



Sebastian Schrittwieser, BSc

# **Verfahrensvariation zur Optimierung der Phospholipid - Gewinnung aus Eigelb**

## **MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieur

Masterstudium Verfahrenstechnik

eingereicht an der

**Technischen Universität Graz**

Betreuer

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn., Thomas Gamse

Institut für Chemische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik

## Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei, meinem Betreuer, Herrn Prof. Thomas Gamse für seine laufende Unterstützung bedanken. Er stand mir bei meiner Bachelorarbeit, Konstruktionsübung und auch jetzt bei dieser Masterarbeit immer mit Rat und Tat zur Seite.

Weiters möchte ich bei der Firma Prozess Optimal, allen voran bei Herrn Dipl.-Ing. Günther Holzer bedanken, ohne jenen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Speziell auch bei Frau Angela Pfleger, die mich im Labor unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Von Seiten der Analytischen Chemie gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Erich Leitner vom Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der TU Graz. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Diehl und der Spectral Service AG, die mich mit kostenlosen Analysen unterstützt haben.

Natürlich danke ich meiner Freundin Anna, die immer an mich geglaubt und mich bei jeder Möglichkeit unterstützt hat. Auch meinen Eltern gebührt ein großer Teil des Dankes. Ohne sie wäre meine Ausbildung in dieser Form nicht möglich gewesen und dafür möchte ich an dieser Stelle Danke sagen.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

---

Datum

---

Unterschrift

## Kurzfassung

Die Naturkosmetik nimmt einen immer größeren Stellenwert in der Gesellschaft ein. Der Trend geht dabei weg von der klassischen, synthetischen Kosmetik zu nachwachsenden, biologischen und regionalen Inhaltsstoffen. Speziell bei der Herstellung von Cremes nimmt der verwendete Emulgator eine entscheidende Rolle ein. Je nach Art der Creme wird zwischen Öl - in - Wasser oder Wasser - in - Öl Emulsionen unterschieden. Tagescremes sind dabei Öl - in - Wasser Emulsionen und in der Naturkosmetik kommen dabei meist Emulgatoren auf Sojabasis zum Einsatz.

Setzt man sich zum Ziel eine Naturkosmetiklinie mit Inhaltsstoffen aus der Steiermark zu entwickeln und herzustellen, stellt die Sojapflanze keine ideale Quelle für einen Emulgator dar. Die Inhaltsstoffe, die der Fähigkeit zur Bildung einer Emulsion zugrunde liegen, sind Phospholipide. Eine regional verfügbare Quelle ist Eigelb und dafür wurde ein Gewinnungsverfahren optimiert.

Es wurden unterschiedliche Ausgangsmaterialien, Extraktions- und Analysemethoden angewendet und bewertet. Der Bereich der Naturstoffe stellte dabei ein durchaus interessantes Gebiet, aber auch eine enorme Herausforderung dar. Es soll ein möglichst reines Produkt aus einem Ausgangsstoff mit mehreren hundert Komponenten gewonnen werden. Zusätzlich dürfen Naturstoffe nicht zu hohen Temperaturen ausgesetzt werden.

Durch die angewandte Vorgehensweise konnten Ergebnisse gewonnen und interpretiert werden, um einen geeigneten Gewinnungsprozess von Phospholipiden aus Eigelb zu realisieren. Dieser konnte durch den kaskadischen Einsatz von Hochdruckextraktion mit überkritischem Kohlendioxid in Kombination mit einer Fest-Flüssig-Extraktion erzielt werden. Der gewonnene Emulgator weist eine Phospholipid-Reinheit von 83% (davon 76% Phosphatidylcholin) bei einer Phospholipid-Ausbeute von 98% auf und weist eine geeignete Emulgator-Fähigkeit auf. Durch das vorteilhafte Phospholipid-Spektrum im gewonnenen Extrakt war keine weitere enzymatische Umwandlung, wie bei im Handel verfügbaren Sojaprodukten notwendig, um eine stabile O/W Emulsion zu bilden.

## Abstract

Natural cosmetics are playing an increasingly important role in society. The trend is moving away from classic, synthetic cosmetics to sustainable, biological and regional ingredients. Especially in the production of creams, the emulsifier used plays a crucial role. Depending on the type of cream, oil is made in water or water in oil emulsions. Day creams are oil-in-water emulsions, and natural cosmetics mostly use soy-based emulsifiers.

If the goal is to develop and produce natural cosmetics with ingredients from Styria, the soybean plant is not an ideal source for an emulsifier. The ingredients that underlie the ability to form an emulsion are phospholipids. A regionally available source is egg yolk and for this a production process has been optimized.

Different starting materials, extraction and analysis methods were used and evaluated. The field of natural products was a very interesting field, but also an enormous challenge in that a product as pure as possible is to be extracted from a starting material with several hundred components.

