

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie

Analytik von Fettsäureestern pflanzlicher Sterole/Stanole in angereicherten Lebensmitteln

Andreas Barnsteiner

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

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Rychlik
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel
2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 22.02.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.07.2012 angenommen.

INHALT

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
2.	Grundlagen	3
2.1.	Phytosterole/-stanole	3
2.1.1.	Struktur und Vorkommen	3
2.1.2.	Metabolismus	6
2.1.3.	Cholesterinsenkender Effekt	8
2.2.	Phytosteryl-/stanyl-fettsäureester	11
2.2.1.	Einsatz in funktionellen Lebensmitteln	11
2.2.1.1.	Hintergrund	11
2.2.1.2.	Industrielle Gewinnung	13
2.2.1.3.	Rechtliche Grundlagen, Spezifikationen und Kennzeichnung	16
2.2.1.4.	Angereicherte Produkte und Marktsituation	19
2.2.2.	Analytik	21
2.3.	On-line LC-GC	22
2.3.1.	Hintergrund	22
2.3.2.	Kopplungstechniken	23
2.3.2.1.	On-column Interface	24
2.3.2.2.	Loop-type Interface	25
2.3.2.3.	Vaporiser Interfaces	27
3.	Material und Methoden	28
3.1.	Material	28
3.1.1.	Chemikalien	28
3.1.2.	Enzympräparate	28
3.1.3.	Pflanzliche Sterol/Stanol- und Steryl-/Stanyl-fettsäureester-Muster	28
3.1.4.	Fette und Öle	30
3.1.5.	Angereicherte Lebensmittel	30
3.1.5.1.	Magermilch-Trinkjoghurts	30
3.1.5.2.	Margarinen	31
3.2.	Methoden	32
3.2.1.	Enzymatische Steryl-/Stanylestersynthese	32
3.2.2.	GC/MS-Bedingungen	32

3.2.3.	GC/FID-Bedingungen	32
3.2.3.1.	Vorversuche.....	32
3.2.3.2.	Analytik.....	33
3.2.4.	Chemische Umesterung der industriellen Muster	33
3.2.5.	Chemische Synthese und Aufreinigung von Steryl-/Stanylestern	34
3.2.6.	Analytik in Magermilch-Trinkjoghurt mittels GC/FID	34
3.2.6.1.	Quantifizierung von Pflanzensteryl-/stanylestern.....	34
3.2.6.2.	Aufarbeitung nach Weibull-Stoldt.....	35
3.2.6.3.	Chemische Hydrolyse	36
3.2.6.4.	Silylierung	36
3.2.6.5.	Quantifizierung von Phytosterolen/-stanolen.....	36
3.2.6.6.	Schnellmethoden-Aufarbeitung.....	37
3.2.7.	Analytik in Margarinen mittels on-line LC-GC	37
3.2.7.1.	Lipidextraktion.....	37
3.2.7.2.	On-line LC-GC/FID-Bedingungen (Loop-Type Interface)	38
3.2.7.3.	On-line LC-GC/MS-Bedingungen	39
3.2.7.4.	On-line LC-GC/FID-Bedingungen (PTV Interface)	39
3.2.8.	Analytik mittels LC/MS.....	41
4.	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1.	Kapillargaschromatographische Analytik von Phytosteryl-/stanylfettsäureestern ..	42
4.1.1.	Einleitung	42
4.1.2.	Methodenentwicklung	43
4.1.2.1.	Identifizierung mittels GC/MS.....	43
4.1.2.2.	GC-Trennung.....	46
4.1.2.3.	GC/FID-Response von Phytosteryl-/stanylestern	51
4.1.2.4.	GC/FID-Kalibrierung	53
4.1.2.5.	Synthese und Aufreinigung von Referenzsubstanzen/-mischungen.....	54
4.1.2.6.	Zusammenfassung.....	56
4.1.3.	Untersuchung angereicherter Magermilch-Trinkjoghurts (Benecol®)	57
4.1.3.1.	Extraktion nach Weibull-Stoldt.....	57
4.1.3.2.	Etablierung einer Extraktionsschnellmethode	60
4.1.3.3.	Validierung der Schnellmethode.....	62

4.1.3.4.	Untersuchung weiterer Produkte.....	63
4.1.3.4.1.	Becel® pro-activ	63
4.1.3.4.2.	Danacol® (Italien).....	65
4.1.4.	Zusammenfassung	69
4.2.	Phytosteryl-/stanylfettsäureester-Analytik mittels on-line LC-GC	70
4.2.1.	Einleitung	70
4.2.2.	Etablierung geeigneter Bedingungen (Loop-Type Interface).....	70
4.2.2.1.	Vergleich der Analytik mittels on-line LC-GC/FID und GC/FID	71
4.2.2.1.1.	GC-Trennung	71
4.2.2.1.2.	Stanylester-Bestimmung in Magermilch-Trinkjoghurtextrakten.....	72
4.2.2.2.	Bestimmung in angereicherten Margarinen	74
4.2.3.	On-line LC-GC mit PTV Interface.....	80
4.2.3.1.	Etablierung geeigneter Bedingungen.....	80
4.2.3.2.	Bestimmung in angereicherten Margarinen	82
4.2.4.	Zusammenfassung	85
4.3.	Flüssigchromatographische Untersuchung (LC/MS)	86
4.3.1.	Einleitung	86
4.3.2.	Etablierung der Methode	87
4.3.2.1.	HPLC-Bedingungen	87
4.3.2.2.	APCI-Ionisierung	89
4.3.2.3.	Trennung komplexer Phytosteryl-/stanylester-Mischungen	92
4.3.3.	Untersuchung angereicherter Lebensmittel.....	94
4.3.4.	Magermilch-Trinkjoghurt.....	95
4.3.4.1.	Emmi-Benecol®	95
4.3.4.2.	Becel® pro-activ.....	97
4.3.4.3.	Danacol® (Italien).....	98
4.3.4.4.	Margarinen	100
4.3.4.4.1.	Mit „Pflanzenstanolestern“	100
4.3.4.4.2.	Mit „Pflanzensterinestern“	105
4.3.5.	Zusammenfassung	108
5.	Zusammenfassung.....	110
6.	Literatur.....	112

ABKÜRZUNGEN

ABC	ATP-binding cassette (Transportproteine)
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase
ACN	Acetonitril
ADI	Acceptable Daily Intake (erlaubte Tagesdosis)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck)
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamide
CA	California (Kalifornien)
CH	Schweiz
CoA	Coenzym A
D	Deutschland
DC	Dünnschichtchromatographie
d_f	Filmdicke [μm]
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DPTMDS	1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyldisilazan
EFSA	European Food Safety Authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EG	Europäische Gemeinschaft
EI	Electron Impact (-Ionization) (Elektronenstoß-Ionisation)
EU	Europäische Union
FAME	Fatty Acid Methyl Ester (Fettsäuremethylester)
FAO	Food and Agricultural Organization
FID	Flammenionisationsdetektor
FIN	Finnland
GC	Gaschromatograph / Gaschromatographie
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoprotein hoher Dichte)
HMG-	β -Hydroxy- β -methylglutaryl-
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie)
I	Italien
I.D.	Innerer Durchmesser

IDL	Intermediate Density Lipoprotein (Lipoprotein mittlerer Dichte)
IS	Interner Standard
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (gemeinsamer FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe)
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LXR	Liver X Rezeptor
MeOH	Methanol
MMI	Multimode-Inlet
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NP-	Normalphasen-
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1 (Protein)
NL	die Niederlande
PCM	Pneumatics Control Modul
PTV	Programmed-temperature Vaporiser (temperaturprogrammierter Injektor)
SCF	Scientific Committee on Food
Sdp	Siedepunkt
SIM	Single Ion Monitoring
SK	Seitenkette
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasen-Extraktion)
SSL	Split-/Splitless (-Injektion)
SVE	Solvent Vapour Exit (Lösungsmitteldampfausgang)
TIC	Total Ion Chromatogram (Gesamtionen-Chromatogramm)
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl-
TX	Texas
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low Density Lipoproteins (Lipoprotein sehr geringer Dichte)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Hypercholesterinämie ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z.B. koronare Herzkrankheiten oder Schlaganfälle, welche weltweit die Haupttodesursachen darstellen (1). Konzepte zur Risikoreduktion beinhalten diätetische Modifikationen wie zum Beispiel den Verzehr mit Phytosterolen/-stanolen und ihren Estern angereicherter Lebensmittel. Die Wirksamkeit dieser funktionellen Lebensmittel zur Senkung des LDL- und Gesamtplasmacholesterinspiegels um 5-15 % wurde in zahlreichen Studien belegt (2-6).

In der Europäischen Union fallen diese Lebensmittel unter die Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten (7). Mit Phytosterylestern angereicherte Margarine war das erste Beispiel für ein funktionelles Lebensmittel, welches nach den Vorgaben der Verordnung vor seiner Zulassung einer Sicherheitsbewertung unterzogen wurde (8, 9). Mittlerweile wurde ein breites Spektrum mit Pflanzensteryl-/stanylestern angereicherter Lebensmittel zugelassen. Im Moment werden vor allem Margarinen und fettarme Lebensmittel wie Milch- und Joghurtprodukte in Europa vermarktet. Die Konzentrationen an zugesetzten Phytosterolen/-stanolen variieren von 0,3 % in milchähnlichen Produkten bis zu 8 % in Margarinen (10). Die zugesetzte Menge an Phytosterolen, Phytosterylestern, Phytostanolen oder Phytostanylestern muss gemäß der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission vom 31. März 2004 im Zutatenverzeichnis der Produkte aufgeführt sein (11).

Phytosterole und -stanole werden aus Pflanzenölen und Tallöl, die zur Veresterung eingesetzten Fettsäuren aus Pflanzenölen gewonnen (12-17). Folglich wurden die für angereicherte Lebensmittel zugelassenen Ester-Präparate bezüglich des Sterol-/Stanolprofiles und der Fettsäuren spezifiziert (12-17). Darüber hinaus soll aufgrund von Stellungnahmen des Scientific Committee on Food (SCF), der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) und der Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM, Deutsche Forschungsgemeinschaft) sichergestellt werden, dass die tägliche Gesamtaufnahme an Phytosterolen 3 g nicht überschreitet (10, 18, 19). Daher bedarf es für die Überprüfung der Authentizität und zur Gewährleistung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes analytischer Methoden, welche die qualitative und quantitative

Bestimmung von Phytosterolen/-stanolen und deren Estern in funktionellen Lebensmitteln erlauben. Aufgrund der bereits jetzt sehr unterschiedlichen und komplexen Matrices und der zu erwartenden Ausweitung des Spektrums angereicherter Lebensmittel wird eine robuste und möglichst universell einsetzbare Schnellmethodik benötigt.

Analysenmethoden zur Bestimmung von Phytosterolen/-stanolen und deren Konjugate, z.B. als Minorlipide in natürlich vorkommenden oder auch in angereicherten Lebensmitteln, basieren meist auf der Isolierung der Sterole und/oder deren Ester mit anschließender kapillargas (GC)- oder flüssigchromatographischer (LC) Untersuchung. Die Bestimmung der Ester erfolgt gewöhnlich kapillargaschromatographisch nach alkalischer Hydrolyse (20-26), wodurch die Information über veresterte Fettsäuren verloren geht.

Zur Trennung intakter Phytosterylester wurden Ansätze mittels GC, LC sowie der Kopplung von LC und GC beschrieben. Die GC wird im Vergleich zur HPLC für die Sterylester-Analytik als sensitiver betrachtet (27, 28). Die Auflösung bei der Trennung komplexer Mischungen unterschiedlich gesättigter Phytosterylester mittels GC war bisher jedoch unbefriedigend (27-31). Die kapillargaschromatographische Analytik erfordert zudem eine vorhergehende Abtrennung störender Fettmatrices. Die on-line gekoppelte LC-GC (on-line LC-GC) stellt dafür eine ideale Methode dar. Durch die effiziente und schnelle Vortrennung der Lipidfraktion mittels LC entfallen aufwändige und mit Verlusten behaftete Aufarbeitungsschritte. Der anschließende Transfer erlaubt eine effiziente kapillargaschromatographische Auftrennung von Phytosterylestergemischen.

Die LC/MS-Analytik ist grundsätzlich zur Untersuchung von Phytosterylestern geeignet, erfordert jedoch eine massenspektrometrische Detektion zur Identifizierung unvollständig getrennter Ester und co-eluierender neutraler Lipide (32).

In dieser Arbeit sollten geeignete kapillargas- sowie flüssigchromatographische Bedingungen für die qualitative und quantitative Bestimmung individueller Phytosteryl-/stanylester in komplexen Mischungen etabliert werden. Anschließend sollten die chromatographischen Trennungen mit effektiven Isolierungstechniken zur Untersuchung der Esterpräparate in angereicherten Lebensmitteln kombiniert und hinsichtlich ihrer Eignung als Schnellmethode überprüft und validiert werden. Als Produktkategorien sollten hierfür die kommerziell bedeutenden Magermilch-Trinkjoghurts und Margarinen dienen.

2. GRUNDLAGEN

2.1. Phytosterole/-stanole

2.1.1. Struktur und Vorkommen

Phytosterole, die pflanzlichen Sterole, gehören der Familie der Triterpene an. Über 100 Phytosterole sind bekannt (33). Sie bestehen aus dem tetracyclischen Steroidgrundgerüst, besitzen zwei Methylsubstituenten an C10 und C13, eine Seitenkette mit 9-10 C-Atomen an C17 und eine zusätzliche Hydroxylgruppe an C3 (Abbildung 1) (34). In Abhängigkeit von ihrer Struktur und ihrer Biosynthese werden 4-Desmethylsterole, 4 α -Monomethylsterole und 4,4-Dimethylsterole differenziert. Der Begriff Phytosterole wird geläufig für die 4-Desmethylsterole, die am häufigsten vorkommenden Abkömmlinge, verwendet. Jene Sterole mit einer Doppelbindung zwischen C5 und C6 werden auch als Δ^5 -Sterole, die gesättigten Vertreter als Stanole bezeichnet (Abbildung 1). Die pflanzlichen 4-Desmethylsterole unterscheiden sich vom tierischen Cholesterol lediglich in der Struktur der Seitenkette durch zusätzliche Methyl- bzw. Ethyl-Substituenten an C24 und/oder einer Doppelbindung (Abbildung 1).

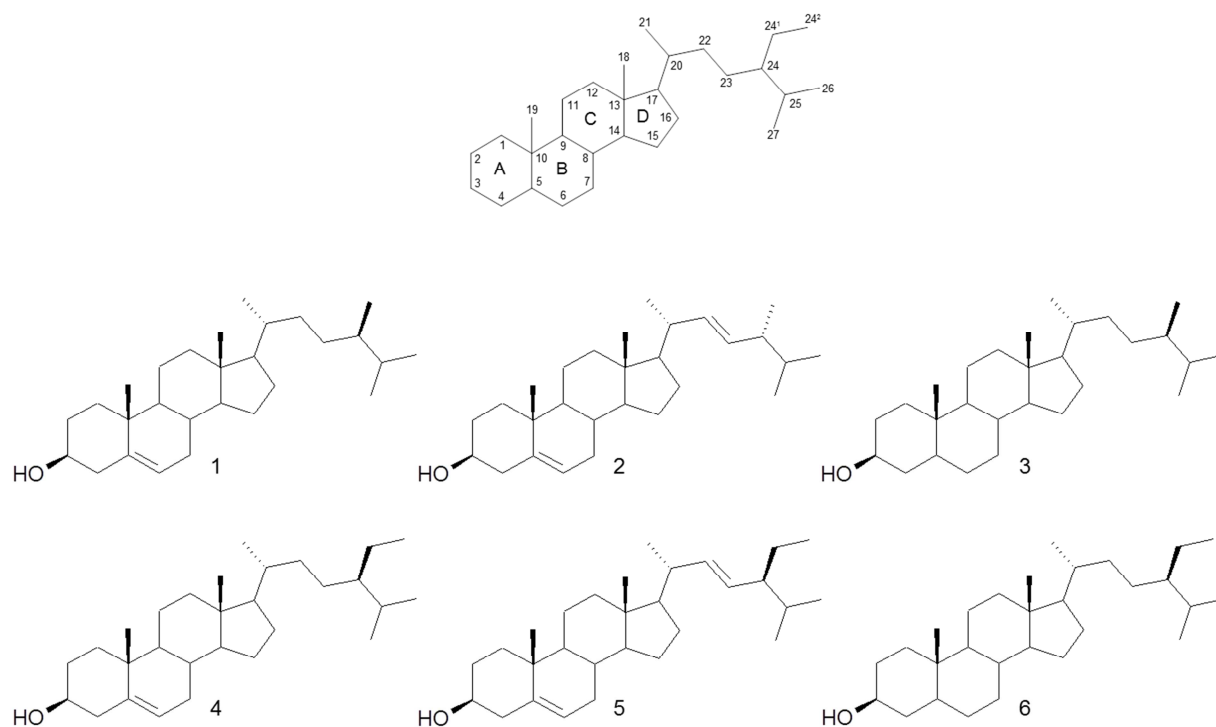


Abbildung 1: Steroidgrundgerüst (Nummerierung nach IUPAC (34)) und Strukturen wichtiger pflanzlicher 4-Desmethylsterole: Campesterol (1), Brassicasterol (2), Campestanol (3), β -Sitosterol (4), Stigmasterol (5) und Sitostanol (6)

Phytosterole sind wichtige strukturelle Komponenten pflanzlicher Zellmembranen. Das lipophile Steroidgerüst ist in die Membran eingelagert, die freie Hydroxylgruppe ragt in das Lumen (35). Entsprechend der Funktion des Cholesterols in tierischen Zellen sind Phytosterole primär an der Regulation der Membranfluidität und damit an der Funktion membrangebundener Enzyme und Rezeptoren beteiligt (33, 36). Darüber hinaus sind sie Vorläufer wichtiger sekundärer Metaboliten, wie z.B. von Cardenoliden, Glykoalkaloiden oder Saponinen (37).

In herkömmlichen Lebensmitteln variieren die Phytosterolprofile und -gehalte in Abhängigkeit von Pflanzen, Sorten, Wachstums- und Lagerungsbedingungen sowie dem Verarbeitungsgrad (38-47). Pflanzliche Sterole sind vor allem in den fettreichen Pflanzenteilen enthalten. Hohe Gehalte sind daher in Saaten und Nüssen, in Pflanzenölen sowie Getreiden vorzufinden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Phytosterolgehalte in Lebensmitteln¹

Lebensmittel	Phytosterolgehalt [mg/100g]
Saaten und Nüsse	68-404
Sesamseed	404
Sonnenblumenkerne	322
Mandeln	208
Pflanzliche Öle	129-1557
Maisöl	809-1557
Weizenkeimöl	967
Rapsöl	250-979
Sonnenblumenöl	374-725
Olivenöl	177
Getreideprodukte	4-344
Weizenkeime	344
Roggenmehl	86
Maismehl	53
Weizenbrot	50
Gemüse	4-50
Obst	1-44

¹(38, 39, 43, 46, 47)

β -Sitosterol ist das häufigste in Nahrungsmitteln enthaltene Phytosterol (ca. 65 %), gefolgt von Campesterol und Stigmasterol (40). Die tägliche Phytosterolaufnahme beträgt mit einer durchschnittlichen westlichen Diät etwa 150-400 mg (18), davon sind etwa 10 % Phytostanole (45).

Die alkoholische 3 β -Hydroxyfunktion pflanzlicher Sterole kann derivatisiert werden. Als natürlich vorkommende Phytosterolkonjugate sind Glykoside oder Ester von Fettsäuren bzw. Hydroxyzimtsäuren beschrieben (Abbildung 2) (33, 37, 45). Die Glykoside und Acylglykoside verbleiben als strukturelle Membrankomponenten, die Phytosteryl-fettsäureester hingegen sind größtenteils intrazellulär lokalisiert und stellen analog zu Cholesterylethern in Säugetieren die Speicherform pflanzlicher Sterole dar (33, 45). Dementsprechend sind vor allem pflanzliche Öle reich an Phytosteryl-fettsäureestern. Diese besitzen eine durchschnittliche Fettsäurekettenlänge von 12-22 C-Atomen, insbesondere C16 und C18 (48). Die Fettsäureester und acylierte sowie nicht acylierte Glykoside sind in Pflanzen ubiquitär (49), die Ester der Hydroxyzimtsäuren dagegen charakteristisch für Getreide (33, 50).

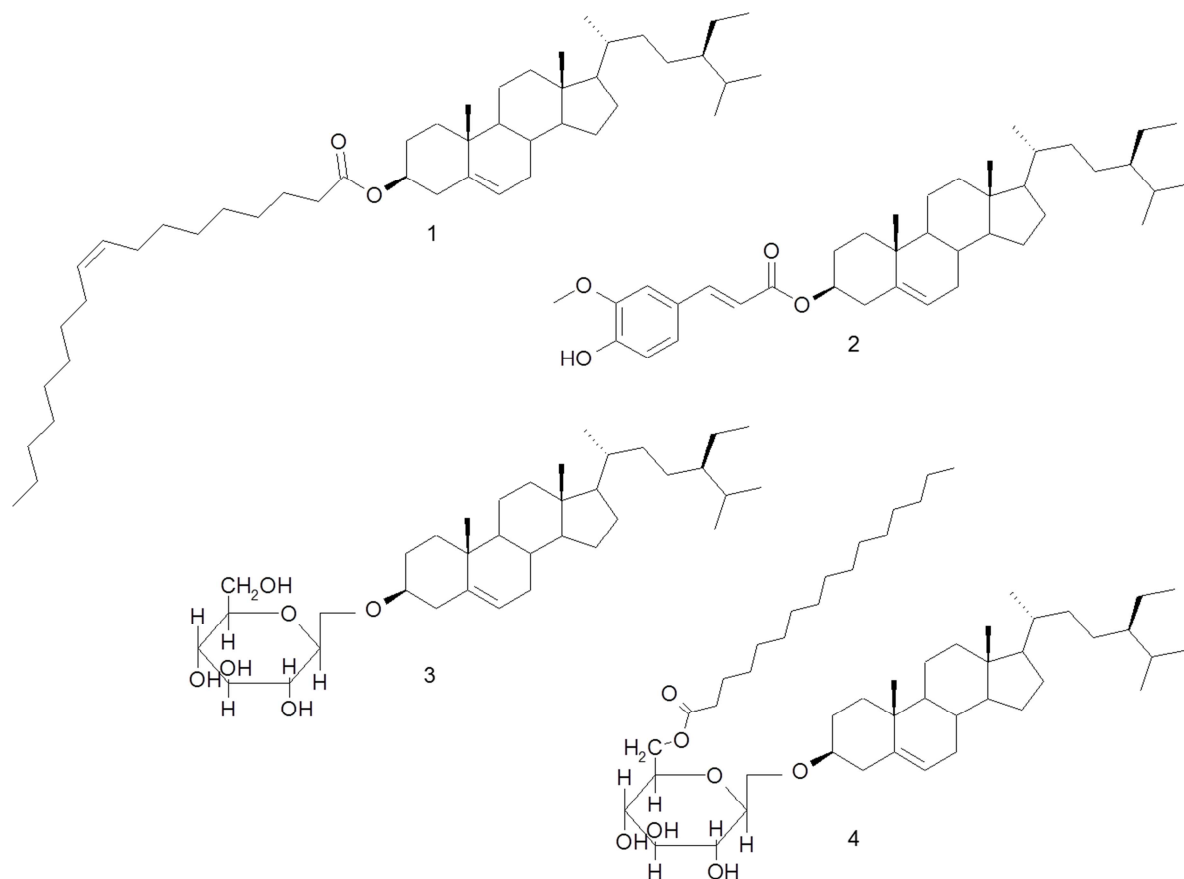


Abbildung 2: Natürlich vorkommende Phytosterolkonjugate: Ester von Fettsäuren (β -Sitosteryloleat) (1) und Hydroxyzimtsäuren (β -Sitosterylferulat) (2), Glykoside (β -Sitosteryl- β -D-Glukosid) (3) und acylierte Glykoside (β -Sitosteryl-(6'-O-palmitoyl)- β -D-Glukosid) (4)

2.1.2. Metabolismus

Phytosterole können von Säugetieren nicht synthetisiert werden (51). Der Metabolismus von Cholesterol unterscheidet sich von dem der pflanzlichen Sterole in einigen Aspekten, wobei die genauen Mechanismen der Sterolabsorption und -exkretion noch wenig verstanden sind (52). Die intestinale Sterolabsorption ist in die drei Schritte (i) Einbau der freien Sterole in die Mizellen, (ii) Transport über die apikale Membran in die Enterozyten und (iii) Mobilisierung in Chylomikronen und basolaterale Abgabe in die Lymphe gegliedert (Abbildung 3). Während Cholesterol zu 29-80 % (53) absorbiert wird, ist die Absorptionsrate der Phytosterole, in Abhängigkeit von Sättigung und der Länge der zusätzlichen Alkyl-Gruppe in der Seitenkette wesentlich geringer. Sie beträgt beispielsweise für Campesterol 1,9 % - 16 %, für β -Sitosterol 0,5 % - 5 %, für Campestanol 0,15 % und Sitostanol lediglich 0,04 % (54, 55).

Der Transport der Sterole in die Epithelzellen erfolgt zum größten Teil über das Niemann-Pick C1-like 1 Protein (NPC1L1), welches hauptsächlich an der apikalen Seite von absorbierenden Enterozyten und Hepatozyten angesiedelt ist (56-58). In NPC1L1-Knockout-Mäusen wurden im Vergleich zum Wildtyp ca. 70 % weniger Sterole in die Epithelzelle aufgenommen (56, 59). Vermutlich sind noch weitere, bisher nicht bekannte Proteine bei der Aufnahme in die Epithelzellen beteiligt (60). In der Epithelzelle wird im Vergleich zum Cholesterol ein geringerer Teil der Phytosterole durch die intestinale Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT2) verestert (61). Unveresterte Sterole werden über das Heterodimer ABCG5/G8 (ATP-binding cassette G5/G8), aus der Familie der ABC-Transportproteine zurück in das Darmlumen befördert (62, 63). Mutationen in diesem Transportkomplex führen zu Sitosterolämie, einer autosomal rezessiv vererbaren Krankheit, die durch eine erhöhte intestinale Absorption und eine verringerte biliäre Exkretion diätetischer Sterole gekennzeichnet ist (Abbildung 3) (62, 64). Nicht absorbierte Phytosterole können während des Darmtransits mit Fettsäuren verestert (65) oder im Dickdarm analog zum Cholesterol mikrobiologisch transformiert werden (66).

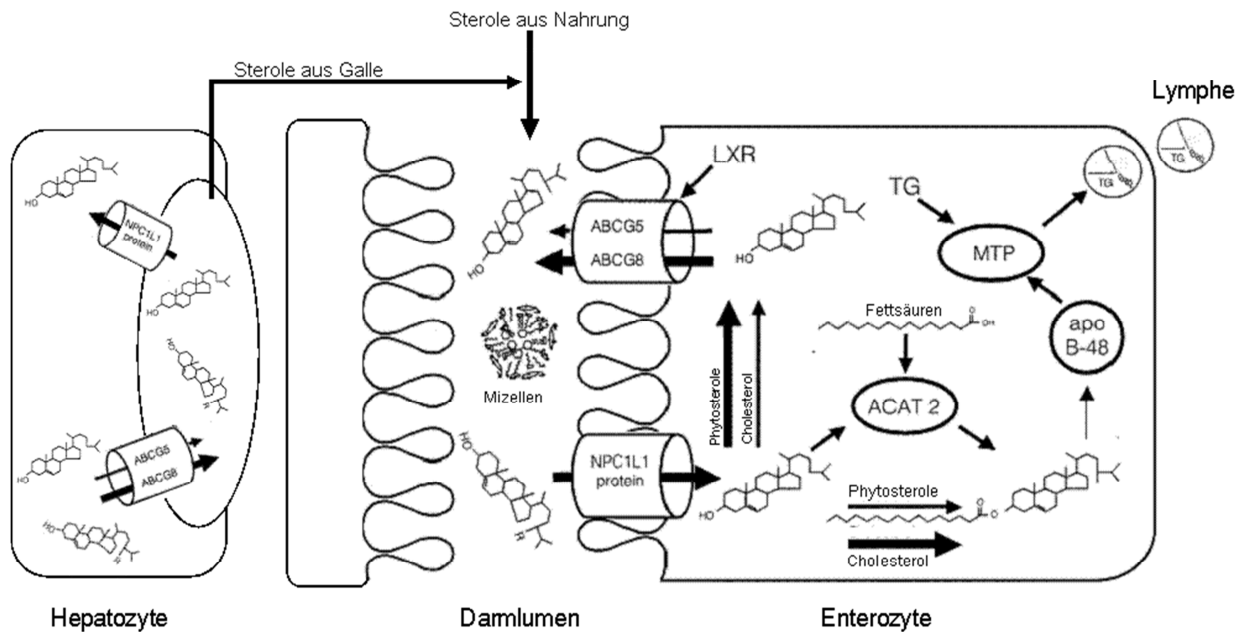


Abbildung 3: Hauptstoffwechselwege bei der Absorption von Cholesterin und Phytosterolen in der Mukosazelle nach (52, 67); ATP binding cassette G5/G8 (ABCG5/G8); Acyl-Coenzym A:Cholesterin Acyltransferase (ACAT); Apolipoprotein (Apo); Liver X Rezeptor (LXR); Mikrosomales Triglyceridtransfer-Protein (MTP); Niemann-Pick C1-Like 1 Protein (NPC1L1); Triglyceride (TG)

In den Epithelzellen werden die Sterylester in Chylomikronen eingebaut und anschließend über die Lymphe zur Leber transportiert. In der Lymphe von Ratten war die Wiederfindung von Phytosterolen am höchsten für Campesterol und am geringsten für Sitostanol und Stigmasterol (68). Phytosterole werden in der Leber jedoch nicht wie das Cholesterin zu Gallensäuren metabolisiert (69). Von der Leber aus gelangen Sterole mit VLDL-Partikeln zum größten Teil in veresterter Form ins System (70) oder werden über die Galle sezerniert. Die Sekretion in die Galle erfolgt ebenfalls über ABC-Transportproteine, wobei die relative β -Sitosterol-Sekretion größer ist als die des Campesterols und diese wiederum größer als die des Cholesterols (71).

Insgesamt unterscheidet sich daher die Verteilung der Phytosterole im Plasma vom Profil, welches mit der Nahrung typischerweise aufgenommen wird. Die Serum-Spiegel von β -Sitosterol und Campesterol betragen ca. 0,3 bzw. 0,4 mg/dL (67, 71, 72). Interessanter Weise steigen die Phytosterol-Plasmalevel nach Phytosterolverzehr, sinken aber nach Phytostanolaufnahme (73, 74).

2.1.3. Cholesterinsenkender Effekt

Die cholesterinsenkende Wirkung der Phytosterole ist seit den 50er Jahren bekannt und begründet den Einsatz von Phytosterolen/-stanolen und deren Estern in der Therapie von Hypercholesterinämie (75-77). Durch einen erniedrigten Serum-Cholesterinspiegel kann das Risiko für koronare Herzerkrankungen auf effiziente Weise gesenkt werden (78-80).

Die Ester werden vor ihrer Resorption durch die pankreatische Cholesterolesterase hydrolysiert und rufen dieselbe Wirkung hervor wie die freien Sterole (8, 81). Studien mit Ileostoma-Patienten zeigten eine fast vollständige Hydrolyse pflanzlicher 4-Desmethylsteryl-/stanylester während der Dünndarmpassage (82). *In vitro* Studien weisen darauf hin, dass 4,4'-Dimethylsterylester von Enzymen des Pankreas nicht hydrolysiert werden können (83) und dass die Hydrolyseraten der Ester von der Struktur sowohl des veresterten Sterols als auch des Fettsäurerestes abhängig sind (84).

Die Wirkung der Phytosterole basiert auf ihrer Fähigkeit die Cholesterol-Absorption sowohl von exogen zugeführtem (ca. 300 mg/Tag) als auch von biliärem Cholesterol (ca. 800-1400 mg/Tag) zu reduzieren (85), was in einem Anstieg der fäkalen Cholesterol-, nicht aber der Gallensäurenexkretion resultiert (80, 86). Ferner wird vermutet, dass nur 4-Desmethylsterole/-stanole aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Cholesterol einen hypocholesterämischen Effekt zeigen (87-90).

Die genauen molekularen Mechanismen sind heute noch unklar (91). Der ursprünglich beschriebene Mechanismus einer Cokristallisation von Phytosterolen mit Cholesterol (75, 77) hat *in vivo* wahrscheinlich keinen Einfluss auf den cholesterinsenkenden Effekt (92). Größeren Einfluss hat dagegen die Konkurrenz von Cholesterol und Phytosterolen um den Einbau in gemischte Mizellen. Diese können nur begrenzt Sterole einlagern. Da Phytosterole hydrophober sind als Cholesterol, kommt es zu kompetitiven Verdrängungsreaktionen von Cholesterol aus den Mizellen (84, 93, 94). Phytosterole müssen jedoch nicht gleichzeitig mit Cholesterol im Darmlumen präsent sein, um cholesterinsenkend zu wirken. In Tierstudien wurde gezeigt, dass geringe Konzentrationen subkutan injizierter Phytosterole die Cholesterolabsorption hemmen (95, 96). Das deutete darauf hin, dass weitere Mechanismen an der hypocholesterämischen Wirkung beteiligt sein müssen, wie zum Beispiel der Einfluss auf Schlüsselenzyme des Cholesterinstoffwechsels in der Leber oder die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT)-Aktivität im Serum (40, 97). Die Expression der Transportproteine ABCG5/G8, ABCA1 und des Cholesterylestertransfer-Proteins sowie der Cytochrom P450

abhängigen 7α -Hydroxylase werden über Liver X Rezeptoren (LXRs) reguliert, welche durch Cholesterol, Oxysterole und manche Pflanzensterole aktiviert werden (98, 99). Pflanzliche 4-Desmethylsterole, nicht aber 4,4-Dimethylsterole, aktivieren LXR (98). Field *et al.* (100) beschreiben eine verminderte ABCG5/G8-Expression nach Stanylester-Zufuhr in Hamstern, jedoch führte eine cholesterolreiche Diät zum Anstieg der mRNA-Level von ABCA1 und G1 in allen Dünndarm-Abschnitten, von ABCG5 in Jejunum und Ileum und von ABCG8 im Duodenum. Die Regulation der ABC-Transportproteine ist wichtig für die Sterolhomöostase; der cholesterinsenkende Effekt scheint nach aktuellem Stand jedoch unabhängig davon zu sein (91).

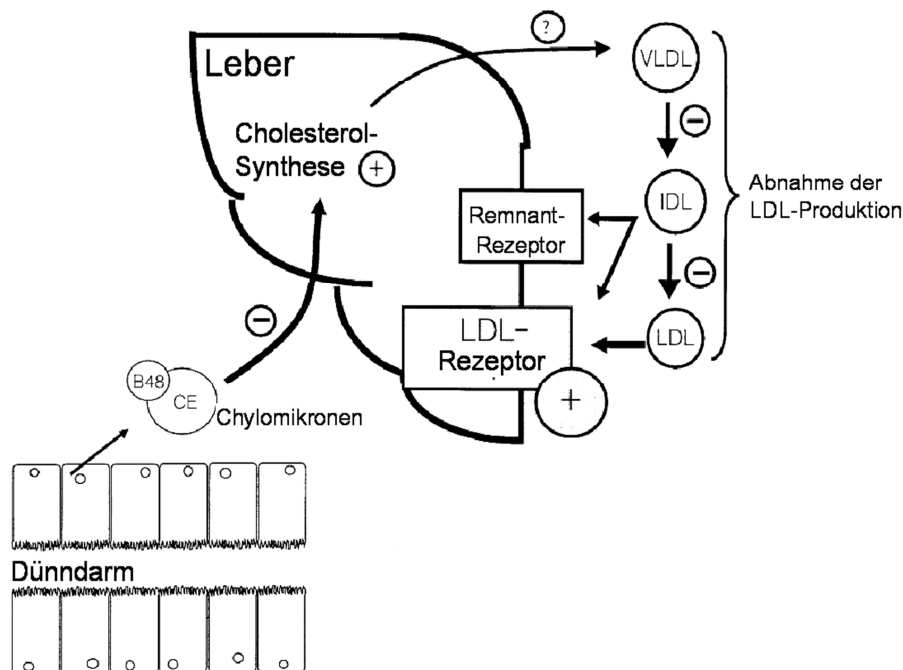


Abbildung 4: Hepatischer Cholesterinstoffwechsel nach Phytosterolverzehr nach (6); Cholesterylester (CE), Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Intermediate Density Lipoprotein (IDL), Low Density Lipoprotein (LDL)

Insgesamt führt eine diätetische Ergänzung mit pflanzlichen Sterolen und Stanolen, neben der reduzierten Cholesterolabsorption, zu einer verminderten Apo-Lipoprotein B- und damit VLDL-Produktion, zuzüglich einer verringerten Cholesterolkonzentration in den freigesetzten VLDL-Partikeln; daraus folgen geringere IDL- und LDL-Konzentrationen mit anschließender Steigerung der LDL-Rezeptor-Expression (6, 91, 97). Die Inhibierung der

Cholesterin-Absorption führt zu einem Zustand relativen Mangels, der gefolgt ist von einer erhöhten Cholesterin-Biosynthese und LDL-Rezeptor Aktivität (Abbildung 4). Dennoch ist das Netto-Ergebnis nach der Aufnahme von Phytosterolen eine verminderte Cholesterin-Konzentration im Plasma (6).

Bereits ein höherer Verzehr an Phytosterolen mit der normalen Ernährung steigert die Cholesterinsekretion und kann den Cholesterinspiegel beeinflussen (86, 101, 102). Katan *et al.* (4) und Demonty *et al.* (3) bestätigten mit ihren Metastudien, dass die tägliche Phytosterol-Dosis von ca. 2 g eine Reduktion des LDL- und Gesamtcholesterins um 9-10 % bewirkt, wobei der HDL-Cholesterin- sowie der Triglyceridspiegel nicht beeinflusst werden. Höhere Dosen führen nicht zu einer besseren Wirkung (Plateaueffekt, Abbildung 5), resultieren aber möglicherweise in ungünstigen Effekten (2, 3, 10).

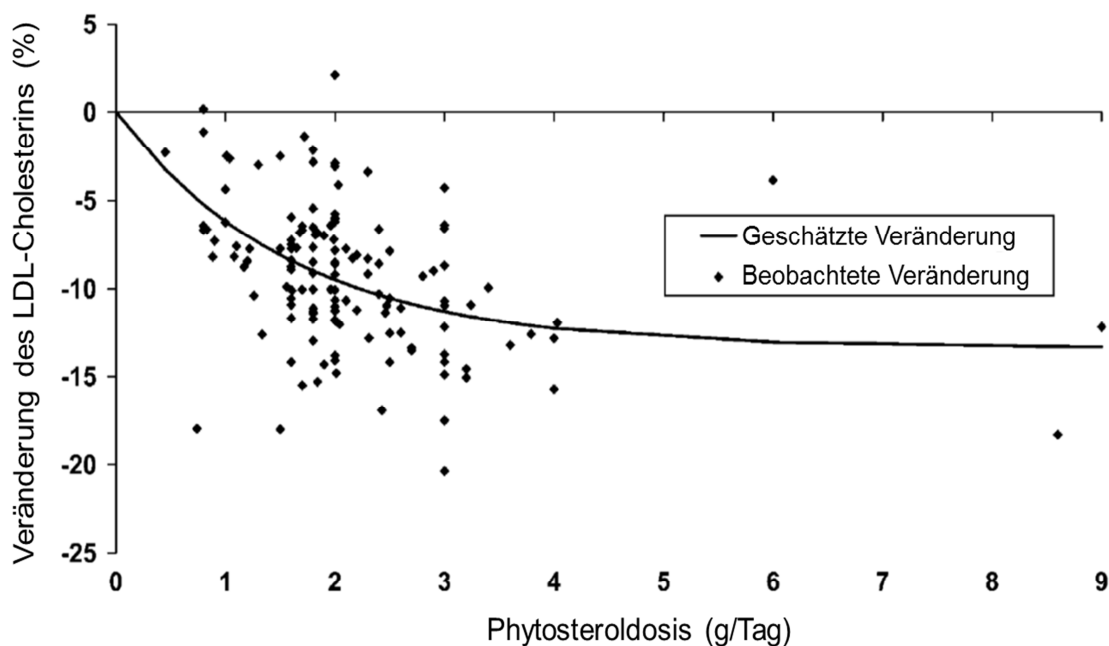


Abbildung 5: Dosis-Wirkungsbeziehung des LDL-Cholesterinspiegel-senkenden Effektes von Phytosterolen (3)

Eine Zufuhr von 2 g/Tag wird erst mit Hilfe von angereicherten Lebensmitteln erreicht. Die cholesterinsenkende Wirkung wird in Abhängigkeit der Lebensmittel-Matrix kontrovers diskutiert. Insgesamt zeigten jedoch alle Studien mit Phytosteryl- und Stanylestern angereicherten Lebensmitteln einen Gesamt- sowie LDL-cholesterinsenkenden Effekt, unabhängig vom Fettgehalt der angereicherten Lebensmittel und davon ob z.B. 2 g/Tag in

einer Portion verzehrt werden oder verteilt auf den ganzen Tag (103). Ein Einfluss der Aufnahmefrequenz für die optimale Ausnutzung des cholesterinsenkenden Effektes kann allerdings nicht ausgeschlossen werden (3, 104).

Bisher wurden keine bedenklichen Nebenwirkungen beschrieben (105), allerdings führte der Verzehr von 2-3 g Phytosterolen/Tag zu einer verringerten Absorption und Plasmakonzentration von β -Carotin um ca. 10-33 % (8, 18), wohingegen die Plasmakonzentrationen anderer fettlöslicher Vitamine nicht signifikant beeinflusst wurden (2, 18, 106).

Für eine weitere Reduktion des Plasmacholesterolspiegels wurde zum Beispiel eine Kombination mit Omega-3-Fettsäuren (107) oder mit Arzneimitteln wie den Statinen, welche die HMGCoA-Reduktase und damit die endogene Cholesterolsynthese hemmen, oder mit Ezetimibe zur Hemmung des NPC1L1-Transportproteins empfohlen (59, 108, 109).

Des Weiteren wurde über antiinflammatorische, fiebersenkende und antidiabetische Eigenschaften, sowie über die Hemmung der Proliferation von Krebszellen berichtet (2, 110-112).

2.2. Phytosteryl-/stanyl-fettsäureester

2.2.1. Einsatz in funktionellen Lebensmitteln

2.2.1.1. Hintergrund

Der cholesterinsenkende Effekt von Phytosterolen wurde in den 1950er Jahren zum ersten Mal beschrieben (75-77). Sitosterol galt als nicht absorbierbar. Es wurde angenommen, dass ein Molekül Sitosterol mit einem Molekül Cholesterol einen unlöslichen Komplex bildet, welcher daraufhin ausgeschieden wird. Zur Therapie von Hypercholesterinämie wurden zunächst verhältnismäßig hohe Dosierungen (bis zu 10 g/Tag) freier Phytosterole eingesetzt (97). Die pharmakologische Wirkung der Phytosterole ist für einen Einsatz in Arzneimitteln eher gering. Zudem besitzen freie Sterole nur eine geringe Löslichkeit in Wasser (<0,01 g/100g) und auch in Fetten (2,5 % bei Raumtemperatur) (113). Daher ist es schwierig, diese zum Beispiel in pharmazeutische Formulierungen (2) oder in Lebensmittelmatrizes einzubringen. Der Versuch, freie Phytosterole in Margarinematrix zu lösen, resultierte in einem Sterolgehalt von kleiner 3 %. Bei einem Verzehr von 25 g Margarine/Tag würde dies lediglich einer zusätzlichen Sterolzufuhr von 0,8 g entsprechen

(88). Erst eine Veresterung mit Fettsäuren erlaubte die technologische Einarbeitung höherer Mengen in fettreiche Lebensmittel wie Margarine. Als erstes angereichertes Lebensmittel wurde im Jahr 1995 eine Margarine mit Phytostanylesterzusatz von Benecol® in Finnland auf dem Markt eingeführt. Seit dem Inkrafttreten der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten (7) sind mit Phytosterolen und Phytosterylestern angereicherte Lebensmittel zur Vermarktung in der Europäischen Gemeinschaft genehmigungspflichtig. Die erste Zulassung erfolgte im Jahr 2000 auf Antrag der Firma Unilever nach einer ausführlichen Sicherheitsprüfung für „gelbe Streichfette mit Phytosterinzusatz“ (8, 9). Diese war mit einer Spezifikation für die Zusammensetzung des eingesetzten Sterol- bzw. Sterylesterpräparates, bestimmten Kennzeichnungspflichten sowie der Auflage eines Überwachungsprogrammes verbunden. Die Anträge zur Genehmigung, die Patente sowie die Produkte (Abbildung 6) nahmen in ihrer Anzahl in den letzten Jahren deutlich zu (10, 114, 115).

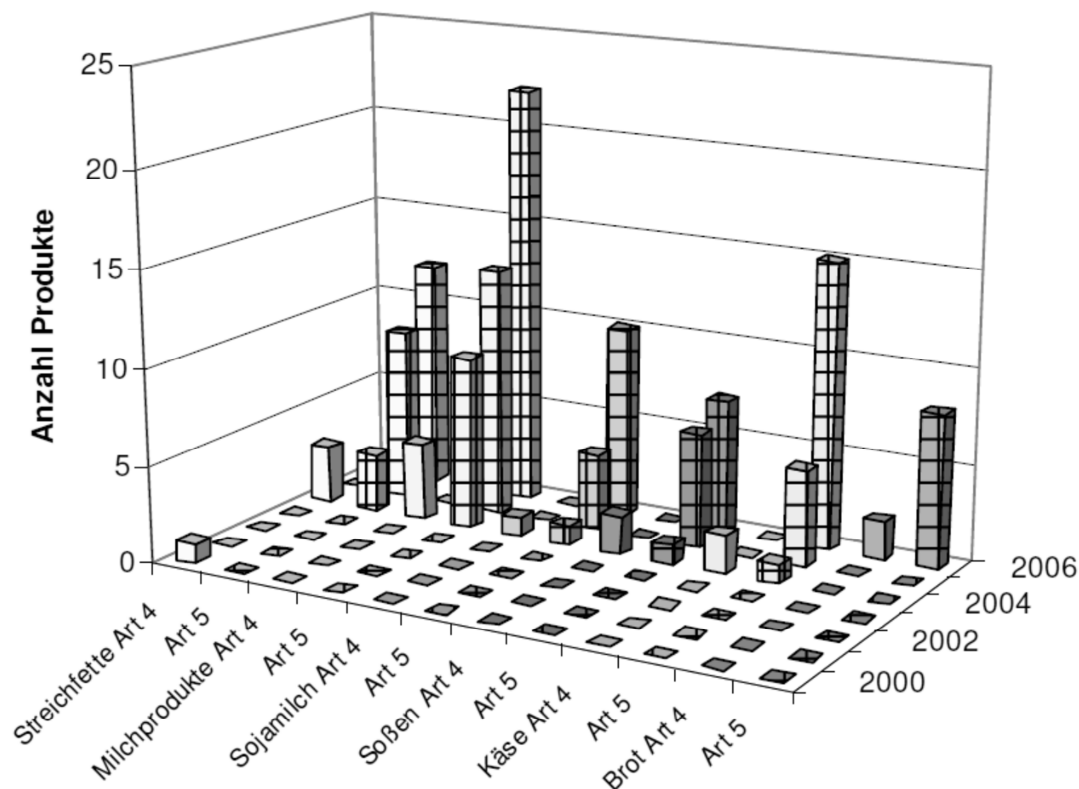


Abbildung 6: Für die Vermarktung in der EU genehmigte Lebensmittel, die bis zum 31.12.2006 nach Artikel 4 der VO 258/97/EG zugelassen bzw. nach Artikel 5 der EU-Kommission angezeigt wurden (115)

Zahlreiche Studien belegen die Wirksamkeit dieser Produkte (3-5). Aufgrund des Plateaueffektes bei einer Zufuhr von mehr als 3 g/Tag (Abbildung 5), der verringerten Absorption von β -Carotin und der Gefahr unerwünschter Nebeneffekte wird eine maximale Verzehrsmenge von 3 g Phytosterolen/-stanolen pro Tag empfohlen (8, 10, 19). Dies entspricht dem von JECFA abgeleiteten „Acceptable Daily Intake“ (ADI) von 0-40 mg für Phytosterole/-stanole pro kg Körpergewicht (116).

2.2.1.2. Industrielle Gewinnung

Die Gewinnung pflanzlicher Sterole erfolgt zum einen im Zuge der Raffination von Pflanzenölen, zum anderen werden sie aus Tallöl, einem Nebenprodukt bei der Papierherstellung aus Holz, isoliert (117).

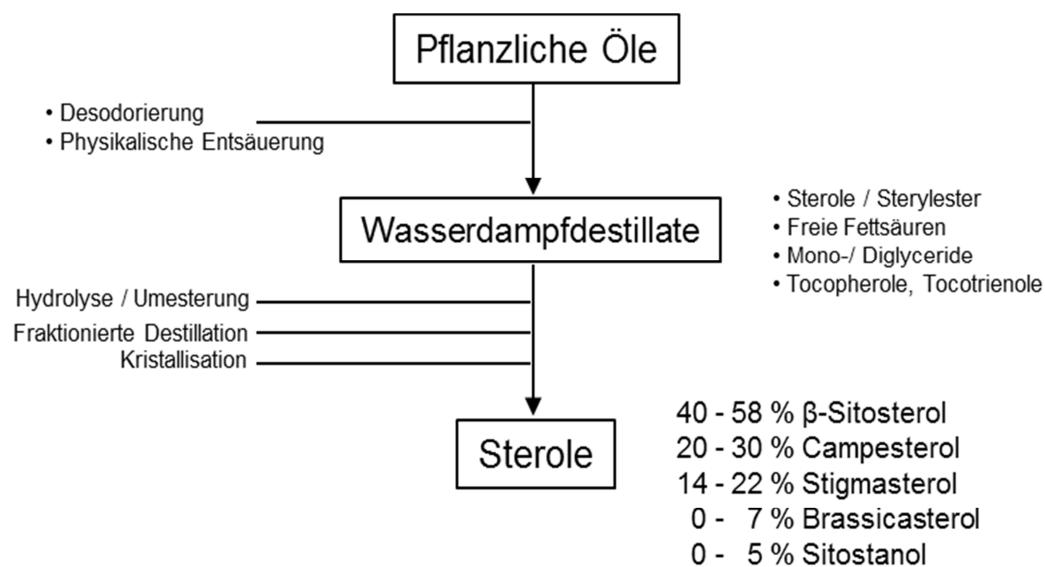


Abbildung 7: Gewinnung von Phytosterolen aus Pflanzenölen; Sterolprofil nach (13)

Bei der Raffination von Pflanzenölen werden die Phytosterole während des Desodorierungsschrittes bzw. der physikalischen Entsäuerung zur Abtrennung flüchtiger Komponenten mitdestilliert (Abbildung 7). Das Destillat enthält unter anderem freie Fettsäuren, Mono-, Di- und Triglyceride, 5-15 % Tocopherole und 8-20 % Phytosterole, zum Teil in veresterter Form. In einem Umesterungsschritt werden die Ester in freie Sterole und Fettsäuremethylester überführt. In einem weiteren Destillationsschritt werden die Phytosterole und Tocopherole isoliert. Die Phytosterole werden anschließend durch

Kristallisationsverfahren gewonnen (113, 117). Phytosterolmischungen aus Pflanzenölen enthalten in der Regel 40-58 % β -Sitosterol, 20-30 % Campesterol, 14-22 % Stigmasterol, 0-7 % Brassicasterol und 0-5 % Sitostanol (13).

Für die Gewinnung pflanzlicher Sterole aus der Holzverarbeitung (Abbildung 8) werden Holzchips unter stark alkalischen Bedingungen (pH 14) für 18 Stunden bei 50 °C aufgeschlossen. Die gewonnene „Tallseife“ enthält mindestens 2 % Phytosterole. Die Seife kann direkt mit organischen Lösemittel extrahiert oder angesäuert werden, wodurch eine ölige Phase, das rohe Tallöl entsteht. Durch Destillation werden Harzsäuren und Fettsäuren abgeschieden, die Phytosterole werden hierbei im Rückstand, dem sogenannten „Tall oil pitch“ aufkonzentriert (5-15 %). Nach alkalischer Hydrolyse wird der Rückstand destillativ fraktioniert. Die Aufreinigung der gewonnenen Phytosterolfraktion erfolgt durch Umkristallisation (113, 117). Phytosterolmischungen aus Tallöl enthalten in der Regel 75-80 % β -Sitosterol, 6-9 % Campesterol, 10-14 % Sitostanol und 0-2 % Campestanol (13).

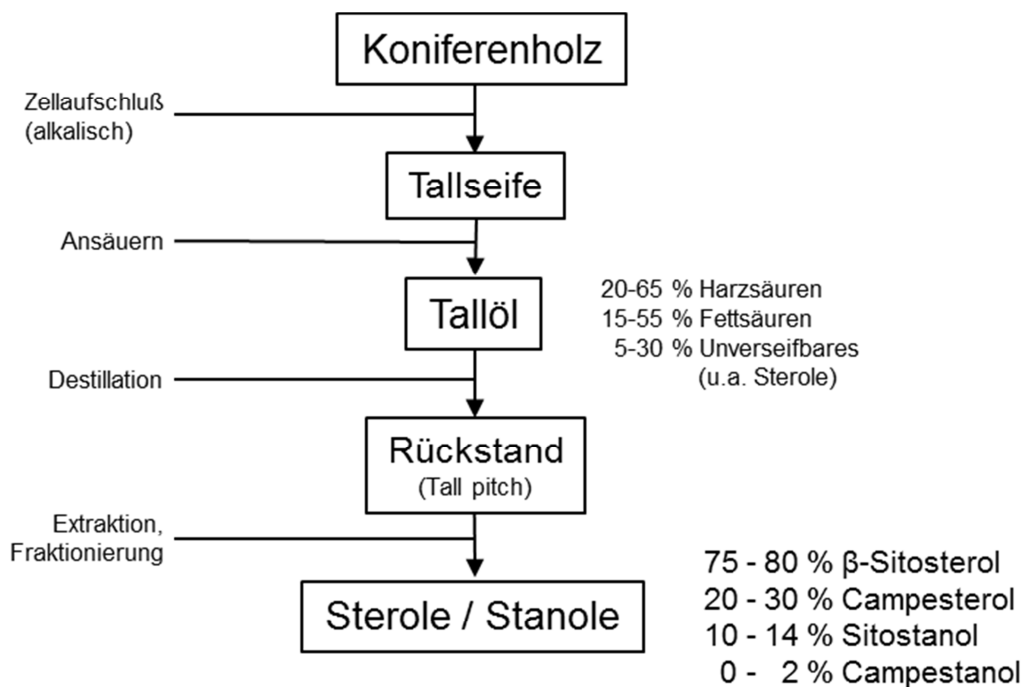


Abbildung 8: Gewinnung von Phytosterolen aus Tallöl, Sterolprofil nach (13)

Die Stanole werden durch Hydrierung der Sterole gewonnen. Diese erfolgt meist mit Hilfe von Edelmetall-Katalysatoren wie Platin oder Palladium (113). Dabei werden bei der Hydrierung z.B. über Pd-Katalysatoren in organischen Lösemitteln Stanol-Ausbeuten von über 99 % erzielt (118, 119). Der Katalysator kann anschließend durch eine

Membranfiltration abgetrennt werden (119). Aus Pflanzenöl gewonnene Stanolmischungen enthalten meist 68-75 % Sitostanol und 25-32 % Campestanol, jene aus Tallöl circa 90 % Sitostanol und circa 10 % Campestanol.

