherung von Kavain im Schaum zu überprüfen, wurden die Versuche 3, 4 und 5 mit Kavain-Standardlösung bei verschiedenen Saponin-Konzentrationen durchgeführt (s. Tab. 4-27). Mit der Erhöhung der Saponin-Konzentration erhöhten sich die Zerschäumungsdauer (d.h. die Schaumbildung), die entstandene Spumatmenge und die Anreicherung von Kavain. So konnte die Konzentration des Kavains im Rückstand von 81 % über 56 % auf 43 % herabgesetzt werden durch Erhöhung der Saponinkonzentration von 0,03 g über 0,06 g auf $0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$.

Die Wiederfindungsrate betrug 86-98 % und war von Kavain- bzw. Saponin-Konzentration unabhängig.

4.2.7.2 Untersuchung des Verhaltens von Kavapyronen und Flavokavinen bei der Zerschäumung von wässrigen Proben des Kava-Kava-HD-Extrakts

Die Stammlösung des Kava-Kava-HD-Extrakts enthielt folgende Verbindungen:

Methysticin (M), Dihydromethysticin (DHM), Kavain (K), Dihydrokavain (DHK), Yangonin (Y), Desmethoxyangonin (DMY), Flavokavin A (FA) und Flavokavin B (FB). Die Zerschäumungsversuche erfolgten mit wässrigen Proben unterschiedlicher Konzentrationen an Kava-Kava-HD-Extrakt und zugesetztem Saponin (s. Tab. 4-27).

A. Einfluss der Konzentration der Kavapyrone und Flavokavine im Kava-Kava-HD-Extrakt auf deren Anreicherung

Die HPLC/UV-Analysenergebnisse der Verbindungen sind in Tab.4-29 zusammengefasst. Eine Erniedrigung der Ausgangskonzentration des HD-Extrakts um das 5-Fache führten zur quantitativen Anreicherung der Flavokavine A und B, leichten Erhöhung des Anreicherungsfaktors für Kavapyrone, leichten Erhöhung der Anreicherung von Dihydrokavain und eindeutigen Erhöhung der Anreicherung von Yangonin und Desmethoxyangonin, nämlich von 20-25 % auf 40-50 % (Tab. 4-29, Versuch 3). Die Erniedrigung der Kavapyron-Konzentration in der Ausgangsprobe zeigte keinen Einfluss auf die Anreicherung von Methysticin, Dihydromethysticin und Kavain.

Tab.4-29: Die mit HPLC/UV-Analyse ermittelten Konzentrationen von Kavapyronen und Flavokavinen ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) bei der Zerschäumung wässriger Proben des Kava-Kava-HD-Extraktes.

	Versuch 1 $10 \text{ mg} \cdot (50 \text{ ml})^{-1}$ 0,1 g Saponinzusatz			Versuch 2 $10 \text{ mg} \cdot (50 \text{ ml})^{-1}$ 0,03 g Saponinzusatz			Versuch 3 $2 \text{ mg} \cdot (50 \text{ ml})^{-1}$ 0,03 g Saponinzusatz		
	Ausg.	Sp.	Rück.	Ausg.	Sp.	Rück.	Ausg.	Sp.	Rück.
M	10,67	11,74	9,88	10,15	13,64	8,82	2,26	3,80	2,0
DHM	21,1	23,55	20,42	20,33	25,44	18,80	4,70	7,11	4,35
K	33,73	37,67	30,01	30,96	43,06	28,99	7,0	12,17	6,22
DHK	40,12	40,78	30,09	26,44	34,94	24,85	7,09	14,89	5,84
Y	3,04	4,35	2,28	2,37	4,26	1,67	0,52	1,91	0,32
DMY	3,67	4,4	2,87	2,47	6,59	1,94	0,39	1,48	0,20
FA	5,98	18,24	0,80	4,1	26,04	1,57	0,85	9,31	0
FB	5,06	14,94	0	2,16	20,0	0,93	0,45	6,78	0

Ausg. Ausgangslösung; Sp. Spumat; Rück. Rückstand; M Methysticin; DHM Dihydro-methysticin; K Kavain; DHK Dihydrokavain; Y Yangonin; DMY Desmethoxy-Yangonin; FA Flavokavin A; FB Flavokavin B

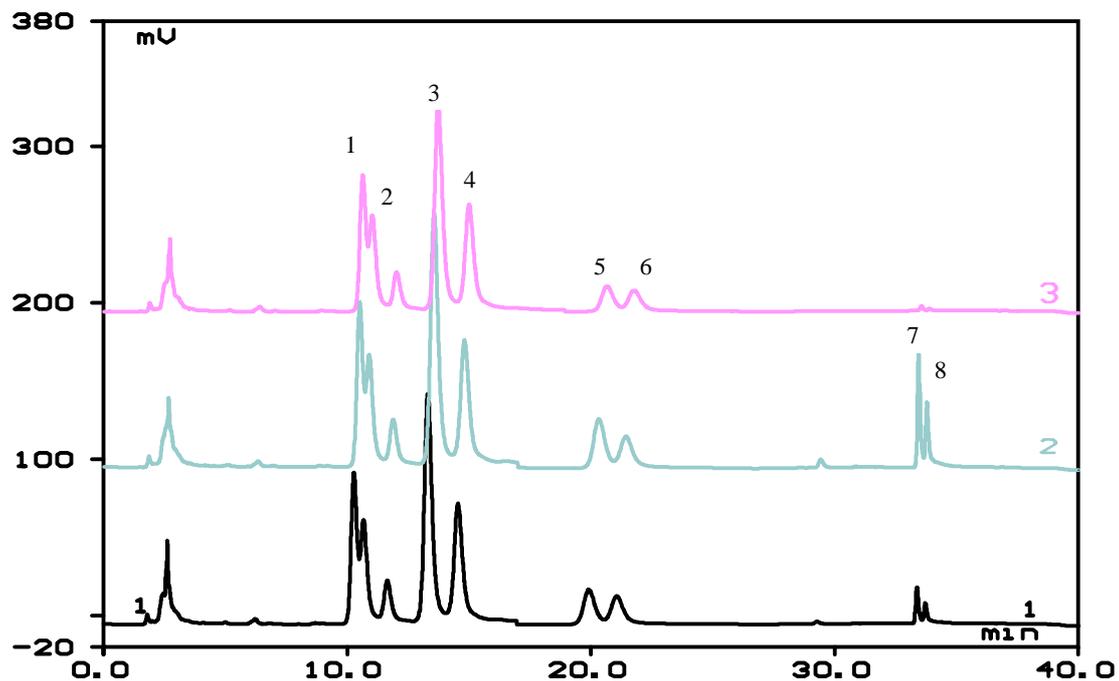


Abb. 4-42: HPLC/UV-Chromatogramme der Kavapyrone und Flavokavine in einer wässrigen Probe des Kava-HD-Extraktes (Versuch 1).
(Chromatogramm-Nr.: 1. Ausgang, 2. Spumat, 3. Rückstand.
(Peak-Nr.: 1. Methysticin, 2. Dihydromethysticin, 3. Kavain, 4. Dihydrokavain, 5. Yangonin (Y), 6. Desmethoxy-Y, 7. Flavokavin A, 8. Flavokavin B

B. Einfluss der Saponin-Konzentration auf die Anreicherung von Kavapyronen und Flavokavinen

Um den Einfluss der Saponin-Konzentration auf die Anreicherung von Kavapyronen und Flavokavinen im Schaum zu überprüfen, wurden die Versuche 1 und 2 mit wässriger Probe des Kava-Kava-HD-Extrakts bei verschiedenen Saponin-Konzentrationen durchgeführt (s. Tab. 4-27). Eine Erhöhung der Saponinkonzentration führte zur Erhöhung der Spumatmenge und somit zu niedrigeren Anreicherungsfaktoren, aber auch zur quantitativer Anreicherung der Flavokavine A und B: So betrug die Konzentration von Flavokavin A und B im Rückstand von Versuch 1 (Saponin: $0,1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$) 13 % bzw. 0 % und von Versuch 2 (Saponin: $0,03 \text{ g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$) 38 % bzw. 43 % (s. Tab.4-29). Lediglich Dihydrokavain zeigte eine um ca. 12 % höhere Anreicherung bei Erhöhung der Saponinkonzentration. Auf die Anreicherung der restlichen Kavapyrone hatte die Saponin-Konzentration keinen Einfluss.

4.2.7.3 Untersuchung des Verhaltens von Kavapyronen und Flavokavin bei der Mehrfach-Zerschäumung von wässrigen Proben des Kava-Pulvers

Tab. 4-30: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Konzentrationen von Kavapyronen und Flavokavinen in ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) sowie in (%), bezogen auf die Konzentration der Ausgangsprobe bei der Mehrfach-Zerschäumung von wässrigen Proben des Kava-Kava-Pulvers.

	Versuch 1 $0,5 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$, 0,05 g Saponinzusatz						Versuch 2* Rückstand des Versuchs 1; 0,05 g Saponinzusatz				
	Ausgangslsg.		Spumat		Rückstand		Spumat		Rückstand		
	[$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	[%]	[$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	[%]	[$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	[%]	[$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	[%]	[$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	[%]	[%] A-V1***
M	10,24	100	25,03	244	7,04	69	14,60	207	4,48	63	44
DHM	46,20	100	85,94	186	37,41	81	64,49	172	27,42	73	59
K	40,86	100	80,13	199	33,28	83	73,07	220	20,75	62	51
DHK	70,88	100	114,7	162	67,26	95	126,9	189	47,55	70	67
Y	4,89	100	17,5	373	1,39	29	6,53	468	0,26	19	5
DMY	4,94	100	14,37	291	1,91	39	6,37	333	0,38	20	8
FA	1,93	100	8,41	454	0**	0	3,1	(0)	0	0	0
FB	1,0	100	6,73	675	0**	0	1,7	(0)	0	0	0

* Die Ausgangsprobe im Versuch 2 ist der Rückstand des Versuchs Nr. 1

** Unter der Nachweisgrenze

*** Der Gehalt im Rückstand des Versuchs 2 prozentual bezogen auf die Ausgangsprobe des Versuchs 1

(Abkürzungen der Kavapyrone und Flavokavine: s. Tab. 4-29)

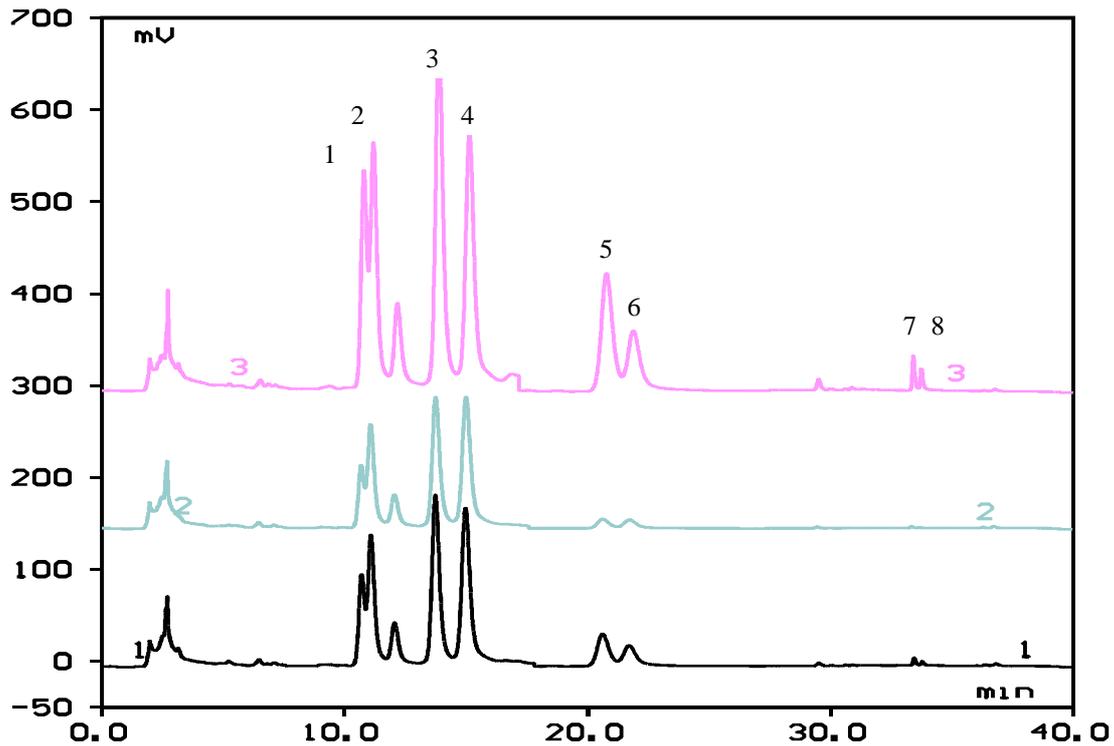


Abb. 4-43: HPLC/UV-Chromatogramme der Kavapyrone und Flavokavine in wässriger Probe des Kava-Pulvers (Versuch 1).
Chromatogramm-Nr.: 1. Ausgang, 2. Rückstand, 3. Spumat;
Peak-Nr.: 1. Methysticin, 2. Dihydromethysticin, 3. Kavain, 4. Dihydrokavain,
5. Yangonin (Y), 6. Desmethoxy-Y, 7. Flavokavin A, 8. Flavokavin B

Kava-Kava-Pulver ist eigentlich ohne Saponinzusatz zerschäumbar. Da aber die hohe Stärke-Konzentration des Kavapulvers zur Verdickung des Extraktes führte, somit die Filtration der Probe erschwerte und eine direkte Messung durch HPLC-Analyse unmöglich machte, wurden stark verdünnte Extrakte für die Zerschäumung vorbereitet, die erst durch Zusatz von Saponin einen stabilen Schaum bildeten.

Eine Zerschäumung des wässrigen Extraktes des Kavapulvers führte in erster Linie zur quantitativen Anreicherung der Flavokavine A und B, aber auch zur Teilanreicherung der Kavapyrone, vor allem Yangonin und Desmethoxyyangonin. Die Mehrfach-Zerschäumung durch Zerschäumung des Rückstandes des Versuchs 1 unter erneutem Saponinzusatz hat zur weiteren Anreicherung der Kavapyrone geführt. Dies zeigt den Einfluss des Mediums auf die Anreicherung. So wurden hier die Kavapyrone zwar leichter, jedoch nur begrenzt angereichert.

4.2.8 Orangenaroma

4.2.8.1 Sensorische Analyse

Ein Teil des frisch gepressten Orangensafts wurde schonend unter niedriger Gasflussrate zerschäumt. Das erhaltene Spumat, der Rückstand sowie die Ausgangsprobe (Orangensaft) wurden sensorisch von 8 geschulten Personen analysiert. Es wurden die Merkmale Farbe/Aussehen, Geruch, Geschmack und Harmonie bewertet. Die Bewertung erfolgte nach dem DLG-Schema zur Bewertung von Fruchtsäften. Die Summe der Bewertungspunkte der Tester wurde durch die Summe der Gewichtungsfaktoren geteilt und lieferte die Qualitätszahl (QZ) der Saftproben. Aus den errechneten Qualitätszahlen wurden Mittelwerte gebildet.

Die Spumatprobe ist am besten bewertet worden (QZ 4.1). Gegenüber der Rückstandsprobe wurde sie überall besser bewertet. Besonders bei „Geschmack“ und auch „Harmonie“ bewerteten die Tester die Spumatprobe höher. Die Tester gaben der Spumatprobe beim Kriterium „Geschmack“ gegenüber den beiden anderen Proben 5 Durchschnittspunkte mehr. Die Spumatprobe schmeckt sehr süß und besonders fruchtig. Die Säure wird überdeckt. Dies verleiht der Spumatprobe einen „weichen Charakter“. Die Rückstandsprobe dagegen hat einen herben, weniger süßen Charakter. Der Geschmack erinnert an Grapefruit und hält lange an. Die Rückstandsprobe verliert beim Kriterium „Geruch“ 5 und beim Kriterium „Farbe/Aussehen“ 3 Durchschnittspunkte. Dies liegt an der Anreicherung der Aromastoffe und der Farbstoffe „Carotinoide“ im Schaum. Die Saftprobe wurde bei den Kriterien „Farbe/Aussehen“ geringfügig besser bewertet als die Spumatprobe. Die Qualitätszahl (3,47) der Saftprobe lag zwischender von Spumat (4,1) und Rückstand (2,93).