Through the applied approach, results could be obtained and interpreted to realize a suitable recovery process of phospholipids from egg yolk. This was achieved by the cascading use of high-pressure extraction with supercritical carbon dioxide in combination with solid-liquid extraction. The obtained emulsifier had a phospholipid purity of 83% (with a phosphatidylcholine content of 76%) with a phospholipid yield of 98% and could have a suitable emulsifier capability. The phospholipid spectrum in the recovered extract did not require any further enzymatic conversion, as with commercially available soy products, to form a stable O / W emulsion.

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	3
2.1	Aufbau der Haut.....	3
2.2	Zusammensetzung von Cremes.....	4
2.3	Naturkosmetik.....	5
2.4	Emulgatoren .....	6
2.4.1	HLB - Wert .....	7
2.5	Lipide.....	8
2.5.1	Fettsäuren .....	9
2.5.2	Triglyceride.....	13
2.5.3	Phospholipide.....	14
2.5.4	Lyso-Phospholipide.....	15
2.5.4.1	Enzymatische Umesterung .....	16
2.5.4.1.1	Phospholipasen.....	17
2.5.4.1.2	Triacylglycerin-Lipasen.....	18
2.5.5	Cholesterin .....	19
2.6	Hühnerei.....	19
2.6.1	Aufbau und Zusammensetzung .....	20
2.6.1.1	Eiweiß.....	20
2.6.1.2	Eigelb.....	21
2.7	Extraktion.....	24
2.7.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion .....	26
2.7.1.1	Fällung der Proteine (Denaturierung) .....	27
2.7.2	Fest-Flüssig-Extraktion .....	27
2.7.2.1	Soxhlet-Apparatur.....	28
2.7.3	Hochdruckextraktion mit verdichteten Gasen.....	29
2.7.3.1	Überkritisches Fluid .....	30
2.7.3.2	Lösemittel für die Hochdruckextraktion.....	31
2.7.3.3	Vorteile der Hochdruckextraktion mit Kohlendioxid.....	33
2.7.3.4	Einfluss von Druck und Temperatur.....	34
2.7.3.5	Hochdruckextraktion von Eigelb .....	34
2.8	Analysemethoden .....	35
2.8.1	Chromatographie .....	35
2.8.1.1	Gaschromatographie (GC) .....	37
2.8.1.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	39

---

2.8.2	Spektroskopie .....	40
2.8.2.1	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie.....	40
3	Experimenteller Teil .....	42
3.1	Ausgangsmaterial .....	42
3.2	Flüssig-Flüssig Extraktion .....	42
3.3	Fest-Flüssig-Extraktion .....	43
3.3.1	Soxhlet .....	43
3.3.2	Rührkessel-Versuche .....	44
3.4	Hochdruckextraktion .....	45
3.4.1	Versuchs-Anlage .....	45
3.4.2	Pilot-Anlage.....	46
3.5	Analyse.....	48
3.5.1	Phospholipid-Gehalt über Aceton Unlösliches .....	48
3.5.2	Phospholipid-Analyse mittels HPLC.....	49
3.5.2.1	Verwendete Geräte.....	49
3.5.2.2	Verwendete Methode.....	50
3.5.2.3	Löslichkeitsversuche.....	51
3.5.3	Phospholipid-Gehalt und Verteilung mittels NMR-Spektroskopie...51	
3.5.3.1	Probenvorbereitung .....	51
3.5.3.2	Verwendete Geräte.....	52
3.5.4	Fettsäureverteilung mittels GC.....	52
3.5.4.1	Probenvorbereitung .....	52
3.5.4.2	Verwendete Geräte.....	53
3.6	Herstellung der O/W Emulsion.....	54
4	Ergebnisse und Diskussion .....	55
4.1	Flüssig-Flüssig Extraktion .....	55
4.2	Fest-Flüssig Extraktion .....	56
4.2.1	Soxhlet-Versuche.....	56
4.2.1.1	Hexan .....	56
4.2.1.2	Ethanol .....	56
4.2.2	Löslichkeitsversuche .....	57
4.2.3	Rührkesselversuche.....	58
4.2.4	Temperatureinfluss .....	60
4.3	Hochdruckextraktion .....	61
4.3.1	Druck- und Temperatureinfluss .....	61
4.3.2	Fettsäureverteilung .....	64

---

4.4	Phospholipid-Gehalt und Verteilung mittels NMR-Spektroskopie .....	66
4.5	Bewertung der Emulsionen.....	67
4.6	Prozess.....	68
5	Zusammenfassung.....	70
5.1	Persönliche Erfahrungen .....	71
5.2	Motivation für weitere Forschungen.....	71
6	Anhang.....	73
6.1	Symbolverzeichnis.....	73
6.2	Abkürzungen.....	74
6.3	Analysezertifikate.....	75
6.4	Literaturverzeichnis.....	83