Die Veresterung der Phytosterole/-stanole kann entweder direkt mit Fettsäuren oder durch Umesterung mit Fettsäuremethylestern bzw. pflanzlichen Ölen, wie zum Beispiel Sonnenblumenöl oder Rapsöl erfolgen (Abbildung 9). Die freien Fettsäuren werden durch alkalische Verseifung von Pflanzenölen mit anschließender Destillation gewonnen, Fettsäuremethylester durch Methanolyse (113).

Die Veresterungsreaktion kann chemisch oder enzymatisch katalysiert werden. Die enzymkatalysierte Veresterung bietet durch milde und umweltschonende Reaktionsbedingungen sowie einer hohen Spezifität Vorteile, ist aber durch lange Inkubationszeiten, unvollständige Umsatzraten und hohe Kosten für die Enzympräparate limitiert (117, 120-124).

Die chemisch katalysierte Veresterung mit freien Fettsäuren erfolgt bei hohen Temperaturen (>180 °C) entweder ohne weitere (125) oder unter Einsatz bei der Nahrungsmittelherstellung zugelassener Katalysatoren (113, 119). Die Bedingungen für die Umesterungsreaktionen sind vergleichbar mit jenen, welche für die chemische Umesterung von Fettmischungen gewöhnlich eingesetzt werden (113, 119). Anschließend wird der Überschuss an eingesetzten Fettsäuren bzw. Fettsäuremethylestern destillativ entfernt (113).

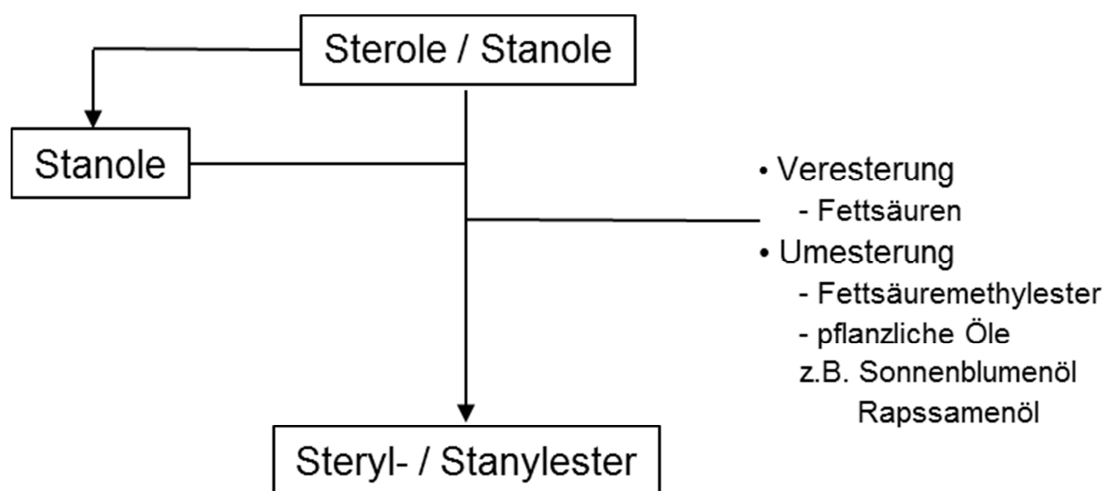


Abbildung 9: Industrielle Herstellung pflanzlicher Steryl-/Stanylester

2.2.1.3. Rechtliche Grundlagen, Spezifikationen und Kennzeichnung

Pflanzliche Sterole, Stanole sowie deren Ester wurden bereits durch viele Instanzen evaluiert. In den USA besitzen angereicherte Produkte den sogenannten „GRAS“ (Generally Recognized As Safe) Status (126-129). In der Europäischen Union fallen diese Produkte unter die Novel-Food Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten (7). Phytosterylester wurden in der Europäischen Union bis dato bereits verzehrt, allerdings nicht in den Mengen, wie sie durch Anreicherung von Lebensmitteln erzielt werden. Daher sind diese neuartigen Produkte und Produktzutaten nach Artikel 1, Absatz 2e vor dem Inverkehrbringen genehmigungspflichtig. Die Verordnung hält dafür zwei mögliche Verfahren bereit, das Genehmigungsverfahren nach Artikel 4 sowie ein vereinfachtes Anzeigeverfahren nach Artikel 5.

Die wissenschaftliche Sicherheitsbewertung vor einer Marktzulassung erfolgt fallbezogen durch die verantwortlichen Behörden für Lebensmittelsicherheit aller EU-Länder. In strittigen Fällen wird abschließend die wissenschaftliche Bewertung der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit, der EFSA, eingeholt. Die Genehmigungsentscheidung trifft anschließend die Europäische Kommission und veröffentlicht sie als Rechtsakt im Amtsblatt der europäischen Gemeinschaft. Jede Entscheidung kann mit verbindlichen Auflagen, zum Beispiel die Kennzeichnung betreffend, verknüpft sein. Das neuartige Lebensmittel darf ausschließlich durch den Antragsteller in Verkehr gebracht werden. Die Zulassung ist nicht auf andere Hersteller übertragbar, allerdings kann durch den Nachweis der wesentlichen Gleichwertigkeit zu einem schon zugelassenen Lebensmittel bzw. einer -zutat die Zulassung über das Anzeigeverfahren nach Artikel 5 erlangt werden.

Mit Benecol®-Phytostanylestern angereicherte Lebensmittel waren bereits vor Inkrafttreten der Novel-Food Verordnung in Finnland auf dem Markt und entfielen daher dieser Regulierung. Für die Vermarktung in Deutschland erteilt das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft daher Ausnahmegenehmigungen bzw. Allgemeinverfügungen nach den nationalen deutschen Rechtsvorschriften (130).

Als erstes neuartiges Lebensmittel mit Pflanzensterinzusatz hat die EU-Kommission am 24.07.2000 die Margarine "Becel® pro-activ" der Firma Unilever zur Vermarktung zugelassen (9). Die Margarine aus pflanzlichen Fetten darf bis zu 8 Gew-% Phytosterinzusatz (entsprechend 14 Gew-% Ester) enthalten, was der 16 bis 24-fachen Phytosterol-

konzentration im Vergleich zu herkömmlichen Produkten entspricht. Folgendes Profil für die aus Pflanzenöl gewonnen Phytosterole wurde festgelegt: 10-40 % Campesterol, 6-30 % Stigmasterol, 30-65 % β -Sitosterol und 0-5 % Sonstige; als Quelle für die zur Veresterung eingesetzten Fettsäuren dient Sonnenblumenöl (8). Das Profil der bei der Raffination pflanzlicher Öle gewonnenen Phytosterole unterscheidet sich von dem der aus Tallöl isolierten Sterole vor allem durch den Stanolanteil (Abbildung 7 und 8). Im Jahr 2003 wurde daher vom Scientific Committee on Food die Spezifikation des als sicher bewerteten Phytosterol-/stanolprofiles aktualisiert (Tabelle 2). Eine Übersicht der bis Januar 2008 genehmigten Anträge für den Einsatz pflanzlicher Sterole und Stanole in funktionellen Lebensmitteln ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2: Sterolspezifikation für in Lebensmitteln eingesetzte Phytosterol/-stanol- bzw. Ester-Präparate (9, 131)

	2000/500/EG [%]	SCF 2003 [%]
Brassicasterol		≤ 3
Campesterol	10 – 40	≤ 40
Campestanol		≤ 5
Stigmasterol	6 – 30	≤ 30
β -Sitosterol	30 – 65	≤ 80
Sitostanol		≤ 15
Sonstige	0 - 5	≤ 3

In einer Stellungnahme bestätigte der wissenschaftliche Ausschuss „Lebensmittel“, dass Phytosterine, Phytosterinester, Phytostanole und Phytostanolester als neuartige Lebensmittel oder neuartige Lebensmittelzutaten gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlamentes und des Rates zu kennzeichnen sind (132). Des Weiteren gebe es keinen Nachweis, dass die Aufnahme von mehr als 3 g/Tag einen weiteren Nutzen bringt, allerdings könnte der Verzehr größerer Mengen unerwünschte Wirkungen haben. Die Kennzeichnung soll den Verbrauchern ermöglichen, ihren Verzehr an Phytosterolen/-stanolen durch die Verwendung von entweder einer Portion mit höchstens 3 g oder drei Portionen mit höchstens 1 g des Stoffes zu beschränken. Die Etikettierung von Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten mit Phytosterinester-, Phytostanol- und/oder Phytostanolesterzusatz wurde in der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 vom 31. März 2004 reguliert (132). Unter anderem muss neben dem Hinweis „mit Pflanzensterin-/Pflanzenstanolzusatz“ die Menge an

zugewetzten Pflanzensterolen/-stanolen oder Estern (Angabe in % oder g der freien Pflanzensterole/Pflanzenstanole je 100 g oder 100 mL des Lebensmittels) im Zutatenverzeichnis aufgeführt sein. Daneben ist die Definition einer Portion anzugeben und die Menge an Pflanzensterinen/Pflanzenstanolen, die in einer Portion enthalten ist.

Tabelle 3: Vielfalt von mit Phytosterolen/-stanolen angereicherten Lebensmittelkategorien, welche in der EU vermarktet werden dürfen, Stand Januar 2008 (10, 115, 133, 134)

Zulassung / Notifizierung	Antragsteller	Zutat	Kategorie ¹												
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K		
Vor (EC) 258/97	Raisio Plc.	Benecol®	Bedarf keiner Zulassung												
2000/500/EC 2004/335/EC	Unilever	Pro active™	X	X	X										
Notifizierung	Cognis	Vegapure®	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
2004/333/EC	Archer Daniels Midland Co (ADM)	CardioAid™	X	X	X		X	X	X						
Notifizierung	Cargill Inc.	Corowise™	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Notifizierung	Danone	Danacol®			X										
Notifizierung	Triple Crown	Prolocol™		X	X				X						
2004/334/EC 2006/58/EC	Pharmaconsult Oy Ltd	Multibene®	X	X	X							X	X		
2006/59/EC	Oy Karl Fazer Ab	-											X		
2004/336/EC Notifizierung	Teriaka Ltd	Diminicol™	X	X	X	X	X	X	X						X
2004/845/EC Notifizierung	Forbes Media-Tech Inc.	Reducol™	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Notifizierung	Arboris	AS-2™	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		
Notifizierung	PrimaPharm B.V.	Beta sitosterol	X	X	X		X	X							
Notifizierung	Fenchem Enterprises Ltd.	Cholevel™	X	X	X				X	X	X	X	X		
Notifizierung	DRT	Phytopin®	X		X	X		X							
Notifizierung	DDO Processing LLC	Nutraphyl™		X	X		X		X		X	X			
Notifizierung	Degussa Food Ingredients GmbH	Cholestatin™	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Notifizierung	Vitae-Caps S.A.	Vitasterol®	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		
Notifizierung	Inpharma S.A.	-		X	X				X						
Notifizierung	Forbes Media-Tech Inc.	Phyto-S- Sterol™	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Notifizierung	Lipofoods	Lipophytol™	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
2007/343/EC	Enzymotech Ltd	CardiaBeat™	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X

¹ Gelbe Streichfette (A), Milchartige Produkte (B), Joghurtartige Produkte (C), Fruchtgetränke (Milchbasis) (D), Sojagetränke (E), Käseartige Produkte (F), Salatdressings (G), Gewürzsoßen (H), Roggenbrot (I), Reisgetränke (J), Öl (K)

Das EFSA-Gremium für diätetische Produkte, Ernährung und Allergien entschied mittlerweile für die ersten Anfragen, dass mit Phytosteryl-/stanylestern angereicherte Produkte mit gesundheitsbezogenen Angaben, sogenannten Health-Claims, welche sich auf die Verringerung eines Krankheitsrisikos beziehen (135), versehen werden dürfen (136-138).

Auf diesen Produkten darf daher z.B. folgender Hinweis deklariert werden: „Pflanzenstanolester senken/verringern den Cholesterinspiegel im Blut. Die Senkung des Blutcholesterinspiegels kann das Risiko einer koronaren Herzerkrankung verringern“ (139).

2.2.1.4. Angereicherte Produkte und Marktsituation

Die Anreicherung von Lebensmitteln mit pflanzlichen Sterolen/Stanolon ist in Form freier Sterole oder auch mit ihren Derivaten möglich. Die ersten angereicherten Lebensmittel waren fettreiche Produkte, wie Margarine, Aufstriche, Mayonnaisen und Salatdressings (114). Das Einbringen größerer Mengen freier Sterole stellte durch die hydro- und lipophoben Eigenschaften eine Herausforderung dar. Durch die Veresterung mit Fettsäuren konnte die lipophobe Hydroxylgruppe maskiert und die Fettlöslichkeit erhöht werden (42, 117). Diese Innovation erlaubte das Einbringen von bis zu 9 Gew-% Phytosterole/-stanole (entsprechend 15 % Estern) in Margarine. Die erste mit Phytostanylestern angereicherte Benecol® Margarine kam 1995 in Finnland auf den Markt. Das Einbringen der Ester in fettarme Lebensmittel, wie etwa Magermilchprodukte, erfordert den Einsatz von Emulgatoren wie z.B. Monoglyceride, Lecithine oder Polysorbate. Diese können jedoch die Stabilität der Formulierung negativ beeinflussen (140). Eine weitere Möglichkeit besteht zum Beispiel in der Kombination von Sterylestern mit modifizierter Stärke (141) oder Proteinen wie z.B. Caseinaten (140). Des Weiteren können freie Sterole/Stanolon als sehr feines Pulver (<1 µm) in emulgierter Form in fettarme bzw. wässrige Lebensmittel eingebracht werden (142).

Der Europäische Markt für Phytosterylester wurde für das Jahr 2007 auf 9500 t geschätzt, was einem Wert von etwa 160 Millionen € entspräche; davon wurden ca. 80 % für den Einsatz in Lebensmittel verwendet. Die am häufigsten vermarkteten Lebensmittel sind gelbe Streichfette, joghurtartige Produkte und Trinkjoghurts (10). Angereicherte Streichfette haben dabei den größten Anteil; der Marktwert dieser Produktkategorie wurde für das Jahr 2007 auf 700 Millionen € kalkuliert. Es wird angenommen, dass sich die Verkaufszahlen bis 2012 mehr als verdoppeln (10). In Deutschland finden Phytosterylester seit dem Jahr 2000 ihren Einsatz in Produkten wie Margarine, Trinkjoghurts, Magermilch, Käse oder Brot (115).

10 Genehmigungsentscheidungen wurden bisher getroffen. Für die Anträge zur Vermarktung angereicherter Wurstwaren oder Fruchtsaftgetränke stehen die Entscheidungen noch aus (Stand Januar 2011). Bis zum 08.07.2010 wurden 115 Anzeigen für im Wesentlichen gleichwertige Produkte nach Artikel 5 der Verordnung (EG) Nr. 258/97

notifiziert (134). Zudem werden Benecol®-Stanylester auch in Produkten wie Pasta, Frühstückscerealien, Fleischprodukten, Fruchtsäften oder Karamell-Kaubonbons eingesetzt. Der Einsatz in weiteren Lebensmittelkategorien ist denkbar. Eine Übersicht über durchschnittliche Packungsgrößen und Phytosterolkonzentrationen in kommerziellen, angereicherten Lebensmitteln ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Beispiele für die Phytosterol/-stanol-Konzentrationen angereicherter Produkte mit den empfohlenen Zufuhrmengen (10)

Kategorie	Durchschnittliche Packungsgröße	Empfohlene Verzehrsmenge	Phytosterol/-stanol-Konzentration	Tägliche Zufuhrmenge
Gelbe Streichfette	250 g	3 x 8-10 g/Tag	7,5-8 g/100g	2-2,3 g
Milchartige Produkte	1000 mL	2-3 x 250 mL/Tag	0,3 g/100mL	1,5-2,4 g
Joghurtartige Produkte	65-125 mL	1-2 x 65-125 mL/Tag	0,6-3,1 g/100mL	1,5 - 2 g
Käseartige Produkte	125 g	3 x 30 g/Tag	2,2 g/100g	2,1 g
Roggenbrot	750 g	3 x 80 g/Tag	0,8 g/100g	2 g

Die Konzentrationen pflanzlicher Sterole variieren in angereicherten Produkten von 0,3 % in Milch bis 8 % in Margarinen. Das breite Spektrum an angereicherten Produkten birgt für den Verbraucher die Gefahr einer übermäßigen Phytosterolaufnahme von mehr als 3 g/Tag (Abbildung 10) und damit unerwünschten Nebeneffekten. Das Bundesinstitut für Risikobewertung sprach sich aufgrund des breiten Spektrums an bereits vermarkteten angereicherten Lebensmitteln für eine Begrenzung der Anzahl an Produkten und gegen die Zulassung weiterer angereicherter Lebensmittelkategorien mit dem Zusatz von Pflanzensterinen aus (115). Mit den Kennzeichnungsvorschriften (132) sollte der bestimmungsgemäße Gebrauch sichergestellt werden. Für die Lebensmittelüberwachung bedarf es daher analytischer Methoden zur Überprüfung der Richtigkeit deklarerter Gehalte.

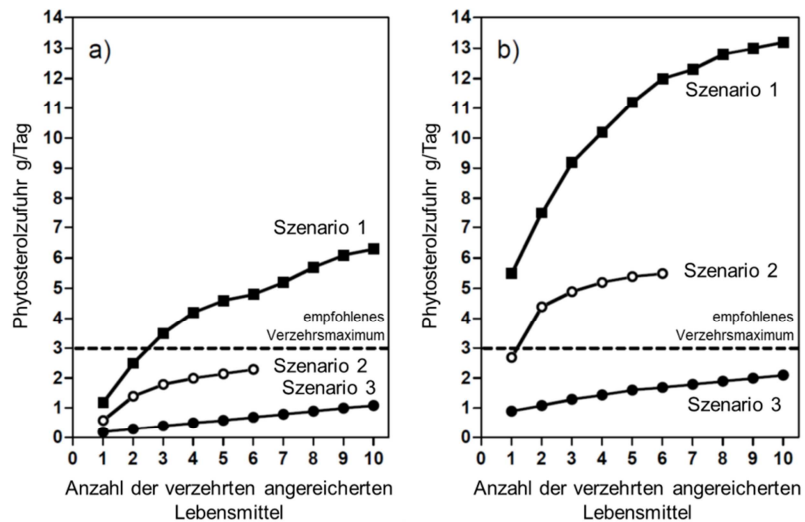


Abbildung 10: Modelle für die tägliche Phytosterolzufuhr in der deutschen Bevölkerung mit den drei Szenarien 2 g (1), 1-2 g (2) und 0,3 g (3) Phytosterole pro angenommener Portion im Jahr 2012; durchschnittliche (a) oder starke Verzehrer (95-te Perzentile) (b) (10)

2.2.2. Analytik

Analytische Ansätze zur Bestimmung von Phytosterolen/-stanolen und deren Estern basieren meist auf der Isolierung der Sterol- und/oder der Esterfraktion, der Hydrolyse der Esterfraktion und anschließender Kapillargas- oder Flüssigchromatographie (20, 22, 26). Offizielle Analysenmethoden dienen vor allem der Authentizitätsprüfung von Fetten und Ölen, in welchen Phytosterole und Phytosterylester als Minorkomponenten vorliegen (143-146). Die Isolierung/Fraktionierung erfolgt dabei meist dünnschichtchromatographisch oder mittels Festphasenextraktion. Die Fraktion der Sterylester wird gewöhnlich vor der kapillargaschromatographischen Analytik alkalisch hydrolysiert. Dadurch gehen die Informationen bezüglich der veresterten Fettsäuren verloren.

Aktuell erschienene wissenschaftliche Arbeiten zur Analytik von Phytosterolen/-stanolen und deren Estern in angereicherten Lebensmitteln sind in der Probenvorbereitung an die offiziellen Methoden angelehnt (21, 23-25). Für die Authentizitätsprüfung wären jedoch chromatographische Methoden erstrebenswert, welche in einem Analysenlauf sowohl die Bestimmung der freien Sterole/Stanoole als auch der intakten Ester erlauben.

Zur Trennung intakter Phytosterylester wurden kapillargas- und flüssigchromatographische Ansätze sowie deren Kopplung (on-line LC-GC) beschrieben. Die HPLC-Bestimmung erforderte eine massenspektrometrische Detektion zur Identifizierung

unvollständig getrennter Ester und co-eluierender neutraler Lipide.

Die GC war im Vergleich zur HPLC für die Sterylester-Analytik sensitiver (27). Die Untersuchung von Phytosteryl- und stanylestern in komplexen Mischungen mittels GC stellt allerdings eine Herausforderung dar. Zum Beispiel wurden die Sterylester auf unpolaren stationären Phasen (DB-1 oder DB-5) nach Kettenlänge, nicht aber nach dem Sättigungsgrad der veresterten Fettsäuren getrennt (28-30). Der Einsatz von polarereren stationären Phasen könnte dieses Problem lösen, die Daten hierzu sind allerdings widersprüchlich: Caboni *et al.* (31) erzielten an einer 30 m langen 50 %-Phenylmethylpolysiloxan- Trennsäule (TAP) nur eine vergleichbare chromatographische Auflösung wie an einer 8 m langen 5 %-Phenylmethylpolysiloxan-Trennsäule. Gordon & Griffith (27) dagegen beschrieben unter Verwendung einer mit TAP beschichteten Kapillare eine Trennung von Sterylestern nach dem Sättigungsgrad veresterter Fettsäuren. Allerdings war die Auflösung bei der Untersuchung einer komplexen Phytosterylesternmischung für die Analytik individueller Ester unzureichend. Eine GC-Trennung von langkettigen Fettsäuresteryl- und stanylestern wurde bisher nicht beschrieben. Zusätzlich unterliegen hochsiedende Sterylester möglicherweise unterschiedlich starken thermisch bedingten Degradierungsprozessen während eines GC-Analysenlaufes (26, 147, 148).

Die kapillargaschromatographische Analytik erfordert zudem eine vorhergehende Abtrennung störender Matrixbestandteile. Hierfür fanden vor allem die Festphasenextraktion (SPE), Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) Anwendung. Die HPLC stellt dabei die effektivste Methode dar. Das Sammeln der LC-Fractionen „off-line“ ist allerdings zeit- und arbeitsaufwendig und schwierig zu automatisieren. Ein automatisierter, direkter Transfer einer LC-Fraktion in ein GC-System gelingt mit einer on-line Kopplung von LC und GC (on-line LC-GC). On-line LC-GC wurde unter anderem bereits für die Untersuchung von Sterolen und Phytosterylestern in Pflanzenölen und Fetten, wie z.B. Kakaobutter eingesetzt (30, 149-151).

2.3. On-line LC-GC

2.3.1. Hintergrund

Die erste vollautomatisierte kommerzielle on-line Kopplung von LC und GC war im Jahr 1989 auf dem Markt verfügbar (152). On-line LC-GC weist gegenüber den „off-line“-Methoden einige Vorteile auf, da die gesamte Aufreinigung und kapillargas-

chromatographische Analyse in einem geschlossenen System stattfindet: (i) der Arbeits- und Zeitaufwand der Analysenmethode ist deutlich reduziert; (ii) die Empfindlichkeit ist erhöht, da die gesamte HPLC-Fraktion übertragen wird; (iii) Verluste von Analyten, Kontaminationen oder Artefaktbildungen sind minimiert, die Reproduzierbarkeit wird dadurch erhöht.

Im Gegensatz zur herkömmlichen Gaschromatographie, bei welcher in der Regel nur Volumina von wenigen Mikrolitern injiziert werden, werden bei der on-line LC-GC zum Teil mehrere hundert Mikroliter in das GC-System transferiert. Daher müssen neben dem Zeitfenster des Transfers vor allem die Bedingungen zur Eliminierung des großen Lösemittelvolumens optimiert werden. Die Etablierung einer on-line LC-GC-Methode ist daher gegenüber einfachen Techniken deutlich komplexer, zeit- und kostenintensiver. Ein Entscheidungsbaum für den gerechtfertigten Einsatz von on-line LC-GC ist in Abbildung 11 dargestellt.

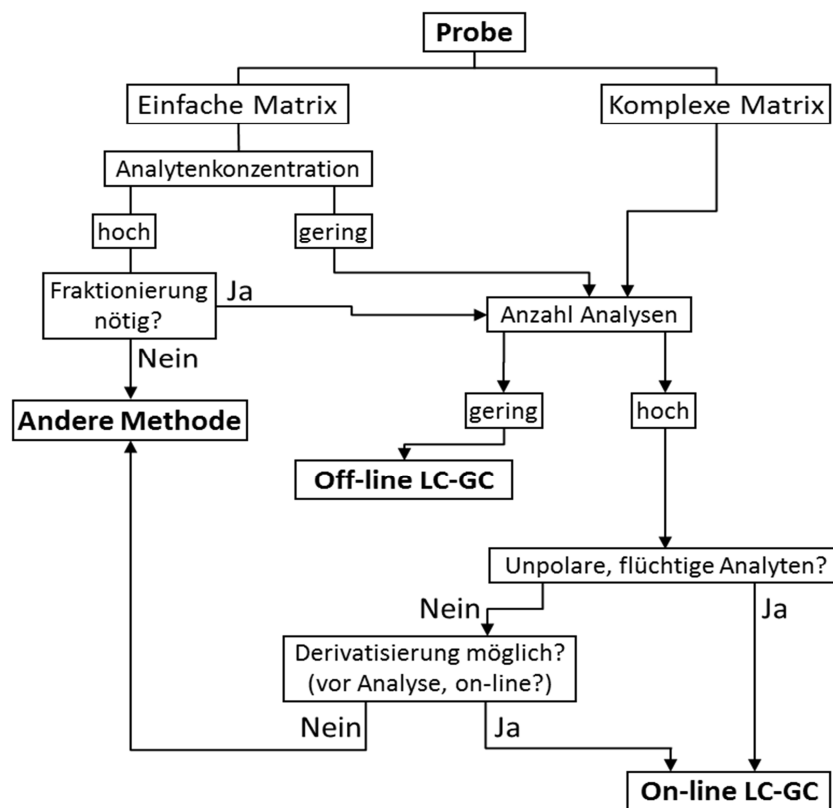


Abbildung 11: Entscheidungsbaum für den Einsatz von LC-GC nach (153)

2.3.2. Kopplungstechniken

Die Kopplung von LC und GC beinhaltet die Schritte (i) flüssigchromatographische Isolierung der Fraktion von Interesse und (ii) Transfer dieser Fraktion in das GC-System mit

anschließender kapillargaschromatographischer Analyse. Die Herausforderung beim Eintrag großer Lösemittelvolumina in das GC-System besteht darin, den Eluenten von den Analyten abzutrennen und letztere als scharfe Startbande auf der kapillargaschromatographischen Trennsäule zu fixieren. Dazu finden vor allem die Techniken (i) On-column Interface, (ii) Loop-type Interface und (iii) Vaporiser Interfaces Verwendung. Bei den Techniken On-column- und Loop-type Interface finden die Abdampfprozesse des Eluenten in den jeweiligen Kapillarsäulensystemen statt. Beim On-column Interface liegt die Ofentemperatur während des Transfers unter dem Siedepunkt des Eluenten, beim Loop-type Interface darüber. Vaporiser Interfaces ermöglichen das Abdampfen des Lösungsmittels außerhalb des GC-Säulensystems.

2.3.2.1. On-column Interface

Das On-column Interface bedarf im Prinzip nur eines Schaltventils, welches den LC-Eluentenstrom nicht mehr in das Abfallgefäß, sondern über eine dünne Transferkapillare durch einen gewöhnlichen On-column Inlet in eine unbelegte Vorsäule („retention gap“) des GC-Säulensystems befördert (Abbildung 12) (154).

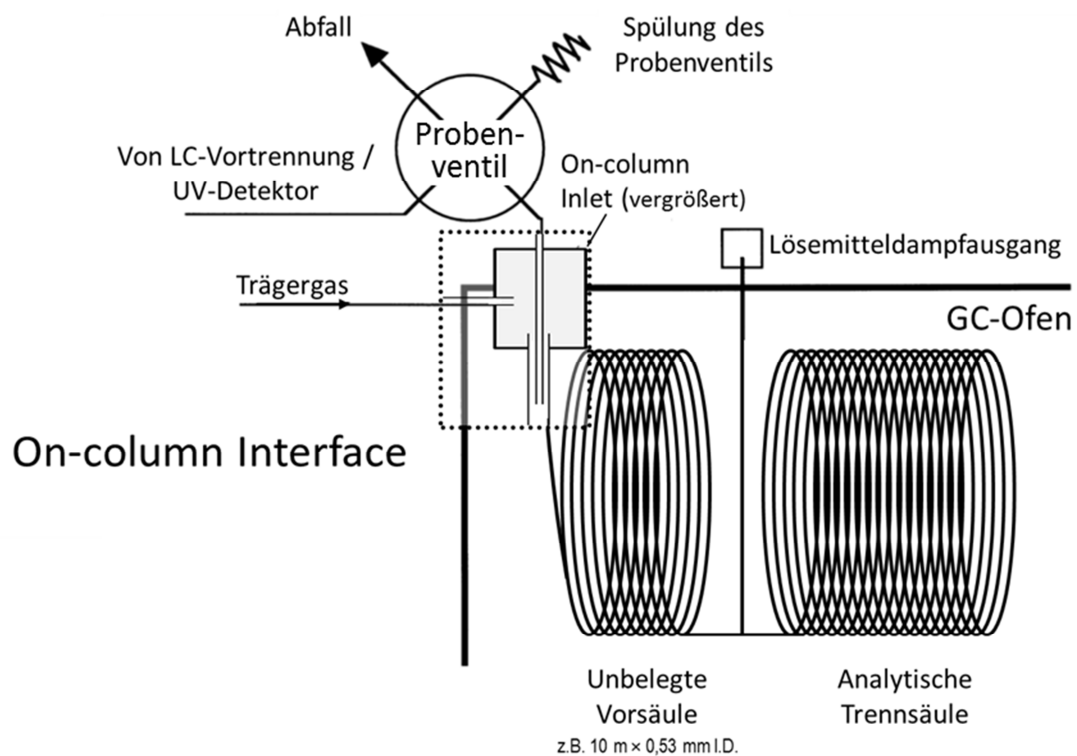


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer on-line Kopplung von LC und GC mittels On-column Interface (154)

Die Ofentemperatur des GC befindet sich während des Transfers unterhalb des auf den Säuleneingangsdruck korrigierten Siedepunkts des Eluenten, welcher somit in die Vorsäule flutet. Da währenddessen stetig Trägergas fließt, wird der Eluent als Film auf der Innenwandung der Kapillare verteilt. Nach Beendigung des Transfers wird der „Eluentenfilm“ von der Injektorseite her mit dem Trägergas abgedampft. Leichtflüchtige Verbindungen werden dabei im verbleibenden Eluentenfilm aufkonzentriert („solvent trapping“) (155). Die schwerflüchtigen Analyten bleiben auf der gesamten Länge der Vorsäule zurück („band broadening in space“ (156, 157)). Um das Abdampfen zu beschleunigen und den Detektor vor größeren Mengen an Lösungsmitteldämpfen zu bewahren, wird vor der Trennsäule ein Lösungsmitteldampfausgang installiert („solvent vapour exit“ (158)), welcher kurz vor Ende des Abdampfvorgangs geschlossen wird. Die stationäre Phase der Trennsäule wird durch die Lösungsmitteldämpfe aufgequollen und verfügt nun über eine gesteigerte Retentionskraft („phase soaking“ (159)). Die transferierten Analyten werden nach dem Start des Temperaturprogrammes von der unbelegten Vorsäule abgedampft und am Anfang der Trennsäule fokussiert („phase ratio focusing“ (152)). Da der Transfer durch die Parameter (i) Fließgeschwindigkeit des Eluenten, (ii) Transfertemperatur, (iii) Trägergasdruck und (iv) Zeitpunkt für das Schließen des Lösungsmitteldampfausgangs beeinflusst wird, ist die Optimierung des On-column Interfaces anspruchsvoll.

2.3.2.2. Loop-type Interface

Der schematische Aufbau eines on-line LC-GC-Gerätes mit Loop-Type Interface ist in Abbildung 13 dargestellt. Das LC- und das GC-System sind über ein Probenventil mit Probenschleife, dem sogenannten Transfer-Loop gekoppelt. Der Eluentenstrom durchfließt die Probenschleife nach der flüssigchromatographischen Trennung und UV-Detektion. Durch Umschalten des Probenventils wird der Inhalt der Probenschleife durch das Trägergas in die unbelegte Vorsäule des GC-Säulensystems gedrückt. Die Ofentemperatur befindet sich dabei über dem auf den Säuleneingangsdruck korrigierten Siedepunkt des Eluenten. Infolgedessen verdampft der Eluent beim Eintritt in die unbelegte Vorsäule; der resultierende Dampfdruck übersteigt den Säuleneingangsdruck des Trägergases, welches flussgeregelt ist und daher nur soviel Flüssigkeit nachschiebt, wie im Gaschromatographen abdampft („fully concurrent solvent evaporation“).

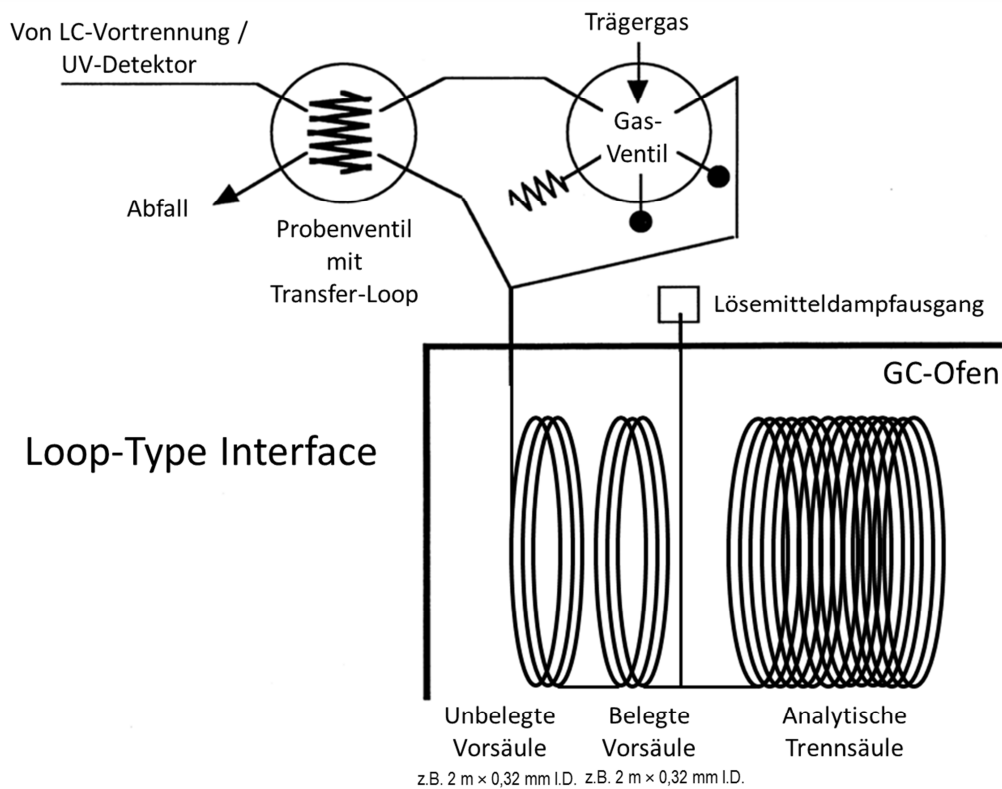


Abbildung 13: Schematische Abbildung einer on-line Kopplung von LC und GC mittels Loop-Type Interface (154)

Ein weiteres Eindringen des Eluenten in die Vorsäule wird somit verhindert. Leicht flüchtige Verbindungen dampfen zusammen mit dem Lösungsmittel ab und werden über den Lösungsmitteldampfausgang (SVE) abgegeben. Mäßig flüchtige Verbindungen können mit Hilfe einer zweiten, belegten Vorsäule zurückgehalten werden (Abbildung 14).

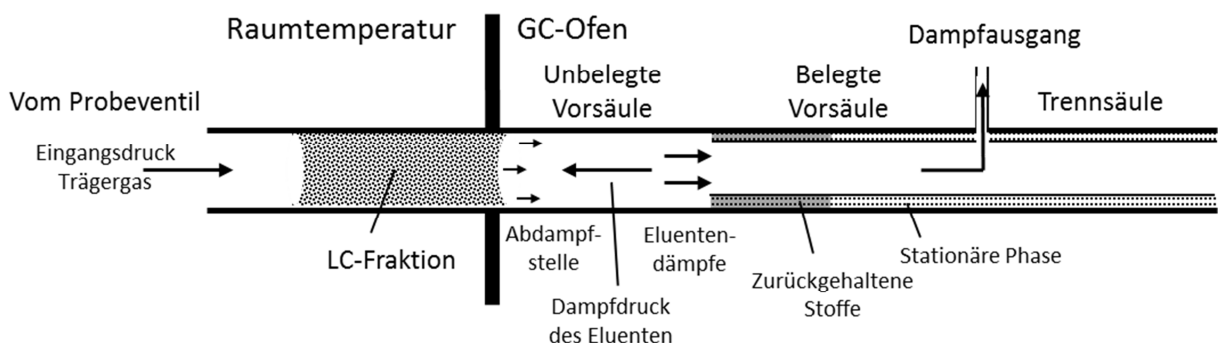


Abbildung 14: Vollständig simultanes Abdampfen des Eluenten beim Loop-Type Interface. Der Dampfdruck stoppt das weitere Vordringen des Eluenten in die unbelegte Vorsäule. Die belegte Vorsäule hält mäßig flüchtiges Probenmaterial zurück (152, 158)

Die schwerflüchtigen Analyten bleiben auf der unbelegten Vorsäule als breite Bande zurück („band broadening in space“), mit steigender Ofentemperatur werden die Analyten auf die belegte Trennsäule überführt („phase ratio focusing“) und dort als schmale Bande fokussiert.

Mit dem Loop-type-Interface können große Volumina transferiert werden (bis 20 mL), allerdings eignet sich dieses nur für Verbindungen, deren gaschromatographische Elutionstemperatur 60 – 100 °C über der Transfertemperatur liegt (152-154).

2.3.2.3. Vaporiser Interfaces

Zur Injektion großer Flüssigkeitsmengen sind sogenannte heiße Verdampfungskammern und PTV-Inlets (Programmable Temperature Vaporiser) in der Gaschromatographie weit verbreitet. Diese können ohne größeren apparativen Aufwand auch zur on-line Kopplung von LC und GC verwendet werden. Für den Einsatz von Vaporisern als Interface wurden zahlreiche Techniken beschrieben (Tabelle 5). Gute Übersichten bieten (152) und (153).

Beim „PTV solvent split“, zum Beispiel, wird direkt in den kalten Inlet injiziert und das Lösemittel über das Splitventil abgeleitet. Die Liner sind in der Regel mit inerten Füllmaterialien (z.B. deaktivierte Glaswolle) oder einem Absorbens (Tenax TA oder Thermotrap TA) gefüllt. Während leichtflüchtige Verbindungen mit dem Lösungsmittel verloren gehen, bleiben mittel- und schwerflüchtige Verbindungen auf dem Füllmaterial zurück. Nach Abblasen des Lösemittels wird das Splitventil geschlossen und das Inlet aufgeheizt, um die Analyten auf die Trennsäule zu transferieren. Ein zusätzlicher Lösemitteldampfausgang ist bei dieser Technik nicht nötig (152, 153).

Tabelle 5: Charakteristika von Vaporiser Interface-Techniken für die LC-GC-Kopplung (153)

Technik	Temperatur während des Transfers	Maximales Fraktionsvolumen [μL]	Anwendungsbereich ^a
PTV split	Unter Sdp des Eluenten	1500	$\geq\text{C13}$, C10-C30 (Tenax)
PTV splitless	Unter Sdp des Eluenten	50-100	$\geq\text{C10}$
PTV vapour overflow	Über Sdp des Eluenten	1500	$\geq\text{C16}$
PTV solvent split	Unter Sdp des Eluenten	10-500	$\geq\text{C14}$
Isothermes, heißes Verdampfen	Über Sdp des Eluenten	1500	$\geq\text{C14} - \text{C18}^{\text{b}}$

^a für typische organische Lösemittel

^b je nach Ansatz

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Folgende Chemikalien und technische Gase wurden verwendet:

- Cholesterylester der Fettsäuren
16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0 (Reinheiten \geq 98%)
und 22:0 (Reinheit \geq 90%) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
 - Fettsäuren und Fettsäuremethylester
8:0, 10:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 22:0
und 22:1 (analytische Reinheiten) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
bzw. Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
 - Sonstige Chemikalien
 - Acetonitril (LiChrosolv®) Merck, Darmstadt (D)
 - Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) +
Trimethylchlorsilan (TMCS), 99:1 Supelco, Taufkirchen (D)
 - Calciumchlorid wasserfrei Riedel de Haën, Taufkirchen (D)
 - Ethanol (96 %) Merck, Darmstadt (D)
 - n*-Hexan (SupraSolv®) Merck, Darmstadt (D)
 - Kaliumhydroxid-Plättchen VWR International, Darmstadt (D)
 - Methanol (LC-MS Grade) Merck, Darmstadt (D)
 - Methyl-*tert*-butylether (MTBE) - (Diveron®S) Evonik Oxeno GmbH, Marl (D)
 - Natriummethoxid-Lösung (5.4 M) Fluka, Taufkirchen (D)
 - Natriumsulfat wasserfrei (p.a.) Fluka, Taufkirchen (D)
 - Pyridin (puriss.) Sigma, Taufkirchen (D)
 - Salzsäure (25 %) Riedel de Haën, Taufkirchen(D)
- MTBE wurde vor der Verwendung destilliert.
- Die technischen Gase Argon (4.6), Helium (5.0), Stickstoff (5.0) und Wasserstoff (5.0) wurden bei Westfalen AG, Münster (D) bezogen.

3.1.2. Enzympräparate

Folgende Enzympräparate wurden verwendet:

- Lipase B acrylic resin aus *Candida antarctica*, exprimiert
in Asp. oryzae, Lipaseaktivität 10.000 U/g Sigma, Taufkirchen (D)
- Lipase aus *Candida rugosa*, Lipaseaktivität 1468 U/mg Sigma, Taufkirchen (D)

3.1.3. Pflanzliche Sterol/Stanol- und Steryl-/Stanylfettsäureester-Muster

Die verwendeten Phytosterol-/stanolpräparate sind in Tabelle 6 aufgeführt, die industriellen Phytosteryl-/stanylfettsäureestermuster in Tabelle 7.

Tabelle 6: Pflanzliche Sterole/Stanole

Bezeichnung	Produktbeschreibung	Hersteller
Generol® 122N ¹	Soja-Sterole	Cognis Illertissen GmbH, Illertissen (D)
Generol® 867 F ²	Tallöl-Sterole	Cognis Illertissen GmbH, Illertissen (D)
Reducol™ Stanol Powder ³	Holz-Stanole	Cognis Illertissen GmbH, Illertissen (D)
Sitosterol (75 %)		Across Organic, New Jersey (US)
Stigmastanol (95 %)	= Sitostanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Stigmasterol (95 %)		Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)

¹ 46,9 % β -Sitosterol, 28,5 % Campesterol, 14,4 % Stigmasterol, 3,5 % Brassicasterol, 0,5 % Campestanol, 0,2 % Sitostanol und 6,1 % andere Sterole

² 77,0 % β -Sitosterol, 8,9 % Sitostanol, 8,3 % Campesterol, 2,4 % Stigmasterol, 0,9 % Campestanol, 0,2 % Brassicasterol und 2,3 % andere Sterole

³ 91,2 % Sitostanol, 8,2 % Campestanol, 0,5 % β -Sitosterol und 0,1 % Campesterol

Für die industriellen Estermischungen (Tabelle 7) lagen lediglich für die Produkte von Cognis Spezifikationen vor. Diesen waren die Sterol- und Sterylestergehalte sowie die Sterolverteilungen zu entnehmen. Mengenangaben zu einzelnen Steryl-/Stanylestern waren für keines der Muster vorhanden.

Tabelle 7: Industrielle Phytosteryl-/ stanylesterester-Muster

Bezeichnung	Produktbeschreibung	Hersteller
STAEST-115	Plant Stanol Ester	Raisio Life Science, Raisio (FIN)
STAEST-115	Plant Stanol Ester, rape seed stanol	Raisio Life Science, Raisio (FIN)
STEREST-113P	Plant Sterol Ester, wood based	Raisio Life Science, Raisio (FIN)
STEREST-115	Plant Sterol Ester, rape seed	Raisio Life Science, Raisio (FIN)
Vegapure® 95E ¹	Plant Sterol Ester, non-GM	Cognis Illertissen GmbH, Illertissen (D)
Vegapure® 95FF ²	Plant Sterol Ester	Cognis Illertissen GmbH, Illertissen (D)

¹ Sterolester + freie Sterole (2,7 %): 99,2 %; Sterolgesamtgehalt: 61,2 %; Sterolverteilung: 69 % β -Sitosterol, 17 % Campesterol, 7 % Sitostanol, 3 % Brassicasterol, 1 % Campestanol, 1 % Stigmasterol, und 2,7 % andere Sterole

² Sterolester + freie Sterole (3,0 %): 99,5 %; Sterolgesamtgehalt: 62,4 %; Sterolverteilung: 46,6 % β -Sitosterol, 27,3 % Campesterol, 17,3 % Stigmasterol, 3,0 % Brassicasterol, 0,9 %, Sitostanol, 0,6 % Campestanol und 3,0 % andere Sterole

3.1.4. Fette und Öle

Folgende kommerzielle Fette und Öle wurden verwendet:

Kokosfett	Walter Rau Lebensmittelwerke GmbH, Hilter (D)
Rapsöl	Star Marke, Tengemann (D)
Sonnenblumenöl	Star Marke, Tengemann (D)
Becel®-Margarine „original“	Unilever Deutschland, Hamburg (D)

3.1.5. Angereicherte Lebensmittel

3.1.5.1. Magermilch-Trinkjoghurts

Die in dieser Arbeit untersuchten kommerziellen, mit Phytosteryl-/stanylestern angereicherten Magermilch-Trinkjoghurtprodukte sind in Tabelle 8 aufgeführt. Alle Produkte wurden in Supermärkten bezogen.

Tabelle 8: Untersuchte kommerzielle Magermilch-Trinkjoghurtprodukte

Produkt	Hersteller	Bezugsland ¹	Packungsangaben		
			Phytosterol-/stanolgehalt	Fettgehalt ²	sonstiges
Benecol® - „original“ - „light“	McNeil Nutritionals Ltd, Bracknell (UK)	NL	3 % Pflanzenstanol	2,1 %	„mit Pflanzenstanolestern“
Emmi-Benecol® - „Erdbeer“ - „Orange“	Emmi, Luzern (CH)	D	3,0 % Pflanzenstanol	2,1 %	„mit Pflanzenstanolestern“
Becel® pro-activ - „Original“, - „Erdbeer“	Unilever Deutschland, Hamburg (D)	D	2 % Phytosterine	1,5 %	„mit Pflanzensterinestern (3,4 %)“
Danacol®	Danone, Milano (I)	I	1,6 % pflanzliche Sterole	0,6 %	

¹ Internationales Kfz-Länderkennzeichen

² Ohne Sterol/Stanol

3.1.5.2. Margarinen

Die in dieser Arbeit untersuchten kommerziellen, mit Phytosteryl-/stanylestern angereicherten Margarineprodukte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Untersuchte kommerzielle Margarineprodukte

Produkt	Hersteller	Bezugsland ¹	Packungsangaben		
			Phytosterol / -stanolgehalt	Fettgehalt ²	sonstiges
Benecol® „Met Olijfolie“	McNeil Nutritionals Ltd (Bracknell, UK)	NL	0,8 g/12g (bzw. 7 %) Pflanzenstanol	55 % (10 % SFAs, 33 % MUFAs, 11 % PUFAs) ³	14 % Olivenöl (bzgl. des Gesamtfettes) Emulgatoren ^{4,5} 0,3 % Protein
Benecol® „Kevyt kasvirasvalevite 32 %“	Ravintoraisio Oy, Raisio (FIN)	FIN	8 % Pflanzenstanol	32 % (6 % SFAs, 16 % MUFAs, 10 % PUFAs)	Emulgatoren ⁴ 2,7 % Protein
Benecol® „Kevyt kasvirasvalevite Oliivi 32 %“	Ravintoraisio Oy, Raisio (FIN)	FIN	8 % Pflanzenstanol	32 % (7 % SFAs, 17 % MUFAs, 8 % PUFAs)	9 % Olivenöl (bzgl. des Gesamtfettes) Emulgatoren ⁴ 2,7 % Protein
Benecol® „Laktoositon kasvirasvalevite 32 %“	Ravintoraisio Oy, Raisio (FIN)	FIN	8 % Pflanzenstanol	32 % (6 % SFAs, 16 % MUFAs, 10 % PUFAs)	Emulgatoren ⁴ 2,8 % Protein
Becel® pro-activ	Unilever Deutschland, Hamburg (D)	D	7,5 % Phytosterine (12,5 % Phytosterinester)	40 % (10 % SFAs, 10 % MUFAs, 20 % PUFAs)	Emulgatoren ^{4,5} 0 % Protein
Bellasan® activ	Walter Rau Lebensmittelwerke GmbH, Hilter (D)	D	7,5 % Pflanzensterine (12,5 % Pflanzensterinester)	39 % (12 % SFAs, 17 % MUFAs, 10 % PUFAs)	Emulgatoren ^{4,5} 0 % Protein
Deli Reform® Active	Walter Rau Lebensmittelwerke GmbH, Hilter (D)	D	7,5 % Pflanzensterine (12,5 % Pflanzensterinester)	39 % (12 % SFAs, 17 % MUFAs, 10 % PUFAs)	Emulgatoren ^{4,5} 0 % Protein

¹ Internationales Kfz-Länderkennzeichen

² Ohne Phytosterole/-stanole

³ Anteile der Fettsäuren: gesättigte (SFAs), einfach ungesättigte (MUFAs), mehrfach ungesättigte (PUFAs)

⁴ Lecithine

⁵ Mono- und Diglyceride

3.2. Methoden

3.2.1. Enzymatische Steryl-/Stanylestersynthese

In Anlehnung an (121) wurden 0,3 mmol Fettsäuremethylester sowie 0,3 mmol Sterol in 500 μ L *n*-Hexan gelöst und mit 50 mg *Candida rugosa* Lipase Typ VII unter Schütteln für 66 Stunden bei 40 °C inkubiert. Die Syntheseausbeuten lagen in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Fettsäure sowie des Sättigungsgrades zwischen 8 und 75 %. Zur Synthese der C22-Fettsäuremethylester wurde *Candida antarctica* Lipase B eingesetzt (Umsätze 0,4-8 %).

3.2.2. GC/MS-Bedingungen

Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten an einem Trace GC ultra mit einem Trace DSQ Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific Inc. (Austin, TX). Das Injektionsvolumen betrug 1 μ L. Die Temperatur des SSL-Inlets wurde auf 280 °C, das Splitverhältnis auf 1:10 eingestellt. Als Trennsäule diente eine 30 m x 0,25 mm Kapillarsäule, welche mit 0,1 μ m Trifluorpropylmethylpolysiloxan (Rtx-200MS; Restek GmbH, Bad Homburg, D) belegt war, als Trägergas Helium mit einem konstanten Fluss von 1,0 mL/min. Die Ofentemperatur betrug bei Injektion 100 °C und wurde für 2 min gehalten; anschließend mit 15 °C/min auf 310 °C programmiert, 2 min gehalten, mit 1,5 °C/min auf 340°C geheizt und 3 min gehalten. Die Transferline war auf 320 °C temperiert, die Ionisationsquelle auf 250 °C. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektronenstoß-Ionisation im positiven Modus (EI+) bei 70 eV. Im Full Scan wurde der Massenbereich m/z 40-750 ab 6 min nach Injektion mit einer Scan-Zeit von 0,4 s aufgezeichnet. Für die GC/MS-Analytik wurde die Software Xcalibur 1.4 SR1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Austin, TX) verwendet.

3.2.3. GC/FID-Bedingungen

3.2.3.1. Vorversuche

Die Vorversuche zur kapillargaschromatographischen Trennung von Steryl-/Stanylestern erfolgten an einem Finnigan FocusGC (Thermo Electron Corporation, Austin, TX), welcher mit einem SSL-Inlet und einem Flammenionisationsdetektor (FID) ausgestattet war. Das Injektionsvolumen betrug 1 μ L. Die Inlettemperatur wurde auf 250 °C, das Splitverhältnis auf 1:10 eingestellt. Die Trennung erfolgte an folgenden stationären Phasen:

(i) DB-5ht (5 %-Diphenyl-95 %-dimethylpolysiloxan; 27 m x 0,25 mm; 0,1 μ m d_f ; J & W

Scientific, Folsom, CA), (ii) Rtx-65TG (65 %-Diphenyl-35 %-dimethylpolysiloxan; 30 m x 0,25 mm; 0,1 μm d_f ; Restek GmbH, Bad Homburg, D) und (iii) Rtx-200MS (Trifluorpropylmethylpolysiloxan; 30 m x 0,25 mm; 0,1 μm d_f ; Restek GmbH, Bad Homburg, D). Die Ofentemperatur betrug bei Injektion 100 °C und wurde unter Verwendung der stationären Phasen DB-5ht und Rtx-65TG mit 15 °C/min auf 220 °C programmiert, 1 min gehalten, mit 5 °C/min auf 340 °C geheizt und 15 min gehalten; unter Verwendung der Rtx-200MS 2 min bei 100 °C gehalten; anschließend mit 15 °C/min auf 310 °C programmiert, 2 min gehalten, mit 1,5 °C/min auf 340 °C geheizt und 3 min gehalten. Die Detektortemperatur war auf 360 °C eingestellt. Die Aufnahme der Daten erfolgte softwaregestützt mit ChromCard (Thermo Electron Corporation, Austin, TX).