4.2.8.2 Einfluss der Zerschäumung auf den Zuckergehalt und Säuregehalt

Die Zuckerverteilung (Glucose: 23 %, Fructose 24 %, Saccharose 53 %) und der Gesamtzuckergehalt waren in der Ausgangsprobe (Orangensaft), in der zugehörigen Rückstands- sowie in der Spumatprobe identisch. Somit sind die Zuckerverbindungen Glucose, Fructose und Saccharose nicht schaumaktiv und ließen sich im Schaum nicht anreichern.

Aus dem Säuregehalt der Ausgangsprobe (Orangensaft) 210 mmol, Spumat 225 mmol und Rückstand 198 mmol erkennt man eine Teilanreicherung der Säuren im Schaum. Es handelt sich wahrscheinlich um die flüchtigen Fruchtsäuren des Orangensafts.

4.2.8.3 Verhalten von Aromastoffen bei der Zerschäumung von Orangensaft

Aus der sensorischen Analyse der Ausgangs-, Rückstands- und Spumatproben des Orangensafts war vor allem an dem gerucharmen Rückstand deutlich feststellbar, dass während einer Zerschäumung die flüchtigen Aromastoffe aus der Probe mit dem Gas extrahiert bzw. im Schaum angereichert werden. Tab. 4-31 zeigt die Aromastoffwerte in der Ausgangs-, Rückstands- und Spumatprobe des Orangensafts.

Tab. 4-31: Die mit GC/FID-Analyse ermittelten Aromastoffkonzentrationen.

Aromastoffe	Konzentration [$\mu\text{g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$]		
	Ausgangsprobe	Spumat	Rückstand
Myrcen	n.n.	34,1	n.n.
Limonen	1641,6	2245,3	154,0
Linalool	n.n.	12,7	n.n.
Valencen	117,6	424,4	24,4
Octadecan	16,7	28,5	11
Nootkaton	n.n.	441,9	n.n.
Hexadecansäure	30,7	396,9	23
Linolsäure	n.n.	246,4	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Orangenaromastoffe (Myrcen, Limonen, Valencen und Nootkaton) werden durch die Zerschäumung z.T. angereichert. Auf eine Berechnung der Anreicherungsfaktoren wird verzichtet, da wegen extrem niedriger Konzentrationen bei den meisten Aromakomponenten keine quantitative Bestimmung möglich war. Bei Komponenten mit höheren Konzentrationen wie Limonen und Valencen liegen die Anreicherungsfaktoren bei 1,37 bzw. 3,62. Verluste bei der Zerschäumung treten vor allem bei leichtflüchtigen Aromastoffen (Limonen 71 % und Valencen 27 %) auf. Eine deutliche Verringerung der Verluste leichtflüchtiger Aromakomponenten ist zu erwarten, wenn der entstandene Schaum im Auffanggefäß direkt in geruchs- und geschmacksneutrales Wasser eingeleitet wird.

4.2.9 Einige polare Substanzgruppen

Tab. 4-32: Die durchgeführten Zerschäumungsversuch zur Anreicherung polarer Inhaltsstoffe (Gasflussrate: 30-100 ml*min⁻¹).

Probe	Verbindungen	Saponin-Zusatz [g]	Ausgangsvolumen [ml]	Säule	Spumat [g]	Schaumaustritt [min]
Kaffeebrühe 3 g *(100 ml) ⁻¹ Wasser	Coffein Chlorogensäure	-	100	mittel	7,2	18 - 90
Orangensaft	Hesperidin	-	50	klein	12	15 - 35
Grapefruitsaft	Naringin	0,06	50	klein	11,8	15 - 40
Sesam 1 g *(100 ml) ⁻¹ Wasser	Sesamol	-	100	mittel	15	17 - 60
Grüner Tee 1 g *(100 ml) ⁻¹ Wasser	Catechine Coffein	-	200	groß	2,5	17 - 70
Rotwein	Anthocyane	0,03	200	groß		17 - 40
Blutorangensaft	Anthocyane	0,02	50	klein	12,4	15 - 40

4.2.9.1 Chlorogensäure und Coffein aus Kaffee

Kaffeebrühe lässt sich aufgrund ihres Gehalts an Schaumbildnern (Proteine, Stärke) gut zerschäumen. Es entsteht ein glänzender goldbrauner Schaum, dessen Stabilität von der Konzentration der Probe abhängig ist. Optimal für die Zerschäumung war eine Kaffeebrühe aus 3 g*(100 ml)⁻¹ Wasser. Mit Hilfe der HPLC/UV-Analyse konnten folgende Chlorogensäuren detektiert werden: Neochlorogensäure, n-Chlorogensäure, Krytochlorogensäure, Iso-1-Chlorogensäure, Iso-2-Chlorogensäure und Iso-3-Chlorogensäure. Sowohl die Chlorogensäuren als auch das Coffein ließen sich im Schaum mittels Zerschäumung nicht anreichern. Dies ist auf ihre gute Wasserlöslichkeit und somit auf ihre polaren Eigenschaften zurückzuführen.

Veränderungen der Kaffeeproben bei der Zerschäumung wurden visuell (Farbe) und anhand der sensorischen Eigenschaften beobachtet. Im Lauf der Zerschäumung kam es zu einer Aufhellung der Kaffeebrühe und nach Ende der Zerschäumung war der Rückstand gelblich, während die Schaumfraktion dunkelbraun gefärbt war. Die Farbintensitäten der Schaum- und Rückstandsprobe im Vergleich zur Ausgangsprobe wurden zusätzlich spektralphotometrisch bei 405 nm gemessen. Dies ergab folgende Farbverhältnisse:

Ausgangssprobe : Spumat : Rückstand = 1 : 1,6 : 0,80.

Eine sensorische Prüfung von Rückstand und Ausgangssprobe (Kaffeebrühe) zeigte, dass im Rückstand Geschmack, Herbe und Aroma viel schwächer ausgeprägt waren als in der Ausgangssprobe, weil Aroma-, Herb- und Geschmacksstoffe des Kaffees z.T. im Schaum angereichert werden.

4.2.9.2 Hesperidin aus Orangensaft und Naringin aus Grapefruitsaft

Grapefruitsaft lieferte im Gegensatz zu Orangensaft erst bei Saponinzusatz einen stabilen Schaum.

Tab. 4-33: Die mit HPLC/UV-Analyse ermittelten Naringin- und Hesperidin-Konzentrationen

Probe	Naringin in Grapefruit [mg*l ⁻¹]	Hesperidin in Orangensaft [mg*l ⁻¹]
Ausgangssprobe	223,65	725,70
Spumat	215,4	726,40
Rückstand	200,7	764,78

Aus Tab. 4-33 kann man erkennen, dass sowohl Naringin als auch Hesperidin nicht mittels Zerschäumung im Schaum anzureichern sind. Dies ist auf ihre gute Wasserlöslichkeit und ihren polaren Charakter zurückzuführen. Visuell und sensorisch war Folgendes an den Orangensaftproben zu beobachten:

Spumat: Farbe: intensiv orange; Geschmack: nach mildem, fruchtigen Orangensaft.

Rückstand: Farbe: hellgelb, wie Grapefruitsaft; Geschmack: herb, nach Grapefruitsaft.

4.2.9.3 Sesamol aus Sesam

Ein wässriger Extrakt von stark geröstetem Sesampulver gab bei der Zerschäumung ebenfalls einen stabilen Schaum. Die Konzentration des Sesamols (HPLC/ELCD-Analyse) war in Ausgangssprobe, Spumat und Rückstand nahezu gleich. Das gut wasserlösliche Sesamol ist somit nicht schaumaktiv und lässt sich aus dem wässrigen Extrakten wegen seiner polaren Eigenschaften nicht anreichern.

4.2.9.4 Catechine aus grünem Tee

Ein wässriger Auszug aus grünem Tee ($1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$ heißes Wasser, 15 min ziehengelassen) ließ sich gut zerschäumen. Mit HPLC/UV-Analyse konnten Coffein, Epigallocatechingallat und Epigallocatechin als Hauptkomponenten identifiziert werden (mittels Standard, Adalbert-Raps-Forschungszentrum). Ausgangslösung, Rückstand und Spumat wurden anhand der gemessenen Peakflächen miteinander verglichen. Es war keine Anreicherung der Catechine und des Coffeins im Schaum zu beobachten (s.Tab. 4-34).

Tab. 4-34: Die mit HPLC/UV-Analyse gemessenen Flächeneinheiten von Coffein und Catechinen bei der Zerschäumung von grünem Tee ($1 \text{ g} \cdot (100 \text{ ml})^{-1}$).

Probe	Coffein	Epigallocatechin-Gallat	Epigallocatechin
Ausgangprobe	214	356	131
Spumat	225	373	145
Rückstand	218	335	130

4.2.9.5 Anthocyane aus Rotwein und Blutorangensaft

Sowohl Rotwein als auch Blutorange waren erst mit Hilfe von Saponin-Zusatz zerschäumbar. In beiden Fällen wurde das Verhalten der Farbstoffe (Anthocyane) visuell beobachtet.

Der Schaum war in beiden Fällen hellrosa bis lila. Zum visuellen Vergleich wurden Ausgangs-, Spumat- und Rückstandsproben 1:9 mit Wasser verdünnt. Es war kein Farbunterschied feststellbar. Auch eine weitere Verdünnung der Rückstände mit anschließender Zerschäumung führte zu keiner Entfärbung. Die gut wasserlöslichen, polaren roten Farbstoffe von Blutorange und Rotwein (Anthocyane) ließen sich mittels einfacher Zerschäumung ebenfalls nicht anreichern.

5 Diskussion

Der Einsatz der Zerschäumungsanalyse zur Anreicherung bzw. Eliminierung von Wert- und Schadstoffen aus gut zerschäumbaren Systemen (wässrige Extrakte der eingesetzten Rohmaterialien) wurde untersucht. Es wurden zahlreiche Ausgangsmaterialien ausgesucht, die Wirkstoffe mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften enthalten. Um eine Korrelation zwischen der Anreicherung einer Verbindung mittels der Zerschäumungsanalyse und ihren hydrophoben Eigenschaften zu überprüfen, wurden zusätzlich Untersuchungsmaterialien mit polaren Inhaltsstoffen zerschäumt. Die Anreicherung einer Verbindung, die Zusammensetzung einer Probe, die wichtigsten Zerschäumungsparameter und die damit zusammenhängenden Phänomene Schaumbildung, Schaumverlauf und Konzentrierungsabläufe innerhalb einer Schaumsäule wurden mittels UV-VIS-, HPLC- und HRGC-MS-analytik näher untersucht.

Die Einflüsse der wichtigsten Parameter auf die Zerschäumung und die Anreicherung schaumaktiver Verbindungen allgemein werden in Abschnitt 5.1 diskutiert. Die Zerschäumung und Anreicherung der einzelnen Substanzgruppen werden unter 5.2 behandelt.

5.1 Einfluss einiger Parameter auf die Zerschäumung und auf die Anreicherung von schaumaktiven Verbindungen

Die schaumaktiven Eigenschaften einer Verbindung waren eine Voraussetzung für ihre Anreicherung im Schaum mittels der Zerschäumungsanalyse. Als schaumaktiv oder oberflächenaktiv wird hier eine Verbindung bezeichnet, die bei der Zerschäumung aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften bevorzugt an den hydrophoben Gasblasenoberflächen des Zerschäumungsgases adsorbiert werden. Nachdem diese das wässrige Medium verlassen haben, wird die Verbindung im Schaum angereichert, auch wenn sie selbst nicht schaubildend ist. Sowohl die Zusammensetzung einer Probe als auch die maßgeblichen Zerschäumungsparameter (Gasflussrate, Säulendimensionierung) beeinflussen den zeitlichen Anreicherungsverlauf und den Anreicherungsfaktor der schaumaktiven Verbindungen [Siehr, 1936; Mischke, 1940; Ahmad, 1975b; Lima, 1994; Uraizee, 1995; Brown, 1999; Loha, 1997].

5.1.1 Zusammensetzung einer zu zerschäumenden Probe

5.1.1.1 Einfluß von Schaumbildnern in einer Probe

Das Vorhandensein natürlicher Schaumbildner und deren Konzentration (z.B. Proteine, Stärke, Saponin) beeinflusst die Stabilität des Schaums und somit die Zerschäumbarkeit der Probe maßgeblich. Verdünnte Saponinmodell-Lösungen ergeben trockenere und leichtere Schäume als konzentrierte. Saponin mobilisiert in den konzentrierteren Lösungen mehr Wasser als in den verdünnten und liefert nasse Schäume [Mischke, 1940]. Höhere Saponin-Konzentrationen bei der Zerschäumung (z. B. in Gingerol-Standardlösung) führten zu einer längeren Zerschäumungsdauer, höheren Spumatvolumina und häufig zu einer nahezu quantitativen Anreicherung der Verbindungen. Der Absolutgehalt einer oberflächenaktiven Verbindung im Schaum war nicht direkt abhängig von Zusatz an Schaumbildner. So erhöhten z. B. niedrigere Saponin-Konzentrationen den absoluten Gehalt einer Verbindung im Schaum indirekt, weil sie trockenere Schäume lieferten.

Einsatz von Saponin als Schaumbildner bei den durchgeführten Zerschäumungen

Saponine sind Glykoside von Steroiden oder polycyclischen Triterpenen, die aufgrund ihres lyobipolaren Charakters Oberflächenaktivität aufweisen und in wässrigen Lösungen stabile Schäume bilden [Eisenbrand und Schreier, 1995]. Saponin wurde bei der Zerschäumung von nicht zerschäumbaren, lösungsmittelhaltigen Proben und Standardlösungen sowie bei der Mehrfach-Zerschäumung eingesetzt. Da organische Lösungsmittel kein geeignetes Medium für die Zerschäumung sind (d.h. ihre Extrakte sind nicht zerschäumbar), wurden solche Proben mit Hilfe von Saponinzusatz zerschäumbar gemacht. Geringe Saponinzusätze führten bereits zu stabilen Schäumen trotz des schaumzerstörenden Effekts der vorhandenen organischen Lösungsmittel. Dank des Saponins konnten auf diese Weise reine methanolische Standardproben zerschäumt werden. Mehrfach-Zerschäumung (erneutes Zerschäumen der unter definierten experimentellen Bedingungen erhaltenen, entschäumten Rückstandsproben) war nach Zusatz von Saponin ebenfalls möglich.

5.1.1.2 Einfluß von schaumaktiven Verbindungen in einer Probe

Die Zusammensetzung einer Probe an schaumaktiven Verbindungen beeinflusste die Anreicherung einer Verbindung im Schaum insofern, als sie sich häufig gegenseitig bezüglich ihres zeitlichen Anreicherungsverlaufs im Schaum beeinflussten (z.B. Anreicherung der Gingerole aus wässrigem Ingwerextrakt und Gingerol-Standardlösung). Die schwach polaren Gingerole konkurrierten mit den stärker polaren. Der absolute Gehalt einer Verbindung in der

Schaumfraktion war stoffspezifisch und wurde zusätzlich von der Konzentration der Verbindung in der Ausgangsprobe beeinflusst (s. 5.1.1.2.1).

5.1.1.2.1 Einfluss der Konzentration einer Verbindung auf ihre Anreicherung im Schaum

Weil die Zerschäumung gerade mit stark verdünnten Proben am effektivsten verläuft, macht sie als Anreicherungsmethode für Spurenverbindungen (Wirkstoffe) aus Pflanzen und Industrieabfällen sowie zur Eliminierung von Störsubstanzen (Glykoalkaloide, Flavokavine) besonders interessant. Die Anreicherung oberflächenaktiver Verbindungen bei der Zerschäumungsanalyse beruht auf der Erniedrigung der Oberflächenspannung ihrer Lösungen. Nach der Gibbs'schen Adsorptionsgleichung lässt sich ein Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung und Tensidkonzentration herleiten [Maas, 1974]:

$$\Gamma = - \frac{c}{RT} \cdot \frac{d\gamma}{dc}$$

c: Konzentration der oberflächenaktiven Verbindung in der Lösung

Γ : Konzentration der oberflächenaktiven Verbindung an der Grenzfläche
flüssig/gasförmig

γ : Oberflächenspannung.