---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt durch die Haut .....	3
Abbildung 2: Öl - in - Wasser (O/W) Emulsion.....	6
Abbildung 3: O/W Emulsion mit Emulgator.....	7
Abbildung 4: HLB Bereiche mit Anwendung .....	7
Abbildung 5: Elaidinsäure: t-9 – Octadecensäure.....	10
Abbildung 6: Ölsäure: c-9 – Octadecensäure .....	10
Abbildung 7: Struktur Glycerin Molekül.....	13
Abbildung 8: Verseifungsreaktion .....	13
Abbildung 9: Schematischer Aufbau von Phospholipiden .....	14
Abbildung 10: Kopfgruppen der Phospholipide.....	14
Abbildung 11: Schematische Darstellung Lyso-Phospholipide .....	16
Abbildung 12: Übersicht der 6 Hauptgruppen von Enzymen .....	17
Abbildung 13: Reaktionen mit Phospholipase A1, A2, C und D als Katalysator .....	18
Abbildung 14: Reaktionsschema einer Hydrolyse von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A1 als Katalysator zu Lyso-Phosphatidylcholin.....	18
Abbildung 15: Reaktionsschema einer Alkohololyse von Phosphatidylcholin mit einer Triacylglycerin-Lipase als Katalysator zu Lyso-Phosphatidylcholin ....	19
Abbildung 16: Cholesterin .....	19
Abbildung 17: Schematischer Schnitt durch ein Hühnerei.....	20
Abbildung 18: Gleichgewichtsbestimmte physikalisch-chemische Trennverfahren ...	25
Abbildung 19: Schematisch vereinfachte Verfahrensweise bei der Flüssig-Flüssig- Extraktion .....	26
Abbildung 20: Schematisch vereinfachte Verfahrensweise bei der Fest-Flüssig- Extraktion .....	28
Abbildung 21: Soxhlet Apparatur .....	29
Abbildung 22: Definition des überkritischen Zustands für eine reine Komponente ....	30
Abbildung 23: Einfluss von Druck und Temperatur auf die Dichte von Kohlendioxid.	34
Abbildung 24: Einteilung chromatographischer Methoden .....	36
Abbildung 25: Schematische Funktionsweise Säulenchromatographie mit Chromatogramm .....	37
Abbildung 26: Schematischer Aufbau einer Gaschromatographie-Anlage .....	38
Abbildung 27: Schematischer Aufbau einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie- Anlage .....	39
Abbildung 28: Schematischer Aufbau eines NMR-Spektrometers.....	41
Abbildung 29: Fließbild der Versuchsanlage .....	46
Abbildung 30: Fließbild der Pilot-Anlage.....	47
Abbildung 31: Vergleich von Ausbeute und Reinheit der beiden Ausgangsmaterialien .....	57

---

Abbildung 32: Ergebnisse der Löslichkeitsversuche.....	58
Abbildung 33: Ergebnisse der Rührkesselversuche .....	59
Abbildung 34:Dampfdruckkurve von Ethanol und Butanon .....	60
Abbildung 35: Druckabhängigkeit bei konstanter Temperatur .....	62
Abbildung 36: Temperaturabhängigkeit bei konstantem Druck .....	63
Abbildung 37: Fettsäurezusammensetzung (gew%) von sequentiellen CO2 Extrakten von Eigelb Pulver (p=300 bar, T=40°C, V=15 l/h) .....	65
Abbildung 38: Durchschnittliches Fettsäure-Spektrum des CO2-Extrakts.....	65
Abbildung 39: Phospholipid Verteilung des entölten Eigelb Pulvers und des Extraktes in mol% .....	66
Abbildung 40: Optischer Vergleich der hergestellten Emulsionen .....	68
Abbildung 41: Gewinnungsprozess .....	69

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grundlage von Feuchtigkeitsemulsionen .....	4
Tabelle 2: Klassifizierung der Lipide nach dem Merkmal "Acylrest" .....	8
Tabelle 3: Klassifizierung der Lipide nach dem Merkmal "neutral-polar" .....	9
Tabelle 4: Liste einiger gesättigten Fettsäuren .....	11
Tabelle 5: Liste einiger ungesättigten Fettsäuren .....	12
Tabelle 6: Zusammensetzung von frischem Eiweiß .....	21
Tabelle 7: Zusammensetzung von frischem Eigelb, getrocknetem und entöltem Eigelb.....	21
Tabelle 8: Fettsäure Verteilung im Eigelb .....	22
Tabelle 9: Vergleich der Phospholipid Verteilung von Eigelb und Soja .....	23
Tabelle 10: Vergleich des durchschnittlichen Fettsäure Verteilung der Phospholipide von Eigelb und Soja.....	23
Tabelle 11: Größenvergleich physikalischer Daten von Gas, verdichtetem Gas und Flüssigkeit.....	31
Tabelle 12: Physikalisch-chemische Daten verschiedener zur Naturstoffextraktion geeigneter Gase .....	32
Tabelle 13: Physikalisch-chemische Daten von Kohlendioxid .....	33

## 1 Einleitung

In der Kosmetikindustrie zeichnete sich in den letzten Jahren ein enormer Trend zu natürlichen Inhaltsstoffen, die möglichst frisch verarbeitet werden, ab. Konsumenten wünschen sich natürliche, tierversuchsfreie und biologische Produkte. Gleichzeitig soll Naturkosmetik ebenso wirksam, verträglich und ansprechend sein wie die klassische Kosmetik.