3.2.3.2. Analytik

Die kapillargaschromatographische Analytik erfolgte an einem HP6890N GC (Agilent Technologies, Böblingen, D), welcher mit einem Autosampler, SSL-Inlet und FID ausgestattet war. Das Injektionsvolumen betrug 1 μL . Die Inlettemperatur wurde auf 280 °C, das Splitverhältnis auf 1:7,5 eingestellt. Als Trennsäule diente eine 30 m x 0,25 mm Kapillarsäule, welche mit 0,1 μm Trifluorpropylmethylpolysiloxan (Rtx-200MS; Restek GmbH, Bad Homburg, D) belegt war, als Trägergas H_2 mit einem konstanten Fluss von 1,5 mL/min. Die Ofentemperatur betrug bei Injektion 100 °C und wurde für 2 min gehalten; anschließend mit 15 °C/min auf 310 °C programmiert, 2 min gehalten, mit 1,5 °C/min auf 340 °C geheizt und 3 min gehalten. Die Detektortemperatur wurde auf 360 °C gesetzt. Zur Signalverstärkung wurde Make up Gas (N_2) mit 25 mL/min verwendet. Die Aufnahme der Daten erfolgte softwaregestützt mit ChemStation Software (Agilent Technologies, Böblingen, D).

3.2.4. Chemische Umesterung der industriellen Muster

Die chemische Umesterung der industriellen Phytosterylfettsäureestermischungen erfolgte nach (160). Nach Verflüssigung der Esterpräparate bei 60 °C wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mg/mL hergestellt. 50 μL der Stammlösungen wurden mit 450 μL *n*-Hexan und 20 μL Natriummethoxid-Lösung versetzt und für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Trocknung der organischen Phase mit Calciumchlorid wurde die wasserfreie Lösung in GC-Vials überführt und kapillargaschromatographisch untersucht.

Die kapillargaschromatographische Untersuchung der Fettsäuremethylester (FAME)

erfolgte an einem Finnigan FocusGC (Thermo Electron Corporation, Austin, TX), welcher mit einem SSL-Inlet und einem FID ausgestattet war. Das Injektionsvolumen betrug 1 μL . Die Inlettemperatur wurde auf 250 °C, das Splitverhältnis auf 1:14 eingestellt. Die Trennung erfolgte an einer mit Dimethylpolysiloxan beschichteten stationären Phase (60 m \times 0.32 mm I.D., 0,25 μm d_f ; J&W Scientific, Folsom, CA). Die Ofentemperatur wurde mit 4 °C/min von 100 °C auf 320 °C programmiert und 25 min gehalten. Die Detektortemperatur war auf 320 °C eingestellt. Die Aufnahme der Daten erfolgte softwaregestützt mit ChromCard (Thermo Electron Corporation, Austin, TX).

3.2.5. Chemische Synthese und Aufreinigung von Steryl-/Stanylestern

Die zu chemischen Steryl-/Stanylester-Synthesen eingesetzten Fettsäuregemische wurden durch Verseifung von Pflanzenölen/Fetten in Anlehnung an ASU L 13.00-18 n. § 64 LFGB (161) gewonnen. Dazu wurden 6 g Pflanzenöl/-fett mit 150 mL ethanolischer KOH-Lösung (3 M, 85 %-ig) für 2 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Die Extraktion der Fettsäuren erfolgte nach HCl-Zugabe (6 M) bei einem pH-Wert von etwa 1-2 mit 3 \times 30 mL *n*-Hexan/MTBE (3:2). Nach Einengen am Rotationsverdampfer wurde das restliche Lösemittel mit Stickstoff abgeblasen.

Die Estersynthese erfolgte mit ca. 0,25 mmol Phytosterolen und einem zwei bis dreifachen Überschuss an Fettsäure bzw. des Fettsäuregemisches in einem 2 mL Braunglas-Bördelkappengläschen. Dieses wurde mit Stickstoff geflutet, verschlossen und anschließend für 25 Stunden in einen auf 180 °C temperierten Heizblock gegeben.

Die Abtrennung nicht veresterter Fettsäuren erfolgte mittels alkalischer Flüssig-Flüssig-Extraktion. Die Synthese-Ansätze wurden dazu mit insgesamt 2,5 mL *n*-Hexan/MTBE (3:2) in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 2,5 mL KOH (1 M) wurde das Gemisch kräftig geschüttelt (Vortex), kurz zentrifugiert (6000 U/min) und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 2,5 mL *n*-Hexan/MTBE (3:2) nachextrahiert. Die vereinten Extrakte wurden unter gelindem Stickstofffluss eingengt und der Rückstand für 30 min bei 103 ± 2 °C getrocknet.

3.2.6. Analytik in Magermilch-Trinkjoghurt mittels GC/FID

3.2.6.1. Quantifizierung von Pflanzensteryl-/stanylestern

Die Kalibrierungen der Geräte erfolgten mit industriellen Pflanzensteryl-/stanylester-

Mischungen oder mit synthetisierten und aufgereinigten Ester-mischungen bekannter Zusammensetzung. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Esterprofile der zur Kalibrierung eingesetzten Mischungen möglichst denen der zu quantifizierenden entsprachen. Die Kalibrierung des Bestimmungsbereichs erfolgte daher meist in einem engen Konzentrationsbereich von zum Beispiel 0,1-0,5 µg Gesamtester pro Injektion mit je 5 Kalibrierpunkten in Dreifachbestimmung. Dazu wurden z.B. drei Stammlösungen mit 10,0 mg der Gesamtester-Mischung pro mL *n*-Hexan/MTBE (3:2) hergestellt; zu 150 µL, 300 µL, 450 µL, 600 µL und 750 µL dieser Stammlösungen wurden 300 µL einer internen Standard-Lösung [2,5 mg Cholesterylpalmitat/mL *n*-Hexan/MTBE (3:2)] gegeben; die Lösungen wurden auf 1,5 mL Gesamtvolumen mit *n*-Hexan/MTBE (3:2) aufgefüllt und nach 1:10 Verdünnung zur Kalibrierung eingesetzt.

Die Kalibrierkurven der jeweiligen Ester wurden mittels linearer Regressionsanalyse in einem Koordinatensystem aus dem Peakflächenverhältnis (individueller Ester / IS) und dem Mengenverhältnis (individueller Ester / IS) berechnet. Jeder Kalibrierpunkt wurde in Dreifachbestimmung ermittelt.

3.2.6.2. Aufarbeitung nach Weibull-Stoldt

Zur Extraktion pflanzlicher Steryl-/Stanylester aus Magermilch-Trinkjoghurt nach dem Verfahren nach Weibull-Stoldt (162) wurden ca. 20 g der Probe in Dreifachbestimmung in ein 600 mL Becherglas eingewogen. Nach Zugabe von 3 mL einer internen Standardlösung [50 mg Cholesterylpalmitat pro mL *n*-Hexan/MTBE (3:2)], 80 mL Wasser und 100 mL HCl (25 %) wurde mittels eines Glasstabes gut gemischt. Das Becherglas wurde mit einem Uhrglas bedeckt, zum Sieden erhitzt und 45 min bei Siedetemperatur gehalten. Dabei wurde durch Zugabe von heißem Wasser das Volumen konstant gehalten. Nach 45 min wurde die Lösung etwa auf die doppelte Menge mit heißem Wasser verdünnt und durch zwei ineinander gelegte, mit heißem Wasser angefeuchtete Faltenfilter filtriert. Becherglas, Uhrglas und Glasstab wurden mindestens dreimal sorgfältig mit heißem Wasser gespült und jeweils quantitativ durch das Faltenfilter filtriert. Dieses wurde anschließend solange mit heißem Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Filtrates gegen Indikatorpapier neutral reagierte. Das Filter wurde auf das gespülte Uhrglas gegeben und für 2 Stunden bei 105 ± 2 °C getrocknet. Danach wurde das getrocknete Filter in eine Soxhlet-Extraktionshülse überführt. Die Fettextraktion nach Soxhlet erfolgte mit MTBE als Extraktionslösemittel. Nach 15 Durchläufen (3 h) wurde der Lipidextrakt eingeeengt und anschließend bei 105 ± 2 °C bis

zur Massenkonzanz getrocknet. Parallel wurde zu jeder Dreifachbestimmung ein Blindwert (ohne Produkteinwaage) angesetzt.

Für die kapillargaschromatographische Analyse wurde ein Aliquot des Lipidextraktes in *n*-Hexan/MTBE (3:2) gelöst und auf eine Konzentration von etwa 0,33 mg/mL verdünnt.

3.2.6.3. Chemische Hydrolyse

300 µL der (Extrakt-) Lösung (ca. 100 µg Ester) wurden in einem 11 mL Vial vorgelegt und mit 500 µL 5,4 M Natriummethoxid-Lösung unter Argon versetzt. Es wurde im geschlossenen Vial bis zum Sieden erhitzt, anschließend 30 min im Dunkeln stehen gelassen, erneut zum Sieden erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 4 mL 0,7 M Salzsäure und 0,5 mL MTBE wurde kräftig geschüttelt und die organische Phase mit Hilfe einer Pasteurpipette abgehoben. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal mit je 0,5 mL MTBE wiederholt. Anschließend wurden die vereinten organischen Extrakte mittels Na₂SO₄ (wasserfrei) getrocknet, die getrocknete organische Phase in ein 1,5 ml Vial überführt und mit Stickstoff abgeblasen. Nach Silylierung und Abdampfen des Lösemittels wurde der Rückstand in 500 µL *n*-Hexan aufgenommen und kapillargaschromatographisch analysiert.

3.2.6.4. Silylierung

Die Silylierung erfolgte mit 100 µL Silylierungsreagenz (BSTFA + 1 % TMCS) sowie 20 µL Pyridin für 20 Minuten bei 80 °C.

3.2.6.5. Quantifizierung von Phytosterolen/-stanolen

Zur Quantifizierung von Pflanzenstanolen mittels GC/FID wurden 3-Punkt-Kalibrierkurven in Dreifachbestimmung erstellt. Lösungen von Cholesterylpalmitat [0,417 µg/µL] mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen Reducoil™ Stanol Powder [0,33; 1,66 und 3,33 µg/µL] wurden nach gleicher Weise wie die Lipidextrakte hydrolysiert (3.2.6.3). Dazu wurden je 50 µL der Lösungen in ein 11 mL Vial gegeben und mit 250 µL MTBE sowie 500 µL 5,4 M Natriummethylat-Lösung unter Argon versetzt. Die Lösungen wurden im geschlossenen Gefäß bis zum Sieden erhitzt, anschließend 30 min im Dunkeln stehen gelassen, erneut zum Sieden erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 4 mL 0,7 M Salzsäure wurde 3-mal mit je 0,5 mL MTBE extrahiert. Der organische Extrakt wurde mittels Na₂SO₄ (wasserfrei) getrocknet und nach Silylierung kapillargaschromatographisch analysiert.

Zur Quantifizierung komplexerer Phytosterol-/stanolmischungen wurden die theoretischen Korrekturfaktoren von Costin *et al.* (163) herangezogen.

3.2.6.6. Schnellmethoden-Aufarbeitung

Es wurden genau 300 μL IS-Lösung [Cholesterylpalmitat 2,5 mg/mL in *n*-Hexan/MTBE (3:2)] in einem Aufschlussgefäß (Gewindeglas GL18 mit Rundboden, D50, 16 x 160 mm; Schott-Schraubdeckel) vorgelegt. Nach Abdampfen des Lösemittels mit Hilfe von N_2 wurden ca. 100 mg des zu untersuchenden Trinkjoghurtproduktes auf 0,1 mg genau eingewogen. Nach Zugabe von 1 mL 25 %-iger HCl-Lösung sowie 400 μL dest. H_2O und einem Rührfisch wurde das Aufschlussgefäß verschlossen und der interne Standard mit Hilfe eines Ultraschallbades vollständig dispergiert. Die Lösung wurde anschließend 45 min bei 130 °C (Siliconbad) unter Rühren aufgeschlossen.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 1 mL dest. Wasser zugegeben und anschließend durch ein Membranspritzenfilter (0,45 μm) filtriert. Das Aufschlussgefäß wurde dreimal mit 5 mL dest. Wasser nachgewaschen und die Waschlösungen ebenfalls durch das Membranspritzenfilter filtriert. Das Filter wurde anschließend noch solange mit dest. Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Filtrates neutral reagierte. Für die quantitative Lipidextraktion wurde das Aufschlussgefäß mit 5 mL Extraktionslösemittel [*n*-Hexan/MTBE (3:2)] nachgespült und daraufhin durch das Membranfilter filtriert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt und die organischen Extrakte in einem Becherglas vereint. Die vereinten Extrakte wurden mittels Na_2SO_4 wasserfrei getrocknet und der Überstand ohne weitere Aufarbeitung kapillargaschromatographisch untersucht.

3.2.7. Analytik in Margarine mittels on-line LC-GC

3.2.7.1. Lipidextraktion

20-40 mg angereicherte Margarine wurden auf 0,1 mg genau in ein Schraubdeckelgläschen eingewogen. Es wurden genau 300 μL IS-Lösung [Cholesterylpalmitat 2,5 mg/mL in *n*-Hexan/MTBE (3:2)] und 5 mL Extraktionslösemittel [*n*-Hexan/MTBE (3:2)] zugegeben, das Gläschen verschlossen und kräftig geschüttelt (Vortex). Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 (wasserfrei) getrocknet und durch einen Membranspritzenfilter (45 μm) filtriert. Das Schraubdeckelgläschen wurde noch zweimal mit je 5 mL *n*-Hexan/MTBE (3:2) nachgespült und ebenfalls durch das Membranfilter filtriert. Die vereinten Extrakte wurden

1:40 verdünnt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung mittels on-line LC-GC untersucht.

3.2.7.2. On-line LC-GC/FID-Bedingungen (Loop-Type Interface)

Die on-line LC-GC/FID-Analytik mittels Loop-Type Interface erfolgte an einer vollautomatischen Dualchrom 3000-Einheit (Carlo Erba Instruments, Milan, I), welche mit einer 500 μL Probenschleife und 2 Spritzenpumpen (Phoenix 30 CU) ausgestattet war. Eine Pumpe wurde als „Master-Pumpe“ für den Eluentenfluss verwendet, die andere für den Backflush der HPLC-Trennsäule.

Die HPLC-Vortrennung von Phytosteryl-/stanylestern und silylierten Sterolen von anderen Lipiden erfolgte an einer Eurospher®-100 Si Trennsäule (250 \times 2 mm I.D., 5 μm Partikelgröße; Knauer, Berlin, D) unter Verwendung eines Eluentengemisches von *n*-Hexan/MTBE (96+4; v+v). 5 μL einer Extraktlösung wurden injiziert. Die Trennsäule wurde auf 20 °C temperiert. Die Flussrate betrug 0,20 mL/min. Die HPLC-Detektion erfolgte an einem UV/VIS-Detektor bei der Wellenlänge $\lambda = 205 \text{ nm}$. Der Backflush mit MTBE (0,2 mL/min für 7 min) wurde direkt nach Transferbeginn, 5,2 min nach Injektion, gestartet.

Der Transfer erfolgte 5,15 min nach Injektion. Bei Transferbeginn wurde der Lösemitteldampfausgang geöffnet. Das Transferventil wurde 20 s nach einem Druckabfall von $\Delta p = 80 \text{ kPa}$ geschlossen, der Lösemitteldampfausgang weitere 40 s später.

Das Kapillarsäulensystem bestand aus (i) einer unbelegten Fused-Silica Kapillarsäule, 3 m \times 0,53 mm I.D., deaktiviert mit DPTMDS (BGB Analytik Vertrieb, Schloßböckelheim, D), welche mit Hilfe eines Glas-Press-Fit (BGB Analytik Vertrieb, Schloßböckelheim, D) mit der (ii) belegten Vorsäule, 3 m \times 0,25 mm I.D. Rtx-200MS, 0,1 μm Filmdicke (Restek GmbH, Bad Homburg, D) verbunden wurde. Nach der zweiten Vorsäule wurden über ein T-Glas-Press-Fit die Trennsäule und der Lösungsmitteldampfausgang (SVE) angebracht. In geschlossenem Zustand endete der SVE in einer Restriktionskapillare (0,5 m \times 0,05 mm I.D.). Als analytische Trennsäule wurde analog zur einfachen GC-Analytik eine mit Trifluorpropylmethylpolysiloxan belegte Rtx-200MS, 27 m \times 0,25 mm I.D.; 0,1 μm d_f (Restek GmbH, Bad Homburg, D) und als Trägergas H_2 verwendet. Der maximale Vordruck für den Flussregler wurde auf 250 kPa gestellt, der Flussregler auf „009“; diese Einstellungen resultierten in einer Flussrate von 1,7 mL/min. Während des Transfers betrug die Ofentemperatur 140 °C. Diese wurde für 5 min gehalten, dann mit 15 °C/min auf 310 °C programmiert, 2 min gehalten und mit 1,5 °C/min auf 340 °C geheizt und 3 min gehalten. Die Detektortemperatur wurde auf 360 °C

gesetzt. Zur Signalverstärkung wurde Make-up Gas (N_2 , 120 psi) verwendet. Die Aufnahme der Daten erfolgte softwaregestützt mit Chrom-Card-Software Version 1.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Austin, TX).

3.2.7.3. On-line LC-GC/MS-Bedingungen

Die Überprüfung der Identitäten von transferierten Analyten erfolgte nach Kopplung eines TSQ 700 Massenspektrometers von Finnigan-MAT (San Jose, CA) an die Dualchrom 3000-Einheit mittels on-line LC-GC/MS. Das Ende der GC-Trennsäule wurde dazu mit Hilfe eines Glas Press Fits (BGB Analytik Vertrieb, Schloßböckelheim) an ein 1 m langes unbelegtes Säulenstück (0,25 mm I.D.) gekoppelt, welches als Interface in der Transferline zwischen GC-Ofen und Massenspektrometer diente und auf 320 °C temperiert war. Als Trägergas wurde für die on-line LC-GC/MS-Analytik Helium verwendet. Die Temperatur der Quelle wurde auf 250 °C programmiert, die des Manifolds auf 70 °C. Die Ionisierung erfolgte analog zur GC/MS (3.2.2) mit EI+ bei 70 eV. Der Emissionsstrom am Filament wurde auf 200 μ A gesetzt, die Multiplierspannung auf 1500 V. Im Full Scan-Modus wurde der Massenbereich m/z 50 - 750 in jeweils 0,5 s gescannt. Die Datenaufzeichnung erfolgte ab 15 min nach der LC-Injektion mit ICISTM Software Rev 8.3.0 (Finnigan Corp., San Jose, CA).

3.2.7.4. On-line LC-GC/FID-Bedingungen (PTV Interface)

Die on-line LC-GC/FID-Analytik mit PTV Interface erfolgte an den Standard-LC und -GC Geräten Agilent 1220 Infinity LC und Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Böblingen, D), welche über ein Agilent 1200 Series 2/6 SwiValve SL gekoppelt wurden. Das Transferventil, welches mit Hilfe der LC-Software kontrolliert wurde, war mit einer 200 μ L Probenschleife ausgestattet.

Zusätzlich zur Trägergasversorgung des Multimode-Inlets, wurde eine zweite Trägergasleitung zum Transferventil installiert (Abbildung 15). Die an dieser Leitung anliegenden Drücke, und damit die Transfergeschwindigkeit, wurden über das Pneumatics Control Modul (PCM) des GCs eingestellt. Der Multimode-Inlet (MMI) war mit einem mit deaktivierter Glaswolle befüllten SSL-Liner (Agilent 5183-4647) bestückt. Das Abdampfen des Lösemittels erfolgte im Solvent Vent-Modus des MMI. Ein in das Kapillarsäulensystem integrierter Lösemitteldampfausgang war daher nicht nötig.

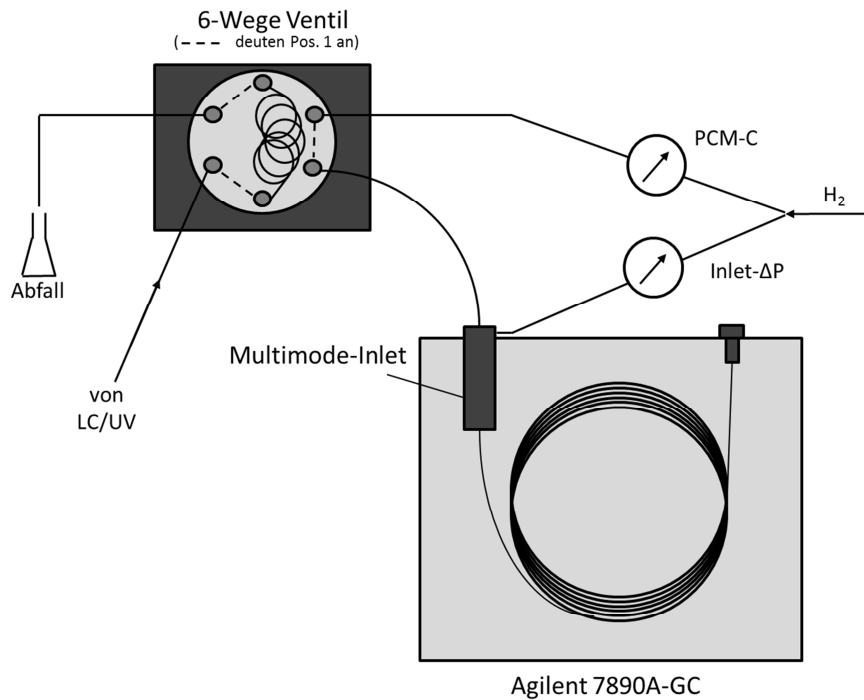


Abbildung 15: Schematischer Aufbau der verwendeten on-line LC-GC-Kopplung mit PTV-Interface (Agilent Multimode-Inlet)

Die bereits etablierten LC-Bedingungen (3.2.7.2) wurden größtenteils übernommen. Als Trennsäule diente ebenfalls eine Eurospher[®]-100 Si, 250 × 2 mm I.D., 5 µm Partikelgröße (Knauer, Berlin), welche auf 27 °C temperiert wurde. Als Eluent wurde *n*-Hexan/MTBE (96+4; v+v) verwendet. Die Flussrate betrug 0,20 mL/min. Auf den Backflush der LC-Säule wurde verzichtet. Das Injektionsvolumen wurde auf 2 µL, die Wellenlänge für die UV-Detektion auf λ=205 nm eingestellt. Der Transfer erfolgte 4,25 min nach Injektion, das Ventil wurde nach 6,25 min wieder in die Ausgangsposition geschaltet. Zur Equilibrierung der MMI-Startbedingungen wurde der GC-Lauf mittels eines Kontaktschlusses 0,05 min vor dem Transfer gestartet. Folgende PTV-Solvent Vent-Bedingungen wurden am MMI eingestellt: Trägergas H₂; Septum-Spülfluss 3 mL/min; Vent-Fluss 1000 mL/min; Vent-Druck 4 psi bis 0,5 min; 50 °C (0,5 min), mit 900 °C/min auf 350 °C (2 min); ab 0,5 min Spülfluss ans Split-Ventil 2,5 mL/min. Am PCM-C Modul wurde folgendes Druckprogramm für den Transfer programmiert: 5 psi (0.3 min), anschließend mit 10 psi/min auf 20 psi. Als GC-Trennsäule diente eine Rtx-200MS, 27 m x 0,25 mm, 0,1 µm d_f (Restek GmbH, Bad Homburg, D). Der Trägergasfluss wurde auf einen konstanten Fluss von 1,5 mL/min eingestellt. Die Ofentemperatur betrug bei Injektion 40 °C und wurde für 2 min gehalten; anschließend mit 100 °C/min auf 100 °C, dann mit 15 °C/min auf 310 °C programmiert, 2 min gehalten, mit 1,5

C°/min auf 340°C geheizt und 3 min gehalten. Die Detektortemperatur wurde auf 360 °C gesetzt. Zur Signalverstärkung wurde Make up Gas (N₂) mit 25 mL/min verwendet. Die Aufnahme der Daten erfolgte softwaregestützt mit ChemStation Software.

3.2.8. Analytik mittels LC/MS

Die Analytik mittels LC/MS erfolgte an einem Dionex Ultimate 3000 RSLC System mit Single Quadrupol Detektor (MSQ Plus) (Dionex Softron GmbH, Germering, Deutschland). Das Injektionsvolumen betrug 5,0 µL. Als Trennsäule diente eine Luna Hexyl-Phenyl, 100 mm × 2 mm I.D.; 3 µm Partikelgröße (Phenomenex, Torrance, CA). Die Säule wurde auf 35 °C temperiert. Folgender MeOH/H₂O-Gradient wurde eingestellt: 90 % MeOH, binnen 2 min auf 95 % MeOH, 3 min bei 95 %, anschließend binnen 15 min auf 100 % MeOH (5 min). Der Eluentenstrom wurde nach der Trennsäule mit Hilfe eines T-Stückes und einer Restriktionskapillare im Verhältnis 1:8 geteilt; wodurch nur 12,5 % in die Ionenquelle des MSQ gelangten.

Die (APCI)-MS-Bedingungen für die Sterylester-Analytik mittels LC/MS wurden von Mezzine *et al.* (32) übernommen; folgende Parameter wurden am MSQ eingestellt: Ionisation: APCI (positiv); Temperatur der Probe: 400 °C; Stickstoff-Eingangsdruck: 40 psi; Cone-Spannung: 80.00 V; Corona-Strom 8 µA. Die Datenverarbeitung erfolgte mit Chromeleon®-Software 6.80 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. Kapillargaschromatographische Analytik von Phytosteryl-/stanylfettsäureestern

4.1.1. Einleitung

Die für den Einsatz in Lebensmitteln zugelassenen Esterpräparate sind hinsichtlich des Sterol-/Stanolprofils und der Fettsäurequelle spezifiziert. In Abhängigkeit von den eingesetzten Quellen können die Sterol- und Fettsäurereste verschiedener Phytosteryl-/stanylesterpräparate beachtlich variieren. Zur Gewährleistung des gesundheitlichen Verbraucherschutzes sind daher für die Lebensmittelüberwachung sowohl qualitative als auch quantitative Verfahren zur Bestimmung von Phytosterolen/-stanolen und deren Estern in angereicherten Lebensmitteln erforderlich. Zudem wurden in Abhängigkeit der veresterten Strukturen unterschiedliche Hydrolyseraten z.B. durch Pankreas-Cholesterolesterase berichtet (164). Die Zusammensetzung der Esterpräparate könnte folglich einen Einfluss auf den cholesterinsenkenden Effekt aufweisen (165).

Die offiziellen Referenzmethoden zur Bestimmung pflanzlicher Sterole dienen der Untersuchung dieser natürlich vorkommenden Minorbestandteile in Pflanzenölen und Fetten. Momentan existiert keine offizielle Analysenmethode zur Untersuchung von Phytosterolen/-stanolen und deren intakter Ester in den zur Anreicherung eingesetzten Präparaten bzw. in den angereicherten Produkten (22, 23, 25). Die Bestimmung von Phytosterolen erfolgt meist indirekt, nach alkalischer Hydrolyse und Derivatisierung der freigesetzten Sterole mittels GC/FID (21-23, 25), wodurch die Information über veresterte Fettsäuren verloren geht. Bisherige Ansätze zur kapillargaschromatographischen Trennung intakter Ester an unpolaren stationären Phasen waren unbefriedigend, da zum Beispiel unterschiedlich gesättigte C18-Sterylester nicht differenziert werden konnten (28-30). Unter Verwendung einer mittelpolaren stationären Phase (50%-Phenyl-50%-methylpolysiloxan) gelang dies zwar für einzelne Sterylester, allerdings war bei der Analytik komplexer Phytosterylestermischungen keine Bestimmung individueller C18-Ester mehr möglich (27). Eine kapillargaschromatographische Trennung pflanzlicher Stanylester bzw. von Phytosteryl-/stanylester-Mischungen wurde bisher nicht beschrieben. Zudem ist die kapillargaschromatographische Quantifizierung von Sterylestern durch thermisch bedingte Degradierung der Analyten während des Analysenlaufes möglicherweise erschwert (26, 147, 148).

Daher waren die Ziele dieser Studie (i) die Optimierung der GC-Trennbedingungen für die Untersuchung komplexer Phytosteryl-/stanylestermischungen, (ii) die Etablierung einer GC-Methodik zur Quantifizierung individueller Ester, (iii) die Anwendung auf kommerziell erhältliche angereicherte Magermilch-Trinkjoghurtprodukte, da bei dieser Produktgruppe keine die Chromatographie störende Fettmatrix zu erwarten ist, sowie (iv) die Entwicklung und Verifizierung einer routinetauglichen und schnellen Aufarbeitungsmethodik.

4.1.2. Methodenentwicklung

4.1.2.1. Identifizierung mittels GC/MS

Aus der Literatur war bekannt, dass die Fragmentierung von Sterylestern längerkettiger Fettsäuren mittels Elektronenstoßionisation (EI) der von Sterylacetaten ähnelt (166-172). Es waren jedoch nur für wenige pflanzliche Steryl-/stanylester EI-Massenspektren beschrieben (166, 171-173).

Fettsäureester pflanzlicher Sterole und Stanole waren kommerziell nicht verfügbar. Mit Hilfe enzymkatalysierter Umesterung von Fettsäuremethylestern mit freien Sterolen/Stanolon wurden insgesamt 20 Stanyl- und 34 Δ^5 -Sterylester langkettiger Fettsäuren dargestellt (3.2.1). Die Charakterisierung der synthetisierten Ester erfolgte mittels GC/(EI)MS (70 eV). Beispielhaft sind die Spektren von Sitosteryloleat und Sitostanyloleat in Abbildung 16 gezeigt. Die charakteristischen Fragmente der Δ^5 -Phytosterylester sind in Tabelle 10 aufgeführt, die der Phytostanylester in Tabelle 11.

Unabhängig vom Sättigungsgrad der veresterten Fettsäure trat bei allen Δ^5 -Sterylestern das Fragment $[M-FS]^+$ als Basispeak auf. Dieses entsteht durch Abspaltung der Fettsäure vom Ester, wobei die positive Ladung am Sterolrest verbleibt. Durch Abspaltung einer Methylgruppe, bevorzugt an Position 19 (169), wird das Ion $[M-FS-15]^+$ gebildet. Werden vom Fragment $[M-FS]^+$ die Ringe A und B abgespalten, entsteht das Fragment $[M-FS-121]^+$. Wird neben der Fettsäure auch die Seitenkette eliminiert, liegt das Fragment $[M-FS-SK]^+$ vor. Durch Spaltung der C13/C17- und der C14/C15- Bindungen an $[M-FS-SK]^+$ mit anschließendem Protonenübergang entsteht das Fragment $[M-FS-SK-42]^+$, bei welchem zusätzlich Ring D eliminiert ist. Die Fragmentierung von Stanylestern (Tabelle 11) unterscheidet sich teilweise von der von Δ^5 -Sterylestern (Tabelle 10). Stanylester bilden zum Beispiel nach Eliminierung der Fettsäure und einer *retro*-Diels-Alder-Reaktion das Fragment $[M-FS-54]^+$. Die Reaktion erfolgt nach 1,2-Eliminierung der funktionellen Gruppe unter Abspaltung von Butadien aus

dem Δ^2 -Sterol. Bei der Fragmentierung von Δ^5 -Sterylestern ist diese Reaktion durch die gebildete Dienstruktur nicht möglich (174).

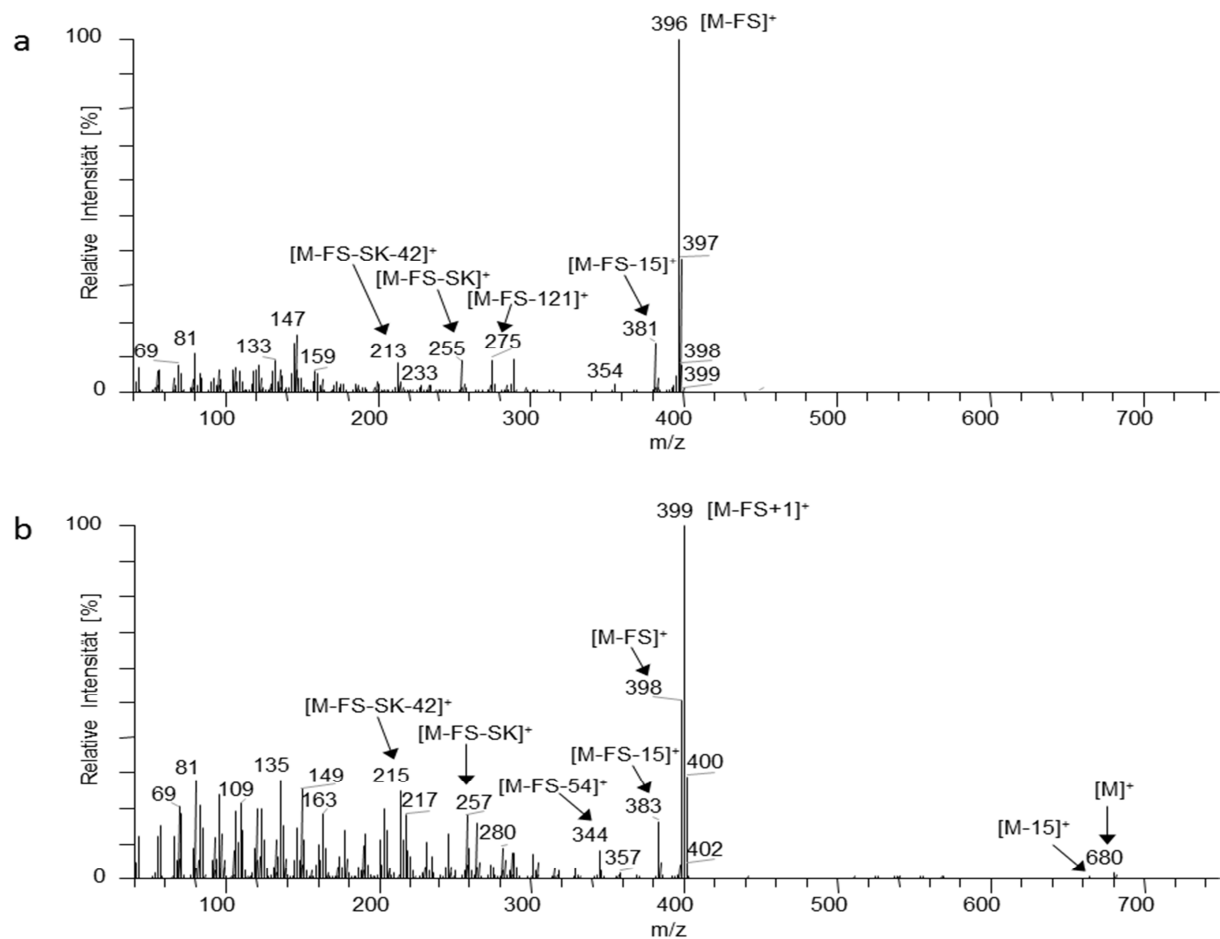


Abbildung 16: EI-MS-Spektren von enzymatisch synthetisiertem Sitosteryloleat (a) und Sitostanyloleat (b). Bedingungen siehe 3.2.2

Bei Δ^5 -Sterylestern gesättigter Fettsäuren wurden keine Molekülonen beobachtet. Bei Sterylestern mehrfach ungesättigter Fettsäuren konnte ein Molekülon sowie das Fragment [M-SK]⁺ in schwacher Intensität detektiert werden (Tabelle 10). In den Spektren der Stanylfettsäureester (Tabelle 11) waren stets Molekülonen präsent. Das Fragment [M-FS]⁺ stellte bei Stanylestern gesättigter Fettsäuren, analog zu den Δ^5 -Sterylestern stets den Basispeak dar. Bei Stanylestern ungesättigter Fettsäuren wies das Fragment [M-FS+1]⁺ die höchste Intensität auf. Zusätzlich wurden bei Stanylestern gesättigter Fettsäuren, analog zu den Stanylacetaten (175), ein Fragment [M-SK-42]⁺ detektiert, welches aus der Abspaltung von der Seitenkette und Ring D hervorgeht.

Tabelle 10: Charakteristische EI-MS Fragmente von Δ^5 -Phytosterylfettsäureestern

Δ^5 -Phytosterylester	[M] ⁺	[M-15] ⁺	[M-FS+1] ⁺	[M-FS] ⁺	[M-FS-15] ⁺	[M-FS-121] ⁺	[M-FS-SK] ⁺	[M-FS-SK-42] ⁺	m/z 81	m/z 95	Andere
Brassicasteryl 14:0	608 (-) ¹	593 (-)	381 (31)	380 (100)	365 (7)	259 (2)	255 (29)	213 (8)	81 (18)	95 (5)	337 (3)
Brassicasteryl 16:0	636 (-)	621 (-)	381 (32)	380 (100)	365 (7)	259 (2)	255 (29)	213 (7)	81 (16)	95 (5)	337 (3)
Brassicasteryl 18:0	664 (-)	649 (-)	381 (33)	380 (100)	365 (7)	259 (2)	255 (31)	213 (8)	81 (21)	95 (5)	337 (2)
Brassicasteryl 18:1	662 (-)	647 (-)	381 (34)	380 (100)	365 (6)	259 (2)	255 (29)	213 (14)	81 (19)	95 (7)	337 (3)
Brassicasteryl 18:2	660 (0.8)	645 (0.1)	381 (43)	380 (100)	365 (7)	259 (2)	255 (27)	213 (12)	81 (29)	95 (11)	337 (4) 535 (0.3)
Brassicasteryl 18:3	658 (0.9)	643 (0.2)	381 (49)	380 (100)	365 (8)	259 (2)	255 (51)	213 (16)	81 (47)	95 (19)	337 (5) 533 (0.5)
Brassicasteryl 20:0	692 (-)	678 (-)	381 (29)	380 (100)	365 (10)	259 (-)	255 (29)	213 (9)	81 (25)	95 (5)	337 (2)
Campesteryl 14:0	610 (-)	595 (-)	383 (33)	382 (100)	367 (16)	261 (9)	255 (9)	213 (7)	81 (10)	95 (6)	
Campesteryl 16:0	638 (-)	623 (-)	383 (37)	382 (100)	367 (14)	261 (8)	255 (8)	213 (7)	81 (9)	95 (5)	
Campesteryl 18:0	666 (-)	651 (-)	383 (35)	382 (100)	367 (14)	261 (8)	255 (8)	213 (6)	81 (9)	95 (5)	
Campesteryl 18:1	664 (-)	649 (-)	383 (42)	382 (100)	367 (17)	261 (10)	255 (8)	213 (9)	81 (13)	95 (6)	
Campesteryl 18:2	662 (0.6)	647 (-)	383 (60)	382 (100)	367 (15)	261 (10)	255 (11)	213 (11)	81 (22)	95 (10)	535 (0.2)
Campesteryl 18:3	660 (0.7)	645 (-)	383 (61)	382 (100)	367 (20)	261 (11)	255 (11)	213 (13)	81 (31)	95 (11)	533 (0.2)
Campesteryl 20:0	694 (-)	679 (-)	383 (37)	382 (100)	367 (13)	261 (8)	255 (8)	213 (7)	81 (9)	95 (5)	
Campesteryl 22:0	722 (-)	707 (-)	383 (36)	382 (100)	367 (12)	261 (8)	255 (8)	213 (8)	81 (12)	95 (6)	
Campesteryl 22:1	720 (-)	705 (-)	383 (33)	382 (100)	367 (7)	261 (8)	255 (9)	213 (9)	81 (9)	95 (8)	
β -Sitosteryl 14:0	624 (-)	609 (-)	397 (34)	396 (100)	381 (16)	275 (9)	255 (9)	213 (7)	81 (10)	95 (6)	
β -Sitosteryl 16:0	652 (-)	637 (-)	397 (35)	396 (100)	381 (14)	275 (8)	255 (8)	213 (7)	81 (10)	95 (5)	
β -Sitosteryl 18:0	680 (-)	665 (-)	397 (35)	396 (100)	381 (13)	275 (7)	255 (8)	213 (6)	81 (9)	95 (5)	
β -Sitosteryl 18:1	678 (-)	663 (-)	397 (38)	396 (100)	381 (14)	275 (8)	255 (9)	213 (8)	81 (11)	95 (6)	
β -Sitosteryl 18:2	676 (0.7)	661 (0.1)	397 (56)	396 (100)	381 (17)	275 (11)	255 (12)	213 (10)	81 (22)	95 (11)	535 (0.2)
β -Sitosteryl 18:3	674 (0.9)	659 (0.1)	397 (70)	396 (100)	381 (19)	275 (12)	255 (12)	213 (11)	81 (25)	95 (13)	533 (0.5)
β -Sitosteryl 20:0	708 (-)	693 (-)	397 (36)	396 (100)	381 (12)	275 (8)	255 (8)	213 (6)	81 (9)	95 (5)	
β -Sitosteryl 22:0	736 (-)	721 (-)	397 (35)	396 (100)	381 (11)	275 (8)	255 (8)	213 (6)	81 (11)	95 (5)	
β -Sitosteryl 22:1	734 (-)	719 (-)	397 (35)	396 (100)	381 (12)	275 (6)	255 (10)	213 (8)	81 (17)	95 (6)	
Stigmasteryl 14:0	622 (-)	607 (-)	395 (32)	394 (100)	379 (7)	273 (2)	255 (32)	213 (8)	81 (19)	95 (6)	351 (9)
Stigmasteryl 16:0	650 (-)	635 (-)	395 (32)	394 (100)	379 (7)	273 (2)	255 (28)	213 (7)	81 (16)	95 (5)	351 (8)
Stigmasteryl 18:0	678 (-)	663 (-)	395 (34)	394 (100)	379 (6)	273 (1)	255 (29)	213 (6)	81 (15)	95 (4)	351 (7)
Stigmasteryl 18:1	676 (-)	661 (-)	395 (34)	394 (100)	379 (7)	273 (2)	255 (28)	213 (7)	81 (18)	95 (6)	351 (8)
Stigmasteryl 18:2	674 (0.5)	659 (-)	395 (41)	394 (100)	379 (9)	273 (4)	255 (38)	213 (9)	81 (32)	95 (10)	351 (11) 535 (0.5)
Stigmasteryl 18:3	672 (0.6)	657 (-)	395 (43)	394 (100)	379 (9)	273 (2)	255 (43)	213 (10)	81 (32)	95 (12)	351 (10) 533 (0.6)
Stigmasteryl 20:0	706 (-)	691 (-)	395 (32)	394 (100)	379 (6)	273 (1)	255 (25)	213 (6)	81 (14)	95 (5)	351 (6)
Stigmasteryl 22:0	734 (-)	719 (-)	395 (34)	394 (100)	379 (6)	273 (1)	255 (25)	213 (10)	81 (16)	95 (6)	351 (6)
Stigmasteryl 22:1	732 (-)	717 (-)	395 (32)	394 (100)	379 (5)	273 (1)	255 (28)	213 (6)	81 (18)	95 (5)	351 (7)

¹ Relative Intensitäten in Klammern² Fragment wurde nicht erhalten

Bei der Fragmentierung von $\Delta^{5,22}$ -Sterylestern wurde im Vergleich zu Δ^5 -Sterylestern mit gesättigter Seitenkette das Ion $[M-FS-SK]^+$ bevorzugt gebildet (175); zusätzlich durch Abspaltung der terminalen Isopropylgruppe an C20/C22 ein Ion $[M-FS-43]^+$.

Charakteristische Fragmente der Fettsäurereste wurden nur bei Stanylestern mehrfach

ungesättigter Fettsäuren beobachtet: die Ionen mit m/z 280 (18:2-Ester) bzw. m/z 278 (18:3-Ester) deuten auf die Bildung eines $[FS]^+$ -Fragmentes hin. Bei Steryl- und Stanylestern traten zudem die beschriebenen Fettsäurefragmente m/z 81 $[C_6H_9]$, wahrscheinlich ein Cyclohexenylkation (18), und m/z 95 $[C_7H_{11}]$ in höheren Intensitäten auf (166).

Tabelle 11: Charakteristische EI-MS Fragmente von Phytostanylfettsäureestern

Phytostanylester	[M] ⁺	[M-15] ⁺	[M-FS+1] ⁺	[M-FS] ⁺	[M-FS-15] ⁺	[M-FS-54] ⁺	[M-FS-SK] ⁺	[M-FS-SK-42] ⁺	m/z 81	m/z 95	Andere
Campestanyl 14:0	612 (3) ¹	597 (1)	385 (34)	384 (100)	369 (36)	330 (10)	257 (16)	215 (84)	81 (20)	95 (16)	443 (3)
Campestanyl 16:0	640 (3)	625 (0.5)	385 (37)	384 (100)	369 (36)	330 (11)	257 (17)	215 (80)	81 (18)	95 (14)	471 (3)
Campestanyl 16:1	638 (1)	623 (0.4)	385 (100)	384 (47)	369 (18)	330 (9)	257 (20)	215 (31)	81 (28)	95 (25)	
Campestanyl 18:0	668 (2)	653 (0.5)	385 (34)	384 (100)	369 (34)	330 (10)	257 (18)	215 (66)	81 (15)	95 (12)	499 (2)
Campestanyl 18:1	666 (1)	651 (0.1)	385 (100)	384 (47)	369 (17)	330 (9)	257 (21)	215 (25)	81 (28)	95 (24)	
Campestanyl 18:2	664 (4)	649 (- ²)	385 (100)	384 (29)	369 (14)	330 (7)	257 (26)	215 (20)	81 (44)	95 (34)	280 (67)
Campestanyl 18:3	662 (2)	647 (0.4)	385 (100)	384 (20)	369 (14)	330 (5)	257 (16)	215 (26)	81 (43)	95 (40)	277 (48) 278 (44)
Campestanyl 20:0	696 (2)	681 (0.4)	385 (37)	384 (100)	369 (29)	330 (11)	257 (20)	215 (68)	81 (18)	95 (12)	527 (2)
Campestanyl 22:0	724 (3)	709 (0.2)	385 (43)	384 (100)	369 (36)	330 (9)	257 (25)	215 (73)	81 (20)	95 (13)	555 (2)
Campestanyl 22:1	722 (2)	707 (-)	385 (100)	384 (74)	369 (32)	330 (13)	257 (30)	215 (28)	81 (30)	95 (25)	
Sitostanyl 14:0	626 (4)	611 (0.7)	399 (37)	398 (100)	383 (38)	344 (10)	257 (16)	215 (78)	81 (20)	95 (16)	443 (3)
Sitostanyl 16:0	654 (3)	639 (0.6)	399 (35)	398 (100)	383 (35)	344 (10)	257 (18)	215 (73)	81 (18)	95 (14)	471 (3)
Sitostanyl 16:1	652 (2)	637 (0.2)	399 (100)	398 (45)	383 (17)	344 (8)	257 (17)	215 (26)	81 (29)	95 (24)	
Sitostanyl 18:0	682 (3)	667 (0.5)	399 (36)	398 (100)	383 (34)	344 (10)	257 (16)	215 (69)	81 (16)	95 (13)	499 (2)
Sitostanyl 18:1	680 (2)	665 (0.3)	399 (100)	398 (51)	383 (17)	344 (8)	257 (19)	215 (26)	81 (29)	95 (24)	
Sitostanyl 18:2	678 (5)	663 (0.1)	399 (100)	398 (26)	383 (11)	344 (5)	257 (19)	215 (22)	81 (45)	95 (38)	280 (82)
Sitostanyl 18:3	676 (4)	661 (0.4)	399 (100)	398 (24)	383 (12)	344 (6)	257 (16)	215 (20)	81 (47)	95 (47)	277 (62) 278 (58)
Sitostanyl 20:0	710 (2)	695 (0.4)	399 (36)	398 (100)	383 (32)	344 (10)	257 (18)	215 (71)	81 (18)	95 (14)	527 (2)
Sitostanyl 22:0	738 (3)	723 (0.4)	399 (37)	398 (100)	383 (32)	344 (10)	257 (21)	215 (69)	81 (18)	95 (14)	555 (2)
Sitostanyl 22:1	736 (2)	721 (-)	399 (100)	398 (58)	383 (20)	344 (9)	257 (33)	215 (34)	81 (35)	95 (27)	

¹ Relative Intensitäten in Klammern

² Fragment wurde nicht erhalten

Stanylfettsäureester können mittels EI-MS aufgrund des in allen Spektren präsenten Molekülions leicht identifiziert werden. Zur Identifizierung von Δ^5 -Sterylfettsäureestern zeigte sich die EI-Massenspektrometrie durch die schnelle Fragmentierung in das energetisch begünstigte Steradienfragment $[M-FS]^+$ (171) als weniger geeignet. Allerdings wurden in dieser Studie bei Δ^5 -Stanylestern mehrfach ungesättigter Fettsäuren Molekülionen in schwacher Intensität beobachtet.

4.1.2.2. GC-Trennung

Die kapillargaschromatographische Untersuchung von Phytosteryl-/stanylfett-

säureestern an unpolaren stationären Phasen, wie zum Beispiel einer DB-5 (5 %-Diphenyl-dimethylpolysiloxan) (29, 30) oder einer DB-1 (Dimethylpolysiloxan) (28), ist mangels Trennung nach Sättigungsgrad veresterter Fettsäurereste unbefriedigend (29). Der Einsatz polarerer stationärer Phasen, wie zum Beispiel der zur Triglyceridanalytik empfohlenen temperaturstabilen TAP (50 %-Phenyl-50 %-methylpolysiloxan) könnte dieses Trennproblem lösen, allerdings sind die beschriebenen Daten inkonsistent (27, 31). Daher wurden zu Beginn die Kapillarsäulen DB-5ht (5 %-Diphenyl-95 %-dimethylpolysiloxan; 27 m x 0,25 mm; 0,1 μm d_f ; J & W Scientific), Rtx-65TG (65 %-Diphenyl-35 %-dimethylpolysiloxan; 30 m x 0,25 mm; 0,1 μm d_f ; Restek GmbH) und Rtx-200MS (Trifluorpropylmethylpolysiloxan; 30 m x 0,25 mm; 0,1 μm d_f ; Restek GmbH) hinsichtlich ihrer Eignung zur Trennung von Phytosteryl-/stanylestern (3.2.3.1) untersucht. Die GC-Trennung eines industriellen Stanylesternmusters auf diesen stationären Phasen ist in Abbildung 17 vergleichend dargestellt.

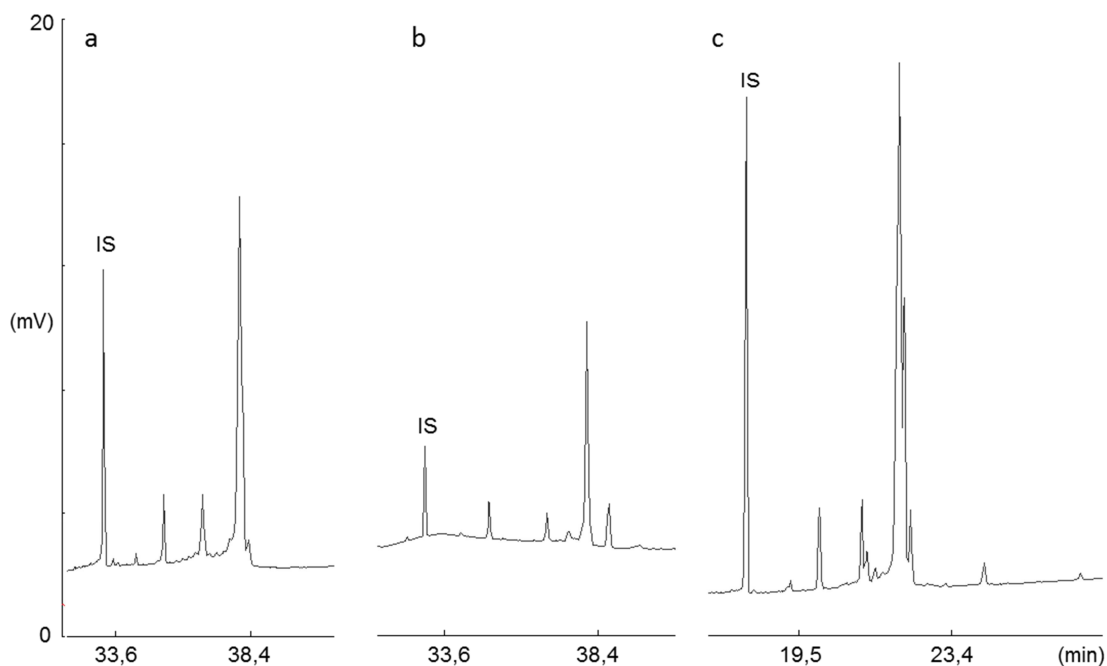


Abbildung 17: Kapillargaschromatographische Trennung des Musters STAEST-115 „Plant Stanol Ester“ an den stationären Phasen DB-5ht (a), Rtx-65TG (b) und Rtx-200MS (c). Bedingungen siehe 3.2.3.1

Die beste Auflösung und der höchste Detektorresponse wurden mit der mittelpolaren Rtx-200MS erreicht. Die relativen Retentionszeiten enzymatisch synthetisierter Steryl- und Stanylester bezogen auf Cholesterylpalmitat auf Rtx-200MS sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Relative Retentionszeiten (RRT) enzymatisch synthetisierter Steryl- und Stanylfettsäureester bezogen auf Cholesterylpalmitat auf Rtx-200MS

Nr.	Sterylester	RRT
1	Cholesteryl 14:0	0,920
2	Brassicasteryl 14:0	0,933
3	Campesteryl 14:0	0,964
4	Stigmasteryl 14:0	0,968
5	Campestanyl 14:0	0,974
15	Cholesteryl 16:0	1,000
6	β -Sitosteryl 14:0	1,000
7	Sitostanyl 14:0	1,010
8	Brassicasteryl 16:0	1,014
9	Campesteryl 16:0	1,052
10	Stigmasteryl 16:0	1,056
11	Campestanyl 16:0	1,063
12	Campestanyl 16:1	1,064
13	Cholesteryl 18:1	1,086
14	Cholesteryl 18:2	1,092
15	β -Sitosteryl 16:0	1,093
16	Cholesteryl 18:3	1,102
17	Sitostanyl 16:0	1,104
18	Brassicasteryl 18:1	1,106
19	Sitostanyl 16:1	1,107
20	Brassicasteryl 18:0	1,107
21	Brassicasteryl 18:2	1,112
22	Brassicasteryl 18:3	1,122
23	Campesteryl 18:1	1,150
24	Campesteryl 18:0	1,151
25	Stigmasteryl 18:1	1,154
26	Stigmasteryl 18:0	1,155
27	Campesteryl 18:2	1,158
28	Stigmasteryl 18:2	1,162
29	Campestanyl 18:1	1,163
30	Campestanyl 18:0	1,165
31	Campesteryl 18:3	1,168
32	Campestanyl 18:2	1,171
33	Stigmasteryl 18:3	1,175
34	Campestanyl 18:3	1,181
35	Cholesteryl 20:0	1,192
36	β -Sitosteryl 18:0	1,198
37	β -Sitosteryl 18:1	1,199
38	β -Sitosteryl 18:2	1,207
39	Sitostanyl 18:0	1,212
40	Sitostanyl 18:1	1,214
41	Brassicasteryl 20:0	1,215
42	β -Sitosteryl 18:3	1,217
43	Sitostanyl 18:2	1,221
44	Sitostanyl 18:3	1,232
45	Campesteryl 20:0	1,267
46	Stigmasteryl 20:0	1,271
47	Campestanyl 20:0	1,282
48	β -Sitosteryl 20:0	1,324
49	Sitostanyl 20:0	1,337
50	Brassicasteryl 22:0	1,338
51	Brassicasteryl 22:1	1,338
52	Campesteryl 22:0	1,394
53	Campesteryl 22:1	1,394
54	Stigmasteryl 22:0	1,398
55	Stigmasteryl 22:1	1,399
56	Campestanyl 22:0	1,411
57	Campestanyl 22:1	1,412
58	β -Sitosteryl 22:0	1,453
59	β -Sitosteryl 22:1	1,454
60	Sitostanyl 22:0	1,471
61	Sitostanyl 22:1	1,473

Die kapillargaschromatographische Untersuchung komplexer Phytosteryl-/stanylfettsäureestermischungen unter Verwendung von Trifluorpropylmethylpolysiloxan als stationäre Phase ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Trennung der Fettsäureester pflanzlicher Stanole (Abbildung 18a und b) erfolgte in Abhängigkeit von der Kettenlänge der veresterten Fettsäure und der Anzahl an C-Atomen des Stanolrestes, sowie nach dem Sättigungsgrad des Fettsäurerestes. Lediglich die Ester einfach ungesättigter und gesättigter Fettsäuren gleicher Kettenlänge, wie z.B. bei Ölsäure- und Stearinsäureestern, eluierten zur selben Zeit. Die Ester der ungesättigten C18-Fettsäuren konnten jedoch differenziert werden.