Für sehr niedrige Konzentrationen ist Γ eine lineare Funktion von c, was näherungsweise einen konstanten Wert für $d\gamma/dc$ bedeutet. In der Nähe der kritischen Mizellkonzentration, einer stoffspezifischen Größe, wird Γ nahezu unabhängig von c, korrespondierend mit einer Konstanz von $d\gamma/d(\ln c)$. Oberhalb dieser kritischen Mizellkonzentration erreicht Γ einen Sättigungswert. Der Verteilungskoeffizient Γ/c ergibt einen konstanten und maximalen Wert bei niedrigen Konzentrationen von c und verringert sich im Bereich der kritischen Mizellkonzentration linear. Dies erklärt, warum die Effizienz der Schaumfraktionierung in sehr verdünnten Lösungen am größten ist [Maas, 1974; Karger und DeVivo, 1968]. Dies konnte bei den Zerschäumungsversuchen mit wässrigem Ingwerextrakt, Standardlösungen von Gingerolen, Carnosolsäure, Curcuminoiden, Flavokavinen und Kavapyronen bestätigt werden.

5.1.1.2.2 Einfluss der Polarität einer Verbindung auf ihre Anreicherung im Schaum

Bei einer Zerschäumung kann eine Verbindung nur dann aus dem wässrigen Milieu im Schaum angereichert werden, wenn sie sich an den aufsteigenden Gasblasenoberflächen bevorzugt anlagert (oberflächenaktiv). Um bei der Anreicherung mehrerer Verbindungen mittels der Zerschäumung auch eine Trennung zu erzielen, müssen die anzureichernden Verbindungen einen Unterschied in ihrer Oberflächenaktivität aufweisen. Die Verbindungen mit der höchsten Oberflächenaktivität verdrängen die anderen und werden an der Grenzfläche mit den Gasblasen konzentriert. Die Oberflächenaktivität einer Verbindung ist abhängig von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und wird durch Molekülgröße, Ladung und hydrophobe Eigenschaften bestimmt [Mahne, 1971; Brown, 1999; Oka et al., 1989]. Nicht oberflächenaktive Verbindungen verbleiben in der Lösung.

Bei den untersuchten Gingerolen und Isohumulonen beeinflusste z. B. die Alkylseitenkette die Polarität und somit die Schaumaktivität der einzelnen Verbindungen. Je hydrophober eine Verbindung war, desto schneller wurde sie im Schaum angereichert im Vergleich zu ihren Homologen. Die einzelnen Komponenten konkurrieren miteinander, wobei die wenig polaren Komponenten bevorzugt im Schaum angereichert werden.

5.1.1.2.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Anreicherung einer Verbindung im Schaum

Proteine lassen sich bekanntermaßen bei ihrem isoelektrischen Punkt am besten anreichern, da ihre Löslichkeit im wässrigen Medium dort ein Minimum erreicht [Chai et al., 1998; Ko et al., 1998; Uriazee, 1995; Loha, 1997; Desouza und Tanner, 1991; Prokorp, 1993].

Übertragen auf diese Arbeit nahm die Anreicherung schaumaktiver Verbindungen bei pH-Wertänderung mit Erhöhung ihrer Polarität ab und umgekehrt. So nahm die Anreicherung von Gingerolen, Isohumulonen und Carnosolsäure im alkalischen Medium durch Erhöhung ihrer Wasserlöslichkeit und somit Polarität ab. Im sauren Medium war es umgekehrt. Im wässrigen Milieu konnte daher die Ausgangskonzentration einiger untersuchter Verbindungen durch Alkalizusatz bei der wässrigen Extraktion erhöht werden. Durch Ansäuern der Extrakte vor der Zerschäumung blieben diese Verbindungen stabil und ihre Ausbeute konnte bei der Zerschäumung z. t. deutlich gesteigert werden.

5.1.2 Zerschäumungsparameter

Parameter wie Gasflussrate, Probenvolumen und Säulendimensionierung hatten generell einen direkten Einfluss auf die Zerschäumungsdauer, die Schaumkonsistenz und die Spumatmenge bzw. den Anreicherungsfaktor.

5.1.2.1 Gasflussrate, Probenvolumen und Säulendimensionierung

Die Gasflussrate ist entscheidend für eine schonende Zerschäumung mit hohem Anreicherungsfaktor [Maas, 1974; Timmons, 1992; Ko et al, 1998; Brown, 1999; Ahmad, 1975a]. Das Flüssigkeitsvolumen im Schaum bestimmt das Maß der Anreicherung. So haben hohe Flussraten einen nassen Schaum erzeugt, d.h. mit dem Schaum wurde relativ viel Flüssigkeit mitgeschleppt. Dies führte zur Erhöhung des Spumatvolumens und einer Abnahme des Anreicherungsfaktors. Niedrigere Flussraten dagegen begünstigten den „Drainage“-Effekt, da der Schaum langsamer in der Säule hochstieg und somit das Zurückfließen von mitgeschleppter Flüssigkeit begünstigt wurde. Zu niedrige Flussraten reichten wiederum nicht aus, um den Schaum kontinuierlich entlang der Säule zu fördern. Der Schaum erreichte nur eine bestimmte Höhe in der Zerschäumungskolonnie und konnte nicht aufgefangen werden.

Eng verbunden mit der Gasflussrate ist auch die Säulendimensionierung. Beide Faktoren beeinflussten die Steiggeschwindigkeit des Schaumes in der Kolonne und den Zeitpunkt des Schaumaustritts. Für bestimmte Probenvolumina wurde die passende Säule eingesetzt, um den Abstand zwischen dem Flüssigkeitspegel der Probe und dem Säulenende optimal zu halten. Dieser Weg war für die Zerschäumung wichtig. Je länger dieser Abstand gestaltet werden konnte, desto trockener wurde die Schaumsäule, beeinflusst durch den „Drainage“-Effekt. Bei Überlänge der Zerschäumungskolonnie gewann die Koaleszenz der Gasblasen an Übergewicht und der Austritt des Schaumes wurde erschwert oder verhindert.

5.1.3 Zusammenhang zwischen Zerschäumungsverlauf, Anreicherungsart und Zusammensetzung einzelner Schaumfraktionen

Die Konzentration der schaumaktiven Verbindungen im Schaum war direkt abhängig vom Schaumverlauf und somit von der Art der Konzentrierung während der Zerschäumung. Nach Maas [Maas, 1974] sind es zwei Wege, die bei einer Zerschäumung zur Konzentrierung einer Verbindung im Schaum führen (s. Abb. 2-3) :

„Drainage“-Effekt: erfolgt, wenn ein Großteil der von den Gas / Flüssig-Grenzflächen eingeschlossenen Flüssigkeit aufgrund der Gravitationskraft abfließt.

„Kollabat-Prinzip“: Die im oberen Bereich der Schaumsäule aufgrund der Gasblasenkoaleszenz zerfallenden (kollabierenden) Lamellen bilden einen angereicherten flüssigen Rücklauf (Kollabat). Es erfolgt ein Austausch von beweglicher, aufsteigender Lamellenflüssigkeit mit abfließendem angereichertem Kollabat im Gegenstrom in der Schaumkolonne.

Wenn man die Zusammensetzung der einzelnen Schaumfraktionen in den durchgeführten Versuchen betrachtet, stellt man fest, dass die Anreicherung einer Verbindung nicht immer nur anhand der Schaumfraktionen feststellbar war. Folgende Beispiele bei der Zerschäumung von Gingerol-Standardlösungen verdeutlichen dies:

- A) Während im Rückstand nach 40 min Zerschäumung [10]-Gingerol nicht mehr nachweisbar war, wurde die Verbindung in der Schaumprobe nach 100 min immer noch angereichert.
- B) Bei der Zerschäumung von verdünnter [6]-Gingerol-Standardlösung nahm die Verbindung im Rückstand kontinuierlich ab, in der letzten Schaumfraktion war jedoch die Verbindung am stärksten angereichert und die Konzentration in den vorherigen Schaumfraktionen war nahezu identisch.
- C) Während [6]-Gingerol und [6]-Shogaol kontinuierlich im Rückstand abnahmen, wiesen fast alle Schaumfraktionen die gleichen Konzentration beider Verbindungen auf.

Die Schaumkonzentration ist von mehreren Faktoren abhängig, die im Laufe einer Zerschäumung meist gleichzeitig ablaufen. Die beiden wichtigsten sind der Drainage-Effekt und die Gasblasenkoaleszenz, die zur Kollabat-Bildung führt (Zurücklauf im Gegenstromprinzip, Gleichgewichtseinstellung entlang der Schaumsäule). Letztere bewirkt eine zusätzliche Anreicherung. Beide Faktoren sind u.a. von der eingestellten Gasflussrate abhängig. Bei der Interpretation der Anreicherungen in den Schaumfraktionen ist es deshalb wichtig, die eingestellte Gasflussrate und den daraus resultierenden Schaumverlauf, das Auftreten von Gasblasenkoaleszenz sowie die Flüssigkeitsmenge im Schaum (gravimetrisch) zu berücksichtigen.

Beispiel A zeigt einen eindeutigen Einfluss der Koaleszenz, der bei Zerplatzen der Gasblasen zum Rücklauf vom Kollabat führt. Somit reichte sich [10]-Gingerol im von unten hochsteigenden Schaum an.

Bei der Zerschäumung einer sehr verdünnten Probe müsste i.d.R. die Konzentration einer Verbindung in der ersten Spumatfraktion größer sein als in der zweiten, wenn der Konzentrierungseffekt aufgrund der Kollabat-Bildung im Gegenstromprinzip unberücksichtigt bleibt. Bei der Zerschäumung von konzentrierten Proben dagegen sollte die Konzentration der schaumaktiven Verbindung in der ersten und zweiten Probe gleich sein. Tatsache bei einigen Versuchen aber war, dass die Konzentration der Verbindungen in Spumat 4 > Spumat 3 > Spumat 2 > Spumat 1 war. Das Spumatvolumen nahm bei unveränderter Gasflussrate im Laufe der Zerschäumung ab, da die Schaumbildung immer schwächer wurde und der Schaum immer langsamer stieg. Der „Drainage“-Effekt wurde hier begünstigt, der Schaum wurde immer trockener und somit auch angereicherter (Konzentrationserhöhung der angereicherten Verbindungen im Spumat).

Da [6]-Gingerol neben [10]-Gingerol kaum angereichert wurde und die Schaumfraktionen sich kaum von der Ausgangsprobe unterschieden, beeinflusste die Kollabat-Bildung die Anreicherung von [6]-Gingerol kaum. Gegen Ende der Schaumbildung trat i.d.R. eine starke Gasblasenkoaleszenz auf, der Schaum stand über der flüssigen Phase im Gleichgewicht. Bei Erhöhung der Flussrate stieg dieser Schaum in der Säule und wurde als End-Schaumfraktion erhalten. Die Anreicherung einer Verbindung wie [6]-Gingerol in dieser letzten Schaumfraktion lag in erster Linie an dem chromatographischen Vorgang, der durch das häufigere Schäumen/Entschäumen im Gleichgewichtszustand erfolgte.

Dass die Kollabat-Bildung bei einigen Versuchen nicht erfolgte, lag an den stabilen Schäumen, die eventuell durch hohe Konzentration an Schaumbildnern (z. B. hoher Saponinzusatz) verursacht wurden, so dass es zu weniger Gasblasenkoaleszenz und folglich weniger Zerfall der Lamellen kam. Somit entstand kein angereicherter flüssiger Rücklauf (Kollabat), der u.U. für die gleichmäßige Anreicherung einer Verbindung mitverantwortlich ist.

Beispiel B zeigt, wie wichtig die Einwaage der Schaumfraktion ist. Da die Flussrate hier konstant gehalten wurde, der Schaumanstieg sich jedoch deutlich verlangsamte, führte dies zu

einer Verstärkung des Drainage-Effektes und zu niedrigeren Flüssigkeitsmengen im Schaum, d.h. er wurde trockener und somit konzentrierter.

Beispiel C ist ein typisches Beispiel für eine Anreicherung aufgrund von Gasblasenkoaleszenz. Für die Überprüfung der zeitlichen Anreicherung einer Verbindung aus der Ausgangsprobe im Schaum ist deshalb die zeitabhängige Kontrolle des Rückstandes erforderlich. Die Verhältnisse der angereicherten Verbindungen (z.B. Gingerole) zueinander in allen Schaum- und Rückstandsfraktionen gaben ebenso, unabhängig von der Spumateinwaage, eine Auskunft über deren Anreicherung.

Somit kann man, je nach Ziel der Zerschäumung, die Anreicherung kontrolliert steuern. Will man z.B. bestimmte Verbindungen in einer Fraktion von anderen Verbindungen trennen oder sie zumindest als Hauptkomponenten erhalten, muss man unter Erhöhung der Gasflussrate zerschäumen. Hier kann aufgrund der Unterdrückung des Drainage-Effekts und somit höherer Spumatmenge die Anreicherung etwas niedriger sein, es wird jedoch die Koaleszenz von Gasblasen verhindert und somit ein Vermischen der Schaumfraktionen. Will man dagegen alle Gingerole nebeneinander anreichern, führt eine langsame Zerschäumung zu höherer Ausbeute unter Ausnutzung der Drainage- und Koaleszenz-Effekte.

5.2 Substanzgruppen

5.2.1 Gingerole aus Ingwer

Ingwer wurde als Ausgangsmaterial für die Zerschäumung ausgesucht, da ein wässriger Extrakt des Ingwerpulvers wegen seines hohen Gehalts an Stärke und Protein [Govindarajan, 1982] gut zerschäumbar ist und Ingwer die Scharfstoffe (Gingerole bzw. Shogaole) enthält, die nicht nur wegen ihrer physiologischen Eigenschaften von Bedeutung sind, sondern auch weil sie unterschiedliche polare Eigenschaften aufweisen. Deshalb kann anhand dieses Beispiels auch die Selektivität der Zerschäumungsanalyse überprüft werden.

Im wässrigen Ingwerextrakts war [6]-Gingerol die Hauptkomponente der Scharfstoffe. Die wässrige Extraktionsausbeute der übrigen Gingerole sowie von [6]-Shogaol konnte mittels alkalischer Extraktion bei pH 11 wesentlich erhöht werden. Vor allem die Ausbeute an [10]-

Gingerol wurde um das 10-Fache erhöht, die von [8]-Gingerol um das 2,4-Fache, von [6]-Shogaol um das 4-Fache und die von [6]-Gingerol lediglich um das 1,1-Fache. Die Gesamtextraktionsausbeute der Gingerole betrug 81 %.

Die Ergebnisse der Zerschäumung wässriger Ingwerextraktpulver haben gezeigt, dass die Scharfstoffe mit [6]-Gingerol als Hauptverbindung, seinem Abbauprodukt [6]-Shogaol sowie [8]-Gingerol und [10]-Gingerol schaumaktiv sind und sich quantitativ anreichern lassen. Der zeitliche Anreicherungsverlauf der Gingerole war stark unterschiedlich. So wurde [6]-Gingerol im Schaum nur langsam und relativ spät gegenüber [8]-Gingerol, [10]-Gingerol und [6]-Shogaol angereichert.

Da [6]-Gingerol wesentlich konzentrierter im Ingwerextrakt vorlag und wegen seiner kürzeren Alkylseitenkette polarer ist, wurde vermutet, dass die zeitlich verzögerte Anreicherung darauf zurückzuführen ist. Daher wurden diese beiden Einflussfaktoren näher untersucht.

[6]-Gingerol ließ sich rasch und quantitativ aus verdünntem wässrigen Extrakt von Ingwerpulver anreichern. Versuche mit Gingerol-Standardlösungen, die alle Gingerole in gleicher Konzentration enthielten und unter identischen Bedingungen zerschäumt wurden, haben gezeigt, dass das abweichende Anreicherungsverhalten von [6]-Gingerol nicht nur an seiner hohen Konzentration in der Probe liegt.

Die Schaumfraktionen zerschäumter Gingerol-Standardlösungen, bei denen alle drei Gingerole in gleicher Konzentration in der Ausgangsprobe vorlagen, zeigten unterschiedliche Gehalte an einzelnen Gingerolen. [10]-Gingerol reicherte sich quantitativ in den ersten Schaumfraktion an (5 min nach Schaumaustritt aus der Säule). [8]-Gingerol reicherte sich kontinuierlich in allen Schaumfraktionen an. Erst in den letzten Schaumfraktionen, die keine anderen Gingerole mehr enthielten, erfolgte die Anreicherung von [6]-Gingerol. Die letzte Schaumfraktion war stark angereichert mit [6]-Gingerol und enthielt keine der anderen Gingerole mehr. [6]-Gingerol reicherte sich relativ spät und konzentriert im Schaum aufgrund des Drainage-Effekts an.

Vergleich der Anreicherung von [6]-Gingerol neben [6]-Shogaol

Im Gegensatz zu [6]-Gingerol nahm [6]-Shogaol im Rückstand relativ rasch ab. [6]-Shogaol entsteht bei der Retroaldolspaltung von [6]-Gingerol [Teuscher, 1997]. Dies führt zur Veränderung des Anreicherungsverhaltens einer Verbindung bei Abspaltung von Wassermolekülen und der daraus resultierenden Veränderung ihres polaren Charakters.