Diese Wünsche zu erfüllen stellt Kosmetikerhersteller vor eine große Herausforderung. Durch den Wegfall von synthetischen Verdickern, Stabilisatoren und Emulgatoren ist die Auswahl an Inhaltsstoffen bereits begrenzt. Zusätzlich erschwert wird die Rezepturentwicklung durch die wenigen Konservierungsmittel, die für Naturkosmetik erlaubt sind [1].

Das Start-Up Naturstofflabor der Firma Prozess Optimal in Wenigzell in der Steiermark verknüpft dabei Hi-Tech Verfahrenstechnik mit traditioneller Landwirtschaft. Durch diesen Ansatz werden die regionalen Landwirtschaftsbetriebe durch neue Wertschöpfungsketten gefördert. Die Naturkosmetik-Palette reicht von Cremes (Tages-, Nacht-, Fuß-, Handcreme, Lippenbalsam) über Deodorants und Raumdüften bis hin zu Seifen. Die Rohstoffe der für die Naturkosmetik verwendeten Hydrolate, ätherischen Öle, Fettsäuren und ähnliches stammen alle aus der Region rund um Wenigzell und werden direkt im Naturstofflabor verarbeitet.

Eine wichtige Schlüsselkomponente für alle Cremes ist dabei der Emulgator. In der Naturkosmetik kommen dabei größtenteils Phospholipide aus Soja zum Einsatz. Die meiste Anwendung finden Emulgatoren aus Soja jedoch in der Lebensmittelindustrie, wodurch es bereits standardisierte industrielle Gewinnungsverfahren dafür gibt. Die Verwendung eines Emulgators aus der Sojabohne hatte für diese Aufgabenstellung jedoch einen Nachteil. Die regionale Verfügbarkeit bzw. Kultivierung der Sojapflanze ist nicht gegeben, wodurch der logistische Aufwand ansteigen würde [1, 2].

Eine regional verfügbare Phospholipid Quelle ist Eigelb. Im Gegensatz zur Gewinnung aus Soja stellt sich jene aus Eigelb jedoch schwieriger dar. Dadurch ist es im Vergleich zu Soja-Lecithin in der industriellen Herstellung teurer [2].

---

Ziel dieser Masterarbeit ist daher ein, den Anforderungen der Naturkosmetik entsprechendes Gewinnungsverfahren für Phospholipide aus Eigelb zu entwickeln.

## 2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen dieser Forschungstätigkeiten behandelt. Zu Beginn wird auf den Aufbau der Haut, den Begriff Naturkosmetik, die Formulierungen von Kosmetika und die Anforderungen an den Emulgator näher eingegangen. Phospholipide gehören zur Gruppe der Lipide und daher werden anschließend deren chemische Eigenschaften genauer beschrieben. Außerdem werden der Aufbau und die Zusammensetzung von Hühnereiern zusammengefasst. Dabei wird auch der Vergleich zwischen Hühnereier und der Sojabohne als Phospholipid-Quelle aufgezeigt. Den Abschluss dieses Kapitels stellen das Trennverfahren, die Extraktion, und die verwendeten Analyseverfahren dar.

### 2.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Sinnesorgan des menschlichen Körpers und stellt die Grenzfläche zur Umwelt dar. Sie hat verschiedene Funktionen zu erfüllen, unter anderem bildet sie eine Schranke gegen schädliche Einflüsse, dient dem Stoffaustausch nach außen, ist eine Kontaktfläche für Sinnesreizungen und bietet zusätzlich durch Hautrötungen eine Signalfunktion. Man unterscheidet die Haut in zwei unterschiedliche Schichten, die Oberhaut und die Lederhaut (siehe Abbildung 1) [3].