Die Elutionsreihenfolge pflanzlicher Δ^5 -Sterylester war vergleichbar zu den Stanylestern (Abbildung 18c). Lag in der Sterolquelle neben Campesterol Stigmasterol vor, eluierten die C18:2-Ester des Campesterols gemeinsam mit Stigmasteryl 18:0/18:1 (Abbildung 18f). Die Δ^5 -Sterylester und Stanylester derselben Fettsäure wurden getrennt (Abbildung 18d und e). Allerdings traten in Anwesenheit von Linolensäureestern der Δ^5 -Sterole Coelutionen mit C18:0-/C18:1- und C18:2 Estern der entsprechenden Stanole auf (Abbildung 18d). Trotz der beobachteten Co-elutionen kann die Rtx-200MS gegenüber allen bisher eingesetzten stationären Phasen als vorteilhaft angesehen werden: (i) die Ester eluierten bei geringerer Temperatur (305 – 325 °C), (ii) die Sterylester wurden von entsprechenden Stanylestern getrennt und (iii) die Ester ungesättigter Fettsäuren konnten differenziert werden.

Die industriellen Sterylestermuster unterschieden sich bezüglich der zur Veresterung eingesetzten Fettsäurequelle: Bei den Präparaten von Raisio (Abbildung 18a-d) sind stets die Ölsäuresterylester dominierend, gefolgt von den Linolsäureestern; bei den Vegapure®-Mustern von Cognis (Abbildung 18e und f) die Linolsäuresterylester, gefolgt von den Ölsäureestern. Die Überprüfung der Fettsäureverteilung in den industriellen Mustern erfolgte kapillargaschromatographisch nach Umesterung. Die Fettsäureverteilungen der Raisio-Muster stimmten mit der Codex Standard-Spezifikation für Rapsöl („low erucic acid“) überein. Die Fettsäureverteilungen der Cognis-Muster entsprach der Codex Standard-Spezifikation für Sonnenblumenöl (176).

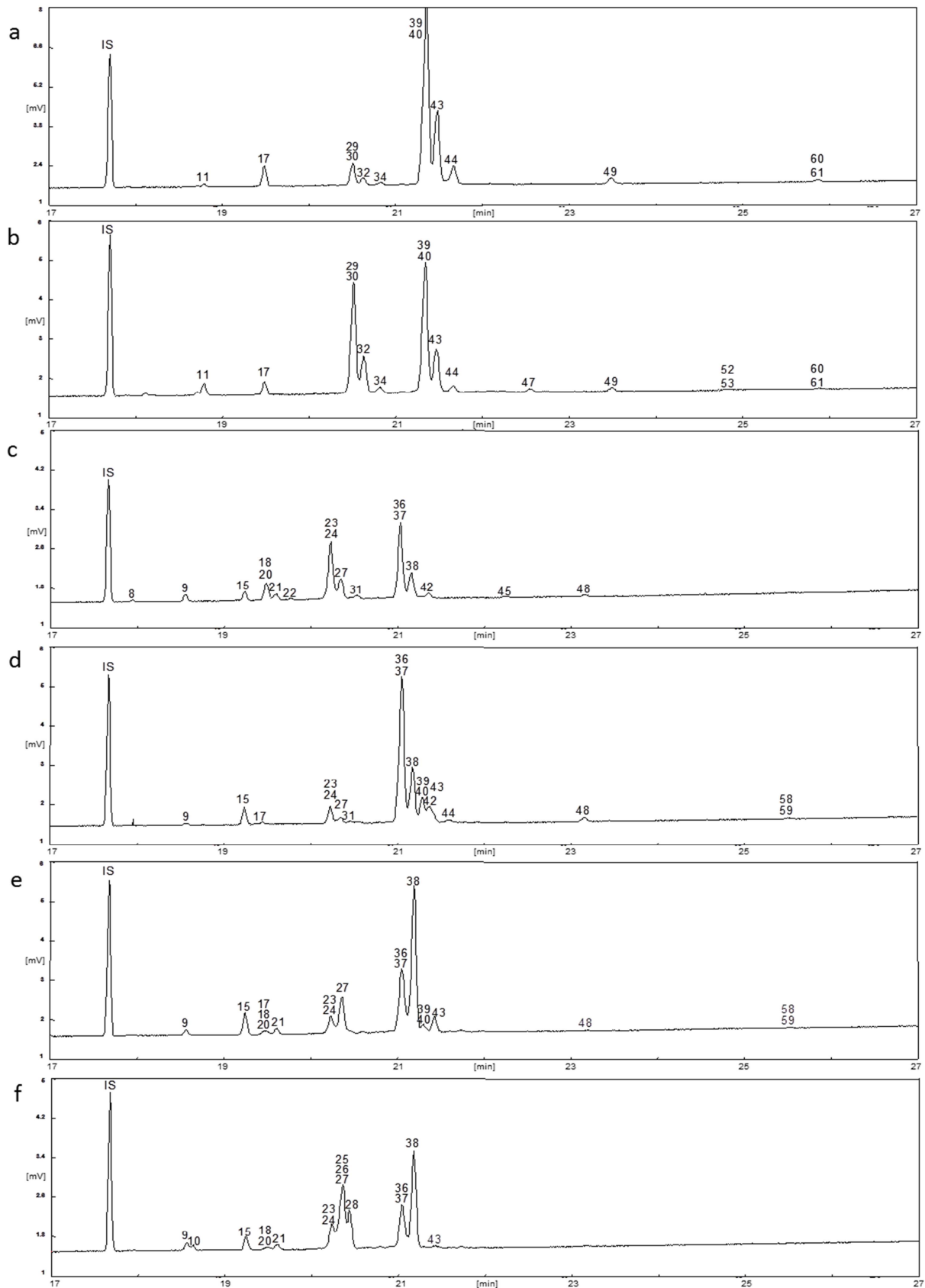


Abbildung 18: GC/FID-Trennung industrieller Phytosterylfettsäureester-Muster auf Rtx-200MS; STAEST-115, Plant Stanol Ester (a), STAEST-115, Plant Stanol Ester -rape seed stanol (b), STEREST-115, Plant Sterol Ester - rape seed (c), STEREST-113P, Plant Sterol Ester - wood based (d), Vegapure® 95E (e) und Vegapure® 95FF (f); Peaknummerierung entsprechend Tabelle 12. Bedingungen siehe 3.2.3.1

4.1.2.3. GC/FID-Response von Phytosteryl-/stanyleestern

Die kapillargaschromatographische Analytik von Fettsäurestereylestern erfordert den Einsatz sehr hoher Temperaturen. Zahlreiche Literaturstellen beschreiben die thermische Instabilität langkettiger Sterylester bei der kapillargaschromatographischen Analyse (26, 147, 148, 151, 177, 178).

Die Quantifizierung der Pflanzensteryl-/stanylester in den industriellen Mustern mit einem theoretischen Responsefaktor von 1.0 resultierte in den in Tabelle 13 aufgeführten Ergebnissen. Der Phytostanylester wurden mit diesem Ansatz zu 91 - 99 % quantifiziert, die Phytosterylester lediglich zu 72 - 78 %. Die GC-Reinheiten der industriellen Raisio-Muster wurden als ≥ 93 % bestimmt, der Estergehalt der Vegapure®-Muster war mit 96,5 % spezifiziert.

Tabelle 13: GC/FID-Response industrieller Sterylester-Muster (FocusGC, Rtx-200MS) bezüglich Cholesterylpalmitat (kalkuliert mit einem Responsefaktor von 1.0)

Bezeichnung	Produktbeschreibung	Sterylester-Response
STAEST-115	Plant Stanol Ester	98,9 ± 3,2 %
STAEST-115	Plant Stanol Ester, rape seed stanol	90,7 ± 1,3 %
STEREST-115	Plant Sterol Ester, rape seed	72,6 ± 1,7 %
STEREST-113P	Plant Sterol Ester, wood based	77,9 ± 1,8 %
Vegapure® 95E	Plant Sterol Ester, non-gm	78,3 ± 1,6 %
Vegapure® 95FF	Plant Sterol Ester	76,3 ± 2,4 %

Den höchsten Response zeigten die beiden „Plant Stanol Ester“ Muster. Der Vergleich der vier „Plant Sterol Ester“ Muster zeigt, dass „Plant Sterol Ester, wood based“ und „Vegapure® 95E“ einen höheren Response aufweisen. Diese Muster enthalten zusätzlich 8-10 % Stanylester. Bei den Mustern „Plant Sterol Ester, rape seed“ und „Vegapure® 95FF“ sind Stanylester nur in Spuren enthalten. Das mit Rapsöl veresterte Muster „Plant Sterol Ester, rape seed“ zeigte hier einen geringeren Response als das mit Sonnenblumenöl veresterte Muster „Vegapure® 95FF“, entsprechend den beiden Mischungen, in denen zusätzlich Stanylester enthalten sind. Evershed *et al.* berichteten von einer um 60 % verringerten Wiederfindung von Cholesterylarachidonat relativ zu Cholesterylpalmitat (147). Daher ist anzunehmen, dass die mehrfach ungesättigten Steryllinolenate stärker einer thermischen Degradierung unterliegen als zum Beispiel Steryloleate oder -linoleate, wodurch der

geringere Response der mit Rapsöl veresterten Muster im Vergleich zu den mit Sonnenblumenöl veresterten erklärt werden könnte.

Die thermisch bedingte Degradation von Sterylestern bei der kapillargaschromatographischen Analyse kann mit Hilfe von Responsefaktoren berücksichtigt werden: Zum Beispiel ermittelten Grob *et al.* (151) für Cholesterylstearat relativ zum acetylierten Cholesterol einen Responsefaktor von 1,15, Plank und Lorbeer (178) unter Verwendung von Betulin als internen Standard einen Responsefaktor von 1,65.

Wie aus dem Vergleich von Tabelle 13 mit Abbildung 18 ersichtlich wird, ist der Gesamtresponse der Sterylester-Muster unter denselben Analysenbedingungen abhängig von der zur Veresterung eingesetzten Sterol/Stanol- und Fettsäurequelle. Mit der Bildung von Gesamtresponsefaktoren für die entsprechenden Sterylester-Muster bliebe die unterschiedliche Degradierung einzelner Ester unbeachtet. Daher wurden die Steryl- und Stanylester entsprechend ihrer GC-Trennung gruppiert. Aus dem Verhältnis der detektierten Fettsäuren aus der FAME-Analytik zu den ermittelten Gehalten aus der Sterylester-Analytik wurden für die Gruppierungen nicht vollständig getrennter Fettsäuresteryl-/stanylester jeweils Responsefaktoren berechnet. Diese sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Responsefaktoren für Δ^5 -Steryl- und Stanylfettsäureester, bezogen auf Cholesterylpalmitat

Veresterte Fettsäure	Sterylester	Stanylester
Palmitin- und Palmitoleinsäure	1,14	0,88
Stearin-, Öl- und Linolsäure	1,32	1,00
Linolensäure	1,97	1,14
Arachidon-, Eicosaensäure		1,24
Behen- und Erucasäure	3,05	1,62

Die ermittelten Responsefaktoren der Stanylester waren grundsätzlich geringer als die der entsprechenden Sterylester. Ester der gesättigten Stanole scheinen gegenüber thermisch bedingter Degradierung stabiler zu sein.

Mit Hilfe der Responsefaktoren konnten die Gehalte der einzelnen Sterylester in den industriellen Mustern berechnet werden. Die unter Berücksichtigung der Responsefaktoren korrigierten Quantifizierungen der industriellen Muster sind in Tabelle 15 aufgeführt. Der Gehalt an freien Sterolen bzw. anderen Verunreinigungen wurde hierbei vernachlässigt.

Tabelle 15: Mittels GC/FID bestimmte Zusammensetzungen industrieller Phytosterylester-Muster [Gew-%] unter Berücksichtigung der Responsefaktoren

Sterylester	Plant Stanol Ester	Plant Stanol Ester rape seed stanols	Plant Sterol Ester rape seed	Plant Sterol Ester wood based	Vegapure® 95E	Vegapure® 95FF
Brassicasteryl 16	-	-	0,4 ± 0,0	-	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Campesteryl 16	-	-	1,9 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,8 ± 0,1
Stigmasteryl 16	-	-	-	-	-	1,0 ± 0,0
Campestanyl 16:0/16:1	0,6 ± 0,0	2,5 ± 0,1	-	-	-	-
β-Sitosteryl 16	-	-	2,5 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,6 ± 0,1	3,1 ± 0,1
Sitostanyl 16:0/16:1	3,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1	-	0,5 ± 0,1	1,4 ¹ ± 0,3	-
Brassicasteryl 18:0/18:1	-	-	6,6 ± 0,1	-	-	0,9 ± 0,1
Brassicasteryl 18:2	-	-	2,4 ± 0,1	-	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Brassicasteryl 18:3	-	-	0,6 ± 0,2	-	-	-
Campesteryl 18:0/18:1	-	-	23,8 ± 0,8	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,1	6,6 ± 0,1
Campesteryl 18:2	-	-	8,7 ± 0,4	2,2 ± 0,1	11,6 ± 0,2	25,2 ² ± 0,9
Stigmasteryl 18:0/18:1	-	-	-	-	-	-
Stigmasteryl 18:2	-	-	-	-	-	10,5 ± 0,3
Campestanyl 18:0/18:1	5,6 ± 0,2	26,2 ± 1,0	-	0,7 ⁴ ± 0,0	0,5 ± 0,0	-
Campesteryl 18:3	-	-	2,7 ± 0,1	-	-	-
Campestanyl 18:2	2,3 ± 0,1	8,5 ± 0,1	-	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0	-
Campestanyl 18:3	2,1 ± 0,2	2,6 ± 0,1	-	-	-	-
β-Sitosteryl 18:0/18:1	-	-	30,6 ± 0,6	50,8 ± 1,4	23,0 ± 0,6	15,4 ± 0,4
β-Sitosteryl 18:2	-	-	11,5 ± 0,3	18,7 ± 0,5	43,5 ± 0,8	29,7 ± 1,0
β-Sitosteryl 18:3	-	-	3,9 ± 0,2	±	-	-
Sitostanyl 18:0/18:1	54,5 ± 2,1	31,1 ± 0,3	-	6,7 ⁵ ± 0,2	1,8 ± 0,0	-
Sitostanyl 18:2	19,2 ± 0,9	10,0 ± 0,4	-	5,0 ⁵ ± 0,3	3,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Sitostanyl 18:3	6,2 ± 0,2	1,8 ± 0,1	-	0,9 ± 0,1	-	-
Unbekannt ⁶	-	-	-	-	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,1
Campesteryl 20	-	-	1,2 ± 0,1	-	-	-
Campestanyl 20	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,1	-	-	-	-
β-Sitosteryl 20	-	-	1,9 ± 0,1	3,3 ± 0,1	-	-
Sitostanyl 20	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,0	-	-	-	-
Campestanyl 22:0/22:1	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	-	-	-	-
Sitostanyl 22:0/22:1	0,8 ± 0,0	0,4 ± 0,0	-	-	-	-
Gesamtstergehalt	99,6 ± 2,7	91,9 ± 1,3	98,5 ± 2,3	98,9 ± 2,9	99,1 ± 2,3	96,4 ± 3,0

¹ Co-elution mit Brassicasteryl 18:0/18:1

² Co-elution mit Stigmasteryl 18:0/18:1

³ Co-elution mit Stigmasteryl 18:2

⁴ Co-elution mit Campesteryl 18:3

⁵ Co-elution mit β-Sitosteryl 18:3

⁶ als Δ⁷-Stigmasteryl 18:2 + Δ⁵-Avenasteryl 18:2 zugeordnet

4.1.2.4. GC/FID-Kalibrierung

Die GC/FID-Kalibrierungen zur Quantifizierung individueller Ester erfolgten mittels linearer Regressionsanalyse in einem Koordinatensystem aus dem Peakflächenverhältnis (individueller Ester / IS) und dem Mengenverhältnis (individueller Ester / IS). Beispielhaft ist

in Abbildung 19 die Kalibrierkurve von Sitostanyl 18:0/-18:1 dargestellt.

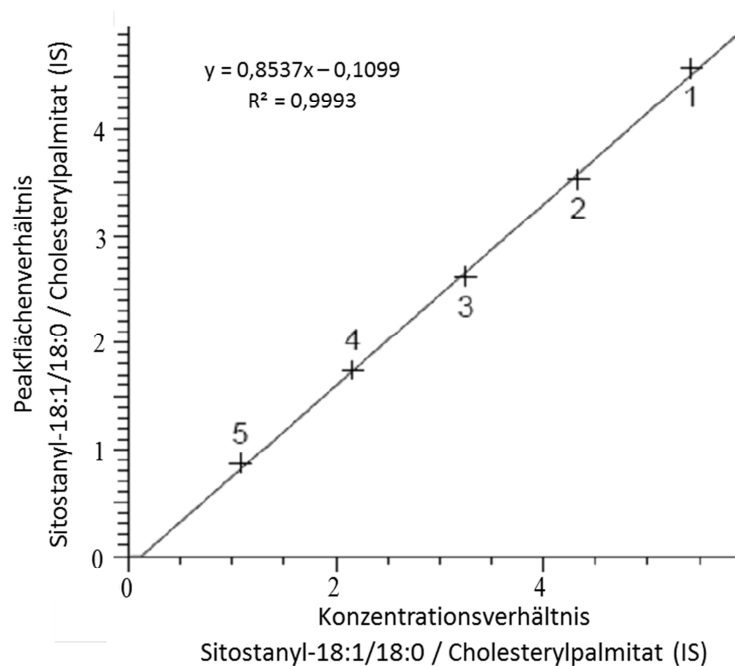


Abbildung 19: Kalibrierkurve von Sitostanyl 18:1/18:0 (GC/FID)

Jeder Kalibrierpunkt wurde in Dreifachbestimmung ermittelt. Die Korrelationskoeffizienten lagen stets zwischen 0,9985 und 0,9999. Die ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32645 (179) für die kalibrierten Pflanzenstanylester sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen [$\mu\text{g}/\text{mL}$] für Pflanzenstanylester mittels GC/FID

Fettsäurerest	16:0/16:1	18:0/18:1	18:2	18:3	20:0/20:1	22:0/22:1
Campestanylester	0,05 ¹ (0,15 ²)	0,11 (0,32)	0,10 (0,30)	0,10 (0,30)	- ³	-
Sitostanylester	0,05 (0,15)	0,14 (0,41)	0,18 (0,53)	0,43 (1,28)	0,18 (0,54)	0,27 (0,80)

¹ Nachweisgrenze (μg pro mL Injektionslösung)

² Bestimmungsgrenze (μg pro mL Injektionslösung)

³ Ester nicht kalibriert

4.1.2.5. Synthese und Aufreinigung von Referenzsubstanzen/-mischungen

Aufgrund der thermisch bedingten Degradierung individueller Phytosteryl-/stanylester im Verlauf einer kapillargaschromatographischen Bestimmung (4.1.2.3) ist für eine

Quantifizierung eine Kalibrierung mit entsprechenden Referenzsubstanzen, wie in Kapitel 4.1.2.4 beschrieben, erforderlich. Da entsprechende Referenzsubstanzen/-mischungen nicht immer zur Verfügung stehen, wurde in Anlehnung an die Patente US 6410758 (180) und WO 2007/101580 (125) eine Methode entwickelt, um individuelle Phytosteryl-/stanylester sowie komplexe Mischungen im Labormaßstab zu synthetisieren (siehe Material und Methoden; Kap. 3.2.5). Nach 25 Stunden Reaktionszeit lag nur noch ein kleiner Anteil Sterole bzw. Stanole frei vor (Tabelle 17). Nach Abtrennung der Fettsäuren mittels alkalischer Flüssig-Flüssig Extraktion lagen die mittels GC/FID bestimmten Reinheiten der Estermischungen in einem Bereich von 87-98 Flächen-% (Tabelle 17). In den Mischungen mit einem höheren Anteil an gesättigten Verbindungen, also in den Ansätzen der Stanyl- bzw. Kokosfettsäureester, gelang die Synthese und Aufreinigung besser.

Tabelle 17: Umsätze und Reinheiten synthetisierter und aufgereinigter Phytosteryl-/stanylfettsäureestermischungen (siehe Material und Methoden; Kap. 3.2.5)

Estermischung	Syntheseumsatz [%] ¹	Reinheit [area-%] ²
Reducol™ Stanol Powder + Rapsölfettsäuren	99	96
Reducol™ Stanol Powder + Sonnenblumenölfettsäuren	99	90
Reducol™ Stanol Powder + Kokosfett-Fettsäuren	99	97
Generol® 122N + Rapsölfettsäuren	96	88
Generol® 122N + Sonnenblumenölfettsäuren	95	87
Generol® 122N + Kokosfett-Fettsäuren	99	95
Generol® 867 F + Rapsölfettsäuren	98	88
Generol® 867 F + Sonnenblumenölfettsäuren	96	88
Generol® 867 F + Kokosfett-Fettsäuren	100	94

¹Syntheseumsatz [%] = $\frac{\sum \text{Peakflächen}_{\text{Ester}}}{(\sum \text{Peakflächen}_{\text{freie Sterole}} + \sum \text{Peakflächen}_{\text{Ester}})} \times 100$; n=1

²Reinheit [%] = $\frac{\sum \text{Peakflächen}_{\text{Ester}}}{(\sum \text{Peakflächen}_{\text{andere Peaks}} + \sum \text{Peakflächen}_{\text{Ester}})} \times 100$; n=1

Die Reinheit der Stanylestermischung von Rapsölfettsäuren wurde als $95,8 \pm 0,3$ Flächen-% bestimmt (n = 3). Die anschließende kapillargaschromatographische Quantifizierung der synthetisierten Stanylester (4.1.2.4) resultierte in einem Estergehalt von $97,8 \pm 1,6$ %. Dies zeigte die Eignung des entwickelten Verfahrens zur Synthese und Aufreinigung von Referenzsubstanzen.

In Abbildung 20 sind die GC/FID-Chromatogramme von chemisch synthetisierten und aufgereinigten Phytosteryl-/stanylestermischungen verschiedener Sterol- und Fettsäurequellen dargestellt.

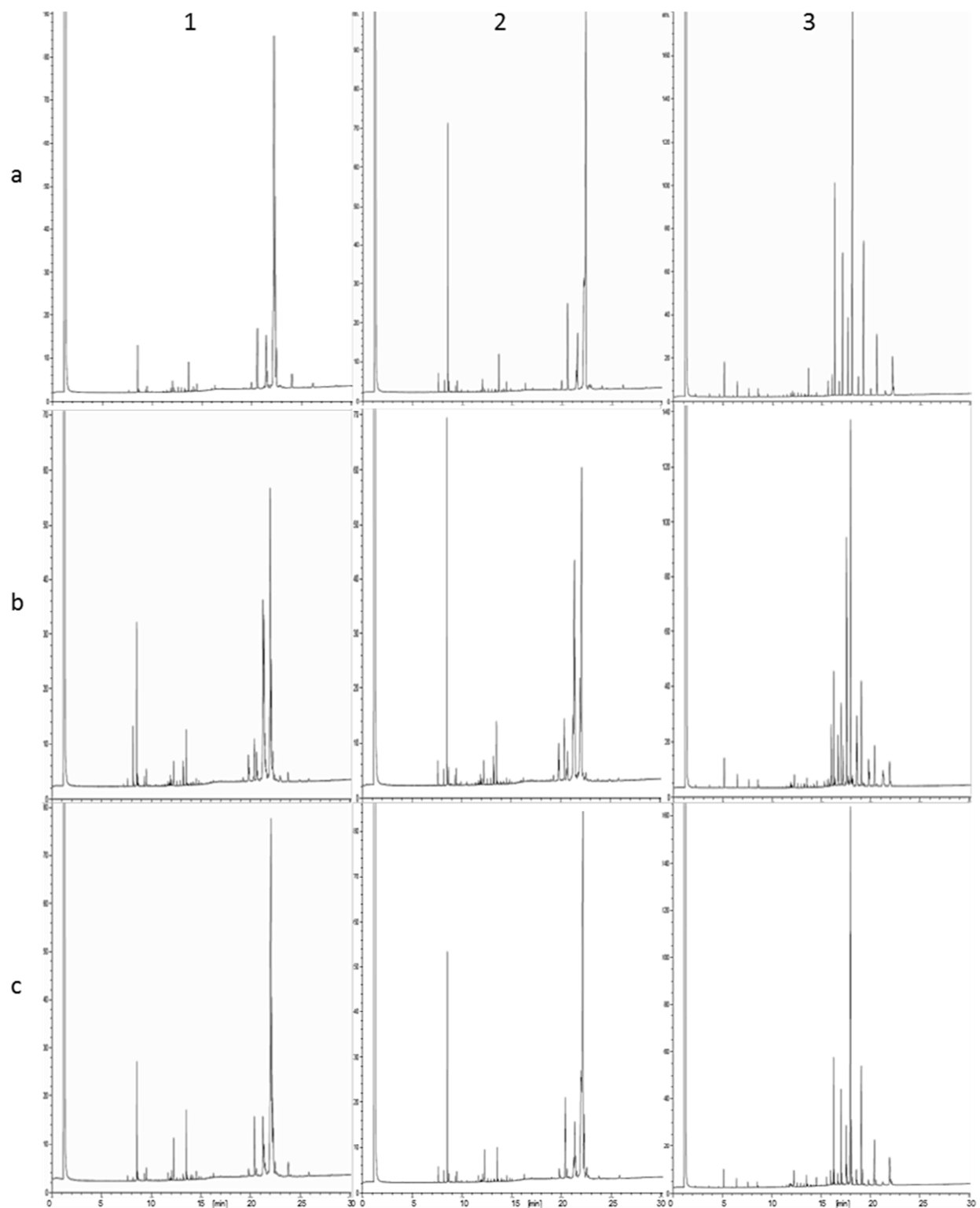


Abbildung 20: Synthetisierte und mittels alkalischer Flüssig-Flüssig Extraktion aufgereinigte Phytosteryl-/stanylestermischungen von Pflanzenstanolen (a) sowie Sterolen aus Soja (b) und Tallöl (c), jeweils verestert mit den Fettsäuren aus Rapsöl (1), Sonnenblumenöl (2) und Kokosfett (3). Bedingungen siehe 3.2.3.2

4.1.2.6. Zusammenfassung

Wichtige Steryl- und Stanylester langkettiger Fettsäuren wurden mit Hilfe

enzymkatalysierter Umesterung gewonnen und mittels GC/(EI)MS massenspektrometrisch charakterisiert. Für die kapillargaschromatographische Trennung komplexer Phytosteryl-/stanylfettsäureester-Mischungen erwies sich die mit Trifluorpropylmethylpolysiloxan als stationäre Phase beschichtete Rtx-200MS geeignet. Steryl- und Stanylester derselben Fettsäure konnten getrennt werden. Die Elution der Ester erfolgte nach Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der veresterten Fettsäuren. Lediglich die Ester gesättigter und einfach ungesättigter Fettsäuren konnten nicht differenziert werden.

Die unterschiedlichen, thermisch bedingten Degradierungen einzelner Ester während der kapillargaschromatographischen Analyse erfordern für die Quantifizierung eine Geräte-Kalibrierung mit entsprechenden Referenzsubstanzen. Da industrielle Ester-Mischungen nicht immer zur Verfügung stehen, wurde ein einfacher und schneller Ansatz zur Synthese und Aufreinigung von Referenzsubstanzen im Labormaßstab entwickelt.

4.1.3. Untersuchung angereicherter Magermilch-Trinkjoghurts (Benecol®)

Als erstes Lebensmittel wurde angereicherter Magermilch-Trinkjoghurt gewählt. Die zugesetzten Sterylester bilden den gesamten Fettanteil dieser Produkte. Mangels lipophiler Störmatrix könnte demnach die kapillargaschromatographische Analytik ohne weitere Aufarbeitung direkt aus dem Fettextrakt erfolgen.

Nach der Patentschrift WO 2007022890 (181) können Milchpulver oder aus Milch gewonnene Proteine wie Natrium- und/oder Calciumcaseinate zum Emulgieren von Sterylestern speziell für die Herstellung von Getränken und Milchprodukten, insbesondere Fermentationsprodukten wie Joghurt eingesetzt werden. Des Weiteren wurde zum Beispiel der Einsatz von Octenylsuccinat-modifizierter Stärke und unverdaulichen Dextrinen zum Emulgieren von Sterylestern beschrieben (141). Vor der Extraktion von Lipiden, welche an Proteine oder Kohlenhydrate gebunden vorliegen, ist ein Aufschluss der Matrixkomponenten notwendig. Die Methode „Bestimmung des Fettgehaltes von Milchprodukten – Verfahren nach Weibull“ (162), welche einen Salzsäure-Aufschluss vor der Soxhlet-Extraktion beinhaltet, sollte daher als Referenzmethode für die Quantifizierung der Ester bei der Entwicklung schnellerer Isolierungstechniken dienen.

4.1.3.1. Extraktion nach Weibull-Stoldt

Zur Extraktion nach Weibull-Stoldt wurden zunächst handelsübliche „mit Phytostanolestern angereicherte“ Magermilch-Trinkjoghurtprodukte der Handelsmarken

Benecol® bzw. Emmi-Benecol® eingesetzt. Der Gehalt an Pflanzenstanolen war auf allen Packungen mit 3,0 % deklariert (3.1.5.1). Circa 20 g der Proben wurden nach kräftigem Schütteln des Bechers in Dreifachbestimmung eingewogen; zusätzlich wurde je Dreifachbestimmung ein Blindwert angesetzt. Die Zugabe von 3 mL interner Standard-Lösung [50 mg/mL] erfolgte zunächst in die Soxhlet-Extraktionshülse. In weiteren Versuchen wurde der interne Standard vor der Salzsäurebehandlung zugegeben. Der Zeitpunkt der IS-Zugabe zeigte keinen Einfluss auf die Quantifizierung. Anstatt Diethylether wurde MTBE als Extraktionslösemittel eingesetzt. Die mittels GC/FID bestimmte Wiederfindung des industriellen Präparates „STAEST-115 – plant stanol ester“ (1 g) in Magermilch-Joghurt (19 g; 0,1 % Fett) betrug $96,3 \pm 1,7$ %.

Tabelle 18: Stanylester-Bestimmungen in Weibull-Stoldt-Extrakten aus angereicherten Magermilch-Trinkjoghurtprodukten

	Benecol®	Benecol® Light	Emmi-Benecol® Erdbeer	Emmi-Benecol® Orange
Fettgehalt [g/100g]¹	5,09 ± 0,01¹	4,92 ± 0,02	5,09 ± 0,01	5,05 ± 0,01
Stanylester [g/100g]²				
Campestanyl 16:0/16:1	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Sitostanyl 16:0/16:1	0,22 ± 0,00	0,22 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,21 ± 0,00
Campestanyl 18:0/18:1	0,70 ± 0,00	0,56 ± 0,01	0,72 ± 0,02	0,69 ± 0,00
Campestanyl 18:2	0,23 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,00
Campestanyl 18:3	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,02
Sitostanyl 18:0/18:1	2,37 ± 0,01	2,47 ± 0,05	2,41 ± 0,04	2,31 ± 0,03
Sitostanyl 18:2	0,88 ± 0,00	0,90 ± 0,03	0,91 ± 0,02	0,87 ± 0,01
Sitostanyl 18:3	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,00
Sitostanyl 20:0/20:1	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Sitostanyl 22:0/22:1	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Andere ²	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00
Summe Ester	4,97 ± 0,01	4,84 ± 0,12	5,16 ± 0,10	4,94 ± 0,02
Veresterte Stanole [g/100g]³	3,04 ± 0,01	2,99 ± 0,08	3,16 ± 0,06	3,02 ± 0,01
Campestanol [%]	22,0 ± 0,2	17,9 ± 0,0	22,1 ± 0,4	22,1 ± 0,4
Sitostanol [%]	77,0 ± 0,3	81,3 ± 0,0	76,4 ± 0,3	76,4 ± 0,5
Fettsäureverteilung [%]³				
16:0/16:1	5,8 ± 0,0	5,6 ± 0,0	5,4 ± 0,1	5,7 ± 0,1
18:0/18:1	61,6 ± 0,0	62,0 ± 0,2	60,7 ± 0,1	60,8 ± 0,4
18:2	22,2 ± 0,1	22,1 ± 0,2	22,4 ± 0,1	22,3 ± 0,3
18:3	7,1 ± 0,0	7,1 ± 0,1	7,8 ± 0,2	7,3 ± 0,5
20:0/20:1	1,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0
22:0/22:1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0

¹ Fettgehalt nach L-02.00-11 (182): Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 3

² GC/FID-Bestimmung: Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 3

³ Berechnet auf Basis der Stanylester-Quantifizierung

Die in den untersuchten Magermilch-Trinkjoghurtprodukten ermittelten Fettgehalte und die Ergebnisse der kapillargaschromatographischen Untersuchungen sind in Tabelle 18 aufgeführt. Ein typisches GC/FID-Chromatogramm zeigt Abbildung 21, die Identitäten der Stanylester wurden mittels GC/MS bestätigt.

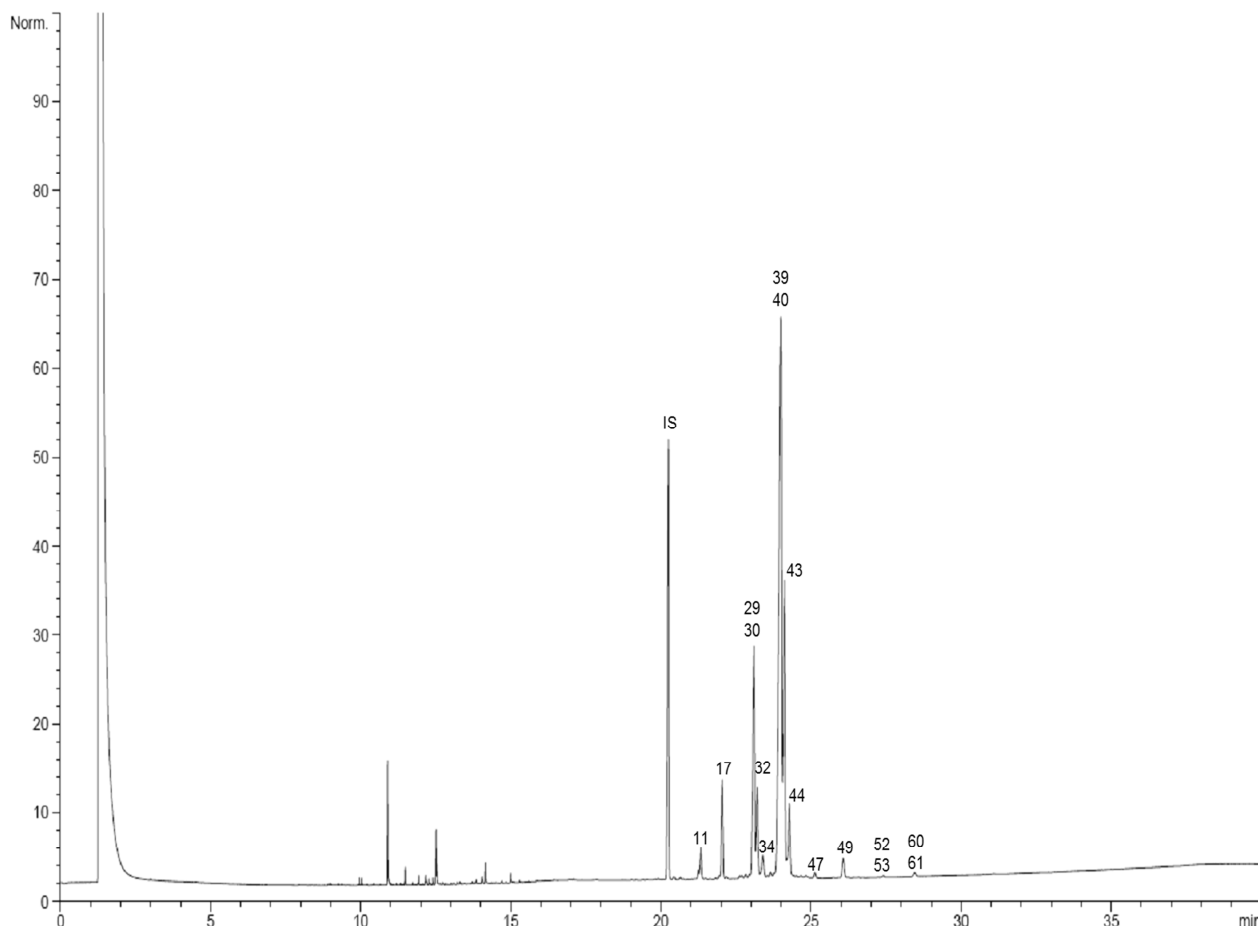


Abbildung 21: Kapillargaschromatographische Analytik eines nach Weibull-Stoldt (182) isolierten Fettextraktes aus einem mit Stanylestern angereicherten Emmi-Benecol®-Trinkjoghurt „Orange“. Peak-Nummerierung nach Tabelle 12. Bedingungen siehe 3.2.3.2

Die ermittelten Fettgehalte stimmten mit den Herstellerangaben überein. Wie aus dem Chromatogramm eines verdünnten Extraktes von angereichertem Trinkjoghurt ersichtlich ist (Abbildung 21), stellen die Stanylester nahezu die gesamte Fettfraktion dar. Ferner sind die mittels Kapillargaschromatographie bestimmten Stanylester-Gehalte mit den gravimetrisch ermittelten Fettgehalten vergleichbar (Tabelle 18). Zudem stimmten die aus den Stanylesterbestimmungen berechneten Stanolgehalte und -verteilungen (Tabelle 18) mit den Ergebnissen der kapillargaschromatographischen Phytosterol/-stanol-Untersuchung eines

handelsüblichen cholesterinsenkenden Joghurts des portugiesischen Marktes, nach Verseifung, überein (24).

Die Genauigkeit der berechneten Stanolgehalte aus der Stanylesterbestimmung (Tabelle 18) wurde durch Quantifizierung der freien Stanole, nach Hydrolyse der Extraktlösungen, überprüft (Tabelle 19).

Tabelle 19: Stanolbestimmung in mit Stanylestern angereicherten Magermilch-Trinkjoghurts

Stanol [g/100g]	Benecol®	Benecol® Light	Emmi Benecol® Erdbeer	Emmi Benecol® Orange
Campestanol	0,64 ± 0,00 ¹	0,52 ± 0,01	0,66 ± 0,00	0,65 ± 0,00
Sitostanol	2,32 ± 0,03	2,40 ± 0,04	2,34 ± 0,01	2,32 ± 0,00
Andere	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Gesamt	3,01 ± 0,06	2,96 ± 0,06	3,05 ± 0,01	3,03 ± 0,01

¹ Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 3

Tabelle 20 zeigt die Vergleichbarkeit der kapillargaschromatographischen Stanylester-Bestimmung nach Weibull-Stoldt-Aufarbeitung.

Tabelle 20: Vergleichbarkeit der Stanylester-Bestimmung nach Weibull-Stoldt-Aufarbeitung

	Person 1	Person 2	Person 3
Fettgehalt [g/100g] ¹	5,10 ± 0,07	5,03 ± 0,01	5,05 ± 0,01
Stanylester [g/100g] ²	4,98 ± 0,11	4,92 ± 0,04	4,89 ± 0,06
Stanolgehalt [g/100g] ³	3,05 ± 0,07	3,01 ± 0,02	2,99 ± 0,04

¹ Fettgehalt nach (182): Extraktionen aus den vereinten Becherinhalten einer Emmi-Benecol® Magermilch-Trinkjoghurtpackung durch drei Personen (Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3)

² GC/FID-Bestimmung: Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3

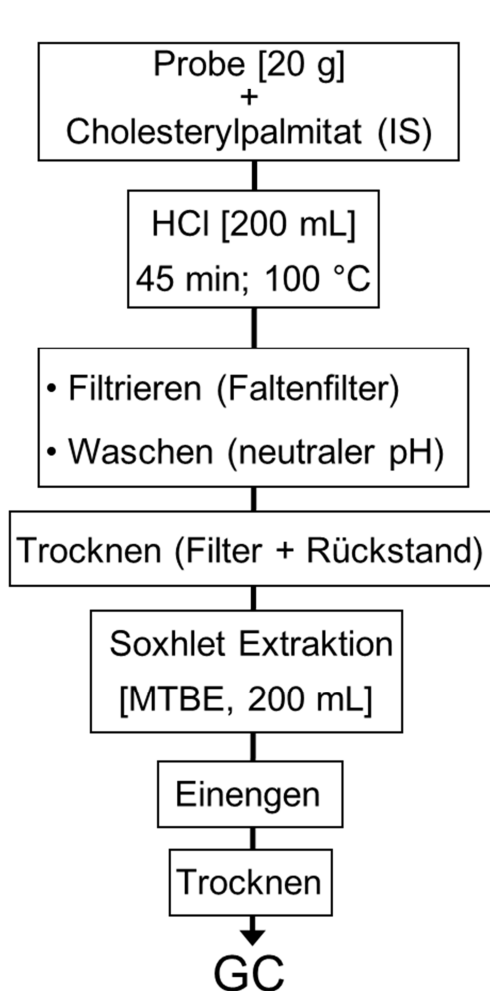
³ Berechnet auf Basis der Stanylester-Quantifizierung

4.1.3.2. Etablierung einer Extraktionsschnellmethode

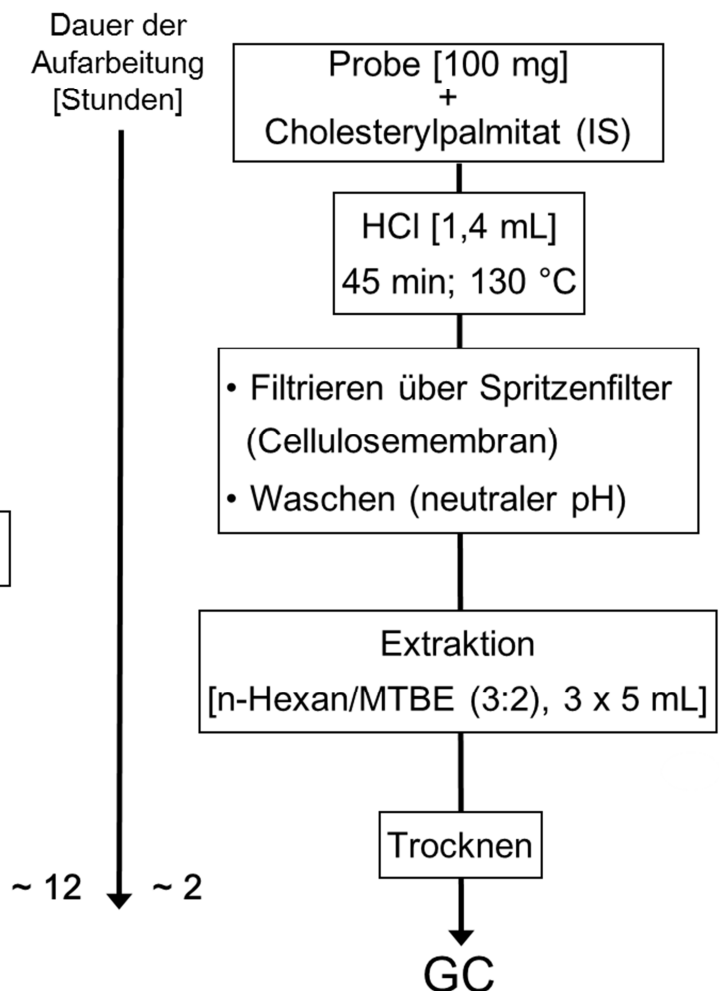
Die Fettextraktion nach Weibull-Stoldt eignete sich zur effektiven Isolierung von Stanylestern aus angereicherten Magermilch-Trinkjoghurtprodukten. Allerdings ist die Aufarbeitung zeitaufwendig und kostspielig. Daher sollte eine schnellere Aufarbeitungsmethode in kleinerem Maßstab etabliert werden. Die Schnellmethode wurde daraufhin weitgehend an die Weibull-Stoldt Extraktionsmethode angelehnt (Abbildung 8). Die

eingesetzte Probenmenge wurde um den Faktor 200 reduziert. Dadurch konnte das Aufschlussvolumen verringert werden. Extraktionsversuche direkt aus dem sauren Aufschlussmedium erwiesen sich als nicht reproduzierbar. Daher wurde für die Filtration der Aufschlusslösung und das Waschen ein Membranspritzenfilter (45 µm) eingesetzt. Die Lipide wurden anschließend mit 3 × 5 mL *n*-Hexan/MTBE (3:2) vom Filter extrahiert. Nach Trocknen der Extraktionslösung konnte diese direkt zur kapillargaschromatographischen Bestimmung eingesetzt werden (Abbildung 22).

Weibull-Stoldt Extraktion



Schnellmethode



Dauer der
Aufarbeitung
[Stunden]

~ 12 ~ 2

Abbildung 22: Vergleich der Probenaufarbeitungsmethoden (i) Weibull-Stoldt Extraktion und (ii) Schnellmethode für die Phytosteryl-/stanylester-Analytik in angereicherten Magermilch-Trinkjoghurtprodukten

4.1.3.3. Validierung der Schnellmethode

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Pflanzenstanylestern in einer Magermilch-Drinkjoghurtmatrix wurden in 100 mg Magermilchjoghurt (Weihenstephan – der Cremige; 0,1 % Fett) 5,0 mg industrielles Muster *STAEEST-115 - Plant Stanol Ester* und 0,75 mg interner Standard mit Hilfe von Ultraschall fein verteilt. Nach Schnellmethoden-Aufarbeitung wurden die zugesetzten Stanylester zu 100 ± 1 % wiedergefunden.

Die Wiederholbarkeit der entwickelten Schnellmethode wurde verifiziert, indem jeder der sechs Becher einer kommerziellen Packung Emmi-Benecol®-Magermilchdrinkjoghurt in Dreifachbestimmung aufgearbeitet und kapillargaschromatographisch quantifiziert wurde. Die Ergebnisse der untersuchten Packungen zweier Geschmacksrichtungen, welche jeweils durch eine andere Person zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet wurden, sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: GC/FID-Bestimmung von Stanylestern in zwei Packungen angereichertem Emmi-Benecol®-Magermilchdrinkjoghurt nach Schnellmethoden-Aufarbeitung

Stanylester [g/100g]	Emmi Benecol® Orange ¹	Emmi Benecol® Erdbeer ¹
Campestanyl 16:0/16:1	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Sitostanyl 16:0/16:1	0,19 ± 0,00	0,17 ± 0,00
Campestanyl 18:0/18:1	0,78 ± 0,01	0,86 ± 0,02
Campestanyl 18:2	0,26 ± 0,00	0,29 ± 0,01
Campestanyl 18:3	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,01
Sitostanyl 18:0/18:1	2,41 ± 0,04	2,10 ± 0,06
Sitostanyl 18:2	0,81 ± 0,04	0,84 ± 0,07
Sitostanyl 18:3	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Sitostanyl 20:0/20:1	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Sitostanyl 22:0/22:1	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Andere ²	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Summe Stanylester [g/100g]¹	5,07 ± 0,07	4,98 ± 0,12
Veresterte Stanole [g/100g]³	3,10 ± 0,05	3,05 ± 0,07
Campestanol [%]	24,5 ± 0,3	28,2 ± 0,3
Sitostanol [%]	75,5 ± 0,3	71,8 ± 0,3
Fettsäureverteilung [%]³		
16:0/16:1	5,2 ± 0,1	5,0 ± 0,1
18:0/18:1	63,8 ± 0,5	60,6 ± 1,3
18:2	21,5 ± 0,5	23,2 ± 1,3
18:3	7,6 ± 0,2	9,0 ± 0,2
20:0/20:1	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,1
22:0/22:1	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,0

¹ Mittelwert ± Standardabweichung von 18 Analysen (6 Flaschen einer Packung, je n = 3)

² Nicht kalibrierte Phytosteryl-/stanylester ("andere") mit RF = 1 quantifiziert

³ Berechnet auf Basis der Ester

Die Ergebnisse der GC/FID-Bestimmung von Phytostanylestern in Extrakten der Schnellmethoden-Aufarbeitungen waren vergleichbar mit denen in Weibull-Stoldt-Extrakten (Tabelle 18). Die Streuung der Werte zwischen den einzelnen Dreifachaufarbeitungen sowie zwischen den Bechern derselben Packung war gering (Tabelle 21). Zudem wurde die Vergleichbarkeit bei der Aufarbeitung eines Bechers durch mehrere Personen validiert (Tabelle 22). Die durch drei Personen ermittelten Gehalte waren vergleichbar. Die Schnellmethoden-Aufarbeitung zeichnete sich insgesamt durch kurze Durchführungsdauer (2 Stunden pro Dreifachansatz), den Einsatz geringer Lösungsmittel- und Proben-Volumina, hohe Wiederfindung sowie sehr gute Wiederhol- und Vergleichspräzision aus.

Tabelle 22: Vergleichbarkeit der Schnellmethoden-Extraktion bei Aufarbeitung eines Emmi-Benecol®-Trinkjoghurtbechers durch drei Personen

	Person 1	Person 2	Person 3
Summe Stanylester [g/100g]	5,01 ± 0,19	5,11 ± 0,08	5,12 ± 0,04
Veresterte Stanole [g/100g] ¹	3,07 ± 0,11	3,12 ± 0,05	3,13 ± 0,02

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3

² Berechnet auf Basis der Ester

4.1.3.4. Untersuchung weiterer Produkte

4.1.3.4.1. Becel® pro-activ

Die „mit 3,4 % Phytosterinestern“ angereicherten Magermilch-Trinkjoghurtprodukte der Marke Becel® pro-activ wurden in lokalen Supermärkten bezogen. Das Chromatogramm eines Lipidextraktes ist in Abbildung 23 dargestellt. Das Phytosteryl-/stanylesterprofil war vergleichbar zu dem des selbstsynthetisierten Estermusters von Tallöl-Sterolen mit Sonnenblumenöl-Fettsäuren, welches daraufhin zur Kalibrierung (3.2.6.1) eingesetzt wurde. Die korrekte Probennahme war durch eine Entrahmung des Produktes und den damit verbundenen Rahmablagerungen mit höheren Ester-Konzentrationen in der Ausstülpung des Flaschenhalses und am Deckel (Abbildung 24) erschwert.

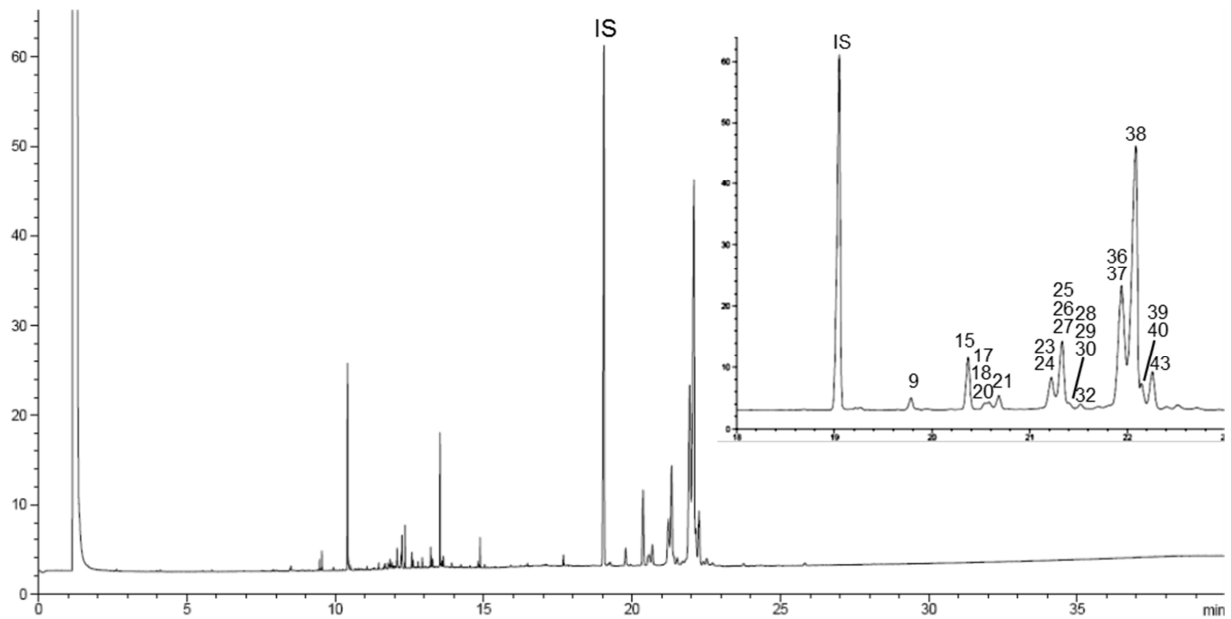


Abbildung 23: GC/FID-Chromatogramm des Lipidextraktes von BeceL® pro-active-Trinkjoghurt. Peak-Nummerierung nach Tabelle 12. Bedingungen siehe 3.2.3.2

Der abgebildete Becher wurde vor dem Öffnen stark geschüttelt. Ein Einrühren des Rahmes mit dem Spatel allein war nicht möglich. Eine Redispergierung des Rahms gelang mit Hilfe von Ultraschall. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 aufgeführt.