Im Rahmen eines weiteren Versuches, bei dem [6]-Shogaol in der Probe in gleicher Konzentration wie [10]-Gingerol vorlag, reicherte sich [10]-Gingerol schneller als [6]-Shogaol an. Das Verhalten von [6]-Shogaol war bei den durchgeführten Versuchen mit Ingwer und Standardproben ähnlich wie das von [8]-Gingerol.

Einfluss der Gingerole aufeinander bezüglich ihrer Anreicherung im Schaum bei der Zerschäumung

Die Gingerole reichern sich im Verlauf der Zerschäumung nicht nur unterschiedlich im Schaum an, sondern beeinflussen sich dabei auch gegenseitig. Dies wurde eindeutig erkennbar, weil sie jeweils einzeln, alle gemeinsam und paarweise in der Probe vorliegend, zerschäumt wurden.

Die Versuche, in denen die Gingerole einzeln in der Probe vorlagen, zeigten, dass [10]-Gingerol sich schneller als [8]-Gingerol im Schaum anreichern lässt und dieses wiederum schneller als [6]-Gingerol. Enthielten die Proben [6]-Gingerol, [8]-Gingerol und [10]-Gingerol nebeneinander, so reicherten sich [6]-Gingerol und [8]-Gingerol nicht nur langsamer an als [10]-Gingerol, sondern auch deutlich langsamer als aus den Proben, in denen sie einzeln vorlagen. [10]-Gingerol dagegen verhielt sich in beiden Fällen sehr ähnlich. Dies zeigte, dass [10]-Gingerol die Anreicherung von [6]-Gingerol und [8]-Gingerol verzögernd beeinflusste.

Bei der Zerschäumung einer Probe, die [8+10]-Gingerole nebeneinander enthielt, wurde der Einfluss von [10]-Gingerol auf die Anreicherung von [8]-Gingerol untersucht. Bei der Zerschäumung einer weiteren Probe, die [8+6]-Gingerole enthielt, wurde der Einfluss von [8]-Gingerol auf die Anreicherung von [6]-Gingerol untersucht. Daraus konnte gefolgert werden, dass [10]-Gingerol die Anreicherung von [8]- und [6]-Gingerol und [8]-Gingerol wiederum die Anreicherung des polareren [6]-Gingerols verzögerte. [6]-Gingerol hatte keinen Einfluss auf die Anreicherung der anderen Gingerole. Die Annahme, dass die unpolaren Verbindungen mit den polareren konkurrieren, wurde damit zusätzlich bekräftigt.

Weiter wurde beobachtet, dass aus einer [6+8+10]-Gingerol-„Mix“-Probe sich das [10]-Gingerol im Schaum gleich zu Zerschäumungsbeginn relativ rasch anreicherte, [8]-Gingerol dagegen kontinuierlich und [6]-Gingerol erst gegen Ende einer Zerschäumung. Eine

beschleunigte Anreicherung von [8]-Gingerol war i.d.R. zu beobachten, wenn [10]-Gingerol praktisch nicht mehr im Rückstand vorhanden war. Ebenso nahm [6]-Gingerol im Rückstand am stärksten ab, wenn [8]-Gingerol bereits angereichert war.

Einfluss der Konzentration der schaumaktiven Gingerole und des Schaumbildners Saponin auf die Zerschäumung

A. Einfluss der Konzentration der Gingerole:

Die quantitative Anreicherung der Gingerole erfolgte schneller aus Proben mit niedrigerer Konzentration ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) als aus Proben mit höherer Konzentration ($100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). [6]-Gingerol ließ sich bei derartig hohen Konzentrationen, alleine schon wegen der großen Konzentrationsunterschiede, nicht mehr quantitativ anreichern.

Nach Maas [1974] reichern sich oberflächenaktive Substanzen am besten aus verdünnten Lösungen an. Bei höherer Konzentration bilden sich Aggregate (Mizellen) mit nach außen gerichteten hydrophilen Gruppen.

B. Einfluss der Konzentration des Schaumbildners Saponin auf die Anreicherung der Gingerole:

Höhere Saponinkonzentrationen führten zu einer Verlängerung der Zerschäumungsdauer, höheren Spumatmengen, aber auch zu einer quantitativen Anreicherung der Gingerole. Ein eindeutiger Einfluss der Saponin-Konzentration auf den zeitlichen Ablauf der Anreicherung war nicht nachweisbar. Der absolute Gehalt eines Gingerols im Schaum war stoffspezifisch und jeweils von der Gingerolkonzentration in der Ausgangsprobe abhängig. [10]-Gingerol mit einer höheren „stoffspezifischen Konstante“ beeinflusste den Gehalt des Spumats an [8]- und [6]-Gingerol. So war der Gehalt an [8]-Gingerol in der Schaumfraktion, erhalten durch Zerschäumung der Probe, in der [8]- neben [10]-Gingerol vorlag, niedriger als in der Schaumfraktion, erhalten bei der Zerschäumung der Probe, in der [8]-Gingerol einzeln vorlag. Das gleiche galt für [6]-Gingerol. Die hohe Wiederfindungsrate aller Gingerole (bei anderen Isolierungsmethoden entstehen häufig Abbauverluste) ist ein Hinweis auf ihre Stabilität während der Zerschäumung

Einfluss der Gasflussrate auf die Zerschäumung und Anreicherung der Gingerole

Eine Erhöhung der Gasflussrate bedeutete Erhöhung des Spumatvolumens, war günstig für eine quantitative and schnelle Anreicherung, nicht aber für den Anreicherungsfaktor, der mit Zunahme des Spumats proportional abnimmt.

Einfluss des pH-Wertes auf die Schaumbildung und Stabilität von Saponin

Bei der Zerschäumung mit Saponinzusatz im sauren, neutralen und alkalischen Medium wurden Schaumbildung und –stabilität sowie Zerschäumungsdauer und Spumatmenge beobachtet.

Während Saponin bei pH 3 bis pH 11 stabil blieb und die Zerschäumungen ähnlich verliefen, trat bei pH 1 und pH 12 eine deutliche Verschlechterung der Schaumbildung ein. Bei pH 13 blieb die Schaumbildung aus, was auf den hydrolytischen Abbau des Schaumhilfsmittels im stark sauren und alkalischen Milieu zurückzuführen ist. Die HPLC/UV-Kontrollanalysen zeigten, dass Saponin innerhalb des breiten pH-Spektrums von pH 3 - pH 11 stabil bleibt. Erst bei pH 1 und ab pH 12 wurden Abbauprodukte von Saponin beobachtet.

Einfluss des pH-Wertes auf die Anreicherung von [6]-Gingerol

Die Konzentration von [6]-Gingerol nahm im Rückstand bei pH-Werterhöhung von pH 3 bis pH 12 kontinuierlich zu. [6]-Gingerole wurde im sauren Milieu quantitativ angereichert, begünstigt durch Polaritätsabnahme von [6]-Gingerol im Sauren.

Dieses Verhalten von [6]-Gingerol ermögliche sogar seine selektive Abtrennung von den weiteren Komponenten der Gingerolfraction. Da [6]-Gingerol im Handel als Reinsubstanz nicht erhältlich ist, wäre dies eine neue Möglichkeit zur einfachen Gewinnung als Reinsubstanz für analytische Zwecke.

Die hohe Extraktionsausbeute der Gingerole im wässrigen Ingwerextrakt bietet prinzipiell die Möglichkeit, Gingerolextrakte mittels anschließender Zerschäumungsanalyse auf schonende, umweltfreundliche und ökonomisch günstige Weise zu erhalten für den Einsatz in Lebensmittel- und Pharma-Industrie.

5.2.2 Antioxidantien aus Rosmarin

Die Zerschäumung von wässrigen Rosmarinextrakten führte zu einer 8-fachen Anreicherung der Antioxidantien Carnosolsäure, Carnosol und Carnosolsäuremethylester. Rosmarinextrakte

lieferten stabile Schäume bei der Zerschäumung dank ihres relativ hohen Eiweißgehaltes von 5 % [Joule 1993].

Die Extraktionsausbeute wurde durch Variation der Einflussparameter pH-Wert und Temperatur des Extraktionsmediums optimiert.

Carnosolsäure war im sauren pH-Bereich stabil, jedoch schlecht wasserlöslich. Die Extraktionsausbeute nahm ab, je saurer das Medium wurde. Im Alkalischen dagegen war die Carnosolsäure gut wasserlöslich. Die höchste Extraktionsausbeute wurde bei pH 11 erzielt. Das Medium hatte nach der Extraktion einen pH-Wert von 7,4 dank der natürlichen Pufferung, die gleichzeitig den Abbau der Carnosolsäure im alkalischen Extraktionswasser verringert.

Bei Erhöhung des pH-Wertes im Extraktionswasser auf pH 11 wurde die Extraktionsausbeute an Carnosolsäure verdoppelt.

Eine Extraktion bei 40 °C führte zu einem massiven Abbau der Carnosolsäure. Im Extraktionsrückstand wurde die Carnosolsäure ebenso abgebaut. Parallelversuche bei 100 °C haben höhere Carnosolsäureausbeuten ergeben. Da aber nicht zu erwarten war, dass Carnosolsäure bei 100 °C stabiler als bei 40 °C ist [Schwarz, 1992c], wurde angenommen, dass ein in der Rosmarinpflanze vorhandenes Enzymsystem den Abbau bei 40 °C bewirkt. Um den Einfluss von Enzymaktivitäten in der Pflanze auszuschließen, wurden Versuche bei identischen Temperaturbedingungen mit protein- und enzymfreien Stabiloton (HD-Extrakt von Rosmarin) wiederholt. Bei diesen Extraktionsversuchen mit Stabiloton war die Carnosolsäureausbeute bei 40 °C und 100 °C gleich. 94 % der aus der Fettmatrix von Stabiloton schlecht extrahierbaren Carnosolsäure wurden in den dazugehörigen Filtrationsrückständen wiedergefunden, ein weiterer Hinweis auf enzymatischen Abbau von Carnosolsäure bei 40 °C. Zur Desaktivierung abbauender Enzyme wurde das Extraktionswasser heiß zum Rosmarinpulver gegeben und dann sofort weiter unter Rückfluss 20 min lang, wie üblich, extrahiert. Ein möglicher enzymatischer Carnosolsäureabbau während der Aufheizzeit nach Zugabe von kaltem bzw. raumtemperiertem Wasser konnte bei Heißwasserzugabe durch eine Hitze-Inaktivierung „pflanzeigener abbauender Enzyme“ verhindert werden. Für den eindeutigen Nachweis einer Enzymaktivität im Rosmarin, die zum Teil den Abbau von Carnosolsäure verursacht, wären weitere, den Rahmen dieser Arbeit sprengende Kontrolluntersuchungen erforderlich.

Die Extraktionsausbeute im alkalischen Milieu (kalt) konnte um das Doppelte im Vergleich zum neutralen Bereich (kalt) erhöht werden. Eine Zugabe von heißem Wasser zum Rosmarinpulver, kombiniert mit einer alkalischen Extraktion bei pH 11, erhöhte die Extraktionsausbeute um das 2,5-Fache (von 21 % auf 51,4 %). Da eine Verlängerung der Extraktionsdauer den Abbau von Carnosolsäure begünstigt, wurde die Extraktion nach 20 min beendet.

Durch Zusatz von 20 % Ethanol bzw. 20 % Methanol zum Extraktionswasser konnte die Ausbeute an Carnosolsäure nicht erhöht werden. Da festgestellt wurde, dass höhere Lösungsmittelkonzentrationen die Zerschäumbarkeit des Mediums negativ beeinflussen, würde ein Zusatz von organischen Lösungsmitteln zum Extraktionswasser den Einsatz von Schaumhilfsmitteln zur Erhöhung der Ausbeute an Carnosolsäure erfordern.

Von großer Bedeutung war der Einfluss des pH-Werts der Ausgangsprobe auf die Stabilität der Carnosolsäure. Bei der Zerschäumung des wässrigen Rosmarinextrakts ohne Veränderung des pH-Wertes, d.h. bei pH 6, wurden in den Schaumproben neben Carnosolsäure bisweilen auch Carnosol und weitere Carnosolsäureabbauprodukte in teilweise recht hohen Konzentrationen gefunden, wogegen sie in der Ausgangsprobe entweder nur in Spuren vorhanden oder gar nicht nachweisbar waren. Diese Befunde wurden ebenso im Spumat der alkalischen Zerschäumung bei pH 7,7 (pH-Wert des wässrigen Extrakts nach alkalischer Extraktion bei pH 11) festgestellt. Dank der Stabilität der Carnosolsäure im Sauren [Schwarz, 1992b] wurde dagegen im Spumat der sauren Zerschäumung bei pH 4 kaum Carnosol gefunden.. Die Summe des Carnosolsäuregehalts in Spumat- und Rückstandsprobensprach dem Gehalt in der Ausgangsprobe. Bei pH 4 konnte ohne Verluste an Carnosolsäure zerschäumt werden.

Zusätzlich wurde überprüft, inwieweit die Zerschäumungsanalyse für organische oder organisch-wässrige Extrakte einsetzbar ist. Ein 10 %iger ethanolisch-wässriger Extrakt war gut zerschäumbar ohne negativen Einfluss auf die Anreicherung der Carnosolsäure im Schaum. Ein 20 %iger ethanolisch-wässriger Extrakt konnte erst durch nach Saponinzusatz zerschäumbar.

Die Anreicherungsgeschwindigkeit der Carnosolsäure im Schaum aus wässriger Standardlösung und Rosmarinextrakt verlief tendenziell ähnlich und besonders schnell aus verdünnten Proben ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Carnosolsäure; ca. 70 % nach 4 min angereichert).

Die HPLC/ELCD-Analyse zeigte, dass Carnosolsäure in allen Schaumfraktionen des wässrigen Rosmarinextraktes in gleichen Konzentrationen enthalten war. Der Schaum stieg in der Säule mit $15 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ regelmäßig hoch. Zum Zeitpunkt des Schaumaustrittes aus der Säule (nach 14 min) enthielt die Ausgangsprobe bereits weniger als 3 % Carnosolsäure. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass Carnosolsäure zwar zum Großteil (70 %) in den ersten 5 min in den Schaum wandert, aber andererseits auch eine Verteilung der Verbindung entlang der gesamten Schaumsäule erfolgt (Effekt des Austausches beweglicher Lamellenflüssigkeit mit angereichertem Kollabat im Gegenstromprozeß [Maas, 1974]). Für eine quantitative Anreicherung der Carnosolsäure im Schaum ist es erforderlich, die Zerschäumung bis zum Ende der Schaumbildung durchzuführen.

Rosmarinsäure, wegen ihrer antioxidativen und antibakteriellen Wirkung von großer Bedeutung [Cuvelier et al., 1996; Takenaka et al., 1997] war aufgrund ihrer polaren Eigenschaft (gute Wasserlöslichkeit) nicht im Schaum anzureichern.

Die Extraktionsausbeute an Carnosolsäure aus wässrigem Rosmarinextrakt konnte unter Variation der Zerschäumungsbedingungen (möglichst schonend und nachhaltig bzw. lösungsmittelfrei) deutlich erhöht werden, ein weiteres Beispiel für die Erschließung natürlicher Rohstoffquellen zur Entwicklung innovativer Produkte im Bereich Lebensmittel.

5.2.3 Bitterstoffe aus Bier

Bier, insbesondere der Pilsene-Typ, bildet aufgrund seines Gehaltes an Bitterstoffen, Proteinen, Glykoproteinen, Schwermetallen, etc. stabile Schäume bzw. ist gut zerschäumbar. Dass Bierschaum sensorisch bitterer schmeckt als Bier selbst, liegt auf der Hand, weil Bitterstoff-Protein-Komplexe vorliegen, die an der Gasblasenoberfläche haften und daher für den Transport der Bitterstoffe in den Schaum sorgen und gleichzeitig Schaumbildung und Schaumstabilität gewährleisten [Kleber und Hums, 1975; Clark et al., 1991; Yokoi et al., 1994; Roberts, 1977; Kamm, 1966]. Bei der Zerschäumung konnten die Bitterstoffe

(Isohumulone als Mengenkomponenten, Humulone als Spurenkomponenten) im Schaum quantitativ angereichert werden.