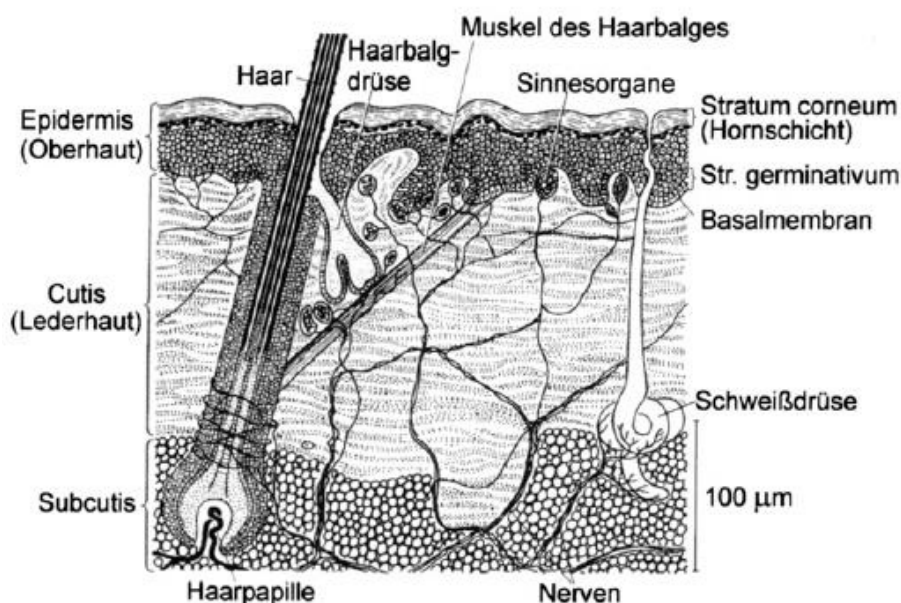


Abbildung 1: Querschnitt durch die Haut

Durch Drüsensekretion bildet sich auf der Haut ein schützender Hydro-Lipidfilm. Dieser Film kann durch Lösemittel wie Alkohol entfernt werden. Die Haut wird dadurch entfettet und das Wasser aus der gequellten Hornschicht verdunstet, wodurch die Haut austrocknet. Derselbe Effekt tritt auch beim Waschen mit Waschmitteln und, unvollständig, sogar mit reinem Wasser auf. Aus diesen Gegebenheiten ist ersichtlich, dass nach jedem Waschvorgang der Hydro-Lipidfilm, der die Haut vor dem Austrocknen schützt, abgewaschen wird. Dieser Schutzfilm wird anschließend über Talgsekretion zeitverzögert regeneriert [3].

Um dem entgegenzuwirken gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Hautschonende Reinigung mit Reinigungsemulsionen bei denen das Lipid-Wasser Verhältnis stark zur Lipidseite verschoben ist, stellt eine Möglichkeit dar. Jedoch leidet der Reinigungseffekt darunter. Die zweite Möglichkeit ist eine entsprechende Pflege mit O/W oder W/O Emulsionen nach der Reinigung [3].

## 2.2 Zusammensetzung von Cremem

Cremem bestehen aus einer Öl- und einer Wasserphase, einem Emulgator, einem Konsistenzgeber, Wirkstoffen, Konservierungsmitteln und Duftstoffen. Je nach Art der Anwendung und Aufbau wird in Feuchtigkeitscremem (Tagescreme) und reichhaltige Cremem (Nachtcreme) unterschieden [1].

Dabei soll die Creme hautverträglich sein und der Konsistenz nach glatt, weich und gut verteilbar. O/W Emulsionen wirken beim Auftragen aufgrund der Wasserverdunstung zuerst kühlend. Mit richtig eingestelltem pH-Wert können sie, durch ihren quellenden Einfluss, der anomalen Verhornung der Oberhaut vorbeugen. Eine Grundlage für eine O/W Emulsion kann wie in Tabelle 1 formuliert werden [3].

Tabelle 1: Grundlage von Feuchtigkeitsemulsionen

Bestandteile	[gew%]
Wasser	20-90
Polyol (Glycerin)	1-5
Unterschiedliche Ölkomponenten, Konsistenzgeber und Fette	10-80

---

Emulgatoren	2-5
Feuchthaltemittel	0-5
Konservierungsmittel und Parfümöle	Je nach Bedarf

---

## 2.3 Naturkosmetik

Der Begriff Naturkosmetik definiert sich über Naturverbundenheit, Nachhaltigkeit sowie sozioökonomische Faktoren. Diese Kriterien beziehen sich sowohl auf die Zusammensetzung und die Herstellung des Produktes, als auch auf das Verpackungsmaterial, die Verpackungssysteme und den Absatzweg. Dadurch stellt die Naturkosmetik einen sehr komplexen, emotionalen und sensiblen Bereich dar.

Die Regelung der kosmetischen Mittel erfolgt europaweit über die Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel [4].

Das Österreichische Lebensmittelbuch hat mit dem Codex-Kapitel B33-Kosmetische Mittel eine Grundlage für die Herstellung und Vermarktung von Naturkosmetika geschaffen. Dabei soll vor allem der Konsument vor Irreführung geschützt werden. Zudem wird auch der Wettbewerb durch Kontrolle, Transparenz und Rückverfolgbarkeit gewährleistet [5].

In engem Zusammenhang mit dem Thema Naturkosmetik steht auch der Begriff Naturstoff. Laut dem Österreichischen Lebensmittelbuch sind Naturstoffe Stoffe pflanzlichen, mineralischen oder tierischem Ursprungs, sowie deren Gemische. Ein weiteres Kriterium ist die Gewinnung bzw. die Weiterverarbeitung dieser Naturstoffe. Dabei sind nur klassische physikalische Methoden wie Gefrierung, Destillation, Extraktion, Filtration, Pressung, Sublimation, Trocknung, Zentrifugation und adsorptive Verfahren zulässig. Speziell bei der Extraktion sind Wasser, Ethanol, Glycerin, Kohlendioxid und andere geeignete Lösemittel natürlichen Ursprungs zulässig [5].