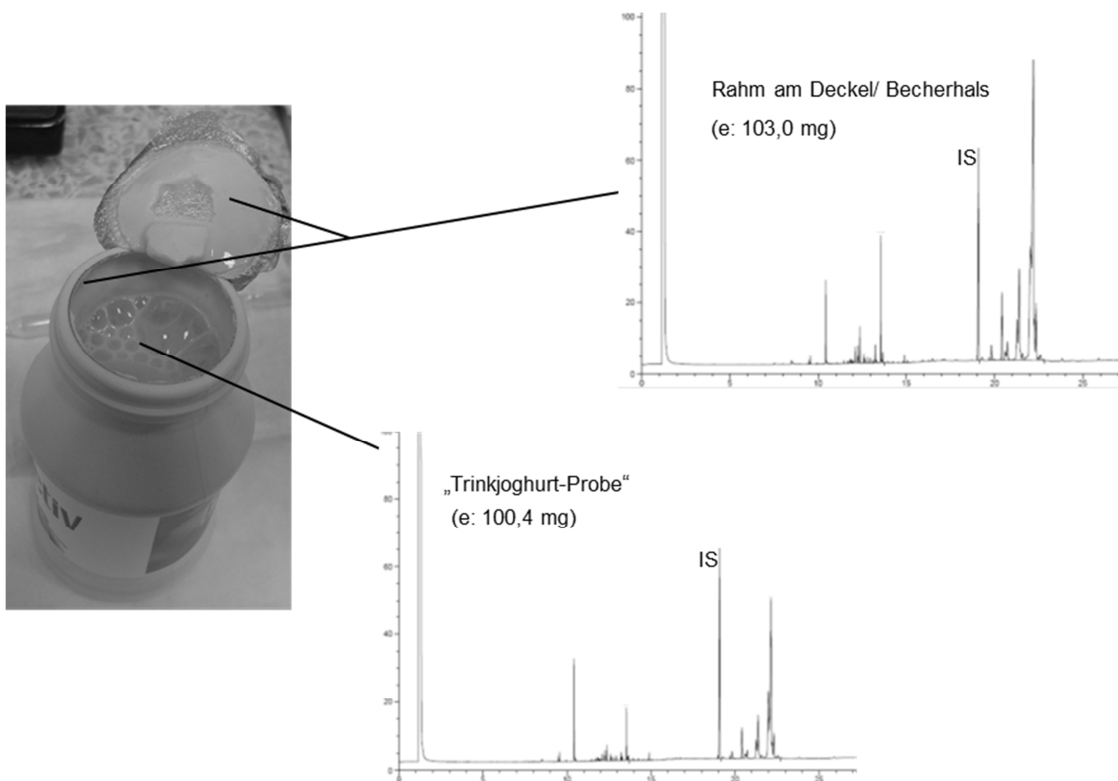


Abbildung 24: Entrahmung als potentielle Fehlerquelle bei der Analytik

Insgesamt waren die Ergebnisse nach Re-dispersion des Rahmes mit den Packungsangaben vergleichbar. Die Sterolverteilung entsprach der Spezifikation des SCF (131).

Tabelle 23: Mittels Schnellmethoden-Aufarbeitung in Becel® pro-activ Magermilch-Trinkjoghurt ermittelte Phytosteryl-/stanylester-Gehalte

Phytosteryl-/stanylester [g/100g]	“Erdbeere” ¹	“Original” ¹
Campesteryl 16:0/16:1	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
β-Sitosteryl 16:0/16:1	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00
Sitostanyl 16:0/16:1	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Brassicasteryl 18:0/18:1 ²	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Brassicasteryl 18:2 ²	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Campesteryl 18:0/18:1	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,00
Campesteryl 18:2 ³	0,34 ± 0,00	0,36 ± 0,01
Campestanyl 18:0/18:1 ⁴	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Campestanyl 18:2	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
β-Sitosteryl 18:0/18:1	0,80 ± 0,01	0,82 ± 0,03
β-Sitosteryl 18:2	1,61 ± 0,01	1,70 ± 0,05
Sitostanyl 18:0/18:1	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Sitostanyl 18:2	0,19 ± 0,00	0,20 ± 0,01
Andere ⁴	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Summe Ester	3,50 ± 0,02	3,61 ± 0,09
Veresterte Sterole [g/100g]⁵	2,1 ± 0,0	2,2 ± 0,1
Brassicasterol [%] ⁵	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Campesterol [%] ⁵	15,2 ± 0,2	15,1 ± 0,1
Campestanol [%] ⁵	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,0
β-Sitosterol [%] ⁵	72,6 ± 0,4	73,1 ± 0,2
Sitostanol [%] ⁵	8,6 ± 0,1	8,5 ± 0,1
Andere [%] ⁵	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,3
Veresterte Fettsäuren [g/100g]⁵		
C16:0/16:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C18:0/18:1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
C18:2	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0

¹ Dreifachbestimmung eines Bechers; Mittelwerte ± Standardabweichung

² Berechnet mit RF = 1

³ Co-elution von Stigmasteryl 18:0/18:1

⁴ Co-elution von Stigmasteryl 18:2

⁵ Berechnet auf Basis der Ester

4.1.3.4.2. Danacol® (Italien)

Danacol®-Trinkjoghurt (Italien) wurde in Supermärkten in Parma, Italien bezogen. Auf den Packungen waren „1,6 % Phytosterine“ deklariert. Der Fettgehalt (nur gesättigte Fettsäuren) war mit 0,6 g/100 g angegeben. Ein GC/FID-Chromatogramm eines mittels der

Schnellmethode gewonnen Lipidextraktes ist in Abbildung 25 dargestellt. Alle Peaks eluierten deutlich vor dem internen Standard Cholesterylpalmitat, was auf kürzere Kettenlängen der veresterten Fettsäuren hinwies. Die Phytosteryl- und Stanylester von Octan- und Decansäure wurden daraufhin mit Hilfe enzymkatalysierter Umesterung synthetisiert (3.2.1). Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeiten und Massenspektren (Tabelle 24); die Zuordnung der Peaks 1, 7 und 13 anhand der MS-Spektren.

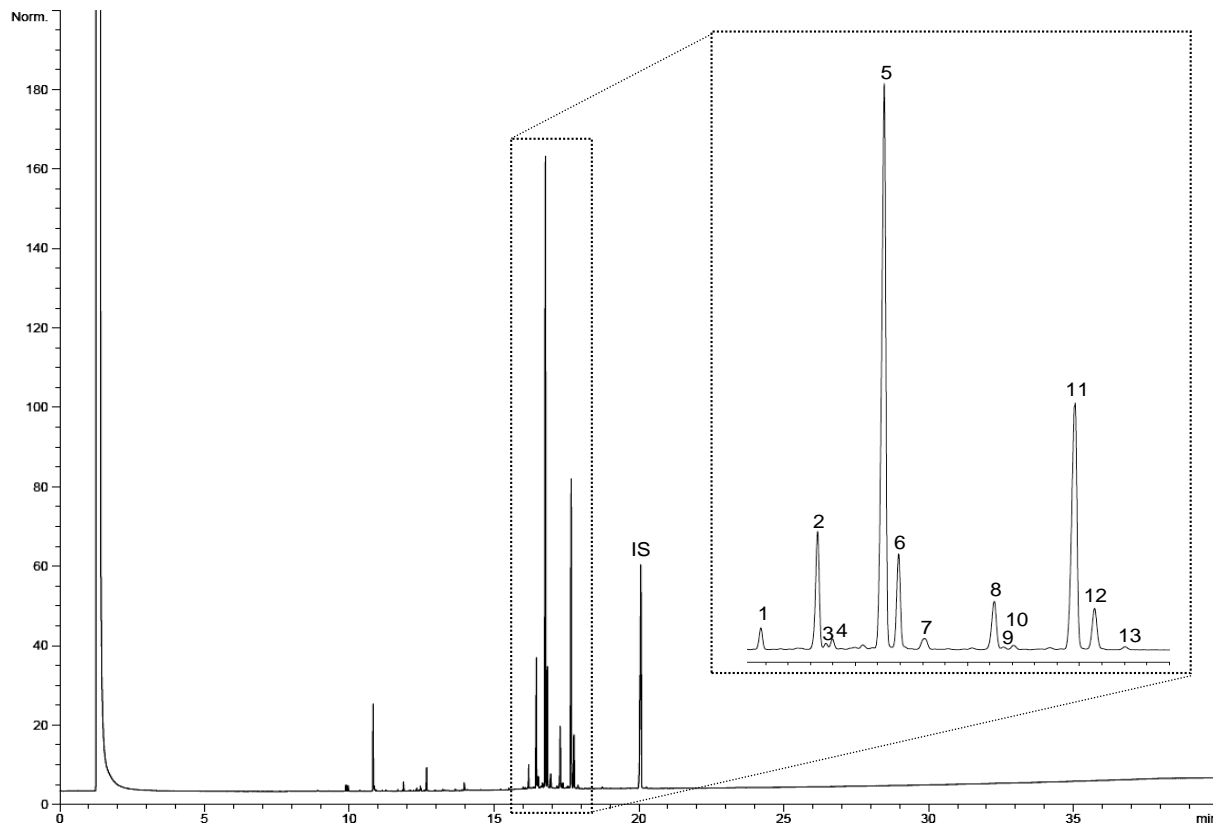


Abbildung 25: GC/FID Analyse des Lipidextraktes von Danacol®-Magermilch-Trinkjoghurt aus Italien (Bedingungen siehe 3.2.3.2; Peaknummerierung identifizierter Peaks entsprechend Tabelle 24, Identifizierung von Brassicasteryl 8:0 (1), Brassicasteryl 10:0 + Δ^7 -Stigmastenyl 8:0 (7) und Δ^7 -Stigmastenyl 10:0 (10) anhand der MS-Spektren

Die Synthese und Aufreinigung (3.2.5) der zur Kalibrierung eingesetzten Octansäure- und Decansäureester von Tallöl-Sterolen (Generol® 867 F) erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Esterausbeute bezogen auf die eingesetzte Sterolmenge betrug nach Aufreinigung ca. 95 Gew-%, die GC-Reinheit $97,3 \pm 0,3$ Flächen-%. Die Stammlösungen (10 mg/mL in *n*-Hexan/MTBE (3:2), *n* = 3) der Octanoate und Decanoate wurde im Verhältnis 1:1 gemischt; Lösungen mit 0,03; 0,06; 0,13; 0,26 bzw. 0,53 μg Gesamtester und jeweils 0,05 μg IS/ μL

wurden zur Kalibrierung des Gerätes eingesetzt. Die Kalibrierkurven der 10 kalibrierten Ester waren über diesen Konzentrationsbereich linear ($R^2 \geq 0,999$).

Tabelle 24: Charakteristische (EI)MS Fragmente (70 eV) synthetisierter Octan- und Decansäure-phytosteryl-/stanylester

Peak ¹	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12
RRT ²	0.826	0.828	0.829	0.842	0.845	0.866	0.868	0.870	0.886	0.889
Sterolrest	Δ^5 C28	$\Delta^{5,22}$ C29	Δ^0 C28	Δ^5 C29	Δ^0 C29	Δ^5 C28	$\Delta^{5,22}$ C29	Δ^0 C28	Δ^5 C29	Δ^0 C29
Fettsäurerest	8:0	8:0	8:0	8:0	8:0	10:0	10:0	10:0	10:0	10:0
M	526 (-) ²	538 (-)	528 (3) ³	540 (-)	542 (3)	554 (-)	566 (-)	556 (3)	568 (-)	570 (3)
M-15	511 (-)	523 (-)	513 (1)	525 (-)	527 (1)	539 (-)	551 (-)	541 (1)	553 (-)	555 (1)
M-FS	382 (100)	394 (100)	384 (79)	396 (100)	398 (69)	382 (100)	394 (100)	384 (84)	396 (100)	398 (78)
M-FS-15	367 (21)	379 (8)	369 (41)	381 (22)	383 (35)	367 (20)	379 (8)	369 (41)	381 (21)	383 (37)
M-FS-C ₃ H ₇		351 (9)					351 (8)			
M-FS-54			330 (9)		344 (9)			330 (10)		344 (10)
M-FS-SK (C20/C22)		282 (7)					282 (8)			
M-FS-121	261 (15)	273 (1)		275 (15)		261 (14)	273 (1)		275 (14)	
M-FS-SK	255 (15)	255 (35)	257 (24)	255 (17)	257 (17)	255 (14)	255 (34)	257 (27)	255 (16)	257 (21)
M-FS-SK-2		253 (13)					253 (11)			
M-FS-SK-D	213 (11)	213 (13)	215 (100)	213 (12)	215 (100)	213 (10)	213 (6)	215 (100)	213 (11)	215 (100)
M-FS-SK-D-2		211 (3)					211 (2)			

¹ Peaknummerierung entsprechend Abbildung 25

² Relative Retentionszeit (RRT) bzgl. Cholesterylpalmitat an einer Rtx-200MS

³ Nicht detektiert

⁴ Relative Intensität in Klammern

Die Ergebnisse der Sterylester-Untersuchung in Danacol-Trinkjoghurts aus Italien sind in Tabelle 25 dargestellt. Die ermittelten Gehalte an Estern sowie die daraus berechneten Gehalte an veresterten Sterolen stimmten mit den Packungsangaben überein. Die Verteilung der veresterten Sterole entsprach der SCF-Spezifikation (131), die Fettsäure-Verteilung den Angaben der Patentveröffentlichung WO 2007/101580 (125). Gegenstand dieser Erfindung sind Sterolfettsäureester mittelkettiger Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 8 und 10 Kohlenstoffatomen in einer bevorzugten Fettsäureverteilung im Gewichtsverhältnis C8 zu C10 von 78:22 bis 50:50. Diese zeichnen sich der Patentschrift zufolge vor allem durch gute technologische sowie sensorische Eigenschaften aus. Im Vergleich zu Esterpräparaten langkettiger und ungesättigter Fettsäuren weisen sie einen höheren Gesamtsterolgehalt auf und sind stabiler gegenüber Oxidation.

**Tabelle 25: Phytosteryl-/stanylester-Bestimmung in Danacol® Magermilch-
Trinkjoghurt aus Italien mittels GC/FID**

Peak ¹	Steryl-/stanylester [g/100g] ¹	„Natur“	„Erdbeer“
1	Brassicasteryl 8:0	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
2	Campesteryl 8:0	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,00
3	Stigmasteryl 8:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
4	Campestanyl 8:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
5	β-Sitosteryl 8:0	0,95 ± 0,02	0,93 ± 0,02
6	Sitostanyl 8:0	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00
7	Brassicasteryl 10:0 ^{2,3}	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
8	Campesteryl 10:0	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
9	Stigmasteryl 10:0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
10	Campestanyl 10:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
11	β-Sitosteryl 10:0	0,57 ± 0,01	0,57 ± 0,01
12	Sitostanyl 10:0	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00
	Andere	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Summe Ester		2,15 ± 0,05	2,13 ± 0,05
Veresterte Sterole [g/100g]⁴		1,62 ± 0,03	1,60 ± 0,03
	Brassicasterol [%]	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
	Campesterol [%]	12,5 ± 0,1	12,5 ± 0,0
	Stigmasterol [%]	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
	Campestanol [%]	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,0
	β-Sitosterol [%]	70,7 ± 0,4	70,5 ± 0,4
	Sitostanol [%]	11,2 ± 0,2	11,4 ± 0,2
	Andere [%]	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,7
Fettsäureverteilung [%]⁴			
	8:0	62,0 ± 0,1	62,1 ± 0,2
	10:0	38,0 ± 0,1	37,9 ± 0,2

¹ Mittelwert ± Standardabweichung (3 Flaschen aus drei verschiedenen Packungen, je n = 3)

² Quantifizierung nicht kalibrierter Ester („Andere“) mit Kalibrierfunktion von β-Sitosteryloctanoat

³ Berechnet bzgl. Brassicasteryl octanoat über Fettsäureprofil, aufgrund der Coelution von Δ⁷-Stigmasteryloctanoat

⁴ Berechnet auf Basis der Ester

Die aus den Esterbestimmungen berechneten Sterolgehalte wurden durch Quantifizierung der freien Sterole nach chemischer Hydrolyse der Extrakte bestätigt (Tabelle 16).

Tabelle 26: GC/FID-Bestimmung der Phytosterole in Danacol[®]-Trinkjoghurt, nach Hydrolyse der Extrakte

Phytosterol [g/100g] ^{1,2}	„Natur“	„Erdbeer“
Brassicasterol	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Campesterol	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Stigmasterol	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Campestanol	,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
β-Sitosterol	1,12 ± 0,02	1,12 ± 0,03
Sitostanol	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,01
Andere	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Summe	1,59 ± 0,03	1,59 ± 0,04

¹ Mittelwert ± Standardabweichung (3 Flaschen aus drei verschiedenen Packungen, je n = 3)

² Quantifizierung mittels „Theoretischer Korrektur Faktoren“ nach Costin *et al.* [28]

4.1.4. Zusammenfassung

Die zur kapillargaschromatographischen Analytik pflanzlicher Steryl- und Stanylester etablierten Bedingungen wurden für die Untersuchung in angereicherten, kommerziellen Magermilch-Trinkjoghurtprodukten eingesetzt.

Die Lipidextrakte wurden zunächst durch das Verfahren nach Weibull-Stoldt gewonnen. Mit der Entwicklung einer schnellen Extraktionsmethode gelang die effiziente Extraktion aus angereichertem Magermilch-Trinkjoghurt binnen 2 Stunden pro Dreifachaufarbeitung. Zusätzlich zeichnete sich die Schnellmethoden-Extraktion durch den Einsatz geringer Lösungsmittel- und Proben-Volumina, eine hohe Wiederfindung sowie sehr gute Wiederhol- und Vergleichspräzision aus.

Der etablierte kapillargaschromatographische Ansatz erlaubte die quantitative Bestimmung individueller Steryl-/Stanylester in Magermilch-Trinkjoghurtprodukten zugesetzten Mischungen. Neben Mischungen langkettiger Fettsäureester, wie zum Beispiel von Rapsöl- oder Sonnenblumenölfettsäuren, wurden in Produkten aus Italien Ester mittelkettiger Fettsäuren detektiert und quantifiziert.

Die ermittelten Ergebnisse stimmten mit den deklarierten Packungsangaben und mit der Spezifikationen für die in Lebensmitteln eingesetzten Phytosteryl-/stanylester-Mischungen überein.

4.2. Phytosteryl-/stanylfettsäureester-Analytik mittels on-line LC-GC

4.2.1. Einleitung

Die kapillargaschromatographische Analytik intakter Phytosteryl-/stanylester in angereicherten Magermilchprodukten konnte aufgrund des vernachlässigbaren Fettgehaltes direkt aus den Lipidextrakten erfolgen. Allerdings erforderte die proteinreiche Trinkjoghurtmatrix einen der Extraktion vorgeschalteten Aufschlusschritt. Zur Lipidextraktion aus fettreichen Matrices, wie zum Beispiel angereicherten Margarinen, ist der Aufschlusschritt nicht notwendig. Allerdings erfordern die zusätzlichen Lipide eine Fraktionierung/Isolierung der Phytosteryl-/stanylester vor der kapillargaschromatographischen Bestimmung. Diese erfolgt meist manuell (off-line) als Probenvorbereitungsschritt, zum Beispiel mittels Dünnschicht- (DC) oder Flüssigchromatographie (LC) bzw. einer Festphasenextraktion (SPE) (20, 22, 26). Eine elegantere Methode zur Analytik von Minorlipiden in komplexen Matrices stellt die on-line gekoppelte LC-GC dar. Die gesamte Aufreinigung und anschließende Kapillargaschromatographie finden dabei in einem geschlossenen, vollautomatisch gesteuerten System statt. Verluste von Analyten oder Kontaminationen sind dadurch minimiert und die Empfindlichkeit sowie die Reproduzierbarkeit der Analysenmethode gesteigert. Die on-line LC-GC wurde bereits zur Analytik von Sterolen und deren Estern in Fetten und Ölen angewandt (30, 149-151, 183, 184). Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, geeignete Bedingungen zur on-line LC-GC Bestimmung intakter Phytosteryl-/stanylestern in angereicherten fettreichen Lebensmitteln zu etablieren.

4.2.2. Etablierung geeigneter Bedingungen (Loop-Type Interface)

Die Etablierung geeigneter on-line LC-GC-Bedingungen erfolgte an einem vollautomatischen Dualchrom 3000 System mit Loop-Type Interface (Carlo Erba Instruments). Für die kapillargaschromatographische Trennung sollte aufgrund der gezeigten guten Trenneigenschaften (4.1.2.2) eine Rtx-200MS als stationäre Phase eingesetzt werden.

Nicht derivatisierte Kieselgelsäulen besitzen eine hohe Kapazität Triacylglycerole zurückzuhalten (185). Um eine optimale Vortrennung zu gewährleisten, wurde daher als LC-Trennsäule eine Eurospher-100 Si verwendet. Als Fließmittel diente *n*-Hexan/MTBE (96+4; v+v) mit einer Fließgeschwindigkeit von 200 μ L/min. Die Phytosteryl-/stanylester eluierten

nach etwa 4 min. Der Transfer erfolgte daher nach 5,15 min. In Abbildung 26 sind die Chromatogramme der on-line LC-GC-Analyse des industriellen Stanylester-Musters STAEST-115 – Plant Stanol Ester dargestellt. Der Backflush der LC-Säule erfolgte direkt nach dem Transfer.

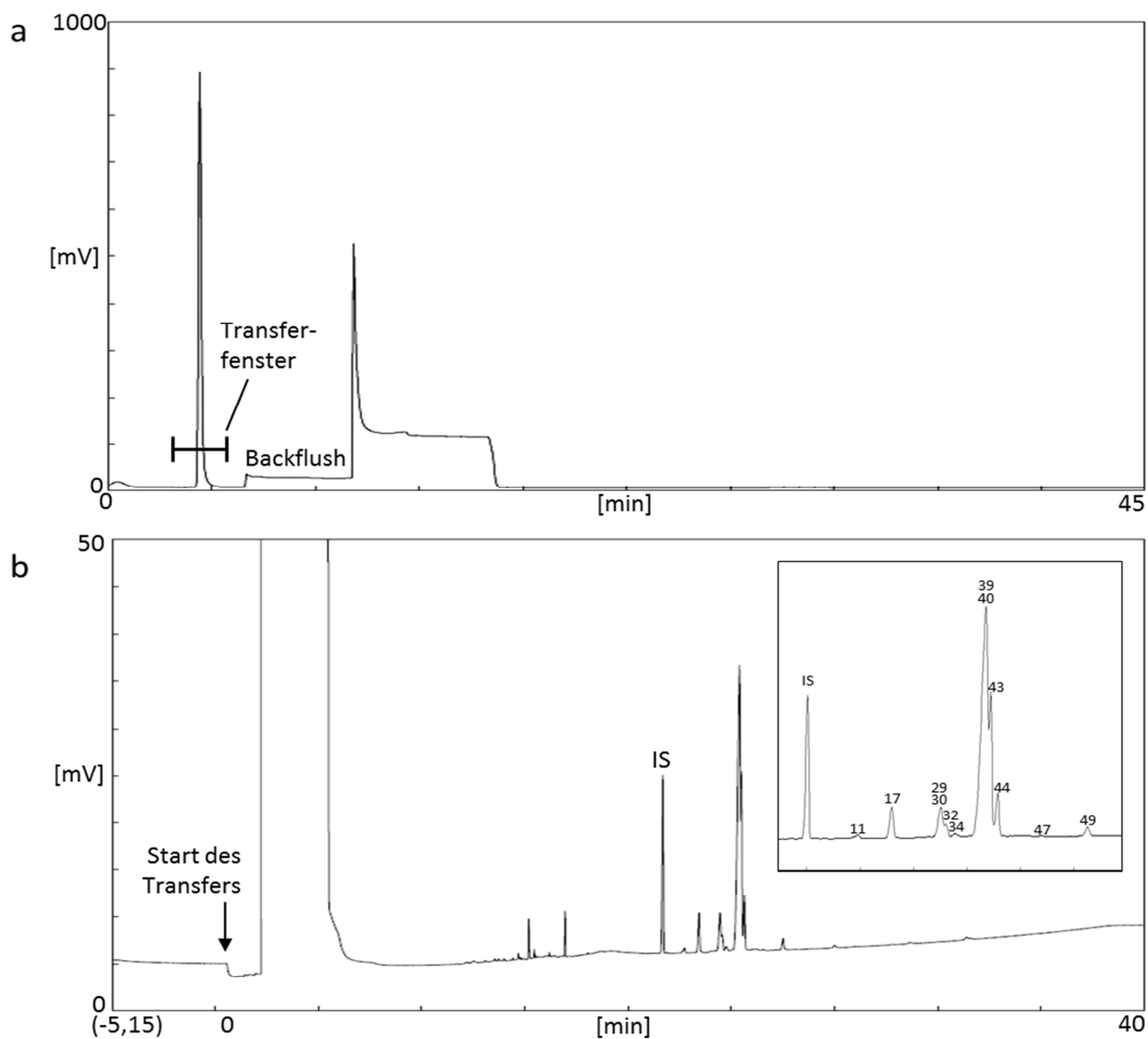


Abbildung 26: On-line LC-GC-Analyse von STAEST-115; LC-(a) und GC-Chromatogramm (b) der transferierten LC-Fraktion (vergrößerter Ausschnitt der Stanylester-Trennung; Peaknummerierung entsprechend Tabelle 12). Bedingungen siehe 3.2.7.2

4.2.2.1. Vergleich der Analytik mittels on-line LC-GC/FID und GC/FID

4.2.2.1.1. GC-Trennung

Die Elutionsreihenfolge der Stanylester nach on-line Transfer der LC-Fraktion (Abbildung 26b) entsprach der einer einfachen GC/FID-Analyse. Die Auflösung war ausreichend, um die Stanylester nach dem Sättigungsgrad der veresterten Fettsäuren

differenzieren zu können. Im direkten Vergleich zur kapillargaschromatographischen Trennung mittels GC/FID (Splitinjektion, Abbildung 18a) wird deutlich, dass diese nach Transfer mittels on-line LC-GC (Loop-Type Interface) weniger scharf war. Dies ist durch das Einbringen des großen Lösemittelvolumens (500 µL) in das GC-Kapillarsäulensystem beim Transfer erklärbar. Die Fixierung der Analyten auf der GC-Trennsäule erfolgt offensichtlich in einem breiteren Bereich als bei einem einfachen GC-Lauf, bei welchem nur etwa zwischen 0,05 und 0,5 µL Lösemittel pro Injektion in die GC-Trennsäule eingebracht werden.

4.2.2.1.2. Stanylester-Bestimmung in Magermilch-Trinkjoghurtextrakten

Das on-line LC-GC System wurde entsprechend dem GC/FID (3.2.6.1) mit verdünnten Lösungen (1:40) kalibriert. Die Korrelationskoeffizienten waren stets größer 0,99. Die Eignung des komplexeren on-line LC-GC-Systems für quantitative Bestimmungen wurde im Vergleich zur Quantifizierung von Stanylestern mittels GC/FID überprüft. Dazu wurden Verdünnungen (1:40) der zur Verifizierung der Schnellmethode aufgearbeiteten Emmi-Benecol® Magermilch-Trinkjoghurtextrakte zusätzlich mittels on-line LC-GC untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 gegenübergestellt.

Sitostanyl-C22-Ester waren in den Chromatogrammen der on-line LC-GC-Untersuchung nicht sichtbar. Unbekannte Peaks konnten in den LC-GC Chromatogrammen aufgrund der schlechteren Auflösung nicht differenziert werden. Die mittels on-line LC-GC erzielten Summenwerte lagen daher etwas unter denen der GC/FID-Bestimmungen. Die Streuung der Werte war erwartungsgemäß etwas höher. Die erzielten Ergebnisse der Stanylesterbestimmungen mittels GC/FID und mittels Loop-type Interface gekoppelter on-line LC-GC waren insgesamt jedoch vergleichbar, die berechneten Stanolgehalte stimmten bei beiden Systemen mit den Packungsangaben (3.1.5.1) überein.

Tabelle 27: Vergleich der quantitativen Bestimmung von Pflanzenstanylestern in Extrakten von angereicherten Magermilch-Trinkjoghurts mittels on-line LC-GC/FID und GC/FID

Stanylester [g/100g]	Emmi-Benecol® Orange		Emmi-Benecol® Erdbeer	
	on-line LC-GC	GC	on-line LC-GC	GC
Campestanyl 16:0/16:1	0,06 ± 0,01 ¹	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Sitostanyl 16:0/16:1	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,00
Campestanyl 18:0/18:1	0,77 ± 0,05	0,78 ± 0,01	0,85 ± 0,05	0,86 ± 0,02
Campestanyl 18:2	0,24 ± 0,04	0,26 ± 0,00	0,30 ± 0,05	0,29 ± 0,01
Campestanyl 18:3	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Sitostanyl 18:0/18:1	2,24 ± 0,06	2,41 ± 0,04	2,08 ± 0,07	2,10 ± 0,06
Sitostanyl 18:2	0,83 ± 0,08	0,81 ± 0,04	0,77 ± 0,07	0,84 ± 0,07
Sitostanyl 18:3	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Campestanyl 20:0/20:1	0,04 ± 0,01 ²	n.k. ³	0,03 ± 0,00	n.k.
Sitostanyl 20:0/20:1	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00
Sitostanyl 22:0/22:1	- ⁵	0,02 ± 0,00	-	0,03 ± 0,00
Andere ⁴	-	0,07 ± 0,01	-	0,10 ± 0,02
Summe Ester	4,85 ± 0,14	5,07 ± 0,07	4,84 ± 0,14	4,98 ± 0,12
Veresterte Stanole [g/100g]⁶	2,97 ± 0,09	3,10 ± 0,05	2,96 ± 0,09	3,05 ± 0,07
Campestanol [%]	25,5 ± 0,3	24,5 ± 0,3	30,0 ± 0,6	28,2 ± 0,3
Sitostanol [%]	74,5 ± 0,3	75,6 ± 0,3	70,0 ± 0,6	71,8 ± 0,3
Fettsäureverteilung [%]⁶				
16:0/16:1	5,0 ± 0,3	5,2 ± 0,1	4,9 ± 0,2	5,0 ± 0,1
18:0/18:1	62,1 ± 1,1	63,8 ± 0,5	60,5 ± 1,2	60,6 ± 1,3
18:2	22,2 ± 1,1	21,5 ± 0,5	22,3 ± 1,1	23,2 ± 1,3
18:3	8,3 ± 0,2	7,6 ± 0,2	10,3 ± 0,3	9,0 ± 0,2
20:0/20:1	2,4 ± 0,2	1,5 ± 0,0	2,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1
22:0/22:1	-	0,4 ± 0,2	-	0,6 ± 0,0

¹ Mittelwert ± Standardabweichung von 18 Analysen (6 Flaschen einer Packung, je n = 3)

² Mit Kalibrierkurve von Sitostanyl 20:0/20:1 berechnet

³ Nicht kalibriert

⁴ Nicht kalibrierte Ester; mit RF = 1 in Bezug auf IS quantifiziert

⁵ Nicht bestimmt

⁶ Berechnet auf Basis der Ester

Es konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung der etablierten Bedingungen die Ergebnisse der Phytostanylesterbestimmungen in Extrakten aus angereicherten Magermilch-Trinkjoghurts mittels GC/FID und on-line LC-GC (Loop-Type Interface) vergleichbar sind.

4.2.2.2. Bestimmung in angereicherten Margarinen

GC/FID-Chromatogramme von Fettextrakten angereicherter kommerzieller Margarinen, welche ohne vorherige Fraktionierung der Phytosteryl-/stanylester direkt injiziert wurden, sind in Abbildung 27 dargestellt.

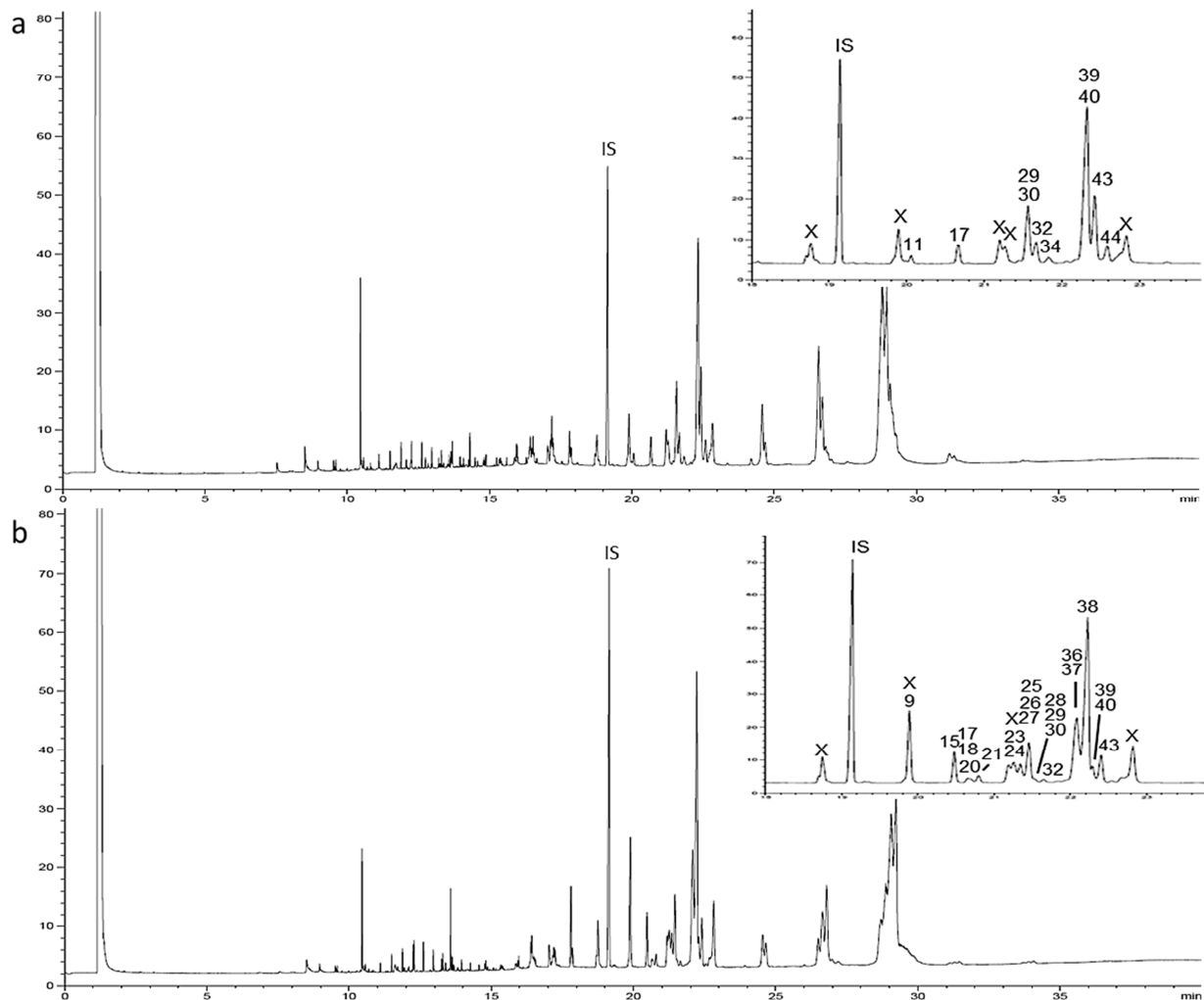


Abbildung 27: Analytik von Lipidextrakten angereicherter kommerzieller Margarinen mittels GC/FID; mit Zusatz an Pflanzenstanylester (a), an Phytosteryl-/stanylester (b). Elutionsbereich der Steryl-/Stanylester vergrößert; Peaknummerierung entsprechend Tabelle 12, unbekannte Peaks (X). Bedingungen siehe 3.2.3.2

Zum Vergleich sind in Abbildung 28 die mittels on-line LC-GC Analyse erzielten Chromatogramme derselben Extrakte dargestellt. Die flüssigchromatographische Fraktionierung der Phytosteryl-/stanylester war unter den etablierten LC-GC Bedingungen äußerst effektiv. Der Vergleich der beiden Abbildungen zeigt, dass im Bereich der Phytosteryl-/stanylester bei der direkten GC/FID-Analyse störende Lipide eluieren, wodurch die

Quantifizierung verfälscht werden könnte. Eine präzise kapillargaschromatographische Bestimmung von Phytosteryl-/stanylestern in fettreichen Matrices erfordert folglich stets die vorhergehende Abtrennung störender Lipide.

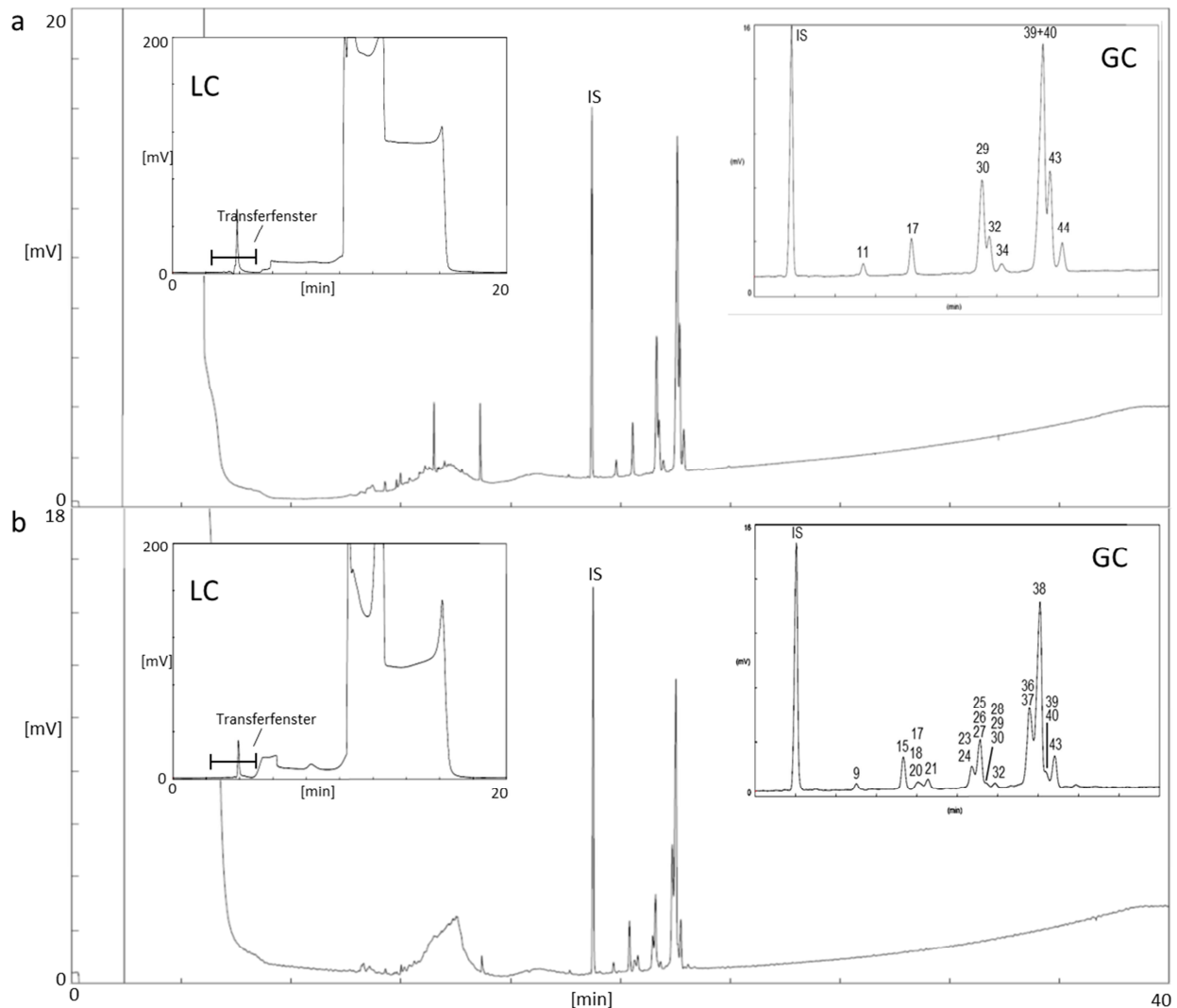


Abbildung 28: Analytik von Lipidextrakten angereicherter Margarine mittels on-line LC-GC; Transfer der Phytosteryl-/stanylester-Fraktion; mit Zusatz an Pflanzenstanylestern (a), mit Phytosteryl-/stanylestern (b), Peaknummerierung entsprechend Tabelle 12. Bedingungen siehe 3.2.7.2

Die Untersuchung der Phytosteryl-/stanylester mittels on-line LC-GC erfolgte in angereicherten, kommerziell erworbenen Margarinen der Handelsmarken Benecol® und Becel® pro-active. Für die Kalibrierungen wurden die entsprechenden industriellen Muster STAEST-115 – plant stanol ester und Vegapure® 95E (Abbildung 18) eingesetzt.

Die Überprüfung der Identitäten transferierter Analyten erfolgte nach Kopplung eines

TSQ 700 Massenspektrometers (Finnigan-MAT, San Jose, CA) an die Dualchrom 3000-Einheit mittels on-line LC-GC/MS. Ein Total-Ionen-Chromatogramm der on-line LC-GC/MS Untersuchung von einer mit Stanylestern angereicherten Margarine ist exemplarisch in Abbildung 29 dargestellt.

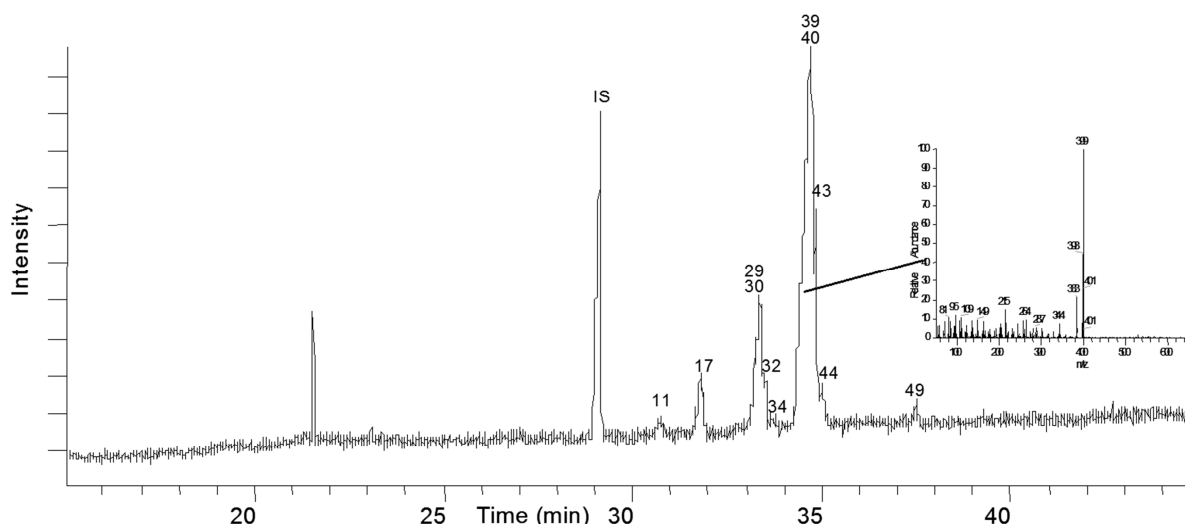


Abbildung 29: Total-Ionen-Chromatogramm einer on-line LC-GC/MS Untersuchung eines Extraktes von mit Stanylestern angereicherter Margarine. Peak-Nummerierung entsprechend Tabelle 12. Bedingungen siehe 3.2.7.3

Die Aufarbeitung der Margarinen erfolgte zunächst nach der entwickelten Schnellmethode mit Salzsäurebehandlung (3.2.6.6), da in den Benecol®-Produkten ein geringer Proteinanteil (3.1.5.2) enthalten war. Die mittels on-line LC-GC bestimmten Gesamtester- und die resultierenden veresterten Sterol-/Stanolgehalte sind in Tabelle 28 dargestellt. Diese stimmten mit den Packungsangaben überein. Lediglich die Resultate der Quantifizierung der Stanylester in Benecol® „Kevyt kasviraavalevite Oliivi 32 %“ lagen etwas über der Angabe.

Daraufhin wurde überprüft, ob für eine effektive Extraktion der Phytosteryl-/stanylester aus angereicherter Margarine auf die Salzsäurebehandlung verzichtet werden könnte. Dazu wurden 20-40 mg Margarine auf 0,1 mg genau in ein Vial gewogen und nach Zugabe der internen Standard-Lösung, *n*-Hexan/MTBE (3:2) und Na₂SO₄ (wasserfrei) durch Ultraschallbehandlung gelöst und getrocknet (Abbildung 30). Die Wiederfindung von STAEST-115 in gespikter, kommerzieller Becel® „original“-Margarine betrug 99,0 ± 2,1 %.

Tabelle 28: Phytosteryl-/stanylester-Analytik in angereicherten Margarinen mittels on-line LC-GC; Aufarbeitung nach Schnellmethode mit Salzsäurebehandlung (3.2.6.6)

Margarine	Gesamtester [g/100g] ¹	Veresterte Phytosterole/-stanole [g/100g] ⁴
Benecol® „Met Olijfolie“	11,3 ± 0,6 ²	6,9 ± 0,3
Benecol® „Kevyt kasvirasvalevite 32 %“	13,5 ± 1,3 ²	8,3 ± 0,8
Benecol® „Kevyt kasvirasvalevite Oliivi 32 %“	16,0 ± 0,7 ²	9,2 ± 0,4
Benecol® „Laktoositon kasvirasvalevite 32 %“	13,6 ± 0,3 ²	8,3 ± 0,2
Becel® pro-activ	12,1 ± 0,3 ³	7,4 ± 0,2

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, je n = 3

² Kalibrierung mit STAEST-115

³ Kalibrierung mit Vegapure® 95E

⁴ Berechnet auf Basis der Ester

Die Probenvorbereitung von Margarine erlaubt die Aufarbeitung einer Dreifachbestimmung innerhalb von 30 Minuten. Mit einer Analysenlaufzeit von 45 Minuten ist mit diesem Ansatz eine Dreifachbestimmung von Phytosteryl-/stanylestern in angereicherter Margarine innerhalb von 3 Stunden möglich.

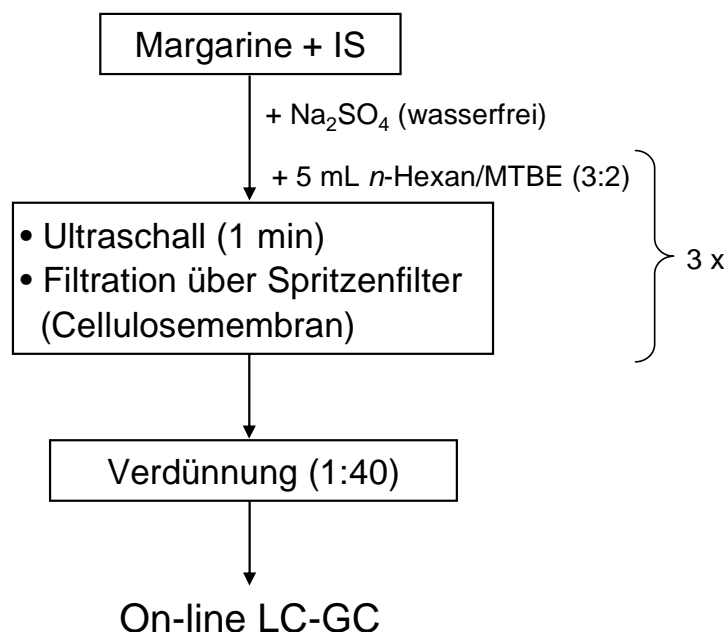


Abbildung 30: Probenvorbereitung für die Untersuchung angereicherter Margarineprodukte mittels on-line LC-GC

TMS-Derivate freier Sterole würden bei der on-line LC-GC-Analyse unter angewandten Bedingungen zusammen mit den Fettsäureestern transferiert werden. Auf die Silylierung und zusätzliche Bestimmung der freien Sterole wurde nach wenigen Stichproben, aufgrund der vernachlässigbar geringen Konzentrationen verzichtet. Die erzielten Ergebnisse der Phytosteryl-/stanylester-Bestimmungen in untersuchten Margarineprodukten nach der Probenvorbereitung ohne HCl-Aufschluss (Abbildung 30) sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Phytosteryl-/stanylester-Analytik in angereicherten Margarineprodukten mittels on-line LC-GC; Aufarbeitung nach der direkten Extraktionsmethode

Stanylester [g/100g] ^{1,2}	Benecol®				Phytosteryl- /stanylester	Becel® pro-activ [g/100g] ^{1,3}
	„Met Olijfolie“	„Kevyt kasvirasvalevite 32 %“	„Kevyt kasvirasvalevite Oliivi 32 %“	„Laktoositon kasvirasvalevite 32 %“		
11 ⁴	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,01	9 ⁴	0,10 ± 0,01
17	0,40 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,60 ± 0,03	0,52 ± 0,02	15	0,49 ± 0,02
29+30	1,58 ± 0,04	2,04 ± 0,07	2,33 ± 0,11	2,05 ± 0,07	17+18+20	0,09 ± 0,01
32	0,57 ± 0,02	0,92 ± 0,03	1,11 ± 0,08	0,93 ± 0,02	21	0,21 ± 0,01
34	0,24 ± 0,00	0,35 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,37 ± 0,02	23+24	0,57 ± 0,06
39+40	5,09 ± 0,07	6,71 ± 0,23	7,14 ± 0,29	6,46 ± 0,15	27 (+25+26)	1,23 ± 0,02
43	1,91 ± 0,03	2,41 ± 0,21	2,74 ± 0,04	2,27 ± 0,13	28+29+30	0,08 ± 0,03
44	0,71 ± 0,01	0,86 ± 0,04	0,98 ± 0,01	0,85 ± 0,03	32	0,06 ± 0,01
47	0,06 ± 0,01	-	-	-	36+37	2,89 ± 0,13
49	0,15 ± 0,02	0,05 ± 0,01	-	0,05 ± 0,03	38	5,35 ± 0,12
Summe Ester	10,9 ± 0,1	14,1 ± 0,5	15,6 ± 0,6	13,7 ± 0,3	39+40	0,48 ± 0,06
Veresterte Sterole/ Stanole [g/100g]⁵	6,7 ± 0,1	8,6 ± 0,3	9,5 ± 0,4	8,4 ± 0,2	43	0,64 ± 0,02
Brassicasterol [%]	-	-	-	-	Andere	0,10 ± 0,01
Campesterol [%]	-	-	-	-		
Campestanol [%]	24,1 ± 0,3	24,9 ± 0,4	26,3 ± 0,4	25,8 ± 0,2		
Stigmasterol [%]	-	-	-	-		
β-Sitosterol [%]	-	-	-	-		
Sitostanol [%]	75,9 ± 0,3	75,1 ± 0,4	73,7 ± 0,4	74,2 ± 0,2		
Andere [%]	-	-	-	-		
Veresterte Fettsäuren [%]⁵						
16:0/16:1	5,3 ± 0,2	5,2 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,2 ± 0,3		5,3 ± 0,2
18:0/18:1	61,3 ± 0,7	62,2 ± 1,4	60,8 ± 0,5	62,1 ± 0,4		33,5 ± 0,2
18:2	22,7 ± 0,6	23,7 ± 1,2	24,7 ± 0,3	23,4 ± 0,6		60,9 ± 0,4
18:3	8,7 ± 0,1	8,6 ± 0,2	9,2 ± 0,2	8,9 ± 0,1		-
20:0/20:1	1,9 ± 0,2	0,4 ± 0,0	-	0,4 ± 0,2		-

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, je n = 3

² Kalibrierung mit STAEST-115

³ Kalibrierung mit Vegapure® 95E

⁴ Nummerierung nach Tabelle 12

⁵ Berechnet auf Basis der Ester

⁶ Nicht kalkulierbar

Zwischen den beiden Aufarbeitungsmethoden konnte anhand der Ester-Bestimmung kein Unterschied festgestellt werden. Sowohl die Gesamtestergehalte als auch die berechneten Sterolgehalte waren vergleichbar und stimmten mit den Packungsangaben überein. Der Stanylestergehalt in Benecol® „Kevyt kasvirasvievite Oliivi 32 %“ war auch nach der direkten Extraktion etwas höher. Die Stanylesterprofile waren zwischen den Proben, unabhängig vom Herkunftsland der Proben und der Geschmacksrichtung, vergleichbar. Die zur Veresterung eingesetzte Stanolquelle enthielt ca. 25 % Campestanol und 75 % Sitostanol. Die Fettsäureverteilung der Ester deutete auf Rapsöl als Quelle hin. Aufgrund der schlechteren Auflösung der on-line LC-GC im Vergleich zum GC/FID wurden bereits bei der Untersuchung der Stanylester in Magermilch-Trinkjoghurt keine C22-Ester detektiert (Tabelle 27). Bei den Margarineproben konnten keine C22- und teilweise auch keine C20-Ester bestimmt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass in jeder Benecol®-Margarine kleine Mengen an C20- und C22-Estern vorhanden waren. Die Problematik der verringerten Auflösung könnte möglicherweise durch Verwendung einer anderen Transfertechnik, zum Beispiel dem „programmable temperature vaporiser“ (PTV)-Interface (2.3.2.3) behoben werden.

Die ermittelte Vergleichbarkeit der direkten Extraktionsmethode in Kombination mit der on-line LC-GC-Analyse ist in Tabelle 30 dargestellt. Des Weiteren wurde die Wiederholbarkeit durch die Untersuchung weiterer sieben Packungen der Margarine Benecol® „Met Olijfolie“ aus derselben Handelsbox validiert. Die Ergebnisse entsprachen den in Tabelle 29 dargestellten (186).