Da die Bitterstoffe sich in ihrer Struktur und Polarität unterscheiden, verhielten sie sich bei der Zerschäumung auch unterschiedlich. Humulone wurden schneller als Isohumulone angereichert und innerhalb der Humulone bzw. Isohumulone waren die n- + Ad-Verbindungen schneller anzureichern als die Co-Verbindungen. Co-Humulon tendiert aufgrund seiner niedrigen Löslichkeit im Bier dazu, sich mit den Schaumbildner-Komponenten zu assoziieren [Diffor et al., 1978]. Dies ist mit der höheren Polarität der Co-Verbindungen im Vergleich zu den n- + Ad-Homologen aufgrund einer Methylgruppe weniger an der Seitenkette zu begründen. Die Bitterstoffe konnten bezüglich ihrer zeitlichen Anreicherung im Schaum folgendermaßen eingeordnet werden:

n- + Ad-Humulon > Co-Humulon > n- + Ad-Isohumulon > Co-Isohumulon.

Die Humulone sind unpolarer als Isohumulone und stabilisieren somit den Schaum am stärksten, indem sie im Schaum am längsten an Proteinen haften bleiben [Wackerbauer und Berlin, 1992, Teil 1]. Deshalb sind es auch die Humulone, die am festen Schaum (trocken, an der Innenwandung der Zerschäumungssäule haftend) beteiligt waren. Die HPLC-Kontrollanalyse zeigte, dass die Isohumulone hier lediglich im Spurenbereich nachweisbar waren, aber hauptsächlich in den Spumatproben angereichert wurden.

Co-Iso- und Co-Humulon weisen im Vergleich zu den entsprechenden n- und Adhomologen ein C-Atom weniger in der Seitenkette auf, sind somit etwas polarer, haben niedrigere pK_s-Werte und deshalb in Würze und Bier besser löslich (Humulon: pK_a-Wert 5, 13 % im Bier (pH 4,2); Isohumulon: pK_a-Wert 3,1 und 90 % im Bier (pH 4,2)) [Wackerbauer und Berlin, 1992, Teil 1]. Die Isohumulone entstehen nach Isomerisierung aus den Humulonen bei der Würzekochung und entwickeln dann ihre erwünschte Bitterkraft aufgrund ihrer guten Löslichkeit im Bier.

Bei der Zerschäumung von im Ultraschallbad entkohlensäuertem Bier ließen sich die Bitterstoffe quantitativ anreichern. Mit Erhöhung des pH-Wertes bis in den alkalischen Bereich auf pH 13 erhöhte sich der Anteil an Bitterstoffen im Rückstand kontinuierlich, insbesondere der von Co-Isohumulon. Außerdem nahm die Schaumbildung ab, die Bitterstoffe wurden instabil und wurden abgebaut.

Entkohlensäuerte Biere, die mit Stickstoffgas zerschäumt wurden, ergaben einen kleinblasigeren, cremigeren, wesentlich weißer erscheinenden und langlebigen Schaum im Vergleich zu CO₂. Die kleineren Gasblasen stiegen viel langsamer hoch und die Chance für oberflächenaktive Moleküle, an ihrer Außenwand zu haften, wurde erhöht [Bamforth, 1989]. Die Gasart beeinflusste Schaumstruktur, Spumatmenge und Anreicherungsfaktor der Bitterstoffe maßgeblich. Anhand der Verhältnisse der Bitterstoffe zueinander in den Spumatfraktionen und im Rückstand konnte mit Hilfe der eingesetzten HPLC-Kontrollanalytik keine gegenseitige Beeinflussung des Anreicherungsverhaltens festgestellt werden.

5.2.4 Carotinoide

Die untersuchten Orangen-, Mandarinen-, Karotten- und Tomatensäfte waren naturgemäß gut zerschäumbar und Farbstoffe bzw. Carotinoide konnten im Schaum angereichert werden (visuell auch spektralphotometrisch feststellbar). Auch Bixin aus einer Standardlösung konnte im Schaum angereichert werden. Tomatensaft enthielt hauptsächlich Lycopin und β -Carotin. In Karottensaft machten Lutein, α -Carotin, und β -Carotin den Haupt-Carotinoidanteil aus. Orangen- und Mandarinenensaft enthielten ein komplexes Gemisch an Carotinoiden. Bei Orangensaft bildeten die Xanthophylle den Hauptanteil der Carotinoide. Mandarinenensaft enthielt als Hauptcarotinoid β -Cryptoxanthin, wobei ein großer Teil davon in veresterter Form vorlag (hauptsächlich β -Cryptoxanthin-Laurat, -Myristat und -Palmitat) [Lin und Chen, 1995]. Die HPLC/DAD-Analyse bestätigte die Schaumaktivität aller Stoffklassen der Carotinoide. So wurden alle im Orangen- und Mandarinenensaft vorliegenden Xanthophylle, Carotinoide und Carotinoidfettsäureester im Schaum angereichert. Der gelbe Farbstoff des Safrans, Crocin, wurde im Schaum nicht angereichert. Dies ist auf seinen polaren Charakter zurückzuführen, bei dem im Gegensatz zu den anderen Carotinoiden das Carotinoid Crocetin glykosidisch an zwei Gentiobiosen gebunden vorliegt und deshalb wasserlöslich ist, eine weitere Bestätigung des Zusammenhangs zwischen der Anreicherung einer Verbindung im Schaum und ihren hydrophoben Eigenschaften.

5.2.5 Curcuminoide und Turmerone aus Kurkuma

Kurkuma liefert mit seinem stärkereichen Rhizom ein Gewürz, dessen auffallend gelbe Farbe auf das Curcumin zurückzuführen ist. Die Wurzel enthält neben 2-5 % Curcumin auch geringe Mengen an Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin. Neben den Curcuminoiden enthält sie 3 bis 7 % etherisches Öl, das hauptsächlich aus Turmeron und ar-Turmeron besteht (60-70 %) [Falbe und Regitz, 1990].

Die Kurkuma-Wurzel enthält reichlich Stärke (50 – 64 %), die als Schaumbildner für die gute Zerschäumbarkeit wässriger Kurkumapulver-Extrakte verantwortlich ist. Das verwendete Kurkumapulver enthielt 1,7 % Curcumin. Bisdemethoxycurcumin war wesentlich besser wasserlöslich als Curcumin. Es bildete daher die Hauptverbindung der Curcuminoid-Fraktion bei der HPLC/UV-Analyse wässriger Extrakte. Im methanolischen Extrakt dagegen war Curcumin die Hauptkomponente. Das verwendete Kurkumapulver enthält auch 1,2 % Sesquiterpenketone (Turmerone). Diese machen 60-70 % des etherischen Extraktes der Kurkuma aus und verleihen dem Kurkuma-Aroma den typischen Charakter. Auch im wässrigen Extrakt des Kurkumapulvers waren die Turmerone die Hauptaromaverbindungen. Die im Kurkumaöl enthaltenen Monoterpene und Sesquiterpene waren mit Wasser nicht extrahierbar. Mittels der Zerschäumungsanalyse wässriger Kurkumapulverextrakte konnten sowohl die Curcuminoide (Bisdemethoxycurcumin, Demethoxycurcumin und Curcumin) als auch die Turmerone (ar-Turmeron, Turmeron und Turmerol) im Schaum angereichert werden.

Bei der Zerschäumung von wässriger Curcumin-Standardlösung konnte man den Einfluss der Konzentration der Curcuminoide auf die Anreicherung feststellen. Während bei der Zerschäumung konzentrierter Proben eine Entfärbung erst spät auftrat (80 min nach Beginn der Zerschäumung), erfolgte bei der Zerschäumung einer 10-fach verdünnten Probe die Entfärbung relativ früh (10 min nach Beginn der Zerschäumung). Die quantitative Anreicherung der Curcuminoide im Schaum war bereits nach 20 min beendet. Die aufgenommenen HPLC/UV-Chromatogramme zeigten, dass sich die Nebenkomponten Bisdemethoxycurcumin und Demethoxycurcumin aus beiden Proben im Verhältnis wie Curcumin im Schaum kontinuierlich und gleichmäßig, unabhängig von der Konzentration der Verbindungen in der Ausgangsprobe, bis zum Ende der Zerschäumung anreicherten. Beide Nebenkomponten sind polarer als Curcumin, somit besser wasserlöslich und anreicherbar.

Mit der Zerschäumung konnten auch Curcuminoide und Turmerone aus wässrigen Extrakten von Kurkumapulver schonend angereichert werden. Die Verbindungen bleiben stabil während der Zerschäumung. Verluste an Turmeronen (80 % Wiederfindungsrate nach Zerschäumung) können verringert werden durch direktes Einleiten des Schaumes in eine im Auffanggefäß vorgelegte Lösung.

Die wässrige Extraktionsausbeute von Curcuminoiden war aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften gering. Sie könnte allerdings durch Kombination mit patentierten Methoden, sowohl im sauren als auch alkalischen Medium, erhöht werden. Stansky ließ 1979 ein Verfahren patentieren, bei dem durch Waschen von Curcuminrhizomen mit einer Seifenlösung ein wasserlöslicher Farbstoffkomplex entsteht. Eine Nachbehandlung mit Essigsäure fällt das Curcumin aus [Stransky, 1979]. 1983 meldete Stranz ein Verfahren zum Patent an, in dem mit Hilfe von Essigsäure und Gelatine ein wasserlöslicher Komplex hergestellt wird, der einen Curcumingehalt von 15 % aufweist [Stranz, 1983]. Unter Einbeziehung dieser Methoden zur Erhöhung der Ausgangskonzentration der Curcuminoide im wässrigen Extrakt könnte die Zerschäumungsanalyse praxisrelevant werden. Die Tatsache, dass im Wasser lediglich die Turmerone aus Kurkumaöl relativ gut löslich sind, bietet die Möglichkeit, Turmerone selektiv aus wässrigen Kurkumaextrakten anzureichern und zu gewinnen.

5.2.6 Glykoalkaloide aus Kartoffelsaft

In Kartoffeln machen α -Solanin und α -Chaconin etwa 95 % des Glykosidalkaloidgehaltes aus. Die Glykoalkaloide kommen besonders in unreifen Kartoffeln und in grün gewordenen, keimenden Kartoffelknollen vor. In hoher Dosis wirken sie toxisch auf den menschlichen Körper [Lindner, 1990; Teuscher, 1997]. Kartoffeln besitzen einen hohen Stärkegehalt, und ihr Saft bildet bei der Zerschäumung einen stabilen Schaum. Für die Zerschäumung wurde der Kartoffelsaft nach 10-facher Verdünnung mit Wasser verwendet, da die Zerschäumung von unverdünntem Kartoffelsaft einen sehr stabilen und nassen Schaum lieferte, der die Zerschäumungsdauer erheblich verlängert und den Anreicherungsfaktor mindert.

Neben frisch gepresstem verdünnten Kartoffelsaft wurden wässrige Standardlösungen der Glykoalkaloide α -Solanin und α -Chaconin mit Hilfe von Saponin zerschäumt. Beide

Glykoalkaloide sind schaumaktiv und ohne wesentliche Verluste anzureichern. Die Oberflächenaktivität der Glykoalkaloide beruht offensichtlich auf ihrem lyobipolaren Charakter.

Einsatzmöglichkeit der Zerschäumungsanalyse zur Eliminierung der Glykoalkaloide in der Praxis:

Die bei der Gewinnung von Alkohol aus Kartoffelstärke in den Brennereien als Rückstand zurückbleibende Schlempe enthält noch wertvolle Proteine und wird deshalb als Viehfutter verwendet. Die Schlempe enthält wegen des Konzentrierungseffekts auch höhere Gehalte an Glykoalkaloiden [Gerstner, 1997]. Mittels Zerschäumungsanalyse könnte man die Glykoalkaloide als unerwünschte toxische Inhaltsstoffe aus Schlempe eliminieren. Da sich bestimmte Kartoffelproteine aus der Schlempe ebenfalls anreichern, müssten Proteinverluste in einem glykoalkaloidfreien Viehfutter in Kauf genommen werden. Hier sind zielgerichtete Untersuchungen notwendig, um das Verhalten der Glykoalkaloide und Proteine bei der Zerschäumung parallel zu beobachten.

5.2.7 Kavapyrone und Flavokavine aus Kava-Kava

Die Wurzelpflanze Kava-Kava (*Piper methysticum*) ist aufgrund ihrer Wirkstoffe, den Kavapyronen, für die Pharmaindustrie interessant. Neben den Kavapyronen liegen in der Pflanze in niedrigeren Konzentrationen gelbe Pigmente, die Flavokavine, vor. Diese sind in Kava-Präparaten unerwünscht, da sie bei längerer Einnahme zur Gelbfärbung der Haut führen [Hänsel, 1993, 1989 und 1961; He et al., 1997; Schulz und Hänsel, 1996; Schulgin, 1975]. Daher wurde die Eliminierung der Flavokavine durch Zerschäumung wässriger Kavapulverextrakte untersucht. Die kristallinen Kavapyrone sind in Wasser sehr schwer löslich, in Lipidlösungsmitteln dagegen leicht löslich und die hydrophoberen Flavokavine wasserunlöslich [Hänsel, 1961]. Bei der Zerschäumungsanalyse konnte festgestellt werden, dass sowohl Flavokavine als auch Kavapyrone aufgrund ihres hydrophoben Charakters schaumaktiv sind. Der Unterschied ihrer hydrophoben Eigenschaften lässt aber unterschiedliches Anreicherungsverhalten bei der Zerschäumung erwarten. Während die Kavapyrone sich nicht bzw. nur zum Teil im Schaum anreicherten, wurden die Flavokavine quantitativ und schnell angereichert. So konnten aus einem wässrigen HD-Extrakt, der die Kavapyrone Methysticin, Dihydromethysticin, Kavain, Dihydrokavain, Yangonin,

Desmethoxyangonin und die Flavokavine A und B enthielt, lediglich die Flavokavine A und B eliminiert und im Schaum angereichert werden, nicht aber die Kavapyrone.

Das unterschiedliche Anreicherungsverhalten der Flavokavine und der Kavapyrone lag nicht an ihrer unterschiedlichen Konzentration in der zerschäumten Probe. Bei der Zerschäumung von stark verdünnter Kavain-Standardlösung konnte die Verbindung nur zum Teil angereichert werden. Auch aus sehr verdünnten Proben wurde Kavain nur zum Teil angereichert. Dass Kavain potentiell schaumaktiv ist, konnte man an seiner Konzentration in den Schaumfraktionen feststellen. Der Anreicherungsfaktor war bei den am stärksten verdünnten Proben am höchsten. Die Wiederfindungsrate von Kavain betrug 86-98 %.

Eine Zerschäumung des wässrigen Extraktes des Kavapulvers führte in erster Linie zur quantitativen Anreicherung der Flavokavine A und B, aber auch zur Teilanreicherung der Kavapyrone, vor allem von Yangonin und Desmethoxyangonin. Durch Mehrfach-Zerschäumung erfolgte eine weitere Anreicherung der Kavapyrone.

Die schnelle, quantitative Anreicherung der Flavokavine im Verlauf der ersten Zerschäumung kann in der Praxis zur Abreicherung der störenden Flavokavine vor der Anreicherung der erwünschten Kavapyrone in einer weiteren Zerschäumung genutzt werden. Allerdings muss man mit Verlusten an Yangonin und Desmethoxyangonin rechnen, die sich z. T. bereits in der ersten Zerschäumung mit den Flavokavinen anreichern.

5.2.8 Orangenaroma

Orangensaft ließ sich sehr gut zerschäumen (s. Anreicherung von Carotinoiden aus Orangensaft; Kapitel 5.2.4). Das Verhalten der Aromastoffe bei der Zerschäumung wurde ebenfalls näher untersucht.