Weiters dürfen mikrobiologische oder enzymatische Methoden eingeschränkt angewendet werden. Dies bezieht sich in erster Linie auf die verwendeten Emulgatoren. Dabei sind Emulgatoren zulässig, die durch Hydrolyse, Veresterung, Umesterung,



Hydrierung oder Glycosidierung aus folgenden Naturstoffen gewonnen werden: Fetten, Ölen, Wachsen, Phospholipiden, Lanolin, Sacchariden, Proteinen und Lipoproteinen. Jene, durch diese Methoden hergestellten Stoffe, gelten als chemisch veränderte Naturstoffe [5].

Laut dem Codex-Kapitel B33-Kosmetische Mittel des Österreichischen Lebensmittelbuches sind alle gewählten Verfahren, Lösemittel und Konservierungsmittel für die Entwicklung bzw. die Herstellung und Verwendung eines Emulgators aus Phospholipiden des Eigelbs zulässig [5].

## 2.4 Emulgatoren

Emulsionen bzw. die dafür eingesetzten Emulgatoren spielen in der Lebensmittel-, Kosmetik- sowie in der Pharmaindustrie eine zentrale Rolle. Als Emulsion bezeichnet man ein heterogenes Gemisch zweier nicht mischbarer Flüssigkeiten. Dabei bildet eine der beiden Flüssigkeiten Tröpfchen (disperse Phase), welche in der zweiten Flüssigkeit schwimmen (kontinuierliche Phase). Eine weit verbreitete Kombination zweier unmischbarer Flüssigkeiten stellt Öl mit Wasser dar. Dabei wird grundsätzlich, je nachdem welche Flüssigkeit dispers in der jeweils anderen vorliegt, in Öl - in - Wasser (O/W) und Wasser in Öl (W/O) Emulsionen unterschieden [6].

Emulsionen sind thermodynamisch instabile Systeme. In Abbildung 2 ist erkennbar, dass sich eine Phasengrenze zwischen der Öl- und der Wasser Phase ausbildet. Die Bedingung dafür ist, wie bereits erwähnt, dass die beiden Flüssigkeiten nicht mischbar sind. Führt man nun Energie zu (z.B. durch einen Rührer), wird eine der beiden Phasen fein in der anderen verteilt. Lässt man diese Dispersion nun für einige Zeit stehen, wird sie wieder in die beiden Ausgangsphasen zerfallen. Um diesem Zerfall der Dispersion entgegenzuwirken, kommen sogenannte Emulgatoren zum Einsatz [3, 7].

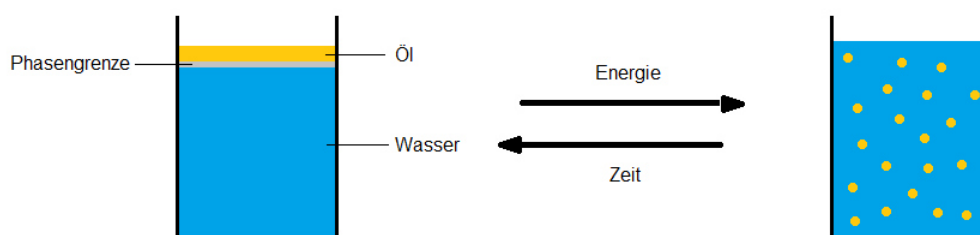


Abbildung 2: Öl - in - Wasser (O/W) Emulsion

Emulgatoren sind grenzflächenaktive Stoffe. Diese Eigenschaft lässt sich aus dem Aufbau des Moleküls erklären. Das Molekül selbst ist amphiphil, es besteht aus einem lipophilen und einem hydrophilen Teil. In Abbildung 3 ist die Beteiligung eines solchen Emulgators an einer Öl - in - Wasser Emulsion dargestellt. Die hydrophile Kopfgruppe (Kreis) geht in die Wasser-Phase und die lipophile Gruppe in die Öl-Phase. Diese Anordnung wird als Mizelle bezeichnet [8].

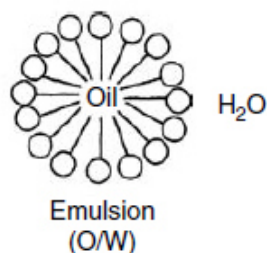


Abbildung 3: O/W Emulsion mit Emulgator

In der Naturkosmetik werden vor allem Phospholipide als Emulgator eingesetzt. Diese werden zum Großteil aus der Sojabohne gewonnen. Der Phospholipid-Gehalt ist bei Standard Produkten meist 60% mit 12-20% des hochwertigen Phosphatidylcholin. Aufwändig hydrierte und entölte Lecithine weisen einen Gehalt von 60% Phosphatidylcholin auf [1].

### 2.4.1 HLB - Wert

Der HLB-Wert (Hydrophile-Lipophile Balance) ist ein Maßstab, mit dem die Wirksamkeit der hydrophilen und der lipophilen Gruppe von Emulgatoren bewertet werden kann. In Abbildung 4 sind einige Anwendungsbeispiele für bestimmte HLB-Werte angeführt [8].