Tabelle 30: Vergleichbarkeit des on-line LC-GC-Ansatzes nach Aufarbeitung von einer Packung Benecol®-Margarine „Kevyt kasvirasvievite 32 %“ durch drei Personen

	Person 1	Person 2	Person 3
Summe Stanylester [g/100g] ¹	12,5 ± 0,7	13,4 ± 0,7	12,7 ± 0,4
Veresterte Stanole [g/100g] ²	7,6 ± 0,5	8,2 ± 0,4	7,7 ± 0,3

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, n = 3

² Berechnet auf Basis der Ester

Zudem wurden zusätzlich aus einer Packung Becel® pro-activ drei Dreifachaufarbeitungen und aus drei weiteren Packungen jeweils eine Dreifachaufarbeitung bestimmt. Die Ergebnisse entsprachen ebenfalls den in Tabelle 29 dargestellten Resultaten. Die

berechnete Sterol/Stanolverteilung stimmte mit der Spezifikation des SCF (131) überein, die Fettsäureverteilung wies auf Sonnenblumenöl als verwendete Fettsäurequelle hin.

4.2.3. On-line LC-GC mit PTV Interface

4.2.3.1. Etablierung geeigneter Bedingungen

Ein PTV-Inlet ermöglicht die Aufnahme großer Probenvolumina (bis zu mehreren hundert Mikrolitern) in ein GC-System. Ein Vorsäulensystem zum Abdampfen des Eluenten sowie ein in das Kapillarsäulensystem integrierter Lösemitteldampfausgang sind bei dieser Technik nicht nötig. Durch die geringere Lösemittelbelastung ist eine längere Lebensdauer der stationären Phasen zu erwarten.

Die Kopplung von LC und GC mittels PTV Interface erfolgte in dieser Studie mit zwei Standard-Agilent Geräten (3.2.7.4). Die LC-Parameter wurden im Wesentlichen von den bereits etablierten LC-GC-Bedingungen übernommen. Die Temperatur des Säulenofens wurde auf 27 °C eingestellt, dadurch eluierten die Sterylester etwas früher (Abbildung 31).

Eine Herausforderung war die Etablierung geeigneter Transfer- und Inlet-Bedingungen. Bei den ersten Versuchen war die Gasversorgung des Multimode-Inlets (MMI) abgekoppelt und erfolgte über das Transferventil. Durch den hohen anliegenden Vordruck wurde beim Schalten des Ventils die Fraktion sehr schnell transferiert bzw. in den MMI injiziert. In den GC-Chromatogrammen transferierter ungesättigter Sterylester waren daraufhin unmittelbar vor den Peaks der eigentlichen Analyten Peaks von Degradierungsprodukten zu erkennen. Zudem wurden in den GC-Chromatogrammen nachfolgender Blankläufe, ohne Probeninjektion in das LC-System, Peaks beobachtet, welche auf Verschleppungen aus dem Interface zurückzuführen waren. Diese Probleme konnten durch die zusätzliche Installation der PCM-C kontrollierten Trägergasversorgung der Transferleitung behoben werden (3.2.7.4). Verschleppungen wurden daraufhin nicht mehr beobachtet und die Peaks der im Inlet gebildeten Degradierungsprodukte waren nach Anpassung der MMI-Bedingungen sehr gering. Die Chromatogramme einer on-line LC-GC Untersuchung der industriellen Stanylester-Mischung STAEST-115, unter Verwendung der etablierten PTV Interface Bedingungen, sind in Abbildung 31 dargestellt.

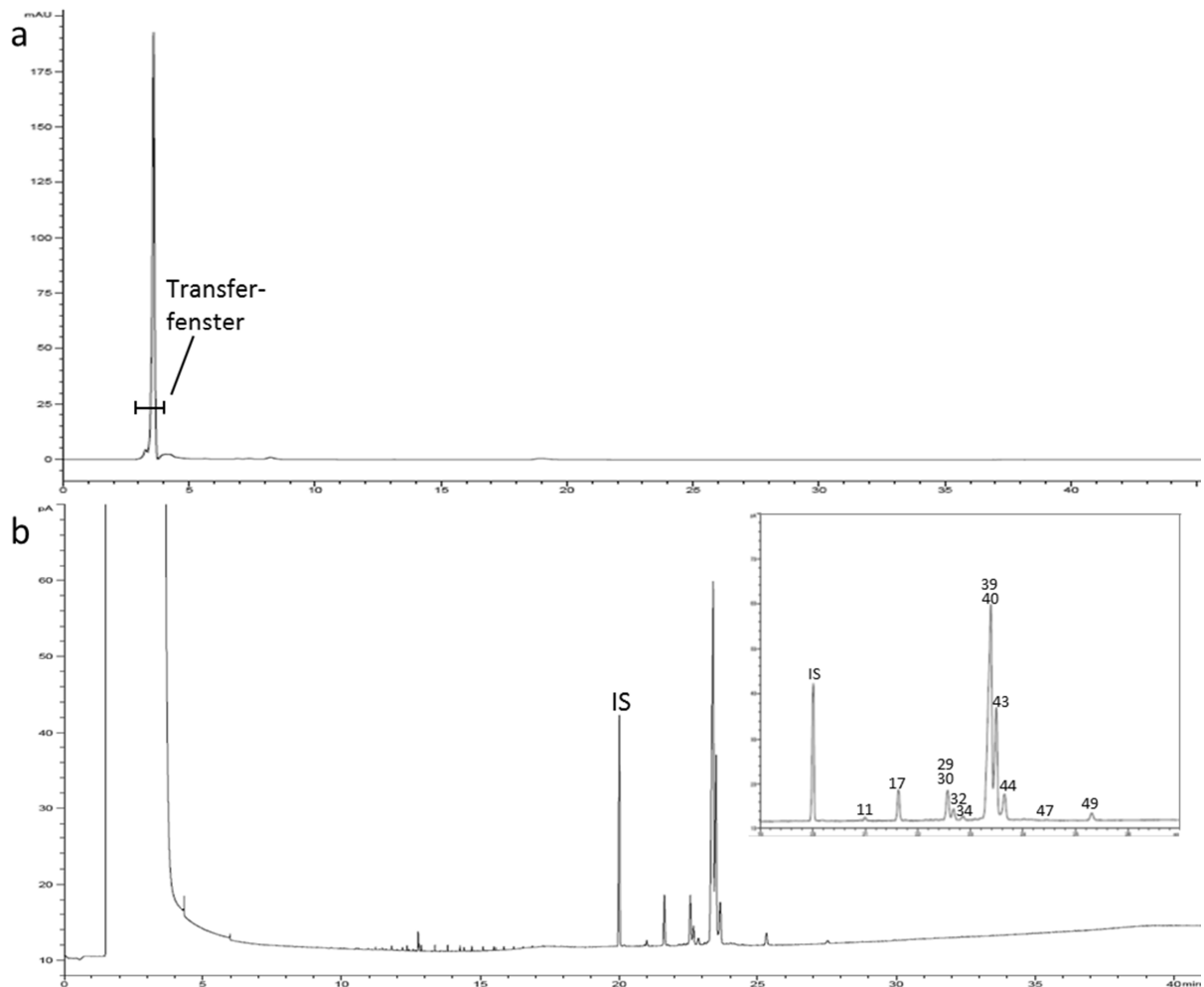


Abbildung 31: Untersuchung von STAEST-115 mittels PTV Interface-gekoppelter on-line LC-GC; LC- (a) und GC-Chromatogramm (b) der transferierten LC-Fraktion (vergrößerter Ausschnitt der Stanylester-Trennung; Peak-Nummerierung entsprechend Tabelle 12). Bedingungen siehe 3.2.7.4

Im Vergleich zur kapillargaschromatographischen Trennung nach Transfer der LC-Fraktion mittels Loop-Type Interface (Abbildung 26) war die Auflösung mittels PTV-Kopplung deutlich besser und sogar mit der einer einfachen GC-Analyse mit Split-Injektion vergleichbar (Abbildung 18). Das Lösemittel wurde bei dieser Kopplung zum größten Teil vor der Kapillartrennsäule eliminiert. Die anschließende Fixierung der Analyten nach Aufheizen des PTV erfolgte offensichtlich in einer ähnlich schmalen Bande wie bei der einfachen GC-Analyse.

Die Eignung des Systems für quantitative Bestimmungen wurde ebenfalls mit verdünnten Lipidextrakten von mit Stanylestern angereichertem Magermilch-Trinkjoghurt verifiziert. Die Kalibrierung erfolgte analog zur Kalibrierung des GC/FIDs mit verdünnten Lösungen (1:5). Die Korrelationskoeffizienten waren stets größer 0,9968. Die Ergebnisse der

on-line LC-GC Analysen sind in Tabelle 31 dargestellt. Lediglich die C22 Ester, welche mittels GC/FID quantifiziert wurden, konnten wie bei der LC-GC Kopplung mittels Loop-Type Interface (4.2.2.1.2) nicht bestimmt werden.

Tabelle 31: Quantifizierung von Pflanzenstanyleestern in Extrakten angereicherter Magermilch-Trinkjoghurts mittels PTV Interface-gekoppelter on-line LC-GC

Stanylester [g/100g]¹	Emmi-Benecol® Orange	Veresterte Stanole [g/100g]	3,07 ± 0,08
Campestanol 16:0	0,07 ± 0,00	Campestanol [%]	25,0 ± 0,5
Sitostanol 16:0	0,17 ± 0,01	Sitostanol [%]	75,0 ± 0,5
Campestanol 18:1/18:0	0,80 ± 0,03	Veresterte Fettsäuren [%]	
Campestanol 18:2	0,27 ± 0,01	16:0	4,9 ± 0,2
Campestanol 18:3	0,10 ± 0,01	18:1/18:0	63,3 ± 1,2
Sitostanol 18:1/18:0	2,36 ± 0,09	18:2	21,0 ± 0,7
Sitostanol 18:2	0,79 ± 0,03	18:3	8,0 ± 0,6
Sitostanol 18:3	0,30 ± 0,02	20:0/20:1	1,5 ± 0,1
Sitostanol 20:0/20:1	0,08 ± 0,01		
Anderer ²	0,06 ± 0,01		
Summe Ester	5,02 ± 0,13		

¹ Mittelwert ± Standardabweichung aus der Untersuchung von 6 Flaschen einer Packung, je n = 3

² Nicht kalibrierte Ester mit RF = 1 in Bezug auf IS quantifiziert

³ Berechnet auf Basis der Ester

Die Ergebnisse der Phytostanylester-Bestimmungen in Extrakten aus angereicherten Magermilch-Trinkjoghurts mittels PTV Interface gekoppelter on-line LC-GC waren mit denen mittels GC/FID (Tabelle 21) bzw. on-line LC-GC (Loop-Type Interface, Tabelle 27) ermittelten vergleichbar.

Eine Abnahme der Auflösung mit steigender Anzahl an Transfers, wie unter Verwendung des Loop-Type Interfaces beobachtet wurde, konnte unter Verwendung des PTV Interfaces auch nach mehreren hundert Transfers nicht festgestellt werden. Die mittels PTV Interface gekoppelte on-line LC-GC zeigte sich insgesamt als deutlich robuster und weniger wartungsintensiv.

4.2.3.2. Bestimmung in angereicherten Margarinen

Die flüssigchromatographische Fraktionierung der Phytosteryl-/stanylester von anderen Lipiden und der anschließende Transfer gelang mit den etablierten Bedingungen an der MMI-gekoppelten on-line LC-GC ebenfalls äußerst effektiv (Abbildung 32). Die Esterfraktion eluierte als scharfer Peak nach 3,6 min, die restlichen Lipide nach 18-32 min. Auf den Backflush der LC-Trennsäule wurde bei dieser Konfiguration verzichtet.

Die Wiederfindung von STAEST-115 in gespikter, kommerzieller Becel® „original“-Margarine betrug $101,1 \pm 1,7\%$. Die Ergebnisse der Untersuchung angereicherter Margarinen mittels PTV Interface gekoppelter online LC-GC sind in Tabelle 32 aufgeführt.

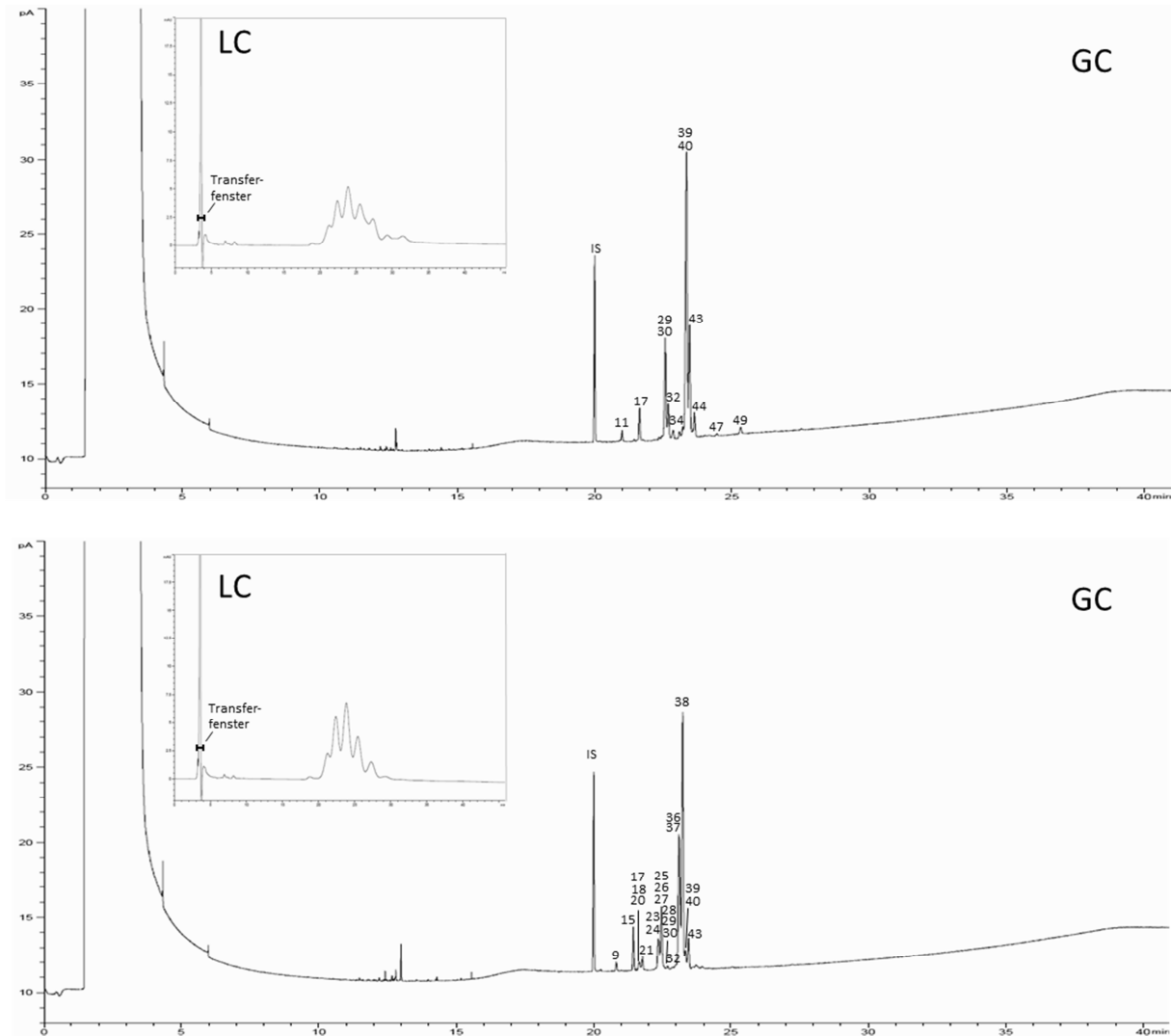


Abbildung 32: Analytik von Lipidextrakten angereicherter kommerzieller Margarinen mittels GC/FID; mit Zusatz an Pflanzenstanylestern (a), an Phytosteryl-/stanylestern (b). Bedingungen siehe 3.2.7.4

Die erzielten Ergebnisse der Untersuchungen von Extrakten aus Benecol® „Met Olijfolie“ und Becel® pro-activ Margarine waren zwischen den beiden on-line LC-GC-Systemen vergleichbar (Tabelle 29 und 30). Mittels PTV Interface gekoppelter LC-GC war die Streuung der Werte etwas größer. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mittels Loop-Type Interface blieb die kapillargaschromatographische Auflösung allerdings konstant gut; so war

es z.B. nach mehreren hundert Transfers noch möglich die Stanylester von C-20 Fettsäuren zu quantifizieren und zwischen den ungesättigten Steryl-/Stanylestern zu differenzieren.

Tabelle 32: Phytosteryl-/stanylester-Analytik in angereicherten Margarinen mittels PTV Interface-gekoppelter on-line LC-GC

Stanylester [g/100g] ^{1,2}	Benecol® „Met Olijfolie“	Phytosteryl-/stanylester [g/100g] ^{1,3}	Becel® pro-activ	Bellasan® aktiv	Deli Reform® Active
11 ⁴	0,18 ± 0,01	9 ⁴	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,01
17	0,49 ± 0,02	15	0,52 ± 0,06	0,53 ± 0,02	0,53 ± 0,01
29+30	2,16 ± 0,16	17+18+20	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,00
32	0,71 ± 0,08	21	0,21 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,01
34	0,24 ± 0,01	23+24	0,58 ± 0,03	0,71 ± 0,01	0,72 ± 0,05
39+40	6,63 ± 0,52	27 (+25+26)	1,23 ± 0,11	1,30 ± 0,09	1,31 ± 0,02
43	2,22 ± 0,24	28+29+30	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01
44	0,86 ± 0,10	32	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
47	0,20 ± 0,03	36+37	2,94 ± 0,24	3,38 ± 0,17	3,30 ± 0,03
Andere	0,20 ± 0,06	38	5,35 ± 0,53	5,16 ± 0,25	5,20 ± 0,11
		39+40	0,45 ± 0,04	0,40 ± 0,01	0,38 ± 0,02
		43	0,77 ± 0,08	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,02
		Andere	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Summe Ester	13,9 ± 1,1		12,5 ± 1,1	12,8 ± 0,6	12,8 ± 0,2
Veresterte Sterole/ Stanole [g/100g]⁵	8,5 ± 0,7		7,7 ± 0,6	7,8 ± 0,3	7,8 ± 0,2
Brassicasterol [%]	-		2,2 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Campesterol [%]	-		15,4 ± 0,1	16,7 ± 0,2	16,9 ± 0,3
Campestanol [%]	24,1 ± 0,2		1,0 ± 0,0 ²	0,6 ± 0,1 ²	0,6 ± 0,1 ²
Stigmasterol [%]	-		n.k. ⁶	n.k. ⁶	n.k. ⁶
β-Sitosterol [%]	-		70,4 ± 0,2	70,8 ± 0,0	70,7 ± 0,5
Sitostanol [%]	75,9 ± 0,6		10,6 ± 0,0	9,0 ± 0,2	8,9 ± 0,3
Andere [%]	-		0,6 ± 0,1		
Veresterte Fettsäuren [%]⁵					
16:0/16:1	4,9 ± 0,2		6,0 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1
18:0/18:1	63,1 ± 0,3		32,4 ± 0,5	35,7 ± 0,8	35,2 ± 0,1
18:2	21,1 ± 0,7		61,0 ± 0,3	57,7 ± 0,7	58,2 ± 0,1
18:3	7,9 ± 0,2		-	-	-
20:0/20:1	1,4 ± 0,1		-	-	-

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, je n = 3

² Kalibrierung mit STAEST-115

³ Kalibrierung mit Vegapure® 95E

⁴ Nummerierung nach Tabelle 12

⁵ Berechnet auf Basis der Ester

⁶ Nicht kalkulierbar

Zusätzlich wurden zwei weitere kommerzielle Margarineprodukte untersucht (Tabelle 32). Die ermittelten Phytosteryl-/stanylesterprofile waren vergleichbar mit denen in Becel® pro activ. Die ermittelten Gehalte stimmten mit den Packungsangaben überein und die berechneten Sterol-Profile mit der Spezifikation des SCF (131).

4.2.4. Zusammenfassung

Die Kopplung von Flüssig- und Kapillargaschromatographie wurde erfolgreich zur Analytik komplexer Phytosteryl-/stanylestermischungen etabliert. Eine effiziente flüssigchromatographische Isolierung der Phytosterylesterfraktion aus Lipidextrakten angereicherter Margarinen gelang an einer unmodifizierten Kieselgelsäule. Die on-line transferierte Esterfraktion wurde anschließend an Trifluorpropylmethylpolysiloxan kapillargaschromatographisch getrennt. Die GC-Trennung sowie die Ergebnisse der Esterquantifizierung in Magermilch-Trinkjoghurtextrakten entsprachen jenen der einfachen GC/FID-Untersuchungen. Allerdings war die Auflösung der GC-Trennung mittels Loop-Type Interface (500 µL Loop) etwas schlechter und verlor zudem mit steigender Anzahl an Transfers deutlich an Qualität. Das Problem konnte durch Austausch der Vorsäulen zwar wieder behoben werden, bedeutete aber dennoch einen für die Routineanalytik inakzeptabel großen Wartungsaufwand.

Die Verwendung eines PTV Interfaces zur on-line Kopplung von LC und GC erlaubte das Abdampfen des Lösemittels bereits vor der Kapillartrennsäule des GC-Systems. Dadurch wurde die Lösemittelbelastung der Säule deutlich reduziert. Die Auflösung war vergleichbar mit der einer GC/FID-Analyse nach Splitinjektion. Auch nach 600 Transfers wurde noch kein Verlust der Trennschärfe beobachtet. Insgesamt zeigte sich daher das mittels PTV Interface gekoppelte on-line LC-GC System als deutlich robuster und dementsprechend besser geeignet für einen Routineeinsatz.

Für die Untersuchung angereicherter Margarine mittels on-line LC-GC konnte die Probenvorbereitung auf ein Minimum reduziert werden. Die Ergebnisse waren konform mit den Herstellerangaben sowie der Spezifikation des Scientific Committee on Foods.

Die Untersuchung von Phytosteryl-/stanylestern in weiteren Lebensmittelkategorien, wie zum Beispiel angereicherter Milch, könnte aufgrund der enthaltenen Lipide und des relativ hohen Proteingehaltes eine Kombination von der Schnellmethoden-Extraktion (3.2.6.6) und Analytik mittels on-line LC-GC erfordern.

4.3. Flüssigchromatographische Untersuchung (LC/MS)

4.3.1. Einleitung

Mezine *et al.* (32) beschrieben eine LC/MS-Methode zur Untersuchung von Phytosteryl- und stanylestern in angereicherten Lebensmitteln. Die Trennung erfolgte an einer Luna Hexyl-Phenyl Trennsäule mit einem Acetonitril-in-Wasser-Gradienten (90–100 %). Die Überlagerung von Sterylesterpeaks und Triglyceriden erforderte eine Detektion mittels Massenspektrometrie. Dazu wurden die Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)-MS Bedingungen optimiert. Die Detektion von Steryl- und Stanylestern erfolgte im Scan Modus in einem Massenbereich von m/z 350 – 410, die Quantifizierung anhand der Massenextrakte des Ions $[M+H-HOOCR]^+$, welches bei der APCI von Steryl- und Stanylestern gebildet werden soll. MS-Spektren wurden in dieser Arbeit nicht gezeigt; zudem lagen für die Stanylester keine Referenzsubstanzen vor. Ein industrielles Δ^5 -Phytosterylester-Muster diente als Standard. Die Elutionsreihenfolge der Phytosterylester wurde abgeleitet von der Elutionsabfolge der Cholesterylester von Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäure. Eine Überprüfung mit synthetisierten Standardsubstanzen wurde nicht beschrieben. Als interner Standard wurde Cholesteryllaurat verwendet. Der Response individueller Cholesterylester gegenüber Cholesteryllaurat (1,00-1,05) wurde nicht beachtet, der des Linolensäureesters nicht bestimmt. Aufgrund der Diskrepanz zwischen der Sterolquantifizierung mittels LC/MS (basierend auf der Bestimmung der Ester) und GC/FID (nach Verseifung der Ester) wurden Responsefaktoren entsprechend den veresterten Sterolresten gebildet. Für β -Sitosterol und Campesterol betragen diese 1,32 bzw. 1,25; für Stigmasterol 3,05. Für Avenasterol, welches mittels GC/FID nicht detektiert werden konnte, wurde ebenfalls ein Responsefaktor von 3,05 angenommen. Der sich mit den gebildeten Responsefaktoren berechnete Sterylestergehalt des industriellen Δ^5 -Phytosterylester-Musters ergab in der Summe 105,18 %.

Als Anwendungsbeispiele für die quantitative Bestimmung von Sterylestern dienten eine kommerzielle Margarine und ein mit einer Emulsion des Sterylester-Musters angereicherter Orangensaft. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat unter Verwendung eines Ultraschallbades. Es ist anzunehmen, dass diese Art der Extraktion bei klassischen Emulsionen funktioniert, jedoch bei mit Milchproteinen emulgierten Sterylester-Präparaten, zum Beispiel entsprechend der Patentschrift WO 2007022890 [24], nicht quantitativ ist. In der angereicherten Margarine (Herstellerangabe: 12 %) wurde ein Sterylester-Gehalt von

12,7 ± 0,6 % bestimmt. Der Einfluss co-eluierender Triglyceride auf die Quantifizierung mittels LC/MS durch Matrixsuppressionen wurde nicht untersucht. Die Wiederfindung der Sterylester aus dem eigens angereicherten Orangensaft betrug 99 ± 2 %.

Zudem wurde ein Extrakt aus mit Stanylestern angereicherter Margarine qualitativ untersucht. Die Fettsäure-Verteilung der detektierten Sitosterylester unterschied sich dabei von jener der Campestanyl- und Sitostanylester.

Mezine *et al.* (32) konnten die prinzipielle Eignung der LC/MS zur Analytik pflanzlicher Sterylester und Stanylester in angereicherten Lebensmitteln zeigen. Allerdings wurde bisher nur eine Δ^5 -Sterylester-Mischung quantitativ untersucht und die Stanylester-Mischung nur qualitativ. Zudem dürfen die Esterpräparate, welche für funktionelle Lebensmittel eingesetzt werden, neben den Sterylestern bis zu 20 % Stanylester enthalten. Der Einfluss von Matrixeffekten (187, 188) auf die Quantifizierung von Phytosteryl-/stanylestern wurde bisher nicht untersucht. Inwiefern die Methode tatsächlich zur Routineanalytik geeignet ist, sollte im Folgenden geklärt werden.

4.3.2. Etablierung der Methode

4.3.2.1. HPLC-Bedingungen

Die LC/(APCI)MS-Bedingungen wurden zunächst von Mezine *et al.* (32) übernommen. Die beschriebene Basislinientrennung von Sterylestern konnte im Vorversuch nicht erreicht werden. Acetonitril (ACN) besitzt eine vergleichbare Polarität zu Methanol (MeOH). Die Verwendung eines MeOH/H₂O-Gradienten könnte die Ionisierung der Analyten durch die geringere Protonenaffinität von Methanol im Vergleich zum Acetonitril begünstigen (189). Unter Verwendung des ACN/H₂O-Gradienten war die beschriebene Signal-Suppression (189) insbesondere bei der Ionisierung von pflanzlichen Stanylestern deutlich erkennbar. Für die Flüssigchromatographie wurde daher anstatt eines ACN/H₂O-Gradienten ein MeOH/H₂O-Gradient etabliert.

Die Detektion der Steryl-/Stanylester erfolgte in dieser Studie direkt im SIM-Modus und nicht über Ionen-Extrakt-Chromatogramme des Fragmentes $[M+H-HOOCR]^+$ aus einem größeren Scanbereich (m/z 350-410). Dies resultierte in einem deutlich besseren Signal/Rausch-Verhältnis, das heißt in höherer Empfindlichkeit. Vorversuche zeigten, dass diese vergleichbar war zu der des GC/FID; sie lag etwa bei 0,05 µg Sitostanypalmitat/mL Injektionslösung.

Mit Lösungen einzelner kommerzieller Cholesterylester und synthetisierter Phytosteryl-/stanylester wurde der MeOH/H₂O-Gradient optimiert. Die Elutionsreihenfolge von langkettigen Cholesterylestern an einer Luna Hexyl-Phenyl Trennsäule ist in Abbildung 33 dargestellt: (i) je länger die veresterte Fettsäure am Sterol, desto länger war die Retention; (ii) Sterylester ungesättigter Fettsäuren wurden weniger stark zurückgehalten.

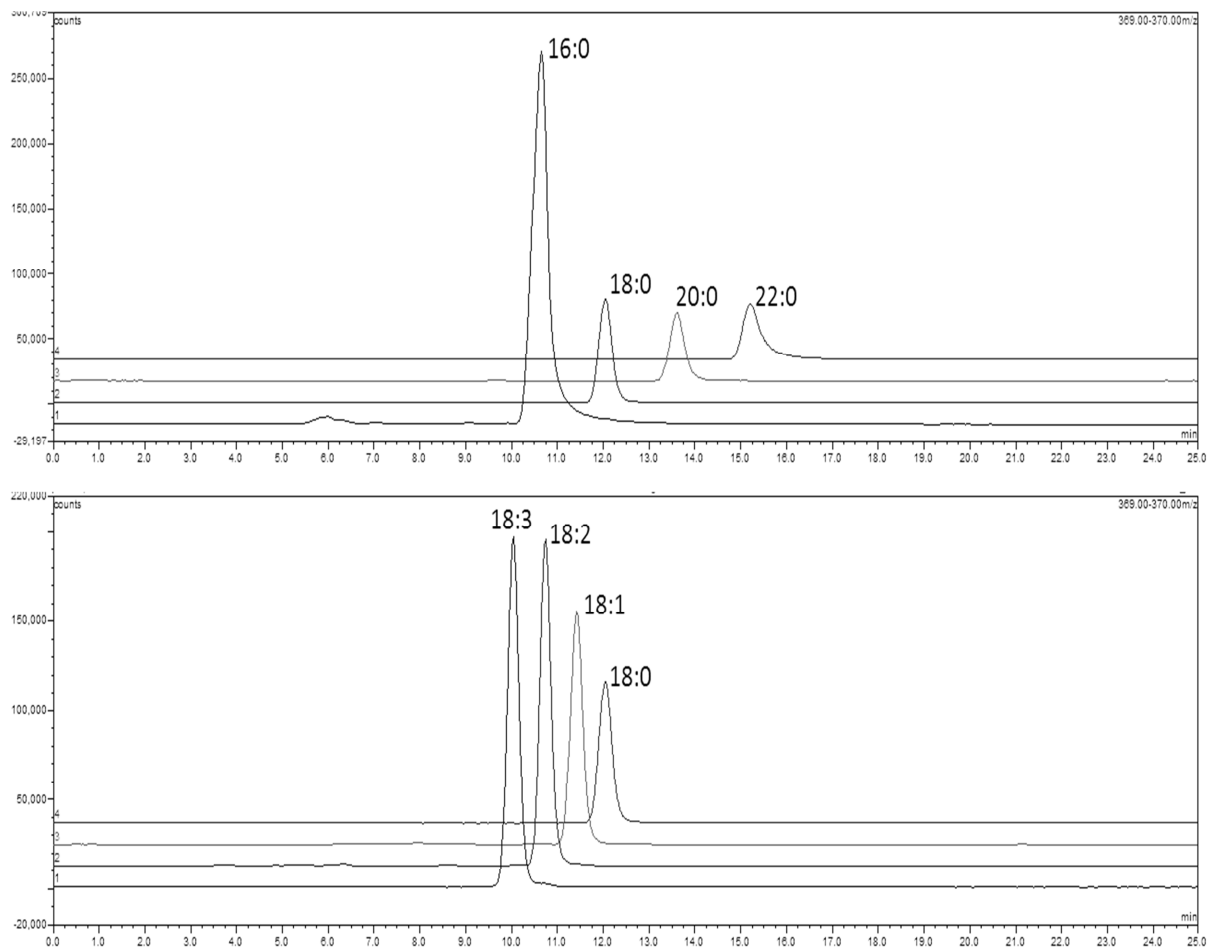


Abbildung 33: Elutionsreihenfolge von Cholesterylestern an einer Luna Hexyl-Phenyl Trennsäule. Bedingungen siehe 3.2.8

Wie aus Abbildung 33 ersichtlich, traten Coelutionen bei Estern mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit Estern kurzkettiger Fettsäuren auf. Die übereinander gelegten SIM-Chromatogramme von synthetisierten Sitostanylestern (Abbildung 34) stellen die Trennproblematik nochmals dar. Im Gegensatz zu den beschriebenen Co-elutionen von Ölsäure- und Palmitinsäureestern bzw. Stearinsäure- und Eicosensäureestern unter Verwendung des ACN/H₂O-Gradienten (32) traten unter den angewandten Bedingungen Co-elutionen bei Anwesenheit von Estern mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf: die

Linolsäureester co-eluierten mit denen von Palmitinsäure, die Linolensäureester mit denen von Palmitoleinsäure (Abbildung 34).

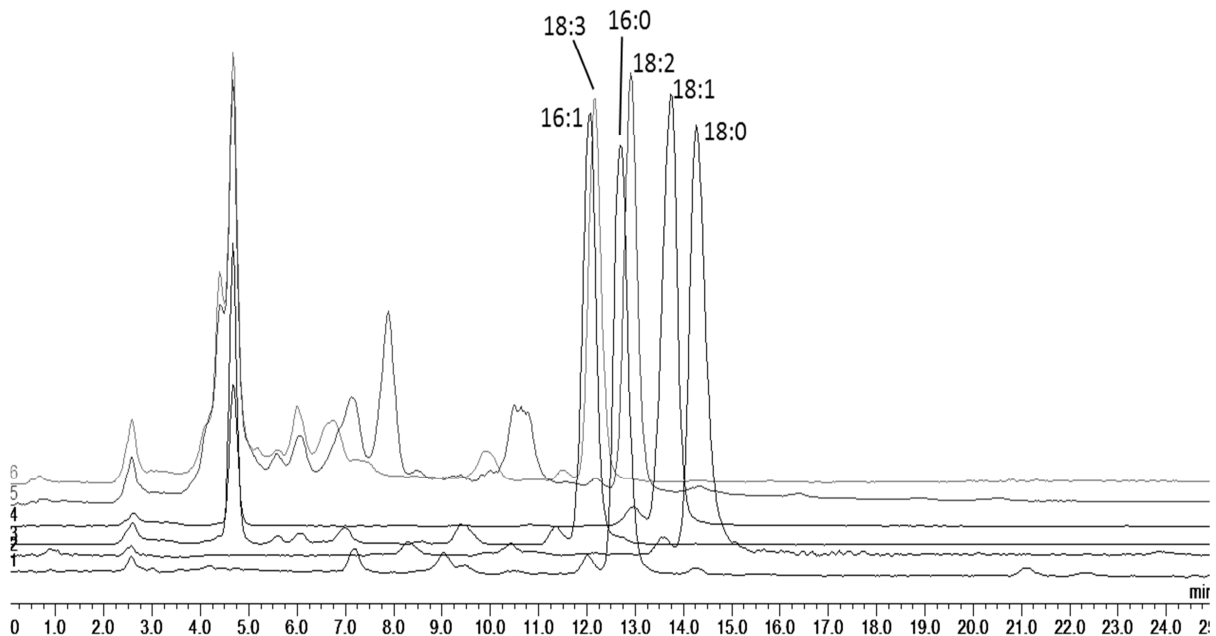


Abbildung 34: Co-elutionen bei der flüssigchromatographischen Trennung von Sitostanylestern an einer Luna Hexyl-Phenyl Trennsäule. Bedingungen siehe 3.2.8

4.3.2.2. APCI-Ionisierung

Nach Umstellung des Gradienten wurden in den Spektren der Steryl- und Stanylester neben den erwarteten $[M-FS+H]^+$ -Fragmenten zusätzliche Peaks in hohen Intensitäten beobachtet. Zum Beispiel stellte bei allen untersuchten Cholesteryl-fettsäureestern stets das Ion $[M-HOOCR+15]^+$ den Basispeak dar (Abbildung 35). Zudem wurden neben den protonierten Molekülionen $[M+H]^+$ Addukte entsprechend $[M+18]^+$ und $[M+30]^+$ angezeigt, welche bei den Sterylestern stets in höheren Intensitäten auftraten als das protonierte Molekülion.

Auch in Spektren der Stanylester gesättigter Fettsäuren konnte kein $[M+H]^+$ -Ion beobachtet werden, nur die Molekülionenaddukte. Mit zunehmender Anzahl der Doppelbindungen in den veresterten Fettsäuren nahmen die Intensitäten des $[M+H]^+$ -Ions zu. Adduktbildungen sind für APCI bekannt. Die gewöhnlichen Addukte sind $[M+(H_2O)H]^+$ ($+m/z$ 19) und $[M+(CH_3OH)H]^+$ ($+m/z$ 33). Allerdings können je nach Natur des Analyten, in manchen Fällen Moleküle $[M+H_2O]^+$ ($+m/z$ 18) bzw. $[M+CH_3OH]^+$ ($+m/z$ 32) auftreten. Ein

$[M+30]^+$ - bzw. $[M+62]^+$ -Addukt wurde nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht beschrieben.

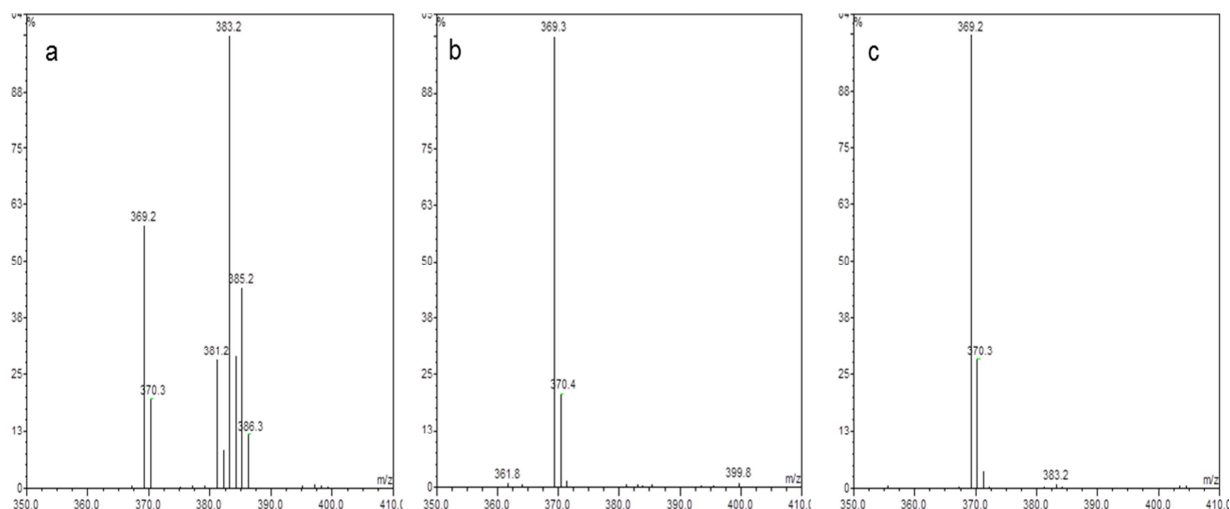


Abbildung 35: APCI-Ionisierung von Cholesterylpalmitat in Abhängigkeit von Eluentenfluss und Gradient: MeOH/H₂O-Gradient (3.2.8), 0,6 mL/min (a); MeOH/H₂O-Gradient, Split des Eluentenstromes (1:8) für MS (b), ACN/H₂O-Gradient (32), 0,6 mL/min

Bei der Ionisierung der Steryl- und Stanylester war unter Verwendung des MeOH/H₂O-Gradienten bei einem Fluss von 0,6 mL/min starke Adduktbildungen zu beobachten (Abbildung 35). Durch Einbau des Splits (T-Stück mit Restriktionskapillare) zwischen Trennsäule und MSQ erreichte nur noch 1/8 des Eluentenflusses die Ionenquelle. Dadurch wurde weniger Eluent ionisiert und die Adduktbildung verhindert. Die Ionisierung wurde so optimiert, ohne die HPLC-Bedingungen zu beeinflussen. Die in der APCI-Quelle gebildeten Ionen entsprachen nun den Erwartungen (Abbildung 36). Die resultierenden chromatographischen Signale waren größer, da im Verhältnis zu den Analyten nun weniger Fließmittel ionisiert wurde. Durch das Splitten des Flusses wird zudem der Verschmutzung der Ionenquelle vorgebeugt, wodurch die Wartungsintervalle verlängert werden.

Bei der Ionisierung von Phytosteryl-/stanylestern mittels APCI (Abbildung 36) wurde mit Ausnahme der C18:3-Stanylester stets das Fragment $[M-FS+H]^+$ als Basispeak gebildet, bei der Ionisierung von C18:3-Stanylestern das Ion $[FS+H]^+$. Die Intensitäten der Molekülionen nahmen mit stärker ungesättigten Fettsäureresten zu. Allerdings waren diese bei Δ^5 -Sterylestern im Vergleich zu Stanylestern viel geringer und nur bei Estern ungesättigter Fettsäuren beobachtbar. $[FS+H]^+$ -Ionen wurden nur bei Stanylestern ungesättigter Fettsäuren detektiert (Abbildung 36).

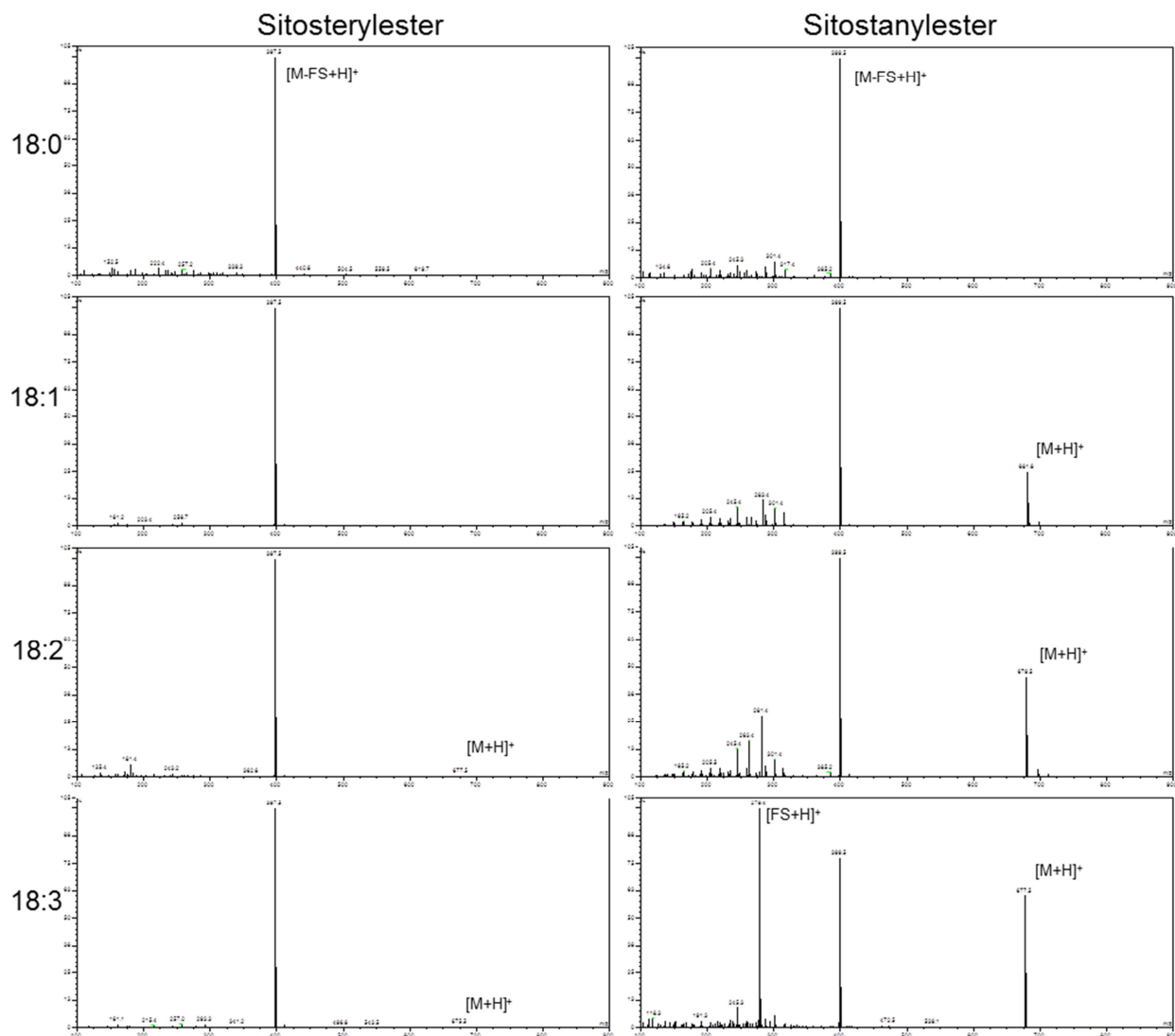


Abbildung 36: Full-Scan-Spektren (m/z 100-900) synthetisierter C18-Fettsäureester von Sitosterol und Sitostanol mittels LC/(APCI)MS. Bedingungen siehe 3.2.8

Die hohen relativen Intensitäten der $[M+H]^+$ -Ionen von Stanylestern mehrfach ungesättigter Fettsäuren können, durch Kalibrierung der entsprechenden SIM-Spuren, zur Bestimmung dieser Esteranteile in den co-eluierenden Peaks (Abbildung 34) genutzt werden. So konnte zum Beispiel der Anteil der Linolsäureester in den Stanyl-C16:0/C18:2-Peaks bestimmt werden (4.3.4.1). Bei Sterylestern war dies unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich.

Des Weiteren wurde untersucht inwiefern die chromatographischen Signale durch Zusatz geringer Konzentrationen organischer Säuren im Eluenten (1; 10 und 100 ppm Ameisen-, Essig- bzw. Trifluoressigsäure) verstärkt werden können (190). Der Einfluss der organischen Säuren war allerdings gering.

4.3.2.3. Trennung komplexer Phytosteryl-/stanylester-Mischungen

Die LC/MS-Chromatogramme synthetisierter Phytosteryl-/stanylester-Mischungen sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Phytosteryl-/stanylester der C16 und C18-Fettsäuren eluieren unter den angewandten Bedingungen (3.2.8) zwischen 10,5 und 14,5 Minuten.

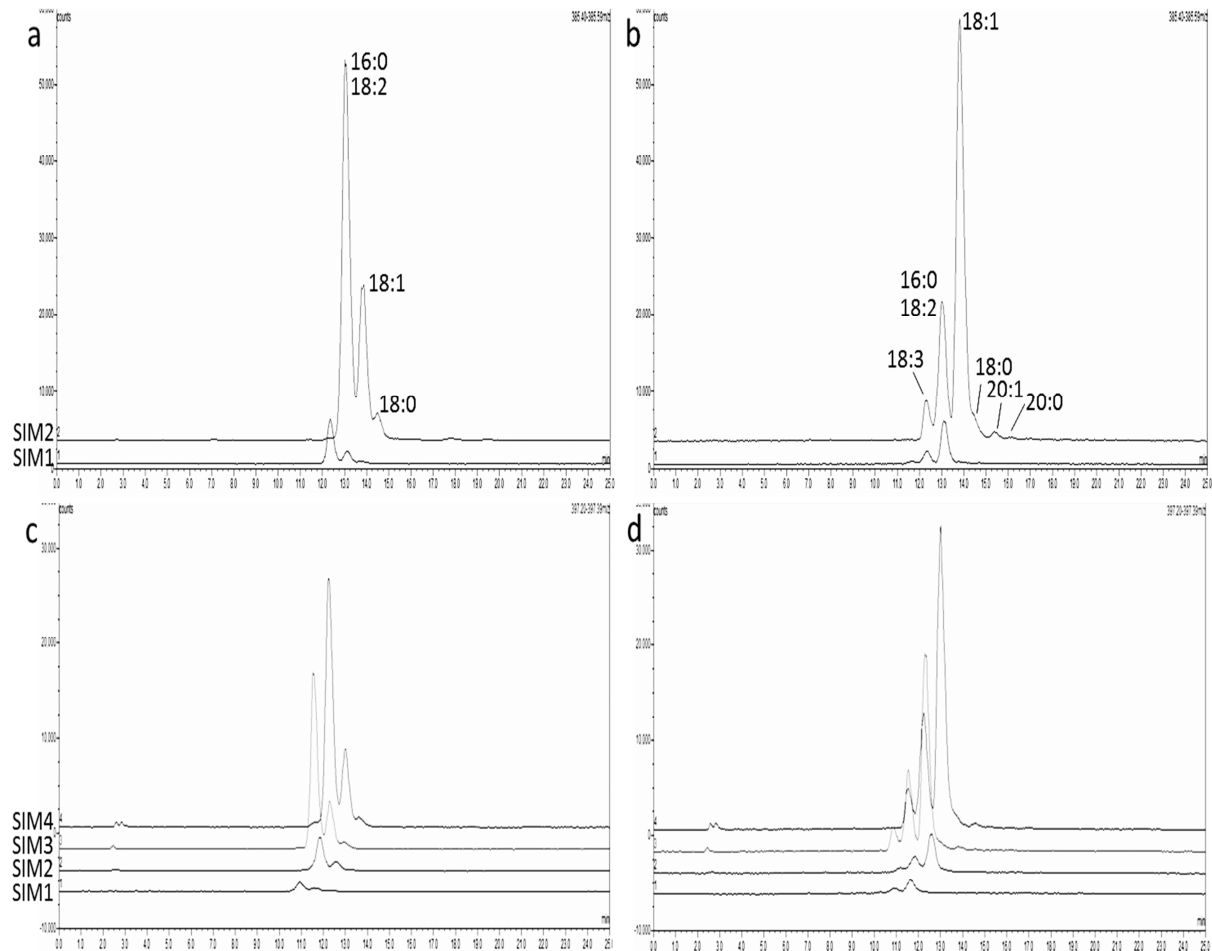


Abbildung 37: LC/MS-(SIM)-Chromatogramme synthetisierter Ester-mischungen von pflanzlichen Stanolen (a, b) und Soja-Sterolen (c, d), welche mit den Fettsäuren von Sonnenblumenöl (a, c) und Rapsöl (b, d) verestert wurden; detektierte SIM-Ionen $[M-FS+H]^+$, Bild a und b: Campestanylester (SIM1) und Sitostanylester (SIM2), Bild c und d: Brassicasterylester (SIM1), Stigmasterylester (SIM2), Campesterylester (SIM3) und Sitosterylester (SIM4); die Elutionsreihenfolge der Fettsäureester war für alle Sterole/Stanoole gleich (Tabelle 33). Bedingungen siehe 3.2.8

Mittels LC/MS konnten durch Betrachtung der einzelnen Massenspektren zusammengehörende Ester nach ihren Sterol-/Stanolresten differenziert werden. Aufgrund des Tailings höher konzentrierter Peaks konnten allerdings C18:0- nicht mehr von C18:1-Estern differenziert werden (Abbildung 37(b) und (d)). Diese wurden daher zur Quantifizierung zusammengefasst. Die Retentionszeiten einzelner synthetisierter Ester sind

in Tabelle 33 aufgeführt.

Die Aufzeichnung einzelner Sterolreste im SIM führte durch die simultane Detektion von Δ^5 -Sterylester-Isotopen in den Chromatogrammen von Stanylestern zu unerwünschten Effekten: Die Anwesenheit von Δ^5 -Sterylestern in den Estermischungen resultierte in einem vermeintlich anderen Fettsäureesterprofil der detektierten Stanylester (Abbildung 38).

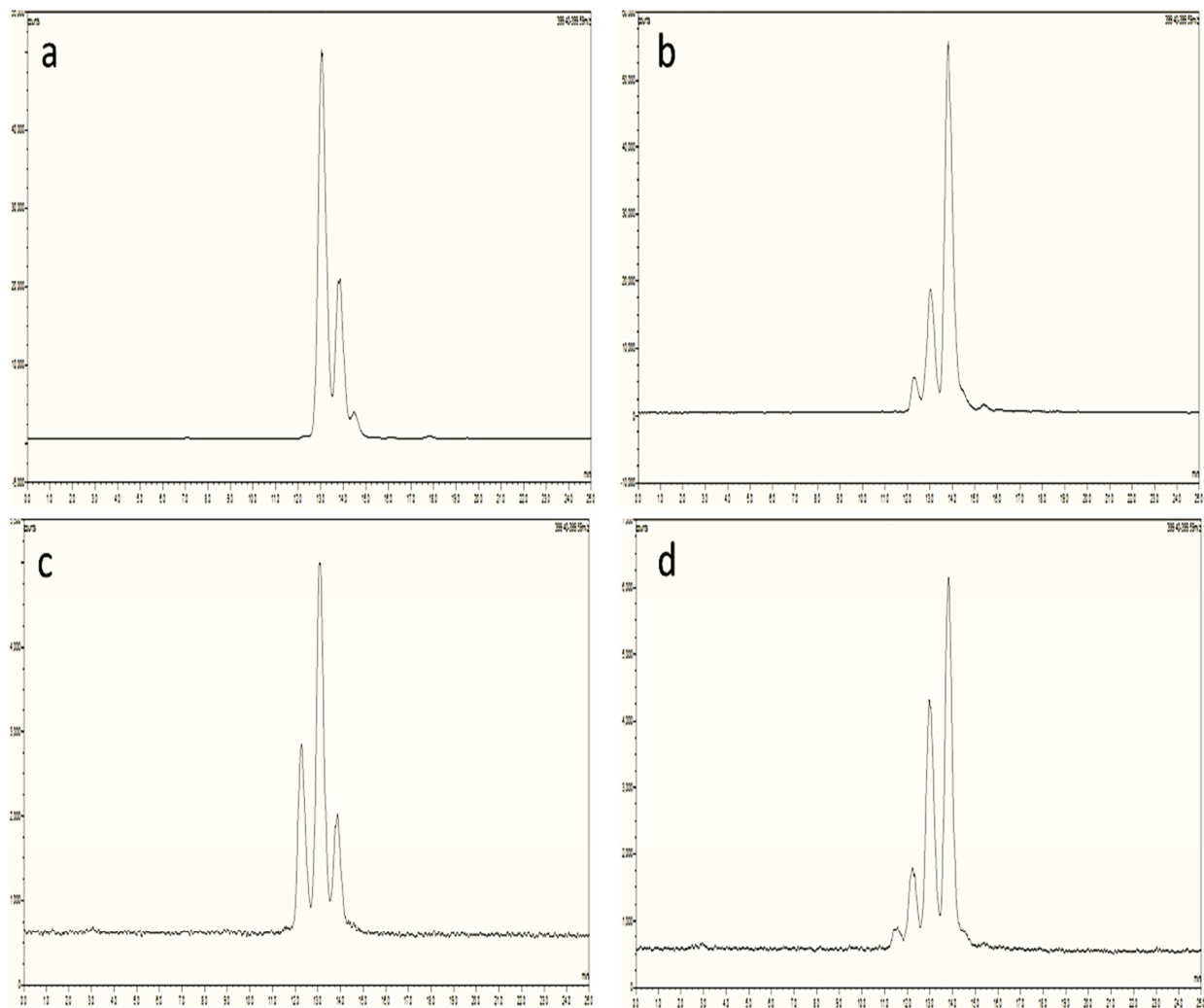


Abbildung 38: LC/MS-(SIM)-Chromatogramme der detektierten Sitostanylester in synthetisierten Estermischungen von Stanolen (a, b) und Tallöl-Sterolen (c, d); Fettsäureester von Sonnenblumenöl (a, c) und Rapsöl (b, d). Bedingungen siehe 3.2.8

Durch die unerwünschte Aufzeichnung von Isotopenpeaks in anderen Massenspuren, ergibt sich für die Quantifizierung mittels LC/MS die Notwendigkeit möglichst identische Mischungen für die Kalibrierung einzusetzen. Eine Limitierung des LC/MS-Ansatzes besteht darin, dass nur jene Ester exakt bestimmt werden können, die gezielt analysiert werden sollen; bei alleiniger Betrachtung theoretischer Massenspuren, ohne Berücksichtigung der

möglichen Interaktionen, könnten leicht falsche Schlussfolgerungen gezogen werden.