Frisch gepresster Orangensaft wurde schonend bei niedriger Gasflussrate zerschäumt und die erhaltenen Fraktionen (Rückstand und Spumat) im Vergleich zur Ausgangsprobe sowohl sensorisch als auch mit GC/FID- und HRGC/MS-Analyse untersucht. Sensorisch wurden die Merkmale Farbe/Aussehen, Geruch, Geschmack und Harmonie beurteilt. Die Anreicherung von Carotinoiden im Spumat beeinflussten das Merkmal Farbe/Aussehen. Die Anreicherung von flüchtigen Aromaverbindungen im Schaum führte zu sensorischen Veränderungen des

Saftes bezüglich der Merkmale Geruch, Geschmack und Harmonie. So wurde die Spumatprobe bei der sensorischen Analyse fruchtiger und aromatischer empfunden als die Ausgangsprobe (Orangensaft). Der Rückstand war entsprechend gerucharm und herb im Geschmack. Die Spumatprobe wurde gegenüber der Rückstandsprobe durchwegs besser bewertet. Besonders bei „Geschmack“ und auch „Harmonie“ bewerteten die Tester die Spumatprobe höher. Die Spumatprobe schmeckt sehr süß und besonders fruchtig. Die Säure wird antagonistisch überdeckt und verleiht der Spumatprobe einen „weichen Charakter“. Die Rückstandsprobe dagegen hat einen herben, weniger süßen Charakter. Der Geschmack erinnert an Grapefruit und hält lange an. Die Rückstandsprobe wurde bei den Kriterien „Geruch“ und „Farbe/Aussehen“ schlechter bewertet. Dies liegt an der Anreicherung von Geruchs- und Farbstoffen (Carotinoiden) im Schaum. Die Saftprobe wurde beim Kriterium „Farbe/Aussehen“ geringfügig besser bewertet als die Spumatprobe, da die dunkelorange Farbe des Spumats nicht typisch für einen Orangensaft ist. Die Qualitätszahl (3,47) der Saftprobe lag zwischen der von Spumat (4,10) und Rückstand (2,93).

Orangenaromastoffe werden durch die Zerschäumung z.T. angereichert (Myrcen, Limonen, Valencen und Nootkaton). Die Anreicherung beruht auf ihren flüchtigen und hydrophoben Eigenschaften. Sie adsorbieren an der Gasblasenoberfläche, flüchtige Verbindungen diffundieren in die Gasblase, werden mitextrahiert und somit im Schaum angereichert. Aus den schaumlosen Anreicherungsverfahren, die lediglich auf der Adsorption einer Verbindung an der Gasblasenoberfläche beruhen (solvent sublation, bubble fractionation) sind Anreicherungen von leicht- und teilflüchtigen Verbindungen bekannt. Flüchtige Verbindungen werden in der Gasblase, teilflüchtige Verbindungen sowohl in als auch an der Gasblase und nicht flüchtige Verbindungen lediglich an der Gasblasenoberfläche adsorbiert und mitgetrennt [Valsaraj, 1986c und 1992; Chiu, 1991]. Mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse erfolgt hier sowohl die Trennung an der Gasblase als auch eine Erhöhung der Anreicherung in der hochsteigende Schaumsäule. Verluste bei der Zerschäumung treten vor allem bei leichtflüchtigen Aromastoffen auf (71 % Limone, 27 % Valencen). Eine deutliche Verringerung der Verluste leichtflüchtiger Aromakomponenten ist zu erwarten, wenn der entstandene Schaum im Auffanggefäß direkt in geruchs- und geschmacksneutrales Wasser eingeleitet wird.

Anhand des erhöhten Säuregehalts des Spumats gegenüber der Ausgangsprobe und der gleichzeitigen Abnahme des Säuregehalts im Rückstand kann man eine Anreicherung eines Teils der Gesamtsäure, offenbar flüchtige Fruchtsäuren des Orangensafts, feststellen.

Die Zucker Glucose, Fructose und Saccharose wurden nicht im Schaum angereichert (nicht oberflächenaktiv aufgrund ihrer Polarität wie die Substanzen unter 5.2.9).

Mittels der Zerschäumungsanalyse kann wegen der Anreicherung von Farb- und Aromastoffen ein Spumat erhalten werden, das ein Orangensaftkonzentrat mit Trinkqualität darstellt. Im Rückstand führt das Austreiben von Aromastoffen und Fruchtsäuren aufgrund der im Rückstand verbliebenen Geschmacksstoffe zu einem vorherrschend herben Charakter, der sogar die Süße überdeckt. Der Rückstand ähnelt in Aussehen/Farbe und Geschmack einem Grapefruitsaftgetränk.

Valsaraj zeigt die Möglichkeit der Entfernung von Geruch- und Geschmackstoffen aus dem Trinkwasser mit Hilfe der schaumlosen Gasblasen-Trennmethode (solvent sublation) [Valsaraj, 1988]. Die Zerschäumungsanalyse könnte auch zur Eliminierung von unerwünschten Aromastoffen aus schäumenden Proben getestet und eingesetzt werden.

5.2.9 Einige polare Substanzgruppen

Es wurde überprüft, wie sich polare Verbindungen bei einer Zerschäumung verhalten.

Tab. 5-35: Polare Verbindungen, mittels Zerschäumungsanalyse nicht angereicherbar, und ihre Ausgangsmaterialien.

Verbindung	Ausgangsmaterial
Coffein	Kaffeebrühe, grüner Tee (wässriger Auszug)
Chlorogensäure	Kaffeebrühe
Hesperidin	Orangensaft
Naringin	Grapefruitsaft
Sesamol	Sesam (wässriger Extrakt)
Catechine	grüner Tee (wässriger Auszug)
Anthocyane	Rotwein, Blutorangensaft
Rosmarinsäure	Rosmarin (wässriger Extrakt)
Crocin	Safran (wässriger Extrakt)
Glucose / Fructose / Saccharose	Orangensaft

5.2.9.1 Chlorogensäure und Coffein aus Kaffee

Kaffeebrühe lieferte einen glänzenden goldbraunen Schaum, dessen Stabilität von der Konzentration der Ausgangsbrühe abhängig war. Weder Coffein noch die Chlorogensäuren (Neochlorogensäure, n-Chlorogensäure, Krytochlorogensäure, Iso-1-Chlorogensäure, Iso-2-Chlorogensäure und Iso-3-Chlorogensäure) ließen sich bei der Zerschäumung von Kaffeebrühe und wässrigen Standardlösungen aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit und polaren Eigenschafte im Schaum anreichern.

Eine visuelle und sensorische Prüfung des Rückstandes und der Ausgangsprobe (Kaffeebrühe) zeigte, dass der Rückstand in Geschmack, Herbe, Aroma und Farbe/Aussehen viel schwächer ausageprägt war als die Ausgangsprobe, weil Aroma-, Gerb-, Geschmacks- und Farbstoffe des Kaffees im Schaum angereichert wurden.

Wenn ausreichend und schonend zerschäumt wird, um Farb-, Geschmacks- und Aromastoffe in der Schaumfraktion quantitativ anzureichern, stellt sie ein flüssiges Kaffeekonzentrat dar, das bei der Rückverdünnung mit heißem Wasser auf das Ausgangsvolumen ein Kaffeegetränk ergibt, das zwar sensorisch einem normalen Kaffeegetränk entspricht, aber coffein-und reizstoffarm (lediglich ein Zehntel an Coffein und Chlorogensäuren).

5.2.9.2 Hesperidin aus Orangensaft und Naringin aus Grapefruitsaft

Weder Hesperidin noch Naringin wurden bei der Zerschäumung von Grapefruit- und Orangensaft im Schaum angereichert. Beide Verbindungen waren aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit und somit aufgrund ihres polaren Charakters nicht schaumaktiv.

Sensorisch war wegen der Anreicherung der Carotinoide und Aromaverbindungen folgendes an den Orangensaftproben nach der Zerschäumung zu beobachten:

Spumat: Farbe: intensiv orange; Geschmack: mild, fruchtig, nach O-saft

Rückstand: Farbe: hellgelb wie Grapefruitsaft; Geschmack: herb, nach Grapefruitsaft.

Mittels schonender Zerschäumung von Orangensaft (Verluste an flüchtigen Aromaverbindungen vermeiden) erhält man ein Spumat (mildes Orangensaftkonzentrat), das bei Rückverdünnung auf das Ausgangsvolumen die originale Farbe und das originale Aroma

wiedererhält, dessen Hesperidin-Konzentration jedoch auf einen Bruchteil gesunken ist. Der Rückstand, der sowohl geschmacklich als auch farblich an Grapefruitsaft erinnert, könnte bei der Verschneidung von Fruchtsaft eingesetzt werden.

5.2.9.3 Sesamol, Catechine und Anthocyane

Wässrige Extrakte von stark geröstetem Sesampulver und grünem Tee ergaben bei der Zerschäumung einen stabilen Schaum. Rotwein und Blutorangensaft konnten erst nach Zusatz von Saponin zerschäumt werden. Die Anreicherung von Sesamol aus Sesam wurde mittels HPLC/ELCD-Analyse überprüft. Die Anreicherung des Coffeins und der Catechine Epigallocatechingallat und Epigallocatechin aus grünem Tee wurde mittels HPLC/UV-Analyse untersucht. Die Anreicherung von Anthocyanen aus Rotwein und Blutorangensaft wurde anhand der roten Farbe der Verbindungen visuell/kolorimetrisch beurteilt.

Durch Vergleich der Ausgangs-, Spumat- und Rückstandsproben miteinander konnte man feststellen, dass bei der Zerschäumung Sesamol, Coffein, Catechine (Epigallocatechingallat, Epigallocatechin) und Anthocyane im Schaum nicht angereichert wurden (z. T. gute Wasserlöslichkeit, polarer Charakter). Anhand der letzten Zerschäumungsversuchsreihen kann man folgern, dass polare Verbindungen nicht oberflächenaktiv sind und nicht im Schaum angereichert werden. Dieses Verhalten kann man ausnutzen zur Isolierung erwünschter und unerwünschter Verbindungen, weil bei der Zerschäumung relativ unpolare Verbindungen quantitativ angereichert und polarere abgereichert werden.

6 Zusammenfassung

Die Zerschäumungsanalyse ist eine effiziente Anreicherungs-methode für oberflächenaktive Verbindungen aus stark verdünnten wässrigen Lösungen. Darüber hinaus ist sie schonend, umweltfreundlich, nachhaltig und kostengünstig, da sie mit Inertgas (N_2) bei Raumtemperatur mit relativ einfachen Apparaturen ohne Zusatz von Lösungsmitteln durchgeführt werden kann. Sie könnte sowohl großtechnologisch für die Gewinnung von nachwachsenden Rohstoffen als auch im Labormaßstab für die Spurenanalyse eingesetzt werden zur selektiven Trennung homologer Verbindungen mit unterschiedlich hydrophoben Eigenschaften und quantitativen Anreicherung einzelner Verbindungen.

Seit Ostwald am Anfang des 20. Jahrhunderts den Einsatz der Zerschäumungsanalyse zur Anreicherung von Proteinen aus Pflanzensäften und zur Trennung von Farbstoffgemischen demonstriert hat, beschränkt sich die Zerschäumungsanalyse bis heute auf dem Gebiet der Naturstoffe auf die Anreicherung und Isolierung von Proteinen/Enzymen.

In dieser Arbeit wurden neue Einsatzgebiete der Zerschäumungsanalyse aufgezeigt, weil auch monomolekulare Naturstoffe aus Nutz- und Heilpflanzen, mit Hilfe der Zerschäumungsanalyse angereichert bzw. als unerwünschte Stoffe eliminiert wurden.

Im Rahmen eines Screenings wurde die Zerschäumbarkeit zahlreicher Gewürze, Nutz- und Heilpflanzen in wässrigen Extrakten überprüft. Aufgrund des natürlichen Gehalts an Schaumbildnern (Proteine, Stärke, Saponine) ergaben Fruchtsäfte bzw. wässrige Extrakte pflanzlicher Materialien ohne Hilfsmittel einen stabilen Schaum und wurden als gut zerschäumbar angesehen.

Aus der Liste zerschäumbarer Systeme wurde eine Auswahl unter zwei Aspekten vorgenommen:

- Inwieweit lässt sich die Zerschäumungsanalyse zur Anreicherung von nachwachsenden Rohstoffen und zur Eliminierung unerwünschter Stoffen einsetzen?
- Welchen Einfluss haben chemisch-physikalischen Eigenschaften einer Verbindung auf ihre Anreicherung und verhalten sich Verbindungshomologe unterschiedlich?

Bei der Zerschäumung wurde das Batch-Verfahren eingesetzt. Zur Optimierung der Anreicherung einer Verbindung im Schaum wurden die wichtigsten Einflussparameter (Konzentration der Schaumbildner und der anzureichernden Verbindung, Gasflussrate, pH-Wert und Säulendimensionierung) berücksichtigt. Um das Verhalten der einzelnen Verbindungen im Verlauf der Zerschäumung zu analysieren, wurde die Variante der „fraktionierten Zerschäumung“ (Entnahme von Schaum- und Rückstandsfraktionen in definierten Zeitabständen während einer Zerschäumung) eingesetzt.

Da die Zerschäumungsanalyse im wässrigen Medium erfolgt, wurde im Interesse einer praktischen Anwendung für ausgesuchte Verbindungen die Extraktionsausbeute mittels „alkalischer Extraktion“ optimiert.

In dieser Arbeit wurden auch Verbindungen, die selbst keine Schaumbildner sind, jedoch aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften im Schaum angereichert werden, als oberflächen- bzw. schaumaktiv bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass die Zerschäumungsanalyse nicht auf die Anreicherung von Schaumbildnern beschränkt ist, sondern zur Anreicherung vieler anderer Stoffklassen aus pflanzlichen Rohstoffen (Gewürze, Nutz- und Heilpflanzen) eingesetzt werden kann:

- Scharfstoffe: [6]-, [8]-, [10]-Gingerol und [6]-Shogaol aus Ingwer
- Antioxidantien: Carnosolsäure, Carnosol und Carnosolsäuremethylester aus Rosmarin
- Bitterstoffe: Humulone und Isohumulone aus Bier
- Xanthophylle, Carotinoide und Carotinoidfettsäureester aus Karotten-, Tomaten-, Orangen- und Mandarinsäften
- Curcuminoide: Curcumin, Bisdemethoxy- und Demethoxycurcumin aus Kurkuma
- Turmerone: ar-Turmeron, Turmeron und Turmerol aus Kurkuma
- Flüchtige Aromaverbindungen aus Orangensaft

Inhaltsstoffe mit unerwünschter Wirkung aus Nutz- und Heilpflanzen mittels Zerschäumung im Schaum eliminiert bzw. abgereichert:

- Glykoalkaloide: α -Solanin und α -Chaconin aus Kartoffelsaft
- Flavokavine: Flavokavin A und B aus Kava-Kava

Folgende polare, gut wasserlösliche Verbindungen konnten mit den angewandten Methoden nicht im Schaum angereichert werden:

- Coffein und Chlorogensäure aus Kaffeebrühe
- Hesperidin aus Orangensaft und Naringin aus Grapefruitsaft
- Sesamol aus Sesam
- Catechine aus grünem Tee
- Anthocyane aus Rotwein und Blutorangensaft
- Rosmarinsäure aus Rosmarin
- Crocin aus Safran
- Glucose, Fructose und Saccharose aus Orangensaft.

Nicht nur verschiedene Substanzgruppen zeigten bei der Zerschäumung unterschiedliches Anreicherungsverhalten, sondern auch homologe Verbindungen einer Substanzgruppe (strukturell bedingte unterschiedliche Polarität und Schaumaktivität). Der zeitliche Verlauf der Anreicherung nahm mit Abnahme der hydrophoben Eigenschaften zu (z.B. Humulone und Isohumulone aus Bier, Gingerole aus Ingwer).

Die Gingerole reicherten sich mit Zunahme ihrer Polarität nicht nur unterschiedlich schnell im Schaum an, sondern beeinflussten sich dabei auch gegenseitig. Die weniger polaren Verbindungen mit längerer Alkylseitenkette reicherten sich schneller im Schaum an und verzögerten die Anreicherung von stärker polaren Verbindungen, aber nicht umgekehrt. Die Annahme, dass die unpolaren Verbindungen bei der Anreicherung im Schaum mit den polaren konkurrieren, wurde damit zusätzlich bekräftigt.

Die Durchführung einer Zerschäumung im Sauren (pH 4) war nicht nur günstig, weil Verbindungen wie Carnosolsäure stabil blieben (Abbau zu Carnosol wurde verhindert), sondern sie ließen sich aufgrund der Erhöhung ihrer hydrophoben Eigenschaften im Sauren besser aus dem wässrigen Milieu im Schaum anreichern (Bitterstoffe aus Bier, Scharfstoffe aus Ingwer).

Hohe Anreicherungsfaktoren konnten vor allem bei der Zerschäumung stark verdünnter Proben unter niedriger Gasflussrate erreicht werden. Durch Auswahl der passenden Säule (s. Säulendimensionierung) für bestimmte Probenvolumina und durch Kontrolle der Gasflussrate ließ sich die Zerschäumung optimieren. Höhere Konzentrationen an Schaumbildnern in der

Probe führten zu längerer Zerschäumungsdauer, höheren Spumatmengen und einer quantitativeren Anreicherung der Verbindungen. Der absolute Gehalt einer schaumaktiven Verbindung im Schaum war stets stoffspezifisch und von der gewählten Ausgangskonzentration der Verbindung in der Probe abhängig.