HLB-Bereich	Anwendung
3–6	W/O-Emulgator
7–9	Feuchthaltemittel
8–18	O/W-Emulgator
15–18	Stabilisierung von Trübungen

Abbildung 4: HLB Bereiche mit Anwendung

## 2.5 Lipide

Als Lipide werden Stoffe organischen Ursprungs bezeichnet, die in unpolaren Lösemitteln löslich sind. Ihr analytisches Merkmal ist, dass sie nur in organischen Lösemitteln und nicht in Wasser löslich sind. Durch diese Eigenschaft können sie einfach von Kohlenhydraten und Proteinen abgetrennt werden [5, 6].

In den Tabelle 2 und Tabelle 3 sind die beiden gängigsten Methoden angeführt, um Lipide zu unterteilen. Die erste Methode klassifiziert Lipide nach ihrer Verseifbarkeit. Bei der Verseifung von Fetten und Ölen werden diese mit wässrigen Lösungen von Basen behandelt. Dabei entstehen der Alkohol Glycerin und die Salze der Fettsäuren (Seifen) [5, 7].

Tabelle 2: Klassifizierung der Lipide nach dem Merkmal "Acylrest"

---

<i>I. Einfache Lipide (nicht verseifbar)</i>
Freie Fettsäuren
Isoprenopid-Lipide (Steroide, Caratinoide, Monoterpene, u.a.)
Tocopherole

---

<i>II. Acyllipide (verseifbar)</i>
Mono-, Di-, Triacylglyceride
Phospholipide
Glykolipide
Diollipide
Wachse
Sterinester

---

Bei der zweiten Methode ist das Unterscheidungskriterium die Polarität. Dabei wird in neutrale und polare (amphiphile) Lipide unterteilt. Phospholipide besitzen ein amphiphiles Verhalten, welches auf ihrer Molekülstruktur beruht. Das Molekül besitzt dabei hydrophile und hydrophobe Gruppen [5, 8].

Tabelle 3: Klassifizierung der Lipide nach dem Merkmal "neutral-polar"

---

<i>I. Neutrale Lipide</i>
Fettsäuren
Mono-, Di-, Triacylglyceride
Steroide, Sterinester
Caratinoide
Wachse
Tocopherole

---

<i>II. Polare (amphiphile) Lipide</i>
Glycerophospholipide
Glyceroglykolipide
Sphingophospholipide
Sphingoglykolipide

---

### 2.5.1 Fettsäuren

Fettsäuren sind unverzweigte Monocarbonsäuren, welche entweder gesättigt oder ungesättigt sind. In fast allen natürlichen Fettsäuren ist eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen vorhanden, da sie biosynthetisch aus Essigsäure ( $C_2$ -Baustein) entstehen. Man unterscheidet zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Gesättigte Fettsäuren enthalten keine C=C-Doppelbindung. Ungesättigte Fettsäuren (z.B. Omega 3 und Omega 6 Fettsäuren) werden, je nach Anzahl der C=C-Doppelbindungen, in einfach und mehrfach ungesättigt unterschieden [5, 7].

Bei ungesättigten Fettsäuren können cis- oder trans-konfigurierte Doppelbindungen auftreten. Dabei ist die Kohlenwasserstoffkette entweder linear (trans) oder gewinkelt (cis) ausgebildet. In den Abbildung 5 und Abbildung 6 sind die beiden möglichen Konfigurationen der Octadecensäure dargestellt [12].

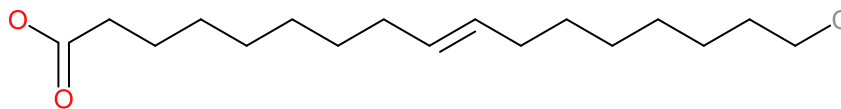


Abbildung 5: Elaidinsäure: t-9 – Octadecensäure

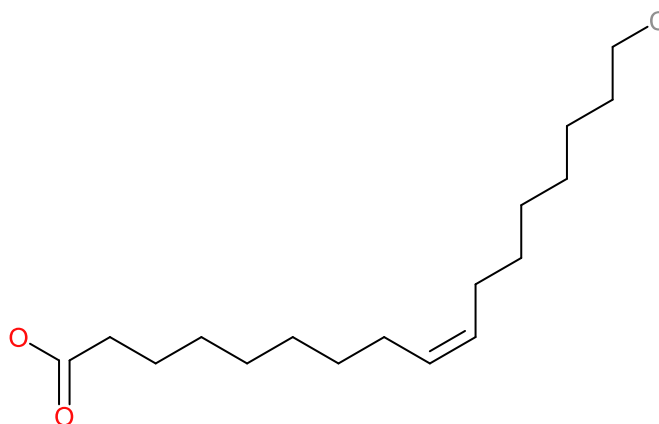


Abbildung 6: Ölsäure: c-9 – Octadecensäure

In der Literatur findet man drei gängige Methoden für die Nomenklatur der ungesättigten Fettsäuren [8]. Diese sollen kurz am Beispiel der Linolsäure erklärt werden. Für den systematischen Namen dieser Fettsäure wird entweder c-9,c-12 – Octadecadiensäure [7] oder laut IUPAC (9Z,12Z) – Octadeca-9,12-diensäure [9] verwendet. Dabei werden cis-Konfigurationen entweder mit c oder Z und trans-Konfigurationen mit t oder E bezeichnet [6, 7].