Tabelle 33: Retentionszeiten [min] synthetisierter Phytosteryl-/stanylester

Fettsäurerest	Phytosterol/-stanolrest					
	Brassicasterol ¹	Campesterol	Stigmasterol	Campestanol	Sitosterol	Sitostanol
C8:0	5,66	6,00	6,21	6,62	6,49	7,07
C10:0	6,73	7,18	7,44	7,82	7,69	8,38
C14:0	- ²	9,91	10,11	10,64	10,56	11,31
C16:1	-	-	-	11,46	-	12,17
C18:3	-	10,82	10,73	11,63	11,48	12,28
C16:0	-	11,4	11,59	12,15	12,04	12,84
C18:2	-	11,55	11,80	12,35	12,21	13,01
C18:1	-	12,26	12,56	13,06	12,9	13,78
C18:0	-	12,99	13,18	13,75	13,61	14,45
C20:0	-	14,54	14,80	15,34	15,20	16,04
C22:1	-	15,38	15,66	16,26	16,11	16,95
C22:0	-	16,16	16,41	17,00	16,90	17,74

¹ Minorkomponente in Tallöl-Sterolmischung

² Nicht synthetisiert

4.3.3. Untersuchung angereicherter Lebensmittel

Der Schwerpunkt der im Folgenden präsentierten LC/MS-Untersuchungen lag auf der Vergleichbarkeit der Ester-Quantifizierung mit den kapillargaschromatographischen Bestimmungen. Auf die Quantifizierung freier Sterole in den Produkten wurde daher verzichtet. „Unbekannte“ bzw. „andere“ Ester wurden mittels LC/MS im SIM-Modus nicht erfasst.

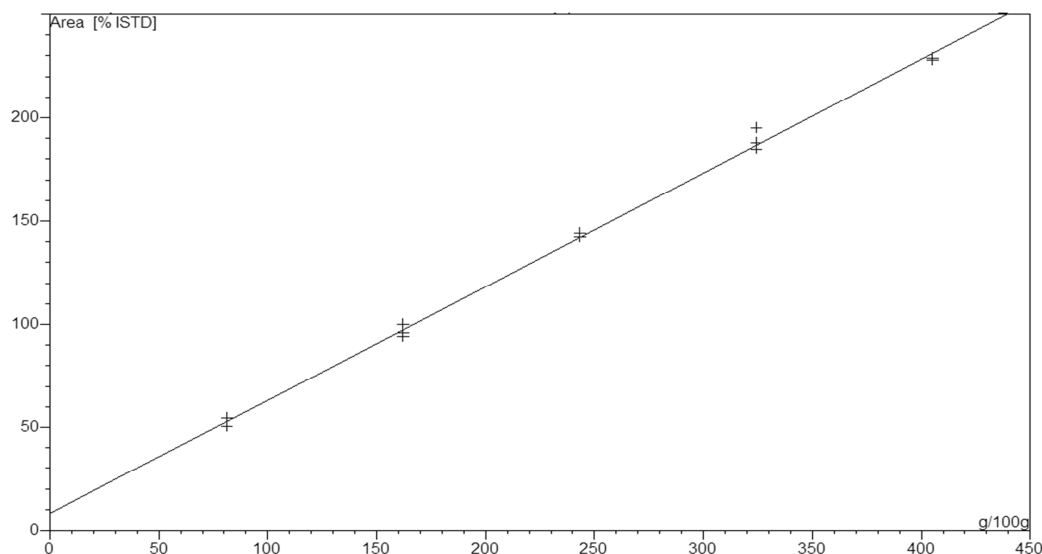


Abbildung 39: Kalibrierkurve von Sitostanyl-18:0/18:1 mittels LC/MS

Die Kalibrierungen und Analysenläufe erfolgten mit den Lösungen, welche bereits für die GC/FID- oder on-line LC-GC-Analytik eingesetzt wurden. Vor den LC/MS-Analysen wurden diese eingeeengt und in doppeltem Volumen Ethylacetat wieder aufgenommen. Die Läufe von Kalibrierlösungen erfolgten jeweils in derselben Sequenz wie die Probenläufe. Die Kalibrierungen erfolgten für die einzeln detektierten Ester. Die Kalibrierkurve von Sitostanyl-18:0/18:1 ist exemplarisch in Abbildung 39 dargestellt.

4.3.4. Magermilch-Trinkjoghurt

4.3.4.1. Emmi-Benecol®

Das erste mittels LC/MS untersuchte angereicherte Produkt war, analog zur kapillargaschromatographischen Analytik, ein mit Stanylestern angereicherter Magermilch-Trinkjoghurt. Die zur Verifizierung der Schnellmethode gewonnenen 18-Extraktlösungen aus der Packung Emmi-Benecol® „orange“ wurden, in Ethylacetat gelöst, mittels LC/MS quantifiziert. Die Chromatogramme der einzelnen SIM-Kanäle sind in Abbildung 40 dargestellt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 aufgeführt. C22-Ester konnten nicht bestimmt werden, C18:1 und C18:0-Ester wurden aufgrund des Tailings der Oleatpeaks zusammengefasst. Die berechneten Gehalte sowie die Stanolverteilung waren zwischen den chromatographischen Methoden vergleichbar; die berechneten Fettsäure-Verteilungen unterschieden sich mangels Basislinientrennung etwas zwischen den Methoden, zeigten aber dasselbe Profil. Die Streuung der Werte war etwas höher als bei der GC/FID-Bestimmung.

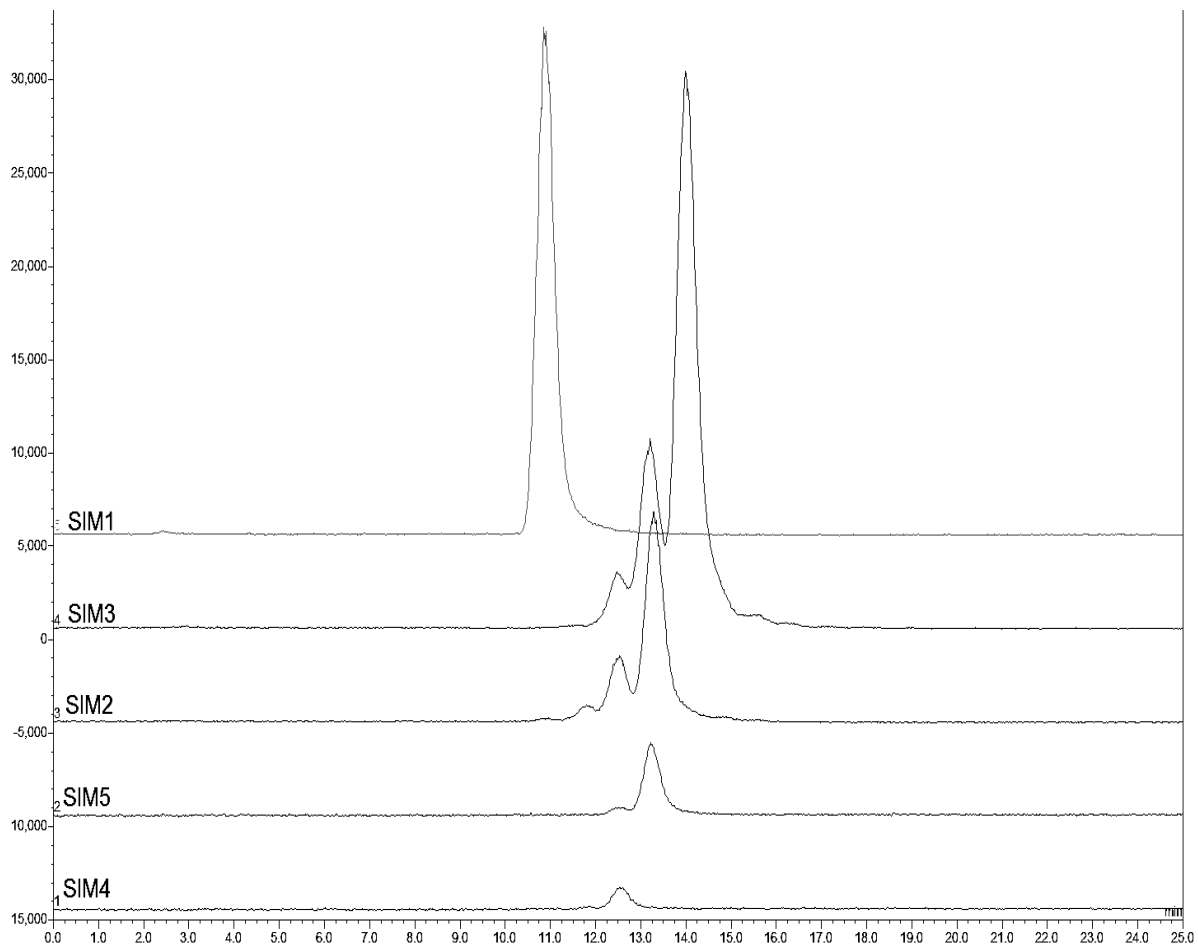


Abbildung 40: LC/MS-Untersuchung des Lipidextraktes eines mit Stanylestern angereicherten Magermilch-Trinkjoghurts; SIM der $[M-FS+H]^+$ -Ionen: IS (SIM1), Campestanylester (SIM2), Sitostanylester (SIM3) sowie der $[M+H]^+$ -Ionen: Campestanyl 18:2 (SIM4), Sitostanyl 18:2 (SIM5). Bedingungen siehe 3.2.8

Tabelle 34: Quantifizierung der Stanylester in angereichertem Magermilch-Trinkjoghurt mittels LC/MS

Stanylester [g/100g] ¹	Emmi-Benecol® orange	Versterte Stanole [g/100g] ³	3,02 ± 0,09
Campestanyl 16:0 ²	0,09 ± 0,01	Campestanol [%]	25,4 ± 0,4
Campestanyl 18:1/18:0	0,84 ± 0,03	Sitostanol [%]	74,6 ± 0,4
Campestanyl 18:2	0,22 ± 0,01	Veresterte Fettsäuren [%]	
Campestanyl 18:3	0,10 ± 0,01	16:0	6,0 ± 1,1
Sitostanyl 16:0	0,21 ± 0,06	18:1/18:0	66,1 ± 0,7
Sitostanyl 18:1/18:0	2,43 ± 0,09	18:2	18,2 ± 1,0
Sitostanyl 18:2	0,68 ± 0,04	18:3	8,3 ± 0,5
Sitostanyl 18:3	0,31 ± 0,01	20:0/20:1	1,4 ± 0,1
Sitostanyl 20:0/20:1	0,07 ± 0,01		
Summe Ester	4,94 ± 0,15		

¹ Mittelwert ± Standardabweichung bei Analyse von 6 Flaschen einer Packung, je n = 3

² Quantifizierung indirekt: [Stanyl 16:0/18:2] - [Stanyl 18:2]

³ Berechnet auf Basis der Ester

4.3.4.2. Becel® pro-activ

Die SIM-Chromatogramme der LC/MS-Untersuchung von Phytosteryl-/stanylestern in Becel® pro-activ Trinkjoghurt sind in Abbildung 41 dargestellt. Das Fettsäureprofil von Steryl- und Stanylestern unterschied sich scheinbar durch die zusätzliche Detektion von Sterylester-Isotopen in den aufgezeichneten Stanylester-Kanälen; was bereits in Kapitel 4.3.2.3, Abbildung 38 gezeigt wurde. Die Kalibrierung erfolgte mit den Estern des Vegapure® 95E-Musters, welches dieselbe Phytosteryl-/stanylesterverteilung aufwies. Die Ergebnisse der LC/MS-Bestimmung sind in Tabelle 35 aufgeführt. Die experimentell bestimmten Estergehalte sowie die daraus berechneten Phytosterolgehalte waren mit den Packungsangaben und mit den Ergebnissen der GC/FID-Bestimmung (Tabelle 23) vergleichbar.

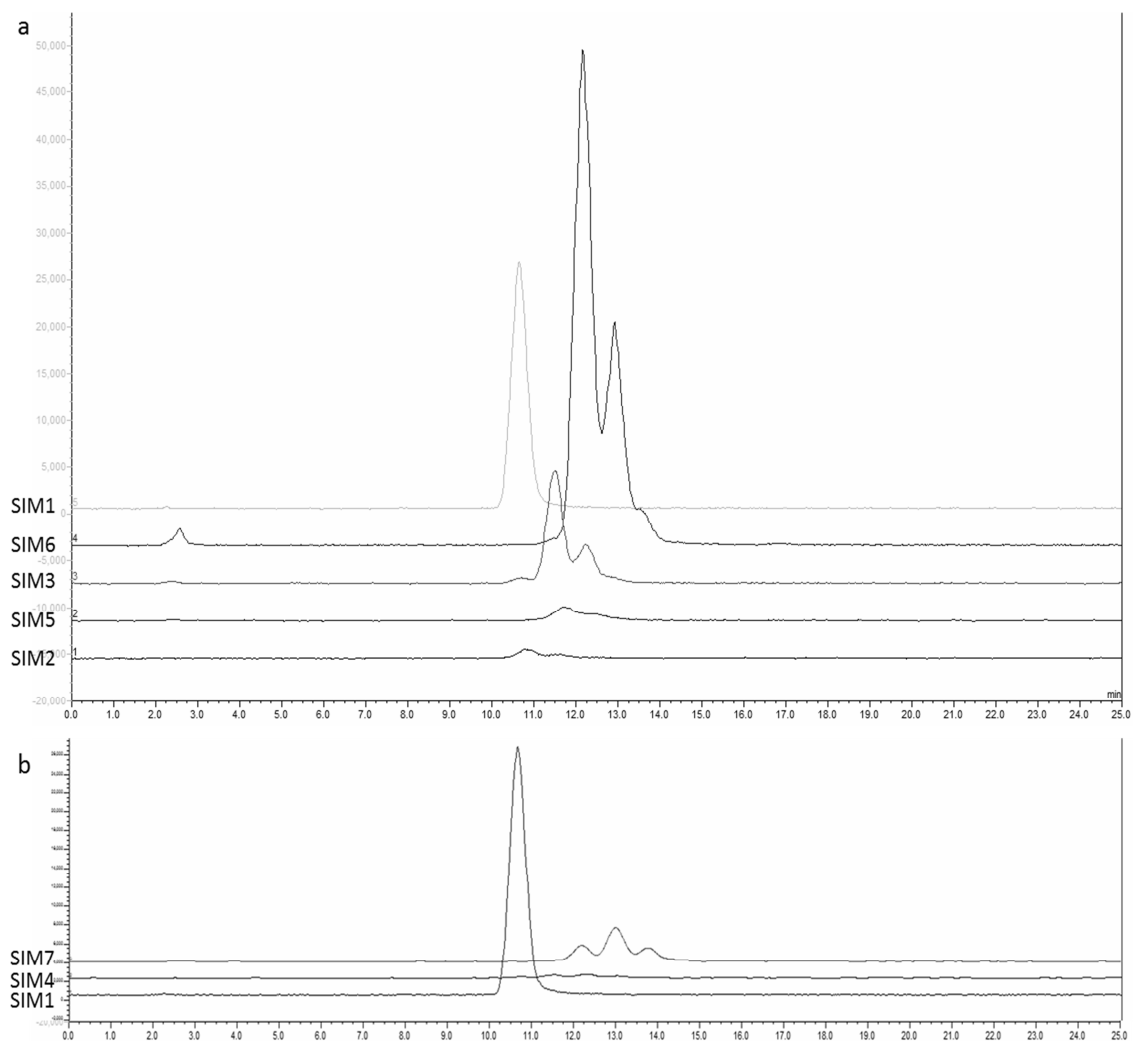


Abbildung 41: LC/MS-Untersuchung von Phytosteryl-(a) und -stanylestern (b) langkettiger Fettsäuren in angereichertem Magermilch-Trinkjoghurt; SIM der $[M-FS+H]^+$ -Ionen: IS (SIM1), Brassicasteryl- (SIM2), Campesteryl- (SIM3), Campestanyl- (SIM4), Stigmasteryl- (SIM5), Sitosteryl- (SIM6) und Sitostanylester (SIM7). Bedingungen siehe 3.2.8

Im Gegensatz zum kapillargaschromatographischen Ansatz war mittels LC/MS die selektive Bestimmung von Stigmasterylestern in dieser Estermischung möglich, welche mit einem relativen Anteil von ca. 1 % nur Minorkomponenten darstellten. Die berechnete Sterolverteilung ist mit der Spezifikation des SCF (131) konform und in Anbetracht der Trennprobleme gut zwischen den chromatographischen Methoden vergleichbar (Tabelle 23). Freie Sterole und „andere“ Ester wurden bei der Analytik mittels LC/MS nicht bestimmt.

Tabelle 35: LC/MS-Bestimmung von Phytosteryl-/stanylestern in Becel® pro-activ

Phytosteryl-/stanylester [g/100g]	Becel® pro-activ "Erdbeere" ¹	Becel® pro-activ "original" ¹
Brassicasteryl 18:2/16:0	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00
Brassicasteryl 18:1/18:0	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Campesteryl 18:2/16:0	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01
Campesteryl 18:1/18:0	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,00
Campestanyl 18:2/16:0	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Campestanyl 18:1/18:0	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Stigmasteryl 18:2/16:0	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Stigmasteryl 18:1/18:0	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
β-Sitosteryl 18:2/16:0	1,65 ± 0,05	1,74 ± 0,03
β-Sitosteryl 18:1/18:0	0,75 ± 0,01	0,82 ± 0,02
Sitostanyl 18:2/16:0	0,17 ± 0,00	0,18 ± 0,01
Sitostanyl 18:1/18:0	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Summe Ester [g/100g]	3,31 ± 0,04	3,49 ± 0,07
Veresterte Sterole [g/100g]²	2,02 ± 0,02	2,13 ± 0,04
Brassicasterol [%]	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Campesterol [%]	14,3 ± 0,3	14,0 ± 0,2
Campestanol [%]	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Stigmasterol [%]	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,2
β-Sitosterol [%]	72,6 ± 0,8	73,5 ± 0,1
Sitostanol [%]	7,6 ± 0,4	7,4 ± 0,2
Fettsäureverteilung [%]²		
16:0/18:2	68,4 ± 0,9	67,9 ± 0,6
18:0/18:1	31,6 ± 0,9	32,1 ± 0,2

¹ Dreifachbestimmung eines Bechers; Mittelwerte ± Standardabweichung

² Berechnet auf Basis der Ester

4.3.4.3. Danacol® (Italien)

Die LC/MS-Trennung der mittelkettigen Phytosteryl-/stanylester in den Danacol®-Trinkjoghurts ist in Abbildung 42 dargestellt. Auch hier war die unerwünschte Detektion von Isotopen der Δ⁵-Sterylester in den Chromatogrammen der Stanylester deutlich erkennbar.

Die Kalibrierung erfolgte mit den Lösungen der synthetisierten und aufgereinigten Estermischungen, analog zur GC/FID-Bestimmung.

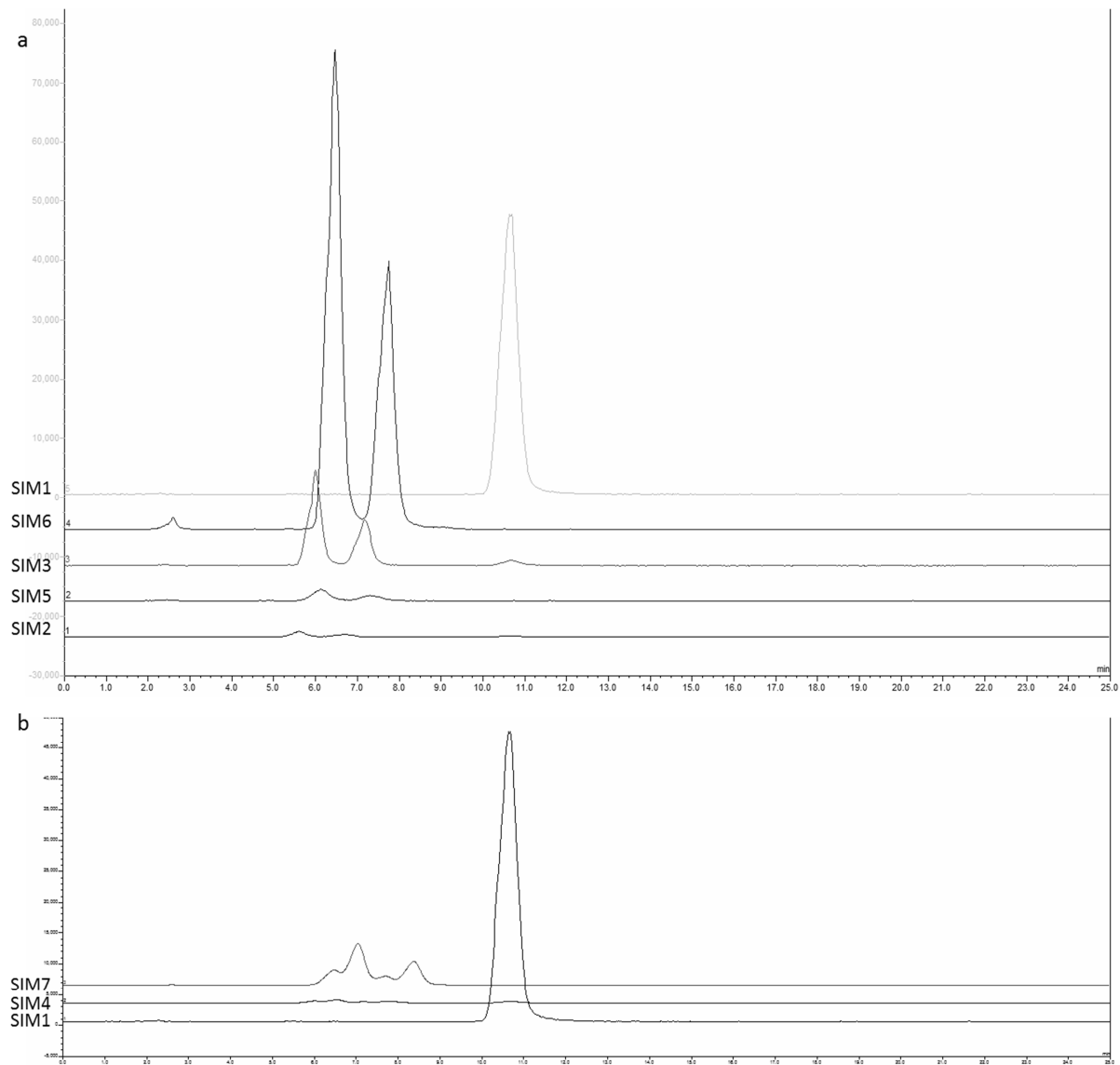


Abbildung 42: LC/MS-Untersuchung von Phytosteryl-(a) und stanylestern (b) mittelkettiger Fettsäuren in angereichertem Magermilch-Trinkjoghurt; SIM der $[M-FS+H]^+$ -Ionen: IS (SIM1), Brassicasteryl- (SIM2), Campesteryl- (SIM3), Campestanyl- (SIM4), Stigmasteryl- (SIM 5), Sitosteryl- (SIM6) und Sitostanylester (SIM7). Bedingungen siehe 3.2.8

Die Ergebnisse der LC/MS-Bestimmung sind in Tabelle 36 aufgeführt. Die bestimmten Gesamtster sowie der berechnete Phytosterolgehalt waren mit den Packungsangaben und mit den Ergebnissen der GC/FID-Bestimmung (Tabelle 25) vergleichbar. Der Vergleich der Sterolprofile zeigte, dass mittels GC/FID weniger Stigmasterol und ein höherer Gehalt an Brassicasterol bestimmt wurde. Die höher bestimmten Gehalte von Stigmasterylestern mittels LC/MS könnten durch die Anwesenheit „anderer“ Ester erklärt werden, welche gleiche Basisfragmente und/oder Isotopenionen bilden.

Tabelle 36: Phytosteryl-/stanylester-Bestimmung in Danacol® Magermilch-Trinkjoghurt aus Italien mittels LC/MS

Phytosterylester [g/100g]¹	„Natur“	„Erdbeer“
Brassicasteryl 8:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Campesteryl 8:0	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,01
Campestanyl 8:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Stigmasteryl 8:0	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
β-Sitosteryyl 8:0	0,95 ± 0,02	0,95 ± 0,02
Sitostanyl 8:0	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,01
Brassicasteryl 10:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Campesteryl 10:0	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Campestanyl 10:0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Stigmasteryl 10:0	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
β-Sitosteryyl 10:0	0,59 ± 0,01	0,59 ± 0,01
Sitostanyl 10:0	0,09 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Summe Phytosterylester	2,16 ± 0,04	2,16 ± 0,05
Veresterte Phytosterole [g/100g]²	1,62 ± 0,03	1,63 ± 0,04
Brassicasterol [%]	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,0
Campesterol [%]	12,6 ± 0,3	12,6 ± 0,2
Stigmasterol [%]	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Campestanol [%]	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0
β-Sitosterol [%]	71,7 ± 0,4	71,4 ± 0,4
Sitostanol [%]	11,7 ± 0,2	12,1 ± 0,2
Fettsäureverteilung [%]²		
8:0	61,8 ± 0,4	61,7 ± 0,2
10:0	38,2 ± 0,4	38,3 ± 0,2

¹ Mittelwert ± Standardabweichung über 3 Flaschen aus drei verschiedenen Packungen, je n = 3

² Berechnet auf Basis der Ester

4.3.4.4. Margarinen

4.3.4.4.1. Mit „Pflanzenstanolestern“

Im Folgenden wurde der Einfluss von co-eluierenden Lipiden aus einer Margarinematrix auf die Stanylesterbestimmung mittels LC/MS im Modell untersucht. Dazu wurde das industrielle Muster „Plant Stanol Ester – STAEST-115“ mit unterschiedlichen Mengen eines Lipidextraktes einer Becel® „original“-Margarine versetzt und nach Verdünnung (in Ethylacetat) injiziert. Je höher zunächst der Margarineanteil gegenüber den Stanylestern war, desto geringer war die resultierende Stanylesterquantifizierung, vor allem die der Sitostanylester (Abbildung 43). Mit steigendem Margarineanteil wurden aber auch zunehmend weniger Campestanylester detektiert. Bei der höchsten untersuchten Margarineaddition war die Quantifizierung der Sitostanylester wieder etwas höher, was auf

eine zusätzliche Suppression des internen Standardsignales bei der höchsten Margarinematrixkonzentration hinweist.

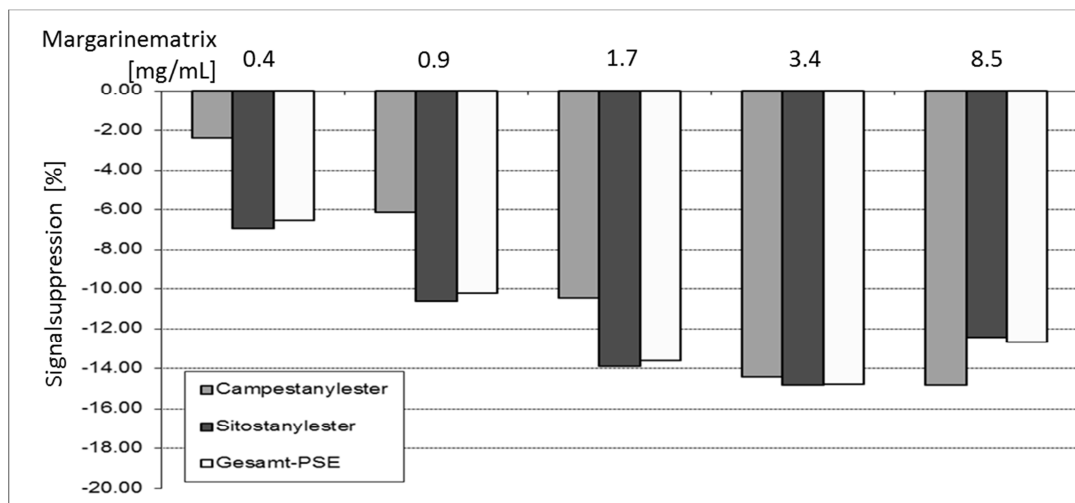


Abbildung 43: Einfluss der Margarinematrix (60 % Fett) auf die Signalsuppression [%] bei der Stanylester-Analytik [STAEST-115, 0,2 mg/mL] mittels LC/MS

Der erste Quantifizierungsversuch von Stanylestern in Benecol®-Margarinen mittels LC/MS wurde analog zu Mezone *et al.* (32) ohne Berücksichtigung von Matrixeffekten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in

Tabelle 37 dargestellt. Der deklarierte Stanolgehalt (8 %, siehe 3.1.5.2) wurde lediglich in der Margarine „Kevyt kasvirasvalevite Oliivi 32 %“ bestimmt. Der Vergleich mit den Ergebnissen der on-line LC-GC-Analysen (Tabelle 29) zeigte, dass der Stanylestergehalt in allen mittels LC/MS untersuchten Margarineextrakten geringer bestimmt wurde. Zudem war das Campestanol/Sitostanol-Verhältnis zu Gunsten des Campestanols verschoben, was auf eine verstärkte Signalsuppression der Sitostanylester hindeutete.

Tabelle 37: Stanylester-Bestimmung in Extrakten angereicherter Margarinen mittels LC/MS, ohne Berücksichtigung von Matrixeffekten

	„Kevyt kasvirasvalevite 32 %“	„Kevyt kasvirasvalevite Oliivi 32 %“	„Laktoositon kasvirasvalevite 32 %“
Summe Ester [g/100g] ^{1,2}	11,5 ± 0,7	13,4 ± 0,4	11,5 ± 0,3
Veresterte Stanole [g/100g] ³	7,0 ± 0,4	8,2 ± 0,2	7,1 ± 0,2
Campestanol [%]	29,1 ± 0,7	28,8 ± 0,3	30,9 ± 0,3
Sitostanol [%]	70,9 ± 0,7	71,2 ± 0,3	69,1 ± 0,3

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, je n = 3

² Kalibrierung mit STAEST-115

³ Berechnet auf Basis der Ester

In Full-Scan-Spektren (m/z 100-900) der Stanylesterpeaks in Total-Ionen-Chromatogrammen der Lipidextrakte angereicherter Margarinen wurden neben den Hauptfragmenten, welche die $[M-FS+H]^+$ -Ionen der Stanylester darstellen, auch Peaks im Massenbereich m/z 840-900 detektiert, welche auf $[M+H]^+$ -Ionen co-eluierender Triglyceride hinwiesen (Abbildung 44). Im Massenspektrum des internen Standardpeaks wurden keine zusätzlichen Fragmente, welche auf eine Co-elution von Lipiden hindeuteten, beobachtet.

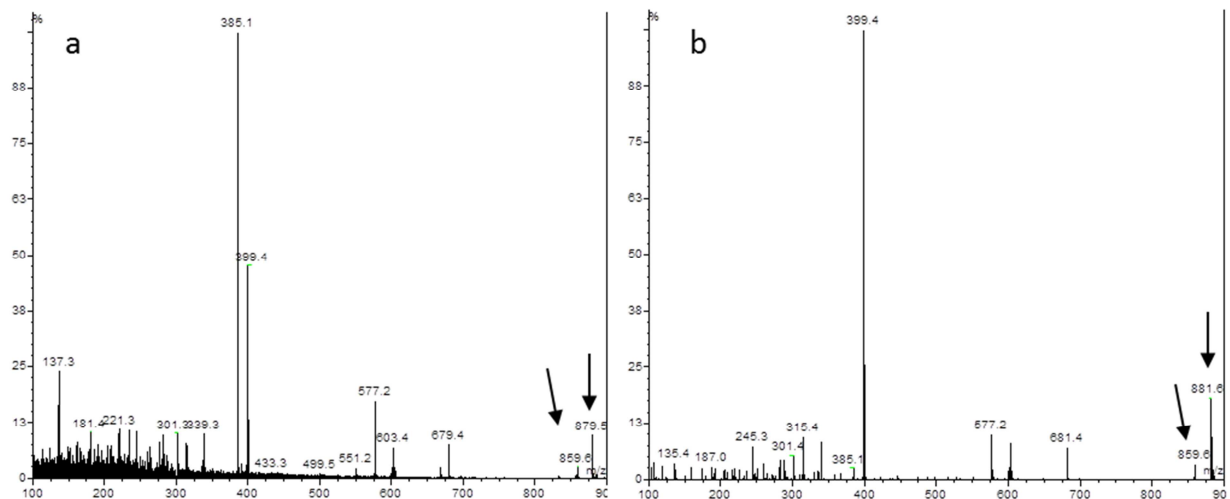


Abbildung 44: Full Scan-Spektren (m/z 100-900) der Hauptpeaks (12,9-13,2 min (a) und 13,5-14,1 min (b)) in Extrakten angereicherter Benecol®-Margarinen. Bedingungen siehe 3.2.8

Die Ionenextrakt-Chromatogramme der Steryl-/Stanylester- und Triglyceridprofile einer Benecol®-Margarine werden in Abbildung 45 mit jenen aus Benecol®-Magermilchtrinkjoghurt, Rapsöl und der Margarine Becel® „original“ verglichen. Die Triglycerid-Verteilung in Benecol®-Margarine unterschied sich von Becel® „original“, welche für die Vorversuche zur Matrixsuppression eingesetzt wurde, war aber mit dem Profil von Rapsöl vergleichbar. In Emmi-Benecol® Magermilch-Trinkjoghurt wurden erwartungsgemäß keine Triglyceride detektiert.

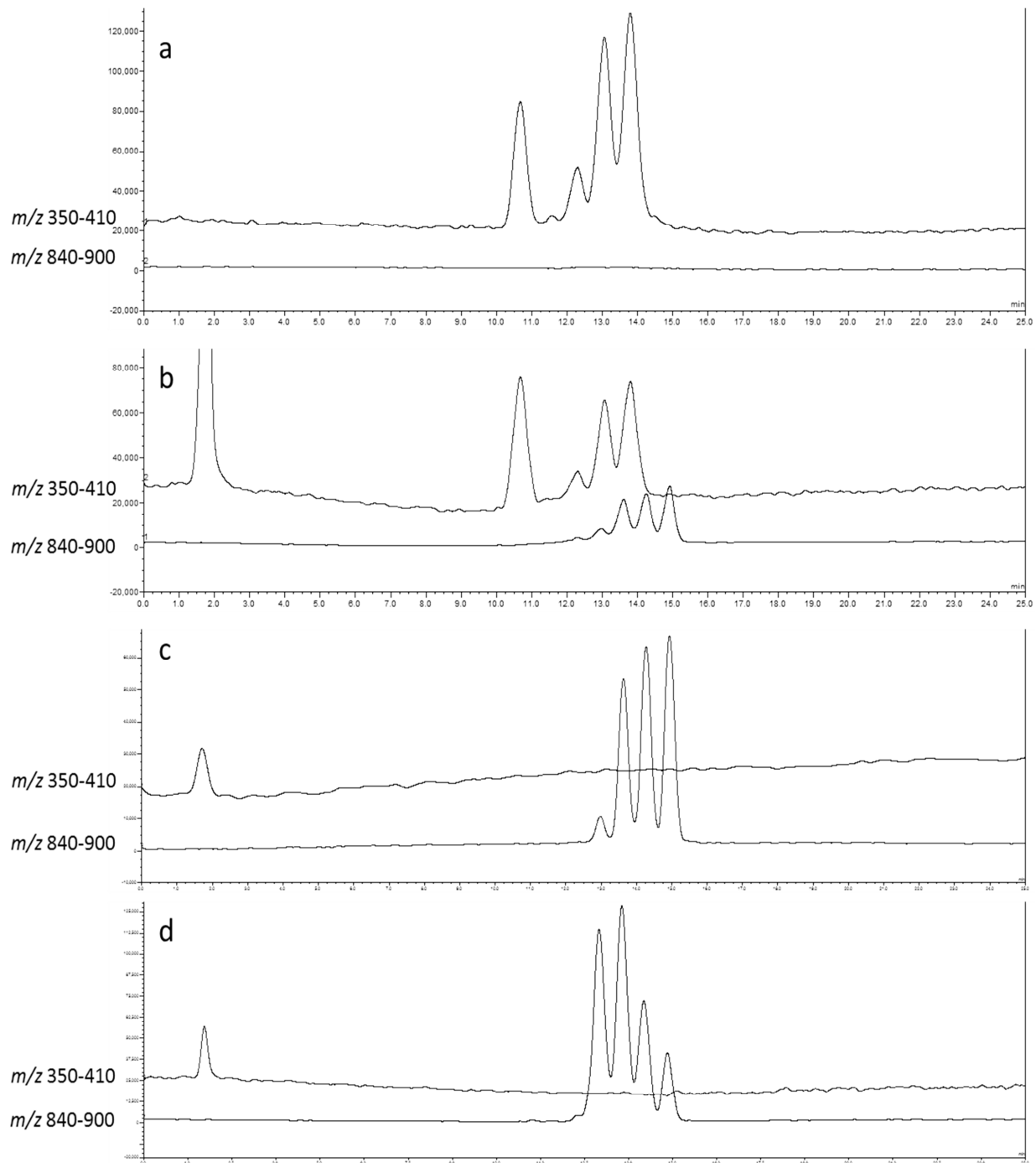


Abbildung 45: TIC-Ionenextrakt-Chromatogramme: Steryl-/Stanylester (m/z 350-410) und Triglyceride (m/z 840-900) in Benecol®-Magermilchtrinkjoghurt (a), Benecol®-Margarine „Kevyt kasvirasvalevite“(b), Rapsöl (c) und Becel® „original“ (d). Bedingungen siehe 3.2.8

Die Quantifizierung von Phytosteryl-/stanylestern mittels LC/MS erfordert demnach entweder analog zur GC-basierten Analytik eine vorherige Isolierung der Ester aus einer Lipidmatrix oder eine angepasste Kalibrierungsstrategie. Im Folgenden sollte daher die bei der Stanylesterdetektion präsente Signalsuppression durch co-eluierende Lipide mit Hilfe einer Matrixkalibrierung kompensiert werden.

In den Margarinen aus Finnland sollten neben den erwarteten ca. 13 % Stanylester demnach ca. 27 % Triglyceride vorliegen (3.1.5.2). Daher erfolgte die Matrixkalibrierung zur Quantifizierung der Stanylester in Benecol®-Margarinen im Konzentrationsbereich 0,05-0,25 µg STAEST-115/µL mit einem Zusatz von 0,3 µg Rapsöl/µL. Die Ergebnisse der LC/MS-Bestimmungen von Stanylestern in angereicherten Margarinen nach Matrixkalibrierung mit Rapsöl-Triglyceriden sind in Tabelle 38 aufgeführt.

Tabelle 38: Stanylester-Bestimmung in Extrakten angereicherter Margarinen mittels LC/MS nach Matrixkalibrierung mit Rapsöl-Triglyceriden

Stanylester [g/100g]¹	„Kevyt kasvirasvalevite 32 %“	„Kevyt kasvirasvalevite Oliivi 32 %“	„Laktoositon kasvirasvalevite 32 %“
Campestanyl 18:3/16:1	0,25 ± 0,02	0,29 ± 0,06	0,28 ± 0,01
Campestanyl 18:2	0,63 ± 0,07	0,70 ± 0,02	0,63 ± 0,04
Campestanyl 16:0	0,18 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,08
Campestanyl 18:1/18:0	2,23 ± 0,11	2,53 ± 0,04	2,31 ± 0,07
Sitostanyl 18:3	0,81 ± 0,04	0,91 ± 0,03	0,82 ± 0,01
Sitostanyl 18:2	1,77 ± 0,14	2,02 ± 0,05	1,79 ± 0,05
Sitostanyl 16:0	0,51 ± 0,06	0,50 ± 0,07	0,41 ± 0,17
Sitostanyl 18:1/18:0	6,40 ± 0,21	7,07 ± 0,11	6,50 ± 0,11
Sitostanyl 20:1	0,14 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Sitostanyl 20:0	0,07 ± 0,01	-	0,07 ± 0,00
Summe Ester	12,9 ± 0,5	14,3 ± 0,4	13,1 ± 0,3
Veresterte Stanole [g/100g]²	7,9 ± 0,3	8,8 ± 0,2	8,0 ± 0,2
Campestanol [%]	26,3 ± 0,3	26,0 ± 0,2	25,8 ± 0,2
Sitostanol [%]	74,7 ± 0,3	74,0 ± 0,2	74,2 ± 0,2
Veresterte Fettsäuren [%]²			
16:0	5,3 ± 0,9	5,0 ± 0,4	4,4 ± 1,0
18:1/18:0	66,4 ± 0,3	67,0 ± 0,7	67,2 ± 0,8
18:2	18,5 ± 0,9	19,0 ± 0,1	18,5 ± 0,2
18:3	8,1 ± 0,1	8,3 ± 0,4	8,4 ± 0,3
20:0/20:1	1,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, je n = 3

² Berechnet auf Basis der Ester

In den Margarinen konnten mittels LC/MS, wie auch schon bei den Trinkjoghurts (4.3.4.1), keine C22-Ester detektiert werden, in der Margarine „Kevyt kasvirasvalevite Oliivi 32 %“ auch keine C20:0-Ester. Durch den Zusatz an Olivenöl war die Matrixsuppression zur Elutionszeit der C20:0-Ester offensichtlich verstärkt. Die Mittelwerte der mittels LC/MS bestimmten Stanylester- sowie die berechneten Stanolgehalte waren im Vergleich zu den online LC-GC Ergebnissen (Tabelle 29) etwas geringer, aber unter Berücksichtigung der analytischen Streuung vergleichbar und stimmten mit den Packungsangaben überein. Die

Stanol- und Fettsäureverteilungen waren unter Berücksichtigung der jeweiligen Trennprobleme ebenfalls gut vergleichbar.

4.3.4.4.2. Mit „Pflanzensterinestern“

Zur direkten Bestimmung von Pflanzenstanylestern in angereicherten Margarinen mittels LC/MS ohne vorherige Isolierung der Ester aus der Lipidmatrix, konnte die Notwendigkeit und die Eignung des Quantifizierungsansatzes mit einer Matrixkalibrierung gezeigt werden. Dabei wurde (i) das Verhältnis von Estern zur Fettmatrix und (ii) die Verteilung der Triglyceride im Fett berücksichtigt. Beide Parameter können bei kommerziellen Margarinen mit zugesetzten Phytosteryl-/stanylestern variieren.

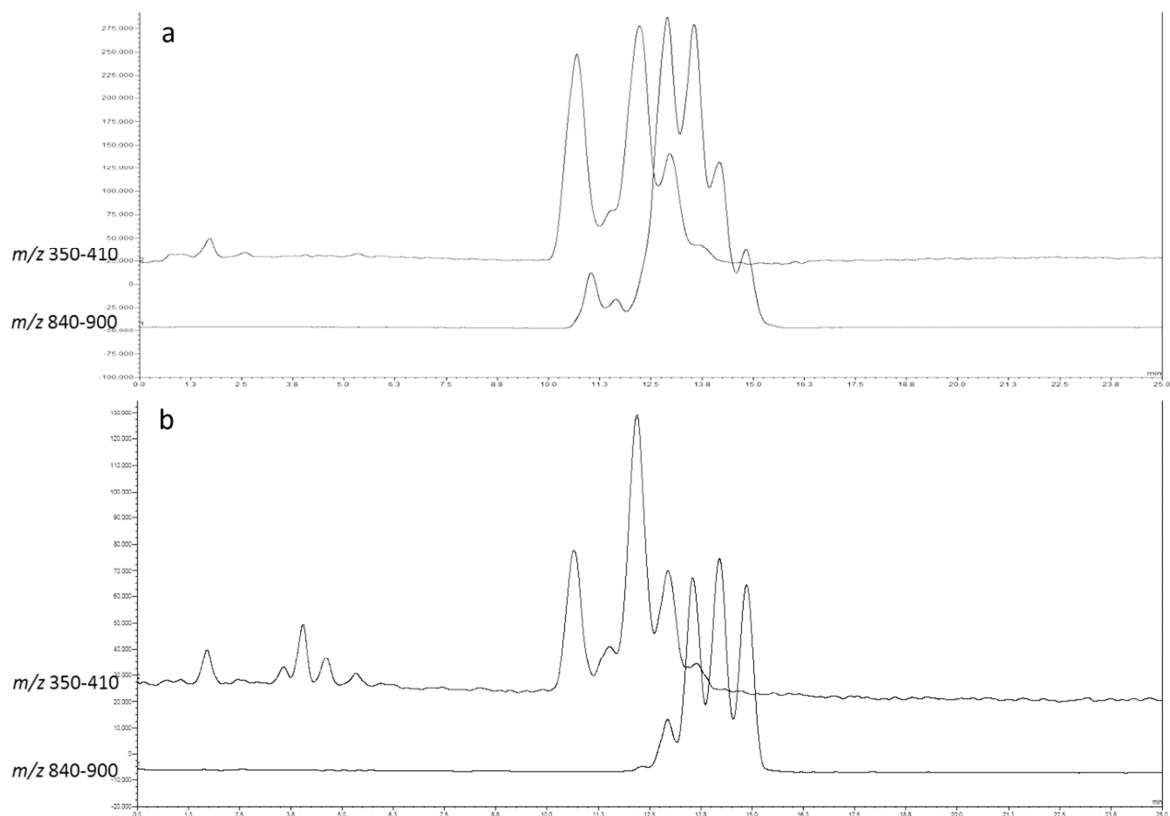


Abbildung 46: TIC-Ionenextrakt-Chromatogramme von Margarineextrakten: Steryl-/Stanylester (m/z 350-410) und Triglyceride (m/z 840-900) in Becel® pro-active (a) und Bellasan® activ (b). Bedingungen siehe 3.2.8

In Abbildung 46 sind Ionenextrakt-Chromatogramme von kommerziellen Margarinen mit „Pflanzensterinester-Zusatz“ (3.1.5.2) dargestellt, welche in lokalen Supermärkten bezogen wurden. Die entsprechenden Ionenextrakt-Chromatogramme von Bellasan® activ entsprachen denen von Deli Reform® Active (nicht dargestellt). Die Profile der

Phytosterylester-Chromatogramme (m/z 350-410) entsprachen dem von Vegapure® 95E. Die auf den Packungen deklarierten Phytosterol- und Fettgehalte waren vergleichbar (3.1.5.2). Die Ionenextrakt-Chromatogramme der Triglyceride unterschieden sich zwischen der Becel® pro-activ und den beiden anderen Margarineprodukten.

Tabelle 39: Phytosteryl-/stanylester-Bestimmung in Extrakten angereicherter Margarinen nach Matrixkalibrierung mittels LC/MS

Phytosteryl-/stanylester [g/100g] ¹	Becel® pro-activ ^{2,3}			Bellasan® activ ⁴	Deli Reform® Active ⁴
	1	2	3		
Brassicasteryl 18:2/16:0	0,23 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,31 ± 0,01
Brassicasteryl 18:1/18:0	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,04	0,15 ± 0,01
Campesteryl 18:2/16:0	1,16 ± 0,04	1,19 ± 0,06	1,21 ± 0,02	1,34 ± 0,07	1,34 ± 0,03
Campesteryl 18:1/18:0	0,51 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,71 ± 0,05	0,68 ± 0,03
Campestanyl 18:2/16:0	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,00
Campestanyl 18:1/18:0	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Stigmasteryl 18:2/16:0	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,00
Stigmasteryl 18:1/18:0	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03
β-Sitosteryl 18:2/16:0	6,11 ± 0,37	6,10 ± 0,14	6,26 ± 0,11	6,22 ± 0,49	6,27 ± 0,12
β-Sitosteryl 18:1/18:0	2,73 ± 0,07	2,77 ± 0,16	2,70 ± 0,10	3,23 ± 0,11	3,17 ± 0,21
Sitostanyl 18:2/16:0	0,72 ± 0,02	0,76 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,69 ± 0,05	0,67 ± 0,01
Sitostanyl 18:1/18:0	0,33 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,02
Summe Ester	12,2 ± 0,5	12,4 ± 0,4	12,4 ± 0,3	13,2 ± 0,7	13,2 ± 0,4
Veresterte Sterole [g/100g]	7,5 ± 0,3	7,6 ± 0,3	7,6 ± 0,2	8,1 ± 0,4	8,1 ± 0,2
Brassicasterol [%]	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1	3,8 ± 0,4	3,5 ± 0,1
Campesterol [%]	13,7 ± 0,1	14,2 ± 0,2	14,1 ± 0,2	15,5 ± 0,5	15,4 ± 0,2
Campestanol [%]	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Stigmasterol [%]	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
β-Sitosterol [%]	72,5 ± 0,1	71,8 ± 0,3	72,2 ± 0,1	71,3 ± 0,6	71,6 ± 0,4
Sitostanol [%]	8,7 ± 0,6	9,0 ± 0,2	8,7 ± 0,1	7,6 ± 0,3	7,5 ± 0,3
Veresterte Fettsäuren [%]					
16:0/18:2	69,2 ± 0,7	68,7 ± 0,7	69,7 ± 0,5	66,2 ± 1,5	66,8 ± 0,8
18:1/18:0	30,8 ± 0,7	31,3 ± 0,7	30,3 ± 0,5	33,8 ± 1,5	33,2 ± 0,8

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, je n = 3

² Kalibrierung mit Vegapure® 95E + Lipidmatrix Becel® original

³ Drei Dreifachaufarbeitungen aus derselbe Packung

⁴ Kalibrierung mit Vegapure® 95E + Lipidmatrix Rapsöl

⁵ Berechnet auf Basis der Ester

Das Triglyceridprofil in Becel® pro-activ (Abbildung 46) zeigte die Coelution von Matrixbestandteilen mit den Analyten sowie dem internen Standard und entsprach in etwa dem von nicht angereicherter Becel® „original“-Margarine, die Triglyceridprofile der beiden anderen Margarineprodukte dem von Rapsöl (Abbildung 45). Für die Matrixkalibrierungen wurde daher für die Bestimmung der Ester in Becel® pro-activ die Lipidmatrix von Becel® „original“ herangezogen und Rapsöl für die Bestimmung in Deli Reform® Active und

Bellasan® activ. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 aufgeführt. Die Ölsäure- und Stearinsäureester wurden aufgrund der schlechten Abtrennung, wie schon in Kapitel 4.3.4.1 zusammengefasst. Die Ergebnisse der Phytosteryl-/stanylester-Bestimmungen in Becel® pro-activ-Margarine waren mittels LC/MS und on-line LC-GC (Tabelle 29) vergleichbar. Aufgrund der jeweiligen systembedingten Trennprobleme wichen die berechneten Profile der veresterten Sterole/Stanole und Fettsäuren zwar leicht voneinander ab, insgesamt jedoch stimmten die mit beiden Systemen quantifizierten Werte und Profile in Becel® pro-activ-Margarine sehr gut mit den Packungsangaben und der Spezifikation des SCF (131) überein.

Die Ergebnisse der LC/MS-Quantifizierung der Phytosteryl-/stanylester-Mischungen in den Margarinen mit einer Kalibrierung ohne zusätzlich Lipidmatrix (Tabelle 40) waren vergleichbar, im Gegensatz zu den Margarineprodukten welche mit Stanylestern angereichert wurden (4.3.4.4.1). Dies könnte durch Co-elutionen zu den Elutionszeiten der Analyten und des internen Standards erklärbar sein (Abbildung 47), wodurch sich die Matrix bedingten Effekte gegenseitig ausgleichen könnten, oder durch den höheren APCI-Response von Δ^5 -Sterylestern.

Tabelle 40: Phytosteryl-/stanylester-Bestimmung in Extrakten angereicherter Margarineprodukte mittels LC/MS, Kalibrierung ohne zusätzliche Lipidmatrix

	Becel® pro-activ ³			Bellasan®	Deli Reform®
	1	2	3	activ	Active
Summe Ester [g/100g] ^{1,2}	11,9 ± 0,5	12,0 ± 0,4	12,1 ± 0,3	13,0 ± 0,9	12,9 ± 0,3
Veresterte Sterole [g/100g] ⁴	7,3 ± 0,3	7,4 ± 0,3	7,4 ± 0,2	8,0 ± 0,5	7,9 ± 0,2

¹ Mittelwert ± Standardabweichung, je n = 3

² Kalibrierung mit Vegapure® 95E ohne zusätzliche Lipidmatrix

³ Drei Dreifachaufarbeitungen aus derselben Packung

⁴ Berechnet auf Basis der Ester

Die Bestimmung der Phytosteryl-/stanylester in Bellasan® activ und Deli Reform® Active (Tabelle 39) resultierte in etwas höheren Gehalten als auf der Packung angegeben. Ein Erklärungsansatz wäre die Suppression des internen Standardsignals durch co-eluierende Lipide, wahrscheinlich Diglyceride (Abbildung 47), welche weder in dem zur Matrixkalibrierung eingesetzten Rapsöl noch in den untersuchten mit Phytostanylestern angereicherten Margarinen (4.3.4.4.1) vorhanden waren. Die bestimmten Pflanzensteryl-/stanylesterprofile von Bellasan® activ und Deli Reform® Active waren mit dem in Becel® pro-activ vergleichbar. Der Brassicasterol-Anteil in Bellasan® activ und Deli Reform® Active wurde

mittels LC/MS allerdings über den maximal für den Einsatz in angereicherten Produkten zugelassenen 3 % quantifiziert (Tabelle 39), mittels online LC-GC (Tabelle 32) dagegen mit 2,6 % und 2,5 %. Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten ist für die LC/MS-Analytik daher die vorherige Abtrennung störender Lipide, z.B. mittels SPE, oder zumindest eine Verifizierung der Ergebnisse mit alternativen Methoden zu empfehlen.