Hohe Wiederfindungsraten anreicherbarer Verbindungen (Ausnahm: flüchtige Aromastoffe) waren ein Indiz für optimierte, schonende Anreicherungsbedingungen. Hohe Verluste an flüchtigen Verbindungen können vermieden werden, wenn der entstandene Schaum im Auffanggefäß direkt in geruchs- und geschmacksneutrales Wasser eingeleitet und verflüssigt wird.

Die Überprüfung des Anreicherungsverhaltens unterschiedlicher Stoffklassen ergab stets eine Korrelation zwischen der Anreicherung einer Verbindung im Schaum und ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften.

Die Zerschäumungsanalyse hat sich als geeignete Methode zur selektiven Trennung von homologen Verbindungen unterschiedlicher hydrophober Eigenschaften sowie zur Anreicherung einzelner schaumaktiver und nicht schaubildender Verbindungen bei Zusatz von Schaumbildnern erwiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen ein weites Spektrum neuer Einsatzmöglichkeiten der Zerschäumungsanalyse als schonende, kostengünstige und umweltverträgliche Methode zur Gewinnung wertvoller Inhaltsstoffe aus pflanzlichen Rohstoffen und Industrieabfällen für Lebensmittel- und Pharmaindustrie und zur Eliminierung zahlreicher unerwünschter Begleitstoffe.

7 Literaturverzeichnis

- Adamson, A. W.: Physical chemistry of surfaces, Fifth Edition, John Wiley & Sons, New York (1990)
- Ahmad, S. I.: Laws of foam formation and foam fractionation I., *Separation Science*, Vol. 10, No. 6, 673-688 (1975a)
- Ahmad, S. I.: Laws of foam formation and foam fractionation II., *Separation Science*, Vol. 10, No. 6, 689-700 (1975b)
- Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren § 35 LMBG*, Bestimmung der titrierbaren Säure von Frucht- und Gemüsesäften [L31.00-1] (1997)
- Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren § 35 LMBG*, Bestimmung von Naringin und Hesperidin: [L31.00-19] (1997)
- Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren § 35 LMBG*, Bestimmung von Chlorogensäure: [L46.00-2] (Dez. 1997)
- Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren § 35 LMBG*, Bestimmung von Coffein: [L46.00-3] (Jan. 1997)
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J.: Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid, *Xenobiotica* Vol. 22, No. 2, 257-268 (1992)
- Asano, S, Hashimoto, N., Contribution of hop bitter substances to head formation of beer, *Report of the Research laboratories of Kirin Brewery Company Ltd.*, 19, 9-16 (1976)
- Baltes: Lebensmittelchemie, Springer-Lehrbuch, 3. Auflage, ISBN 3-540-55645-1, S. 374-375 (1992)
- Bamforth, C. W.: Food colloids, ed. by R. D. Bee, Cambridge, ISBN 0-85186-826-6, pp. 48-55 (1989)
- Bamforth, C. W.: The foaming properties of beer, *J. Inst. Brew.*, November-December, Vol. 91, pp. 370-383 (1985)
- Barth: Interne Methode der Firma Barth für Hopfen und Hopfenprodukte in Wolnzach.
- Belitz Grosch: Lehrbuch der Lebensmittelchemie 4. Auflage, Springer-Verlag ISBN 3-540-55449-1, S. 214-219, 235, 807-808 (1992)
- Biacs, P. A., Daood, H. G.: High-performance liquid chromatography with photodiode array detection of carotenoids and carotenoid esters in fruits and vegetables, *J. plant physiol.* Vol. 143. pp. 520-525 (1994)

- Boehringer Mannheim: *Arbeitsvorschrift, biochemische Analytik, Lebensmittel-Analytik*
- Brieskorn, C. H. et al.: The Structure of Carnosol, *Org. Chem.* 29: 2293-2298 (1964)
- Brieskorn, C. H. und Dömling, H.J.: Carnosolsäure, der wichtige antioxydative Inhaltsstoff des Rosmarin- und Salbeiblattes, *Z-Lebensm. Unters. Forsch.* 141,10 (1969)
- Brown-AK, Kaul-A, Varley-J: Continuous foaming for protein recovery. I. Recovery of β -casein, *Biotechnology and Bioengineering*, 62 (3) 278-290, 32ref. (1999)
- Bushway, R. J., Ponnampalam, R.: α -Chaconine and α -Solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking, *J. Agric. Food Chem.* 29, 814-817 (1981)
- Carman, A. S., Kuan, S., Ware, G. M., Francis, O. J., Kirschenheuter, G. P.: Rapid high-performance liquid chromatographic determination of the potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine, *J. Agric. Food Chem.*, 34, 279-282 (1986)
- Chai-J, Loha-V, Prokorp-A, Tanner-RD: Effect of bubble velocity and pH step changes on the foam fractionation of sporamin, *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 46 (7) 2868-2872, 18 ref (1998)
- Charm, S. E., Morningstar, J., Matteo, C-C, Paltiel, B.: The Separation and purification of enzymes through foaming. *Analytical Biochemistry* 15, 498-508 (1966)
- Chen, Q., Shi, H., Ho, C.T.: Effects of Rosemary Extracts and Major Constituents on Lipid Oxidation and Soybean Lipxygenase Activity, *JAOCS*, Vol. 69, no. 10 (Oct.1992)
- Chiu, H-L. and Huang, S-D.: Adsorptive bubble separation of heptachlor and hydroxychlorde, *Separation science and technology*, 26 (1), 73-83 (1991)
- Clark, D. C., Wilde, P. J., D. R. Wilson: The effect of pre-isomerised hop extract on the properties of model protein stabilized foams, *J. Inst. Brew.*, May-June, Vol. 97, pp. 169-172 (1991)
- Collins, M. A., Charles, H.P.: Antimicrobial activity of Carnosol and Ursolic acid: two antioxidant constituents of *Rosmarinus officinalis* L., *Food Microbiology*, 4, 311-315 (1987)
- Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H.: Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia Officinalis*), *Agric. Food Chem.* 42, 665-669 (1994)
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C.: Antioxidative Activity and Phenolic Composition of Pilot-plant and Commercial Extracts, of Sage and Rosemary, *JAOCS*, Vol.73, no.5 (1996)

- Dale, C. J., Young, T. W.: Low molecular weight nitrogenous components and their influence on the stability of beer foam, *J. Inst. Brew.*, Vol. 98, pp. 123-127 (March-April, 1992)
- DeSouza, A. H., Tanner, R. D., Effler, W. T.: The effect of pH and gas composition on the bubble fractionation of proteins, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28/29, 655-666 (1991)
- Diffor, D. W., Likens, S. T., Rehberger, A. J, Burkhardt, R. J.: The effect of Isohumulone / Isocohumulone ration on beer head retention, *J. of the Amer. Soc. Brew. Chem.*, 36 (2) 63-65 (1978)
- Donley, J. R.: Solid-Phase Extraction of hop acids from beer or wort for subsequent analysis, *American Society of Brewing Chemists*, Vol. 50 No. 3, pp.89-93 (1992)
- E. Maccarone et al.: Flavor components of italian orange juices, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (6), S. 2293-2298 (1998)
- Eisenbrand und Schreier, Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 9. Auflage (1995)
- Falbe, J. und Regitz, M.: Römpp Chemie Lexikon CM-G, Thieme-Verlag, 9. Auflage (1990)
- Finzelberg: Kava kava rhizoma,
<http://www.finzelberg.de/Special/Monos/KavaKavaRhizoma.en.html> (Stand Januar 2001)
- Fly, W. H., Chicoye, E.: The Effect of Countercurrent Distribution Fractions of Hop Extracts on Beer Foam, *J. of the Am. Soc. of Brew. Chem.*, 35 (2) 69-72 (1977)
- Franke, W.: Nutzpflanzenkunde, 4. neubearbeitete Auflage, Thieme Verlag, S. 191-192, 232-233, 283 ff, 355 et al. (1989)
- Frankel, E. N., Huang, S.W., Aeschbach, R., Prior, E.: Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion, *Agric. Food. Chem.* 44, 131-135 (1996)
- Frankel, E. N., Huang, S.W.: Evaluation of Antioxidant Activity of Rosemary Extracts, Carnosol and Carnosic Acid in Bulk Vegetable Oils and Fish Oil and their Emulsions, *Agric. Food. Chem.* 72, 201-208 (1996)
- Friedman, M., Dao, L.: Distribution of Glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 419-423 (1992)
- Friedman, M., McDonald, G., Haddon, W. F.: Kinetics of acid-catalyzed hydrolysis of carbohydrate groups of potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine, *J. Agric. Food Chem.* 41, 1397-1406 (1993)

- Furukubo, S., et. al.: A new factor which affects the foam adhesion of beer, *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 30, pp. 155-158 (1993)
- Gerstner, G., Heyer, A. G., Thiemann, H., Engel, K.-H.: *Lebensmittelchemie*, 51 (2), S. 33 (1997)
- Gonzalez, A.G., Rodriguez, C. M., Luis, J. G.: Diterpenes from the flowers of *Salvia canariensis*, *Phytochemistry*, Vol.26, No. 5, pp. 1471-1474 (1987)
- Govindarajan, V. S.: Chemistry, Technology and Quality Evaluation, *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutrition* 17 (1) Part I, 1-96, and 17(3) Part II, 189-258 (1982)
- Govindarajan, V.S.: Turmeric-Chemistry, Technology and Quality, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12: 199-301 (1980)
- Grieves, R. B.: Adsorptive Bubble Separation Methods, *Treatise on analytical chemistry*, Vol. 1 (5), Kolthoff I. A. (Hrsg.), Interscience Publ., New York, 371-448 (1982)
- Grieves, R.B., Charewicz, W. and Brien, S. M.: The separation of phenol from dilute, alkaline aqueous solution by solvent extraction, solvent solution, and foam fractionation, *Analytica Chimica Acta*, 73, 293-300 (1974)
- Griswell, L.G.: Method of separating and recovering soluble proteins from protein-containing solutions employing foam fractionation, United-state-patent, 77-04-P0614 (1976)
- Hänsel, R., Bähr, P. und Elich, J.: Isolierung und Charakterisierung von zwei bisher unbekanntem Farbstoffen des Kava-Rhizoms, *Arch. Pharm.*, Verlag Chemie GmbH Weinheim Bergstraße S. 739-743 (1961)
- Hänsel, R., Langhammer, L., Rimpler, H.: Analytische Untersuchungen an Kava- Lactonen: UV-absorptiometrische Untersuchungen, *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* 300 (2) (1967)
- Hänsel, R.: Kava-Kava in der modernen Arzneimittelforschung, *Zeitschrift für Phytotherapie* 17, Hippokrates Verlag GmbH Stuttgart, S. 180-194 (1996)
- Hänsel, R.: *Phytopharmaka-Grundlagen und Praxis*, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S. 249-251 (1989)
- Hänsel, R., Keller, K., Schneider, G.: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Band 6, Drogen P-Z, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S. 200-218 (1993)
- He, X. G., Lin, L. U., Lian, L. Z.: Electrospray HPLC-MS in Phytochemical analysis of Kava-Extract, *Planta Med.* 63 (1), S. 70-74 (1997)
- Hollemans, M., Tonies, T.R.J.M., Bisperink, C.G.J., Ronteltap, A.D.: The role of malt lipids in beer foam, *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 28, pp 168-173 (1991)

- Hopia, A. I. et al.: Effect of Different Lipid Systems on Antioxidant Activity of Rosemary Constituents Carnosol and Carnosic Acid with and without alpha-Tocopherol, *Agric. Food Chem.* 44, 2030-2036 (1996)
- Hornig, J.Y., Huang, S.D.: Removal of Organic Dye (Direct Blue) from Synthetic Wastewater by Adsorptive Bubble Separation Techniques, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 1169-1175 (1993)
- Hossain-M., Fenton-G: Application of foam separation processes for protein extraction/stripping, *Australian Biotechnology*, 8 (5) 289-294, 10 ref. (1998)
- Hubert Vesper: Charakterisierung und lagerungsbedingte Veränderung von Carotinoiden in Extrakten aus *Capsicum annuum* L., Dissertation, S. 2-7 (1996)
- Institut der Naturheilkunde der Universität Ulm, Homepage: <http://www.uni-ulm.de/klinik/nhk/kava-kava.html> (Stand 2000)
- Jackson, G.: A Technique for identifying foam damage by lipids, *J. Inst. Brew.*, Vol. 87, pp. 242-243 (July-August, 1981)
- Joule-Ernährungswissenschaftliches Informationssystem, *BLS-Schlüsselsystem des BGA*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg (1993)
- Kamm, G.: Über den Schaum allgemein und den des Bieres, *Brauwelt* Jg. 106 Nr. 31/32, 19/21, Seite 549-555 (April 1966)
- Kamm, G.: Über den Schaum allgemein und den des Bieres, *Brauwelt*, Nr. 31/32, 549-555 (1966)
- Karger, B.B. and DeVivo, D.: General survey of adsorptive bubble separation processes, *Separation science*, 3 (5), 393-424 (Oct. 1968)
- Karger, B.L., Caragay, A.B.: Studies in solvent sublation: Extraction of methyl orange and rhodamine B, *Separation science*, 2(1), 39-64 (1967)
- Kehrer, C.: Zur Extraktion von Curcuma mittels überkritischem Kohlendioxid, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München (1996)
- Kleber und N. Hums: Über den Schaum des Bieres, *Brauwissenschaft*, Jahrgang 28, Heft 2, Seite 33-38 (1975)
- Ko, S., Loha, V., Prokorp, A., Tanner, R.D.: Batch foam recovery of sporamin from sweet potato, *Applied-Biochemistry-and-Biotechnology*, 70-72, 547-558, 18 ref. (1998)
- Kretzschmar, R.: Pharmakologische Untersuchungen zur zentralnervösen Wirkung und zum Wirkungsmechanismus der Kava-Droge und ihrer kristallinen Inhaltsstoffe, *Phytopharmaka Forsch. Klin. Anwend.*, S. 29-38 (1995)

- Krüger, E., Radau, B., Rönn, D.: Untersuchungen von Schaum und Bier mit proteinchemischen Arbeitsmethoden, *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, Heft 9, Seite 312-319 (1993)
- Lange, H.: Schäume und ihre Stabilität, *VDI-Berichte* Nr. 182, 71-77 (1972)
- Lawrence, B.M.: Major Tropical Spices - Ginger (*Zingiber officinalis* Rosc.), *Perfum. Flavor.* 9, pp.1-40 (1984)
- Lemlich, R.: Adsorptive Bubble Separation Methods, *Industrial and Engineering Chemistry* 60 (10), 16-29 (1968)
- Lemlich, R.: Adsorptive Bubble Separation Techniques. Academic Press, New York, S. 133-143, (1972a)
- Lemlich, R.: Adsorptive Bubble Methods, *Recent Developments in Separation Science* 1, 113-127 (1972b)
- Lewis, Y.S.: Spices and Herbs for the Food Industry, 97-83, Food Trade Press, Orpington (1984)
- Lima, V., Varley, J.: Foam Fractionation of proteins. *Annals of the New York Academy of Science* 782, 375-390 (1994)
- Lin, S.D., Chen, A. O.: Major Carotenoids in Juices of Ponkan Mandarin and Liucheng Orange, *Journal of Food Biochemistry* 18, S. 273- 283 (1995)
- Lindner, E.: Toxikologie der Nahrungsmittel, 4. Auflage, Thieme Verlag, pp.41- 43 (1990)
- Liu, Z., Wang, D., Ding, F., Yuan, N.: On the denaturation of enzymes in the process of foam fractionation. *Bioseparation* 7, 167-174 (1998)
- Loha-V, Tanner-RD, Prokorp-A: The effect of pectinase on the bubble fractionation of invertase from alpha-amylase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-65, 395-408, 9 ref. (1997)
- Lopez-Avila, V. and Benedicto J.: Supercritical Fluid Extraction of Kava Lactones from *Piper methysticum* (Kava) Herb, *J. High Resol. Chromatogr.*, Vol. 20., pp. 555-559 (Oct. 1997)
- Luis, J. G., Andrés, L. S., Hydroxylated Abietane Diterpenes from *Salvia mellifera*, *Phytochemistry* Vol.33, No. 3,pp. 635-638, C-16 (1993)
- Luis, J. G., Gonzales, A. G., Andrés, L. S., Mederos, S.: Diterpenes from in vitro-grown *Salvia canariensis*, *Phytochemistry*, Vol.37, No. 5,pp. 1463-1466 (1992)
- Luis, J. G., Quinones, W., Grillo, T. A., Kishi, M. P.: Hydroxylated Abietane Diterpenes from *Salvia mellifera*, *Phytochemistry*, Vol.35, No. 5,pp. 1373-1374 (1994)