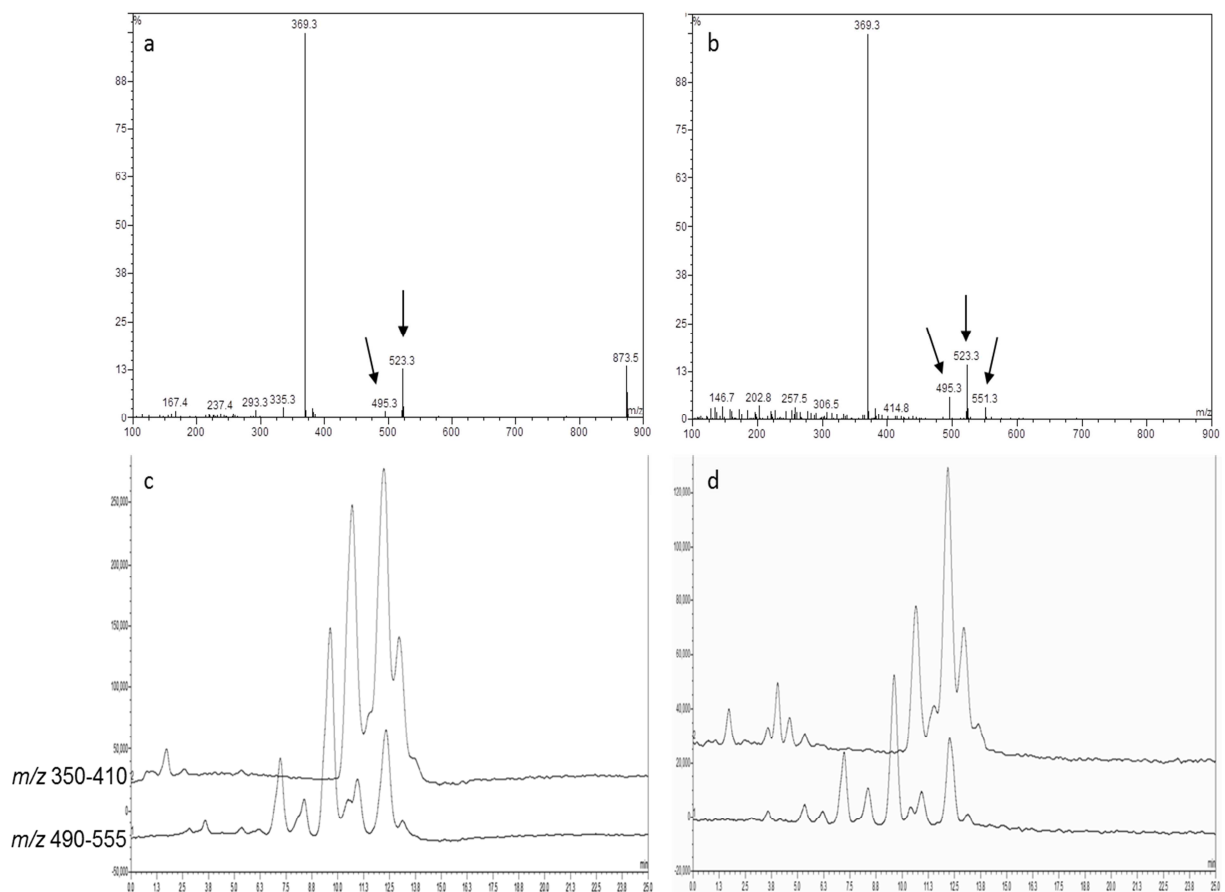


Abbildung 47: Full-Scan Spektren (a, b) der internen Standard-Signale in Becel® pro-active (a, c) und Bellasan® activ-Margarine (b, d), sowie die entsprechenden Ionenextrakt-Chromatogramme (c, d) aus den TICs der Margarineextrakte: Steryl-/Stanylester (m/z 350-410) und wahrscheinlich Diglyceride (m/z 490-555). Bedingungen siehe 3.2.8

4.3.5. Zusammenfassung

Die Phytosteryl-/stanylester-Analytik in angereicherten Lebensmitteln mittels LC/MS erfolgte in Anlehnung an den beschriebenen Ansatz an einer Luna Hexyl-Phenyl-Trennsäule und der Detektion mittels APCI-MS im SIM-Modus (32). Anstatt eines ACN/H₂O-Gradienten wurde ein MeOH/H₂O-Gradient für die Trennung etabliert. Zwischen Trennsäule und MS wurde ein T-Stück mit Restriktionskapillare eingebaut um den Eluenteneinstrom in die

Ionenquelle zu reduzieren und die Ionisierung der Analyten zu optimieren.

Die Ionisierung sowie die Elutionsreihenfolge der Pflanzensteryl-/stanylester wurden mit synthetisierten Referenzen überprüft. Unter den angewandten Trennbedingungen konnten C16:0- nicht von C18:2-Estern getrennt werden. In den Chromatogrammen von Stanylestern erschienen bei Anwesenheit der respektiven Sterylester in den untersuchten Mischungen zusätzliche Peaks. Dieses Phänomen ist durch die natürlich vorkommenden Isotope der $[M-FS+H]^+$ -Fragmente von Sterylestern begründet. Daher und aufgrund von möglichen Matrixeffekten bei der Ionisierung co-eluierender Steryl- und Stanylester sollte für die Kalibrierung ein möglichst identisches Steryl-/Stanylester-Muster eingesetzt werden.

Zudem sollte bei Anwesenheit von co-eluierenden Di- und Triglyceriden in den zu untersuchenden Extrakten eine vorherige Fraktionierung oder eine entsprechende Matrixkalibrierung durchgeführt werden. Beim Ansatz der Matrixkalibrierung sollte das Profil der eingesetzten Lipidmatrix das der Lipidmatrix des angereicherten Lebensmittels exakt widerspiegeln.

Die Kalibrierungen erfolgten mit Phytosteryl-/Stanylester-Mischungen, entsprechend der in den Produkten eingesetzten Präparate. Die Ergebnisse der LC/MS-Bestimmungen der Ester in angereicherten Magermilch-Trinkjoghurtprodukten stimmten sehr gut mit den Ergebnissen der GC/FID-Analysen überein; die in angereicherten Margarineprodukten, sofern eine passende Lipidmatrix zur Kalibrierung der LC/MS herangezogen wurde, mit jenen der on-line LC-GC.

Insgesamt war die LC/MS sehr gut zur Analytik von Esterpräparaten bzw. von angereicherten Produkten bekannter Zusammensetzung geeignet. Vor allem im Hinblick auf mögliche Matrixeffekte und eventuell fehlerhafte Quantifizierungen sollte die LC/MS-Analytik im Rahmen der Lebensmittelüberwachung eher als Screening-Methode herangezogen werden.

Der größte Nachteil der vorgestellten LC/MS-Methode liegt in der „Blindheit“ gegenüber anderen Sterolen bzw. deren Estern. Daher ist bei unbekanntem Mischungen zusätzlich zur LC/MS-Untersuchung ein GC-basiertes Screening der Proben zu empfehlen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war geeignete chromatographische Bedingungen für die qualitative und quantitative Bestimmung individueller Phytosteryl-/stanylester in komplexen Mischungen zu etablieren und diese mit effektiven Isolierungstechniken zur Untersuchung der Esterpräparate in angereicherten Lebensmitteln zu kombinieren.

Eine effiziente Trennung komplexer Phytosteryl-/stanylestermischungen gelang kapillargaschromatographisch an einer mit Trifluorpropylmethylpolysiloxan beschichteten stationären Phase. Mit Hilfe enzymatisch synthetisierter Referenzen wurden die Retentionszeiten und Massenspektren (EI+) von Phytosteryl- und Stanylestern ermittelt. Die etablierten GC-Bedingungen erlaubten die Differenzierung intakter Steryl-/Stanylester nach Kettenlänge und Sättigungscharakter der veresterten Strukturen. Lediglich die Ester gesättigter und einfach ungesättigter Fettsäuren wurden nicht getrennt. In manchen komplexen Mischungen führte die Anwesenheit von Stigmasteryl- und/oder Linolensäureestern zu Trennproblemen.

Die Quantifizierung individueller Steryl-/Stanylester erfordert aufgrund der thermisch bedingten Degradierungen während der GC-Analyse Kalibrierungen. Zur Synthese und Aufreinigung von einzelnen Referenzsubstanzen sowie komplexen Phytosteryl-/stanylestermischungen im Labormaßstab wurde eine einfache Methode entwickelt.

Die Eignung der Kapillargaschromatographie zur quantitativen Bestimmung der Phytosteryl-/stanylester wurde am Beispiel der Produktkategorie „angereicherter Magermilch-Trinkjoghurt“ gezeigt. Die Lipidfraktion dieser Produkte konnte nach einer Salzsäurebehandlung (Extraktion nach Weibull-Stoldt) effizient isoliert werden. Ergänzend wurde eine schnelle und robuste Aufarbeitungsmethode entwickelt und validiert: diese „Extraktionsschnellmethode“ erlaubte die Aufarbeitung einer Dreifachbestimmung binnen 2 anstatt 12 Stunden. Die Bestimmung der Phytosteryl-/stanylester erfolgte anschließend direkt aus den Lipidextrakten mittels GC/FID. Die ermittelten Ergebnisse stimmten mit den deklarierten Packungsangaben und mit der Spezifikation für die in Lebensmitteln eingesetzten Phytosteryl-/stanylester-Mischungen überein.

Die kapillargaschromatographische Untersuchung in fetthaltigen Produkten, wie angereicherter Margarine, erfordert eine vorgeschaltete Abtrennung störender Lipide. Hierfür wurde die on-line gekoppelte LC-GC etabliert. Als Kopplungstechniken wurden Loop-

Type- und PTV Interface eingesetzt. Insgesamt zeigte sich letzteres robuster und besser geeignet für den Routineeinsatz. Die Probenvorbereitung für die Untersuchung in angereicherter Margarine mittels on-line LC-GC konnte auf ein Minimum reduziert werden und betrug für eine Dreifachbestimmung weniger als 30 Minuten. Die Ergebnisse waren konform mit den Herstellerangaben sowie der Spezifikation des Scientific Committee on Food.

Des Weiteren wurde die Eignung eines flüssigchromatographischen Ansatzes, mittels LC/(APCI)-MS, untersucht. Die flüssigchromatographische Trennung erfolgte an einer Luna Hexyl-Phenyl-Trennsäule unter Verwendung eines MeOH/H₂O-Gradienten. Die LC/MS-Chromatogramme wurden entsprechend der veresterten Sterol-/Stanolreste im SIM-Modus aufgezeichnet. Es traten jedoch Trennprobleme, Isotopen- und Matrixeffekte auf; z.B. konnten C16:0-Sterylester nicht von C18:2-Estern differenziert werden und in Steryl-/Stanylestermischungen wurden natürlich vorkommende Isotope von Sterylesterfragmenten als zusätzliche Peaks in den Chromatogrammen von Stanylestern detektiert. Die Ergebnisse der Quantifizierungen mittels LC/MS waren mit den kapillargaschromatographischen Bestimmungen vergleichbar, sofern eine passende (Matrix-) Kalibrierung herangezogen wurde. Folglich sind Resultate der LC/MS-Analytik stets im Blickwinkel möglicher Nebeneffekte (z.B. Matrixsuppression des internen Standards, der Analyten, Detektion von Sterylestern mit gleichem Fragmentierungsverhalten wie Zielanalyten, Isotopenpeaks) zu betrachten und gegebenenfalls mit einer alternativen Analysenmethode zu verifizieren.

Mit Hilfe der entwickelten, routinetauglichen Methoden ist es möglich pflanzliche Steryl-/Stanylfettsäureester qualitativ und quantitativ in kommerziell angereicherten Lebensmitteln der Kategorien Magermilch-Trinkjoghurt und Margarine zu ermitteln. Die schnellen und robusten Methoden erlauben die Überprüfung der in Lebensmitteln eingesetzten Phytosteryl-/stanylester-Mischungen hinsichtlich Deklaration und Spezifikation.

6. LITERATUR

1. WHO *Cardiovascular diseases (CVDs)*; Media Center, Fact sheet No 317, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>: January 2011.
2. Brufau, G.; Canela, M. A.; Rafecas, M., Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutr. Res. (N. Y., NY, U. S.)* **2008**, 28, (4), 217-225.
3. Demonty, I.; Ras, R. T.; van der Knaap, H. C. M.; Duchateau, G. S. M. J. E.; Meijer, L.; Zock, P. L.; Geleijnse, J. M.; Trautwein, E. A., Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J. Nutr.* **2009**, 139, (2), 271-284.
4. Katan, M. B.; Grundy, S. M.; Jones, P.; Law, M.; Miettinen, T.; Paoletti, R., Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin. Proc.* **2003**, 78, (8), 965-978.
5. Abumweis Suhad, S.; Barake, R.; Jones Peter, J. H., Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.* **2008**, 52.
6. Plat, J.; Mensink, R. P., Plant Stanol and Sterol Esters in the Control of Blood Cholesterol Levels: Mechanism and Safety Aspects. *Am. J. Cardiol.* **2005b**, 96, (1A), 15D-22D.
7. Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Official Journal* **14/02/1997**, L 043, 0001 - 0006.
8. SCF, Opinion of the Scientific Committee on Food on a request for the safety assessment of the use of phytosterol esters in yellow fat spreads. **2000**.
9. Commission Decision of 24 July 2000 on authorising the placing on the market of 'yellowfat spreads with added phytosterol esters' as a novel food or novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (2000/500/EC). *Official Journal of the European Communities*. L200, 59.
10. EFSA, Consumption of food and beverages with added plant sterols in the European Union. *The EFSA Journal* **2008**, (133), 1-21.
11. Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission vom 31. März 2004 über die Etikettierung von Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten mit Phytosterin-, Phytosterinester-, Phytostanol- und/oder Phytostanolesterzusatz. *Amtsblatt der Europäischen Union*. L 97, 44.
12. Commission Decision of 31 March 2004 authorising the placing on the market of yellow fat spreads, milk based fruit drinks, yoghurt type products and cheese type products

- with added phytosterols/phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament (2004/336/EC). *Official Journal of the European Union. L 105, 49.*
13. SCF, Opinion of the Scientific Committee on Food on an application from MultiBene for approval of plant-sterol enriched foods. **2003c.**
 14. Commission Decision of 12 November 2004 on authorising the placing on the market of milk based beverages with added phytosterols/phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (2004/845/EC). *Official Journal of the European Union. L 366, 14.*
 15. Commission Decision of 31 March 2004 authorising the placing on the market of milk type products and yoghurt type products with added phytosterol esters as novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (2004/335/EC). *Official Journal of the European Union. L105, 46.*
 16. Commission Decision of 31 March 2004 authorising the placing on the market of yellow fat spreads, milk type products, yoghurt type products, and spicy sauces with added phytosterols/phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (2004/334/EC). *Official Journal of the European Union. L105, 43.*
 17. Commission Decision of 31 March 2004 authorising the placing on the market of yellow fat spreads, salad dressings, milk type products, fermented milk type products, soya drinks and cheese type products with added phytosterols/ phytostanols as novel foods or novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (2004/333/EC).
 18. SCF, General view of the Scientific Committee on Food on the long-term effects of the intake of elevated levels of phytosterols from multiple dietary sources, with particular attention to the effects on β -carotene. **2002.**
 19. DFG-Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (SKLM) über den Einsatz von Phytosterinen in Lebensmitteln, Endfassung vom 3. August 2007.
 20. Abidi, S. L., Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr., A* **2001**, 935, (1-2), 173-201.
 21. Santos, R.; Limas, E.; Sousa, M.; Castilho, M. d. C.; Ramos, F.; Noronha da Silveira, M. I., Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. *Food Chem.* **2007**, 102, (1), 113-117.
 22. Lagarda, M. J.; Garcia-Llatas, G.; Farre, R., Analysis of phytosterols in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, (5), 1486-1496.
 23. Clement, L. M.; Hansen, S. L.; Costin, C. D.; Perri, G. L., Quantitation of Sterols and Steryl Esters in Fortified Foods and Beverages by GC/FID. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2010**, 87, (9), 973-980.

24. Saraiva, D.; Castilho, M. d. C.; Martins, M. d. R.; da Silveira, M. I. N.; Ramos, F., Evaluation of Phytosterols in Milk and Yogurts Used as Functional Foods in Portugal. *Food Anal. Methods* **2011**, 4, 28-34.
25. Laakso, P., Analysis of sterols from various food matrices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, 107, (6), 402-410.
26. Duchateau, G. S. M. J. E.; Janssen, H.-G. M.; Louter, A. J. H., Plant sterol analysis in relation to functional foods. *Nutraceutical Sci. Technol.* **2004**, 1, (Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals), 75-131.
27. Gordon, M. H.; Griffith, R. E., Steryl ester analysis as an aid to the identification of oils in blends. *Food Chem.* **1991**, 43, (1), 71-8.
28. Evershed, R. P.; Male, V. L.; Goad, L. J., Strategy for the analysis of steryl esters from plant and animal tissues. *J. Chromatogr.* **1987**, 400, 187-205.
29. Gunawan, S.; Melwita, E.; Ju, Y.-H., Analysis of trans-cis fatty acids in fatty acid steryl esters isolated from soybean oil deodoriser distillate. *Food Chem.* **2010**, 121, (3), 752-757.
30. Kamm, W.; Dionisi, F.; Fay, L. B.; Hischenhuber, C.; Schmarr, H. G.; Engel, K. H., Analysis of steryl esters in cocoa butter by on-line liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr., A* **2001a**, 918, (2), 341-349.
31. Caboni, M. F.; Iafelice, G.; Pelillo, M.; Marconi, E., Analysis of Fatty Acid Steryl Esters in Tetraploid and Hexaploid Wheats: Identification and Comparison between Chromatographic Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, (19), 7465-7472.
32. Mezine, I.; Zhang, H.; Macku, C.; Lijana, R., Analysis of Plant Sterol and Stanol Esters in Cholesterol-Lowering Spreads and Beverages Using High-Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, (19), 5639-5646.
33. Moreau, R. A.; Whitaker, B. D.; Hicks, K. B., Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.* **2002**, 41, (6), 457-500.
34. Moss, G. P., The nomenclature of steroids: recommendations by the IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, (3), 429-458
35. Hennessey, T. M., Effects of membrane plant sterols on excitable cell functions. *Comp. Biochem. Physiol., C: Comp. Pharmacol. Toxicol.* **1992**, 101C, (1), 1-8.
36. Hartmann, M.-A., Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* **1998**, 3, (5), 170 - 175.
37. Schaller, H., Sterol and steroid biosynthesis and metabolism in plants and microorganisms. In *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, Mander, L.; Lui, H.-W., Eds. Elsevier: Oxford, 2010; Vol. 1, pp 755-787.

38. Normen, L.; Ellegard, L.; Brants, H.; Dutta, P.; Andersson, H., A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, (3-4), 193-201.
39. Piironen, V.; Toivo, J.; Puupponen-Pimia, R.; Lampi, A.-M., Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *83*, (4), 330-337.
40. Watzl, B.; Rechkemmer, G., Phytosterine - Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkungen. *Ernährungs-Umschau* **2001**, *48*, (4), 161-164.
41. Piironen, V.; Toivo, J.; Lampi, A. M., Natural Sources of Dietary Plant Sterols. *J. Food Compos. Anal.* **2000a**, *13*, (4), 619-624.
42. Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Toivo, J. I.; Swank, M. A.; Simpkins, A. H., Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats. *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, (2), 123-142.
43. Piironen, V.; Toivo, J.; Lampi, A. M., Plant sterols in cereals and cereal products. *Cereal Chem.* **2002**, *79*, (1), 148-154.
44. Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Ashraf-Khorassani, M., Phytosterol Composition of Nuts and Seeds Commonly Consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, (24), 9436-9445.
45. Piironen, V.; Lindsay, D. G.; Miettinen, T. A.; Toivo, J.; Lampi, A.-M., Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Agric. Food Chem.* **2000b**, *80*, (7), 939-966.
46. Normen, L.; Bryngelsson, S.; Johnsson, M.; Evheden, P.; Ellegard, L.; Brants, H.; Andersson, H.; Dutta, P., The Phytosterol Content of Some Cereal Foods Commonly Consumed in Sweden and in the Netherlands. *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, (6), 693-704.
47. Normen, L.; Johnsson, M.; Andersson, H.; Van Gameren, Y.; Dutta, P., Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden. *Eur. J. Nutr.* **1999**, *38*, (2), 84-89.
48. Dyas, L.; Goad, L. J., Steryl fatty acyl esters in plants. *Phytochemistry* **1993**, *34*, (1), 17-29.
49. Moreau, R. A.; Hicks, K. B., The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes. *Lipids* **2004**, *39*, (8), 769-776.
50. Seitz, L. M., Stanol and sterol esters of ferulic and p-coumaric acids in wheat, corn, rye, and triticale. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, (3), 662-7.
51. Salen, G.; Ahrens, E. H., Jr.; Grundy, S. M., Metabolism of beta-Sitosterol in Man. *J. Clin. Invest.* **1970**, *49*, 952-967.
52. Betters, J. L.; Yu, L., NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, (13), 2740-2747.
53. Bosner, M. S.; Lange, L. G.; Stenson, W. F.; Ostlund, R. E., Jr., Percent cholesterol

- absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **1999**, 40, (2), 302-308.
54. Ostlund, R. E., Jr.; McGill, J. B.; Zeng, C.-M.; Covey, D. F.; Stearns, J.; Stenson, W. F.; Spilburg, C. A., Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy D5-phytosterols and phytostanols in humans. *Am. J. Physiol.* **2002**, 282, (4, Pt. 1), E911-E916.
55. Luetjohann, D.; Bjoerkhem, I.; Beil, U. F.; von Bergmann, K., Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J. Lipid Res.* **1995**, 36, (8), 1763-73.
56. Altmann, S. W.; Davis, H. R., Jr.; Zhu, L.-j.; Yao, X.; Hoos, L. M.; Tetzloff, G.; Iyer, S. P. N.; Maguire, M.; Golovko, A.; Zeng, M.; Wang, L.; Murgolo, N.; Graziano, M. P., Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2004**, 303, (5661), 1201-1204.
57. Garcia-Calvo, M.; Lisnock, J.; Bull, H. G.; Hawes, B. E.; Burnett, D. A.; Braun, M. P.; Crona, J. H.; Davis, H. R., Jr.; Dean, D. C.; Detmers, P. A.; Graziano, M. P.; Hughes, M.; MacIntyre, D. E.; Ogawa, A.; O'Neill, K. A.; Iyer, S. P. N.; Shevell, D. E.; Smith, M. M.; Tang, Y. S.; Makarewicz, A. M.; Ujjainwalla, F.; Altmann, S. W.; Chapman, K. T.; Thornberry, N. A., The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, (23), 8132-8137.
58. Sane, A. T.; Sinnett, D.; Delvin, E.; Bendayan, M.; Marcil, V.; Menard, D.; Beaulieu, J.-F.; Levy, E., Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J. Lipid Res.* **2006**, 47, 2112-2120.
59. Davis, H. R., Jr.; Zhu, L.-j.; Hoos, L. M.; Tetzloff, G.; Maguire, M.; Liu, J.; Yao, X.; Iyer, S. P. N.; Lam, M.-H.; Lund, E. G.; Detmers, P. A.; Graziano, M. P.; Altmann, S. W., Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, (32), 33586-33592.
60. Nguyen, D. V.; Drover, V. A.; Knopfel, M.; Dhanasekaran, P.; Hauser, H.; Phillips, M. C., Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. *J. Lipid Res.* **2009**, 50, 2235-2244.
61. Lin, D. S.; Steiner, R. D.; Merkens, L. S.; Pappu, A. S.; Connor, W. E., The effects of sterol structure upon sterol esterification. *Atherosclerosis* **2010b**, 208, (1), 155-60.
62. Berge, K. E.; Tian, H.; Graf, G. A.; Yu, L.; Grishin, N. V.; Schultz, J.; Kwiterovich, P.; Shan, B.; Barnes, R.; Hobbs, H. H., Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science (N.Y.)* **2000**, 290, (5497), 1771-5.
63. Lu, K.; Lee, M.-H.; Hazard, S.; Brooks-Wilson, A.; Hidaka, H.; Kojima, H.; Ose, L.; Stalenhoef, A. F. H.; Mietinnen, T.; Bjorkhem, I.; Bruckert, E.; Pandya, A.; Brewer, H. B., Jr.; Salen, G.; Dean, M.; Srivastava, A.; Patel, S. B., Two genes that map to the STSL locus

- cause sitosterolemia: Genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, 69, (2), 278-290.
64. Salen, G.; Patel, S.; Batta, A. K., Sitosterolemia. *Cardiovasc. Drug Rev.* **2002**, 20, (4), 255-270.
65. Nissinen, M. J.; Vuoristo, M.; Gylling, H.; Miettinen, T. A., Respective hydrolysis and esterification of esterified and free plant stanols occur rapidly in human intestine after their duodenal infusion in triacyl- or diacylglycerol. *Lipids* **2007**, 42, (7), 603-612.
66. Wilkins, T. D.; Hackman, A. S., Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans. *Cancer Res.* **1974**, 34, (9), 2250-4.
67. von Bergmann, K.; Sudhop, T.; Lutjohann, D., Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am. J. Cardiol.* **2005**, 96, (1A), 10D-14D.
68. Hamada, T.; Goto, H.; Yamahira, T.; Sugawara, T.; Imaizumi, K.; Ikeda, I., Solubility in and affinity for the bile salt micelle of plant sterols are important determinants of their intestinal absorption in rats. *Lipids* **2006**, 41, (6), 551-556.
69. Boberg, K. M.; Einarsson, K.; Bjoerkhem, I., Apparent lack of conversion of sitosterol into C24-bile acids in humans. *J. Lipid Res.* **1990b**, 31, (6), 1083-8.
70. Tilvis, R. S.; Miettinen, T. A., Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **1986**, 43, (1), 92-7.
71. Sudhop, T.; Sahin, Y.; Lindenthal, B.; Hahn, C.; Luers, C.; Berthold, H. K.; von Bergmann, K., Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut* **2002**, 51, (6), 860-863.
72. Strandberg, T. E.; Gylling, H.; Tilvis, R. S.; Miettinen, T. A., Serum plant and other noncholesterol sterols, cholesterol metabolism and 22-year mortality among middle-aged men. *Atherosclerosis* **2010**, 210, (1), 282-287.
73. Nestel, P.; Cehun, M.; Pomeroy, S.; Abbey, M.; Weldon, G., Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2001**, 55, (12), 1084-1090.
74. Jones, P. J.; Raeini-Sarjaz, M.; Ntanios, F. Y.; Vanstone, C. A.; Feng, J. Y.; Parsons, W. E., Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanol esters. *J. Lipid Res.* **2000**, 41, (5), 697-705.
75. Pollak, O. J., Successful Prevention of Experimental Hypercholesteremia and Cholesterol Atherosclerosis in the Rabbit. *Circulation* **1953**, 7, 696-701.
76. Thompson, G. R.; Grundy, S. M., History and Development of Plant Sterol and Stanol Esters for Cholesterol-Lowering Purposes. *Am. J. Cardiol.* **2005**, 96, (1A), 3D-9D.
77. Pollak, O. J., Reduction of Blood Cholesterol in Man. *Circulation* **1953**, 7, 702-706.

78. Ikeda, I.; Sugano, M., Inhibition of cholesterol absorption by plant sterols for mass intervention. *Curr. Opin. Lipidol.* **1998**, 9, (6), 527-531.
79. Plat, J.; Kerckhoffs, D. A. J. M.; Mensink, R. P., Therapeutic potential of plant sterols and stanols. *Curr. Opin. Lipidol.* **2000**, 11, (6), 571-576.
80. Miettinen, T.; Gylling, H., Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases. *Ann. Med. (Basingstoke, UK)* **2004**, 36, (2), 126-134.
81. Mattson, F. H.; Grundy, S. M.; Crouse, J. R., Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **1982**, 35, (4), 697-700.
82. Normen, L.; Ellegaard, L.; Janssen, H.-G.; Steenbergen, H.; Trautwein, E.; Andersson, H., Phytosterol and phytostanol esters are effectively hydrolysed in the gut and do not affect fat digestion in ileostomy subjects. *Eur. J. Nutr.* **2006**, 45, (3), 165-170.
83. Miller, A.; Majauskaite, L.; Engel, K.-H., Enzyme-catalyzed hydrolysis of g-oryzanol. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, 218, (4), 349-354.
84. Brown, A. W.; Hang, J.; Dussault, P. H.; Carr, T. P., Phytosterol ester constituents affect micellar cholesterol solubility in model bile. *Lipids* **2010b**, 45, (9), 855-62.
85. Carr, T. P.; Elliot, J. D., Food components that reduce cholesterol absorption. *Adv. Food Nutr. Res.* **2006**, 51, 165-204.
86. Lin, X.; Racette, S. B.; Lefevre, M.; Spearie, C. A.; Most, M.; Ma, L.; Ostlund, R. E., Jr., The effects of phytosterols present in natural food matrices on cholesterol metabolism and LDL-cholesterol: a controlled feeding trial. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, 64, (12), 1481-1487.
87. Weststrate, J. A.; Meijer, G. W., Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1998**, 52, (5), 334-43.
88. Sierksma, A.; Weststrate, J. A.; Meijer, G. W., Spreads enriched with plant sterols, either esterified 4,4-dimethylsterols or free 4-desmethylsterols, and plasma total- and LDL-cholesterol concentrations. *Br. J. Nutr.* **1999**, 82, (4), 273-282.
89. Vissers, M. N.; Zock, P. L.; Meijer, G. W.; Katan, M. B., Effect of plant sterols from rice bran oil and triterpene alcohols from sheanut oil on serum lipoprotein concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 72, (6), 1510-1515.
90. Trautwein, E. A.; Schulz, C.; Rieckhoff, D.; Kunath-Rau, A.; Erbersdobler, H. F.; Arjan de Groot, W.; Meijer, G. W., Effect of esterified 4-desmethylsterols and -stanols or 4,4'-dimethylsterols on cholesterol and bile acid metabolism in hamsters. *Br. J. Nutr.* **2002**, 87, (3), 227-237.
91. Calpe-Berdiel, L.; Escola-Gil, J. C.; Blanco-Vaca, F., New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis (Amsterdam, Neth.)* **2009**, 203, (1), 18-31.

92. Mel'nikov, S. M.; Seijen ten Hoorn, J. W. M.; Bertrand, B., Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytostanols via a cocrystallization mechanism? *Chem. Phys. Lipids* **2004b**, 127, (1), 15-33.
93. Mel'nikov, S. M.; Seijen ten Hoorn, J. W. M.; Eijkelenboom, A. P. A. M., Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: an in vitro study. *Chem. Phys. Lipids* **2004a**, 127, (2), 121-141.
94. Jesch, E. D.; Carr, T. P., Sitosterol reduces micellar cholesterol solubility in model bile. *Nutr. Res. (N. Y., NY, U. S.)* **2006**, 26, (11), 579-584.
95. Vanstone, C. A.; Raeini-Sarjaz, M.; Jones, P. J. H., Injected phytosterols/stanols suppress plasma cholesterol levels in hamsters. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, 12, (10), 565-574.
96. Konlande, J. E.; Fisher, H., Evidence for a Nonabsorptive Antihypercholesterolemic Action of Phytosterols in the Chicken. *J. Nutr.* **1969**, 98, 435-442.
97. Ling, W. H.; Jones, P. J., Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* **1995**, 57, (3), 195-206.
98. Plat, J.; Nichols, J. A.; Mensink, R. P., Plant sterols and stanols: Effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J. Lipid Res.* **2005a**, 46, (11), 2468-2476.
99. Sudhop, T.; Luetjohann, D.; von Bergmann, K., Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol. Ther.* **2005**, 105, (3), 333-341.
100. Field, F. J.; Born, E.; Mathur, S. N., Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. *J. Lipid Res.* **2004**, 45, (12), 2252-2259.
101. Andersson, S. W.; Skinner, J.; Ellegard, L.; Welch, A. A.; Bingham, S.; Mulligan, A.; Andersson, H.; Khaw, K. T., Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2004**, 58, (10), 1378-1385.
102. Klingberg, S.; Ellegaard, L.; Johansson, I.; Hallmans, G.; Weinehall, L.; Andersson, H.; Winkvist, A., Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008b**, 87, (4), 993-1001.
103. Plat, J.; van Onselen, E. N. M.; van Heugten, M. M. A.; Mensink, R. P., Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, 54, (9), 671-677.
104. AbuMweis, S. S.; Vanstone, C. A.; Lichtenstein, A. H.; Jones, P. J. H., Plant sterol consumption frequency affects plasma lipid levels and cholesterol kinetics in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2009**, 63, (6), 747-755.
105. Kritchevsky, D.; Chen, S. C., Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Res. (N.Y., NY, United States)* **2005**, 25, (5), 413-428.

106. Derdemezis, C. S.; Filippatos, T. D.; Mikhailidis, D. P.; Elisaf, M. S., Effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2010**, 15, (2), 120-134.
107. Micallef, M. A.; Garg, M. L., Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, 20, (12), 927-939.
108. Plat, J.; Brufau, G.; Dallinga-Thie Geesje, M.; Dasselaar, M.; Mensink Ronald, P., A plant stanol yogurt drink alone or combined with a low-dose statin lowers serum triacylglycerol and non-HDL cholesterol in metabolic syndrome patients. *J. Nutr.* **2009**, 139, (6), 1143-9.
109. Grigore, L.; Norata, G. D.; Catapano, A. L., Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimibe and statins. *Vasc. Health Risk Manage.* **2008**, 4, (2), 267-278.
110. Bouic, P. J. D., The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2001**, 4, (6), 471-475.
111. Panda, S.; Kar, A.; Patil, S., Soy sterols in the regulation of thyroid functions, glucose homeostasis and hepatic lipid peroxidation in mice. *Food Res. Int.* **2009**, 42, (8), 1087-1092.
112. Zhao, Y.; Chang, S. K. C.; Qu, G.; Li, T.; Cui, H., beta -Sitosterol Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in SGC-7901 Human Stomach Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, (12), 5211-5218.
113. Cantrill, R.; Kawamura, Y., Phytosterols, phytostanols and their esters. *69th JECFA - Chemical and Technical Assessment* 2008.
114. Kamal-Eldin, A.; Moazzami, A., Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. *Recent Pat. Food, Nutr. Agric.* **2009**, 1, (1), 1-14.
115. Niemann, B.; Sommerfeld, C.; Hembek, A.; Bergmann, C., Lebensmittel mit Pflanzensterinzusatz in der Wahrnehmung der Verbraucher - Projektbericht über ein Gemeinschaftsprojekt der Verbraucherzentralen und des BfR. *BfR Wissenschaft* 2007.
116. Schneider, K.; Di Novi, M.; Baines, J.; Schlatter, J., Phytosterols, phytostanols and their esters. *WHO Food Addit. Ser.* **2009**, 60, (Safety Evaluation of Certain Food Additives), 117-163.
117. Weber, N.; Mukherjee, K. D., Plant sterols and steryl esters in functional foods and nutraceuticals. *Nutraceutical Sci. Technol.* **2006**, 5, (Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-Products), 483-508.
118. Augustine, R. L.; Reardon, E. J., The Palladiom catalyzed hydrogenation of cholesterol. *Org. Prep. Proced.* **1969**, 1, (2), 107-109.
119. Miettinen, T.; Vanhanen, H.; Wester, I. Use of a stanol fatty acid ester for reducing

- serum cholesterol level. United States Patent Number: 5502045. Mar. 26, 1996.
120. Weber, N.; Weitkamp, P.; Mukherjee, K. D., Steryl and Stanyl Esters of Fatty Acids by Solvent-Free Esterification and Transesterification in Vacuo Using Lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya*. *J. Agric. Food Chem.* **2001b**, 49, (11), 5210-5216.
 121. Vu, P.-L.; Shin, J.-A.; Lim, C.-H.; Lee, K.-T., Lipase-catalyzed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil. *Food Res. Int.* **2004**, 37, (2), 175-180.
 122. Weber, N.; Weitkamp, P.; Mukherjee, K. D., Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst. *J. Agric. Food Chem.* **2001a**, 49, (1), 67-71.
 123. Weber, N.; Weitkamp, P.; Mukherjee, K. D., Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. *Food Res. Int.* **2002**, 35, (2/3), 177-181.
 124. He, W.; Jia, C.; Ma, Y.; Yang, Y.; Zhang, X.; Feng, B.; Yue, L., Lipase-catalyzed synthesis of phytostanyl esters in non-aqueous media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, 67, (1-2), 60-65.
 125. Horlacher, P.; Hietsch, D.; Albiez, W.; Timmermann, F.; Beck, K. Sterol esters having short chain fatty acids. WO 2007/101580. Sept. 13, 2007.
 126. Tarantino, L. M., FDA Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000176 (CFSAN/Office of Food Additive Safety): <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154610.htm>. 2006.
 127. Rulis, A. M., FDA Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000061 (FDA/CFSAN/OPA): <http://www.fda.gov/ohrms/DOCKETS/dockets/95s0316/95s-0316-rpt000343-039-appx-E-Ref-27-GRAS-vol268.pdf>. 2001.
 128. Tarantino, L. M., FDA Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000177 (CFSAN/Office of Food Additive Safety): <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154615.htm>. 2005.
 129. Tarantino, L. M., FDA Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000181 (CFSAN/Office of Food Additive Safety): <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154632.htm>. 2006.
 130. BfR, Fragen und Antworten zu Pflanzensterinen, FAQ des BfR vom 25. Juni 2007. http://www.bfr.bund.de/cm/276/fragen_und_antworten_zu_pflanzensterinen.pdf.
 131. SCF, Opinion of the Scientific Committee on Food on Applications for Approval of a Variety of Plant Sterol-Enriched Foods. **2003**.

132. Commission Regulation (EC) No 608/2004 of 31 March 2004 concerning the labelling of foods and food ingredients with added phytosterols, phytosterol esters, phytostanols and/or phytostanol esters. *Official Journal of the European Union. L 97, 44.*
133. BfR, Anträge auf Zulassung neuartiger Lebensmittel gemäß Artikel 4 der Verordnung (EG) Nr. 258/97 (Stand: 08.07.2010): http://www.bfr.bund.de/cm/208/100723_antraege_auf_zulassung_neuartiger_lebensmittel_gemaess_artikel_4_der_verordnung_eg_nr_258_97.pdf.
134. BfR, Notifizierungen neuartiger Lebensmittel gemäß Artikel 5 der Verordnung (EG) Nr. 258/97 (Stand: 08.07.2010): http://www.bfr.bund.de/cm/208/100723_notifizierungen_neuartiger_lebensmittel_gemaess_artikel_5_der_verordnung_eg_nr_258_97.pdf.
135. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Union. L404,9.*
136. EFSA, Scientific substantiation of a health claim related to plant stanol esters and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006; Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (Question No EFSA-Q-2008-118). *The EFSA Journal* **2008**, 825, 1-13.
137. EFSA, Scientific substantiation of a health claim related to plant sterols and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (Question No EFSA-Q-2008-085). *The EFSA Journal* **2008**, 781, 1-12.
138. EFSA, Scientific substantiation of a health claim related to a low fat fermented milk product (Danacol®) enriched with plant sterols/stanols and lowering/reducing blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006; Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (Question No EFSA-Q-2008-779). *The EFSA Journal* **2009**, 1177, 1-12.
139. EFSA, Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from McNeil Nutritionals Ltd. related to the scientific substantiation of a health claim on plant stanol esters and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease. *The EFSA Journal* **2008**, (825), 1-13.
140. Horlacher, P.; Gierke, J.; Timmermann, F.; Albiez, W.; Hofmann, A. Sterol ester powder. United States Patent Application Publication: US 2008/0187643.
141. Inaba, K.; Oga, H.; Tsubomoto, H. Powdered plant sterol ester containing preparations, method for preparing the same and foods and drinks containing the same. United States Patent Application Publication: US 2008/0138488.
142. Stevens, L. A.; Schmelzer, W., Aqueous dispersible sterol product. United States Patent:

- US 6623780. **2003**.
143. AOCS, Determination of the Composition of the Sterol Fraction of Animal and Vegetable Oils and Fats by TLC and Capillary GLC (Method Ch. 6-91). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society* 1991.
 144. Naudet, M.; Hautfenne, A., Standard method for the determination of total sterols in fats and oils. *Pure & Appl. Chem.* **1985**, 57, (6), 899-904.
 145. ISO 6799: Determination of composition of the sterol fraction of fats and oils by gas-liquid chromatography. *International Organization for Standardization* **1991**.
 146. International Olive Oil Council, Determination of the composition and content of sterols by capillary-column gas chromatography. COI/ T.20/ Doc. no.10/ Rev. 1. **2001**.
 147. Evershed, R. P.; Prescott, M. C.; Goad, L. J., Deuteration as an aid to the high-temperature gas chromatography-mass spectrometry of sterol fatty acyl esters. *J. Chromatogr.* **1992**, 590, (2), 305-12.
 148. Lechner, M.; Reiter, B.; Lorbeer, E., Determination of free and esterified sterols in potential new oil seed crops by coupled online liquid chromatography-gas chromatography. *Fett/Lipid* **1999**, 101, (5), 171-177.
 149. Grob, K.; Lanfranchi, M., Reproducibility of results from LC-GC of sterols and wax esters in olive oils. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989a**, 12, (9), 624-6.
 150. Grob, K.; Lanfranchi, M.; Mariani, C., Determination of free and esterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1989b**, 471, 397-405.
 151. Grob, K.; Lanfranchi, M.; Mariani, C., Evaluation of Olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, 67, (10).
 152. Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L., On-line coupled LC-GC: Theory and Applications. *Recent Applications in Multidimensional Chromatography* **2003**, 2-10.
 153. Hyotylainen, T.; Riekkola, M.-L., On-line coupled liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr., A* **2003**, 1000, (1-2), 357-384.
 154. Grob, K., Efficiency through combining high-performance liquid chromatography and high resolution gas chromatography: progress 1995-1999. *J. Chromatogr., A* **2000**, 892, (1+2), 407-420.
 155. Grob, K., Solvent effects in capillary chromatography. *J. Chromatogr.* **1983**, 279, 225-232.
 156. Grob, K., Peak broadening or splitting caused by solvent flooding after splitless or cold on-column injection in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1981**, 213, (1), 3-14.
 157. Grob, K., „Band broadening in space“ and the „retention gap“ in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1982**, 237, (1), 15-23.

158. Grob, K.; Schmarr, H. G.; Mosandl, A., Early solvent vapor exit in GC for coupled LC-GC involving concurrent eluent evaporation. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. J. High Resolut. Chromatogr.* **1989** 12, 375-382.
159. Grob, K.; Schilling, B., Observation of a peak under the action of „phase soaking“, a gas chromatographic solvent effect, during passage through a capillary column. *J. Chromatogr.* **1983b**, 259, (1), 37-48.
160. Schulte, E.; Weber, K., Schnelle Herstellung der Fettsäuremethylester aus Fetten mit Trimethylsulfoniumhydroxid oder Natriummethylat. *Fat. Sci. Technol.* **1989**, 91 181.
161. Tierische und pflanzliche Fette - Bestimmung der Verseifungszahl. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Untersuchung von Lebensmitteln L-13.00-18* **2004**.
162. Bestimmung des Fettgehaltes von Milchprodukten - Verfahren nach Weibull. *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB: Untersuchung von Lebensmitteln L-02.00-11* **2005**.
163. Costin, C. D.; Hansen, S. L.; Chambers, D. P., Using Theoretical Correction Factors for Quantitative Analysis of Sterols and Sterol Concentrates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, 86, (2), 111-118.
164. Brown, A. W.; Hang, J.; Dussault, P. H.; Carr, T. P., Plant sterol and stanol substrate specificity of pancreatic cholesterol esterase. *J. Nutr. Biochem.* **2010a**, 21, (8), 736-740.
165. Rasmussen, H. E.; Guderian, D. M., Jr.; Wray, C. A.; Dussault, P. H.; Schlegel, V. L.; Carr, T. P., Reduction in cholesterol absorption is enhanced by stearate-enriched plant sterol esters in hamsters. *J. Nutr.* **2006**, 136, (11), 2722-2727.
166. Lusby, W. R.; Thompson, M. J.; Kochansky, J., Analysis of sterol esters by capillary gas chromatography-electron impact and chemical ionization-mass spectrometry. *Lipids* **1984**, 19, (11), 888-901.
167. Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H., *Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes* Holden-Day: San-Francisco, 1964; Vol. II.
168. Knights, B. A., Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry. *J. Gas Chromatogr.* **1967**, 5 273 - 282.
169. Partridge, L. G.; Djerassi, C., Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. 250. Characteristic fragmentations of cholesteryl acetate. *J. Org. Chem.* **1977**, 42 (17), 2799 - 2805.
170. Cranwell, P. A.; Robinson, N.; Eglinton, G., Esterified lipids of the freshwater dinoflagellate *Peridinium lomnickii*. *Lipids* **1985**, 20, (10), 645-51.
171. Evershed, R. P.; Prescott, M. C.; Spooner, N.; Goad, L. J., Negative ion ammonia chemical ionization and electron impact ionization mass spectrometric analysis of steryl fatty acyl esters. *Steroids* **1989**, 53, (3-5), 285-309.

172. Miller, L. A. D.; Gordon, M. H., Use of lipolysis in the isolation of sterol esters. *Food Chem.* **1996**, 56, (1), 55-59.
173. Dyas, L.; Prescott, M. C.; Evershed, R. P.; Goad, L. J., Steryl esters in a cell suspension culture of celery (*Apium graveolens*). *Lipids* **1991**, 26, (7), 536-41.
174. Norton, R. A., Isolation and identification of steryl cinnamic acid derivatives from corn bran. *Cereal Chem.* **1994**, 71, (2), 111-17.
175. Rahier, A.; Benveniste, P., Mass spectral identification of phytosterols. In *Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids* Nes, W. D.; Parish, E. J., Eds. Academic Press, Inc.: San Diego, 1989; pp 223-50.
176. Codex, *Standard for Named Vegetable Oils Codex-Stan 210. Codex Alimentarius 1999.*
177. Kuksis, A.; Myher, J. J.; Marai, L.; Little, J. A.; McArthur, R. G.; Roncari, D. A. K., Fatty acid composition of individual plasma steryl esters in phytosterolemia and xanthomatosis. *Lipids* **1986**, 21, (6), 371-7.
178. Plank, C.; Lorbeer, E., Analysis of free and esterified sterols in vegetable oil methyl esters by capillary GC. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, 16, (8), 483-7.
179. 32645, D. *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*; 2008.
180. Roden, A.; Boyer, M. H.; Bruce, R.; Detrano, F.; Williams, J. L. Preparation of sterol and stanol-esters. US 6410758. 2002.
181. Horlacher, P.; Gierke, J.; Timmermann, F.; Albiez, W.; Hofmann, A. Sterol ester powder for food, drug and cosmetic use. WO 2007/022890. 2007.
182. MilchErzV. *Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung - MilchErzV) vom 21. Dezember 2007 (BGBl. I S. 3282)*
183. Kamm, W.; Dionisi, F.; Hischenhuber, C.; Schmarr, H.-G.; Engel, K.-H., Rapid detection of vegetable oils in milk fat by on-line LC-GC analysis of b-sitosterol as marker. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104, (11), 756-761.
184. Kamm, W.; Dionisi, F.; Fay, L.-B.; Hischenhuber, C.; Schmarr, H.-G.; Engel, K.-H., Rapid and simultaneous analysis of 16-O-methylcafestol and sterols as markers for assessment of green coffee bean authenticity by on-line LC-GC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2002a**, 79, (11), 1109-1113.
185. Grob, K.; Kaelin, I.; Artho, A., Coupled LC-GC: the capacity of silica gel (HP)LC columns for retaining fat. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991a**, 14, (6), 373-6.
186. Barnsteiner, A.; Lubinus, T.; Gianvito, A. d.; Schmid, W.; Engel, K.-H., GC-based analysis of plant stanyl fatty acid esters in enriched foods. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 5204-5214.
187. Gosetti, F.; Mazzucco, E.; Zampieri, D.; Gennaro, M. C., Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass

- spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2010**, 1217, (25), 3929-3937.
188. Nelson, M. D.; Dolan, J. W., Ion suppression in LC-MS-MS - a case study. *LCGC North Am.* **2002**, 20, (1), 24, 26, 28, 30, 32.
189. Kostianen, R.; Kauppila, T. J., Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2009**, 1216, (4), 685-699.
190. Marwah, A.; Marwah, P.; Lardy, H., Analysis of ergosteroids VIII: Enhancement of signal response of neutral steroidal compounds in liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analysis by mobile phase additives. *J. Chromatogr., A* **2002**, 964, (1-2), 137-151.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen herzlichst bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit und den angegliederten Projekten beigetragen haben:

Allen voran meinem Doktorvater Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, welcher mich auf diesen Weg gelenkt und auf diesem stets unterstützt hat. Insbesondere danke ich ihm für sein entgegengebrachtes Vertrauen, seine Offenheit und Diskussionsbereitschaft sowie für das „Highlight“: die Teilnahme und Präsentation der Forschungsergebnisse auf dem Symposium der American Chemists Society (ACS) in San Francisco.

Dr. Wolfgang Schmid, Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, danke ich insbesondere für die Projektleitung des LGL-Projektes „Phytosterole in funktionellen Lebensmitteln“ und sein ehrliches Interesse am Projektfortschritt.

Den ehemaligen Kollegen Dr. Andreas Miller, sowie dem leider viel zu früh verstorbenen Bertrand Seumo, möchte ich vor allem für die Einführung in die Kunst der on-line gekoppelten LC-GC danken.

Dr. Ludwig Adam danke ich für die freundschaftliche Überlassung all seiner „GC-Schätze“ - insbesondere der Geräte „HP3“ und „HP4“, welche sich im Laboralltag durch überragende Performance auszeichneten.

Für die außerordentlich gute und konstruktive Arbeitsatmosphäre danke ich meinen ehemaligen BüromitbewohnerInnen Dr. Hedwig Strohalm und Tim Lubinus, dem lebenden LC-Lexikon aus Ostfriesland und Mitgründer der „Sterolkammer“, sowie allen weiteren Mitarbeitern der Novel Food-Gruppe. Für Ihr Interesse und Ihren Einsatz möchte ich hier noch gesondert „meiner Nachfolgerin“ Rebecca Esche danken: Ich hoffe du hältst mich LC-GC-technisch auch weiterhin auf dem Laufenden;-)

Vielen Dank an die StudentInnen, HiWis und technischen Assistenten die mich praktisch unterstützt haben: Anne-Christin Gerspach, Sigrid Schwab, Svitlana Dubinina, Claudia Fuchs, Tobias Schober, Oxana Fastovsky und Angelica Murru (geb. di Gianvito) – Mille, Mille Gracie!! Auch den restlichen „ALT“-Kollegen sowie allen weiteren ALT-Studenten und HiWis danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und unterhaltsame Mittagsrunden!

Frau Gerda Röske danke ich für die hervorragende Unterstützung bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Den Grünau-Mitarbeitern Hubert Schmid, Karl-Heinz Ruf und Dr. Peter Horlacher danke ich für die großzügige Bereitstellung industrieller Phytosterol- und Sterylester-Muster und allen anderen Grünauern für die tolle Ausbildungs- und Arbeitszeit vor und während des Studiums!

Stefan Huber danke ich für seine Unterstützung bei diversen LC/MS-Troubleshooting.

Des Weiteren bedanke ich mich noch bei den Mitarbeitern von Agilent, die unser on-line LC-GC-Projekt begeistert unterstützt haben, insbesondere Alexander Nun, Walter Kohlert, Stefan Fenzel und Udo Huber.

Es hat Spaß gemacht!!!

Zum Schluss danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Rychlik und Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz bzw. die Aufgabe des Zweitprüfers zu übernehmen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Andreas Barnsteiner

Geboren am 12.11.1978 in Schwabmünchen

Schulbildung und Zivildienst:

09/85-07/89 Grundschule Babenhausen

09/89-06/98 Kolleg der Schulbrüder, Illertissen

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

08/98-08/99 Pflegediensthelfer im Kreiskrankenhaus Babenhausen

Berufsausbildung

09/99-01/02: Ausbildung zum Chemielaboranten, Grünau Illertissen GmbH, Illertissen;
anschließend: befristetes Arbeitsverhältnis

Studium:

10/02-05/07: Studium der Ernährungswissenschaften, Technische Universität München,
Freising, Weihenstephan

Studienschwerpunkte: Lebensmittelwissenschaft und Bio-Medizin

Abschluss: Master of Science (M.Sc.)

Berufliche Tätigkeiten:

06/07-05/11: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Allgemeine

Lebensmitteltechnologie, Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, Freising, Weihenstephan

seit Juni 2011: Naturwissenschaftler, Cefak KG, Kempten

Veröffentlichungen

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

Barnsteiner A.; Esche R.; di Gianvito A.; Chiavaro E.; Schmid W.; Engel K.-H., Capillary gas chromatographic analysis of complex phytosteryl/-stanyl ester mixtures in enriched skimmed milk-drinking yoghurts. *Food Control*, **2012**, 27, 275-283.

Engel, K.-H.; Barnsteiner, A., Authentication of foods enriched with plant sterols / stanols and their esters. In: *Progress in Authentication of Food and Wine*, ACS Symposium Series, Vol. 1081, Chapter 12, pp 177–187; Publication Date (Web): November 17, **2011**.

Barnsteiner A.; Esche R.; Engel K.-H.; Kohlert W.; Fenzel S., Analysis of plant stanyl fatty acid esters in enriched margarine using an on-line coupled Agilent 1220 Infinity LC/7890 GC system, Agilent Application Note, publication number 5990-8251EN; **2011**.

Esche R.; Barnsteiner A.; Engel K.-H.; Kohlert W.; Fenzel S., Two-dimensional chromatography: LC-GC online coupling of on Agilent 1260 Infinity LC and an Agilent 7890A GC, Agilent Technical Overview, publication number 5990-8025EN; **2011**.

Barnsteiner, A.; Lubinus, T.; di Gianvito, A.; Schmid, W.; Engel, K.-H., GC-based analysis of plant stanyl fatty acid esters in enriched foods. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 5204-5214.

Poster und Vorträge

Barnsteiner, A.; Schmid, W.; Engel, K.-H., GC-basierte Analytik von Fettsäureestern pflanzlicher Sterole/Stanole in angereicherten Lebensmitteln, Arbeitstagung des Regionalverbandes der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (GDCh), Wissenschaftszentrum Weihenstephan, 15. Februar 2011.

Barnsteiner, A.; Schmid, W.; Engel, K.-H., Authentizität mit Estern pflanzlicher Sterole/Stanole angereicherter Lebensmittel. 39. deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim, 20. - 22. September 2010.

Engel, K.-H.; Barnsteiner A., Authentication of foods enriched with plant sterols / stanols and their esters. 239th ACS National Meeting, San Francisco, CA, March 21-25 2010.