- Maas, K.: Adsorptive Bubble Separation Methods, *Methodicum Chemicum*, Vol. 1, Korte F (Hrsg.), Academic press, New York, 165-171 (1974)
- Macarone, E, Campisi, S, Fallico, B, Rapisarda, P, Sgarlata, R: Flavor components of Italian orange juices, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (6), S. 2293 (1998)
- Madaus, G., Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Band III, Georg Olms-Verlag Hildesheim, New York (1976), S. 2142-2146
- Madea, K., Yokoi, S., Kamada, K., Kamimura, M., Foam stability and physicochemical properties of beer, *Journal of ASBC*, 49 (Nr. 1): 14-18, 1991
- Mahne, E. J.: Foam separation processes, *Chemistry in Canada*, 23 (3) 32-33 (1971)
- Manegold, E.: Schaum. Chemie und Technik Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg (1953)
- Masuda, Toshiya and Jitoe, Akiko: Antioxidative and Antiinflammatory Compounds from Tropical Gingers: Isolation, Structure Determination, and Activities of Cassumunins A, B, and C, New Complex Curcuminoids from *Zingiber Cassumunar*. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1850-1856 (1994)
- Mischke, M.: Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie II, *Kolloid Zeitschrift* 90 (1), 7-89 (1940)
- Mohan, S. B., Smith, L., Kemp, W., Lyddiatt, A: An immunochemical analysis of beer foam, *J. Inst. Brew.*, May-June, Vol.98, pp. 187-192 (1992)
- Montero-GA, Kirschner-TF, Tanner-RD: Bubble and foam concentration of cellulase, *Applied-Biochemistry-and-Biotechnology*, 39/40, 467-475, 6 ref. (1993)
- Morgan, M., Coxon, D. T.: Tolerances: glycoalkaloids in potatoes, *Natural toxicants in food progress and products*, edited by D.H. Watson, pp. 221-227 (1987)
- Narziß, L., Reicheneder, E., Barth, D.: Über den Beitrag von hochmolekularen Proteinfractionen und Glykoproteiden zum Bierschaum, *Brauwissenschaft*, Jg 35/Heft 9, Seite 213-223 (1982)
- Neal E. Craft and Stephen A. Wise: Optimization of an isocratic high-performance liquid chromatographic separation of carotinoids, *Journal of Chromatography*, 589, 171-176 (1992)
- Nutraceutical Advancement, Institute for,
<http://www.nutraceuticalinstitute.com/methods/kava.html> (Stand 2000)
- Ohloff, G: Riechstoffe und Geruchssinn. Die molekulare Welt der Düfte, Springer-Verlag, ISBN 3-540-52560-2 (1990)
- Oka, H.: Foam counter-current chromatography of Bacitracin, *Journal of chromatography*, 482, 197-205 (1989)

- Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S., Yagi, A.: High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, *Journal of Chromatography* 679, 381-386 (1994)
- Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A.: Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* Leaves, *Phytochemistry*, Vol.37, No. 5, pp. 1463-1466 (1994)
- Ono, M., Hashimoto, S., et. al: Foaming and beer Flavor, *J. of the American Society of Brewing Chemists*, 41 (1) , 19-13 (1983)
- Ostwald, W, Siehr, A.:Über Schaum-und Zerschäumungsanalyse, *Chem.-Ztg.* Nr. 64, 61. Jahrgang, S.649-653 (11. August 1937)
- Ostwald, W., Mischke, W.: Untersuchungen über Zerschäumung mit besonderer Rücksicht auf Fragen der angewandten Chemie I, *Kolloid-Zeitschrift* 90, 17-25 (1940)
- Ostwald, W., Siehr, A.: Über Zerschäumungsanalyse, II, *Kolloid Zeitschrift* 79 (1), 11-25 (1937)
- Ostwald, W., Siehr, A.: Über Zerschäumungsanalyse, *Kolloid-Zeitschrift* 76 (1), 33-46 (1936)
- Ostwald, W.: Verfahren zum Verdampfen von Flüssigkeiten. Patentschrift Nr. 327976, Klasse 12a, Gruppe 2. Reichspatentamt (1929)
- Palmieri, M. C., Greehalf, W., Laluce, C.: Efficient Flotation of yeast cells grown in batch culture, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, 248-254 (1996)
- Parthasarathy, S. et al.: Foam Separation of Microbial Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 23, 174-183 (1988)
- Peters, D.: Eine Methode zur vergleichenden Bestimmung von Schäumen, *Angew. Chem.* 64 (21), 586-590 (1952)
- Phenomenex Nutraceuticals: Kava kava by reversed phase, *Emerging Technologies, Developed methods*, (1997)
- Philip, T., Chen, T., Nelson, D. B.:Detection of adulteration of california orange juice concentrates with extremally added carotinoids by liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 37, 90-95 (1989)
- Prokorp-A, Tanner-RD: Foam fractionation of proteins: Potential for separations from dilute starch suspensions, *Starch/Staerke*, 45 (4) 150-154, 14 ref. (1993)
- Reichheimer, S.L. et al.: Antioxidant Activity of Lipid-Soluble Phenolic Diterpenes from Rosemary, *JAOCS*, Vol. 73, No. 4 (1996)
- Roberts, R. T., Glycoproteins and Beer Foam; European Brewery convention proceedings of the 15th convention, Nice, 453-464 (1975)

- Roberts, R. T., Keeney, P.J., and Wainwright, T.: The Effects of Lipids and Related Materials on beer Foam, *J. Inst. Brew.* 84, S. 9-14 (1978)
- Roberts, R. T.: Colloidal Aspects of Beer Foam, *The Brewers Digest-June*, pp. 50-58 (1977)
- Rodgers, N. E.: Foam separation of gluten and starch, United States patent, Appl. No.: 318,145, U.S.CL. 260/112 G (1972)
- Ronteltap, A. D. et al.: Beer foam physics, *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 28, pp 25-32 (1991)
- Rouseff, Russell L.: High Performance Liquid Chromatographic Separation and Spectral Characterization of the Pigments in Turmeric and Annatto, *Journal of Food Science*, Vol. 53, No. 6 (1988)
- Rubin, E. and Gaden, E. L.: Foam Separation, *New Chemical Engineering Techniques*, H. M. Schoen, ed., Interscience, New York, 319-385 (1962)
- Schreiber, K.: The steroid alkaloids of Solanum, *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, Hawkes, J. G., Ed., Linnean Society Symposium Series 7, Academic Press, New York, pp 193-202 (1979)
- Schulgin, A.T.: The narcotic pepper- The chemistry and pharmacology of *Piper methysticum* and related species, *Bulletin on Narcotics*, Vol. XXV, No. 2, pp. 59-73 (April-June 1975)
- Schulz, V., Hänsel, R.: Rationale Phytotherapie: Ratgeber für die ärztliche Praxis , 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, ISBN 3-540-61240-8, Seite 71-79 (1996)
- Schwabe Firmeninformation: Moderne Phytopharmaka zur Behandlung psychischer Erkrankungen, *Spitzner Arzneimittel*, S.21 ff. (1996)
- Schwabe, K.-P.: Kawa- Kawa- Extrakt, Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung, *Offenlegungsschrift DE 40 28 945 A1 der Firma Schwabe* (1996)
- Schwarz, K. und Ternes, W., Z: Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* III, *Lebensm. Unters. Forsch.* 195:104-107 (1992)
- Schwarz, K. und Ternes, W., Z: Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* I, *Lebensm. Unters. Forsch.* 195:95-98 (1992)
- Schwarz, K. und Ternes, W., Z: Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* II, *Lebensm. Unters. Forsch.* 195:99-103 (1992)
- Siehr, A.: Zur Kenntnis der mechanischen Eigenschaften von Schäumen I, *Kolloid Zeitschrift* 77 (1), 27-32 (1936)

- Siewek, F.: Exotische Gewürze: Herkunft, Verwendung, Inhaltsstoffe, 72-74, Birkhäuser-Verlag, Basel (1990)
- Simpson, W. J., Huches, P. S.: Stabilisation of foams by hop-derived bitter acids chemical interactions in beer foam, *Cerevisia and Biotechnology* 19, Nr. 3, 39-42 (1994)
- Slack, B. T., Bamforth, C. W.: The fractionation of polypeptides from barley and beer by hydrophobic interaction chromatography: the influence of their hydrophobicity on foam stability, *J. inst. Brew.*, Vol. 89, pp. 397-401 (November-December, 1983)
- Smith, Roger M., Witowska, B.A.: Comparison of Detectors for the Determination of Curcumin in Turmeric by High-performance Liquid Chromatography, *Analyst*, Vol. 109, 259-261 (March 1984)
- Sorensen, S. B., Bech, L. M., Muldbjerg, M., Beenfeldt, T., Breddam, K., Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation, *MBAA Technical Quarterly*, Vol. 30, pp. 136-145 (1993)
- Souci, Fachmann, Kraut: Die Zusammensetzung der Lebensmittel, *Nährwert- Tabellen*, 5. Auflage, medpharm, scientific publishers, ISBN 3-88763-027-0, S. 872
- Stransky, C.E.: U.S.-Patent No. 4,138,212 (1979)
- Stranz, J. L.: U.S. - Patent No. 4,368,208 (1983)
- Su, H.C.F., Horvat, R., Jilani, G.: Isolation, Purification and Characterization of Insect Repellents from *Curcuma Longa* L. *J. Agric. Food Chem.*, 30: 290-292 (1989)
- Takenaka, M. et al.: New Antimicrobial Substances against *Streptomyces scabies* from Rosemary, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (9), 1440-1444 (1997)
- Tena, M. T., Valcárcel, M.: Supercritical Fluid Extraction of Natural Antioxidants from Rosemary, *Analytical Chemistry*, Vol. 69, No. 3, Feb.1 (1997)
- Tennesen, H., Karlsen, J.: Studies on Curcumin and Curcuminoids V. Alkaline Degradation of Curcumin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 180: 132-134 (1985)
- Teuscher, E.: Biogene Arzneimittel, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 5. Auflage, S. 374-377 (1997)
- Teuscher, E.: Biogene Arzneistoffe, 5. Auflage, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart ISBN 3-8047-1482-X., S. 187-188 (1997)
- Timmons, M. B., Weeks, N. C., Chen, S.: Feasibility of using foam fractionation for the removal of dissolved and suspended solids from fish culture water, *Aquacultural Engineering*, 11 (4), 251-265 (1992)

- Todd, P.H., Johnson, P.A., Worden, L.R.: Evaluation of the relative bitterness and light stability of reduced iso- α -acids, *Master Brewers Association of the Americas, Technical Quarterly*, 9, 31-35 (1972)
- Uraizee, F., Narsimhan, G.: Foam fractionation of proteins and enzymes. II. Performance and modelling, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 12, 315-316 (April 1990)
- Uraizee, F., Narsimhan, G.: Foam-based separation of proteins, *Bioseparation Process in Foods*, Singh, R. K. and Rizvi, S. S. H. (Hrsg.), 175-225 (1995)
- Valsaraj, K., T. and Springer, C.: Removal of traces of pentachlorophenol from aqueous acidic solutions by solvent extraction and solvent sublation, *Separation Science and Technology*, 21 (8), 789-807 (1986a)
- Valsaraj, K., T. et.al: Removal of hydrophobic organic compounds from the aqueous phase, *ACS Symp. Ser. 509 (Environ. Rem.)*, 116-28 (1992)
- Valsaraj, K., T. et.al: Solvent sublation for the removal of hydrophobic chlorinated compounds from aqueous solutions, *Wat. res.* Vol. 20 (9), 1161-1175 (1986c)
- Valsaraj, K., T.: Comparison of co-solvent effects on solvent sublation and bubble aeration of hydrophobic organics from aqueous solutions, *J. Indian Chem Soc.*, Vol. LXIII, 1010-1013 (Nov. 1986)
- Valsaraj, K.T. : Solvent sublation for the removal of a hydrophobic taste and odour causing from aqueous solution, *J. Indian Chem. sec.*, Vol. LXV, 369-376 (May 1988)
- Vesper, C., Kindsmüller, C., Meurens, M., Kollmannsberger, H., Nitz, S: Isolation and Quantification of the Pungent Principles of Ginger, *Chem. Mikrobiol. Technol Lebensm.* 17 (3/4) 114-117 (1995)
- Wackerbauer, K., Berlin, B., Balzer, B.: Hopfenbitterstoffe in Bier, Teil 3: Der Einfluß der Nicht-Isohumulon-Bitterstoffe auf die Bierqualität, *Brauwelt* Nr. 16/17, Seite 734-737 (1992)
- Wackerbauer, K., Berlin, B.: Hopfenbitterstoffe in Bier, Teil 1: Veränderungen in der Zusammensetzung der Bitterstoffe während des Brauprozesses. *Brauwelt* Nr. 5, Seite 152-155 (1992)
- Wainwright, T.: Brewing Industrial Research Foundation, Scientific and technical Advisory Committee (1978)
- Walbrauch, S.: Verfahren zur Isolierung der Carotinoide aus Säften und Getränken, *Flüssiges Obst*, Heft 2, S. 64- 66 (1984)
- Wechner, S.: Untersuchungen zur Qualität und Stabilität von CO₂- Hochdruckextrakten aus Ingwer (*Zingiber officinale* Rosc.), Diss., Techn. Univ. München (1997)

-
- Weinreich, B: Untersuchungen zur Struktur und zum Extraktionsverhalten antioxidativ wirksamer Inhaltsstoffe aus *Rosmarinus* und *Salvia officinalis* L., Dissertation, Technische Universität München (1989)
- Wenkert, E., Fuchs, A., McChesney, J. D.: Chemical Artifacts from the Family *Labiatae* , *Org. Chem.* 30: 2931-2934 (1964)
- Werner, P.: Hochdruckextraktion von Kava-Kava-Rhizomen zur Gewinnung pharmakologisch aktiver Komponenten, Diplomarbeit, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (1998)
- Wingerath, T., Stahl, W., Sies, H.: Fruit Juice Carotenol, Fatty Acid Esters and Carotenoids as identified by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *Journal Agrc. Food. Chem.*, 44, 2006-2013 (1996)
- Yokoi, S., Yamashita, K., Kunitake, N., Koshino, S.: Hydrophobic beer proteins and their function in beer foam, *American society of brewing chemists*, 52 (3) 123-126 (1994)

8 Anhang

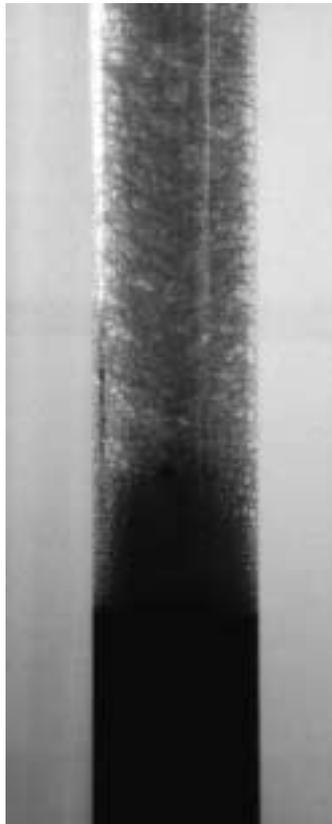


Abb. 8-1: Trennung der Farbstoffe Patentblau und Neucoccin voneinander durch Anreicherung von Patentblau im Schaum [Versuch durchgeführt nach Ostwald, 1937]



Abb. 8-2: Austritt und Sammeln des mit Patentblau angereicherten Schaums (Spumat) aus der Zerschäumungskolonie



Abb. 8-3: Schaumzerfall aufgrund der Gasblasenkoaleszenz und Disproportionierung am oberen Teil der Schaumsäule gegen Ende der Zerschäumung.



Abb. 8-4: Aufgenommenes Bild von Ausgangs-(mitte), Spumat-(rechts) und Rückstandsprobe (links) eines Orangensaftes



Abb. 8-5: Aufgenommenes Bild von Ausgangs- (mitte), Spumat- (rechts) und Rückstandsprobe (links) eines Mandarinenstoffes



Abb. 8-6: Aufgenommenes Bild von Ausgangs- (mitte), Spumat- (rechts) und Rückstandsprobe (links) eines wässrigen Extraktes vom Kurkumapulver