Eine weiters verbreitete Methode, um Fettsäuren zu benennen, stellt die sogenannte Kurzschreibweise in Kombination mit der Omega Bezeichnung dar. Dabei wird z.B. Linolsäure mit 18:2  $\omega$ 6 bezeichnet, wobei 18 die Anzahl an C Atomen, 2 die Anzahl an Doppelbindungen ist.  $\omega$ 6 bedeutet, dass sich die erste Doppelbindung am sechsten C Atom, vom Methylen (-CH<sub>3</sub>) aus gezählt, befindet [13].

In der nachfolgenden Tabelle 4 und Tabelle 5 sind einige gesättigte sowie ungesättigte Fettsäuren mit ihren systematischen und Trivialnamen sowie in Kurzschreibweisen angeführt [7].

Tabelle 4: Liste einiger gesättigten Fettsäuren

<i>Systematischer Name</i>	<i>Trivialname</i>	<i>Kurzschreibweise</i>
Methansäure	Ameisensäure	1:0
Ethansäure	Essigsäure	2:0
Propansäure	Propionsäure	3:0
Butansäure	Buttersäure	4:0
Pentansäure	Valeriansäure	5:0
Hexansäure	Capronsäure	6:0
Heptansäure	Önanthsäure	7:0
Octansäure	Caprylsäure	8:0
Nonansäure	Pelargonsäure	9:0
Decansäure	Caprinsäure	10:0
Undecansäure	-	11:0
Dodecansäure	Laurinsäure	12:0
Tridecansäure	-	13:0
Tetradecansäure	Myristinsäure	14:0
Pentadecansäure	-	15:0
Hexadecansäure	Palmitinsäure	16:0
Heptaadecansäure	-	17:0
Octadecansäure	Stearinsäure	18:0
Nonadecansäure	-	19:0
Eicosansäure	Arachinsäure	20:0
Docosansäure	Behensäure	22:0
Tetracosansäure	Lignocerinsäure	24:0
Hexacosansäure	Cerotinsäure	26:0
Octacosansäure	Montansäure	28:0
Tricontansäure	Melissinsäure	30:0
Dotriacontansäure	Laccersäure	32:0

Tabelle 5: Liste einiger ungesättigter Fettsäuren

<i>Systematischer Name</i>	<i>Trivialname</i>	<i>Kurzschreibweise</i>
c-9 – Dodecansäure	-	12:1 $\omega$ 3
c-5 – Tetradecansäure	-	14:1 $\omega$ 9
c-9 – Tetradecansäure	-	14:1 $\omega$ 5
c-9 – Hexadecansäure	-	16:1 $\omega$ 7
c-7,c-10,c-13 – Hexadecantriensäure	Roughaninsäure	16:3 $\omega$ 3
c-4,c-7,c-10,c-13 – Hexadecantraensäure	-	16:4 $\omega$ 3
c-9 – Octadecensäure	Ölsäure	18:1 $\omega$ 9
c-11 – Octadecensäure	-	18:1 $\omega$ 7
t-11 – Octadecensäure	-	*
t-9 – Octadecensäure	Elaidinsäure	*
c-9,c-12 – Octadecadiensäure	Linolsäure	18:2 $\omega$ 6
c-9,c-12,c-15 – Octadecatriensäure	$\alpha$ -Linolensäure	18:3 $\omega$ 3
c-6,c-9,c-12 – Octadecatriensäure	$\gamma$ -Linolensäure	18:3 $\omega$ 6
c-6,c-9,c-12,c-15 – Octadecatetraensäure	Stearidonsäure	18:4 $\omega$ 3
c-11 – Eicosensäure	Gondosäure	20:1 $\omega$ 9
c-9 – Eicosensäure	-	20:1 $\omega$ 11
c-8,c-11,c-14 – Eicosatriensäure	Dihomagama- linolensäure	20:3 $\omega$ 6
c-8,c-11,c-14 – Eicosatriensäure	Meadsäure	20:3 $\omega$ 9
c-5,c-8,c-11,c-14 – Eicosatetraensäure	Arachidonsäure	20:4 $\omega$ 6
c-5,c-8,c-11,c-14,c-17 – Eicosapentaensäure	-	20:5 $\omega$ 3
c-13 – Docosensäure	Erucasäure	22:1 $\omega$ 9
c-11 – Docosensäure	-	22:1 $\omega$ 11
c-7,c-10,c-13,c-16,c-19 – Docosapentaensäure	-	22:5 $\omega$ 3
c-4,c-7,c-10,c-13,c-16,c-19 – Docosahexaensäure	-	22:6 $\omega$ 3
c-15 – Tetracosensäure	-	24:1 $\omega$ 9

\* Kurzschreibweise kann für trans. Fettsäuren nicht verwendet werden

## 2.5.2 Triglyceride

Fette und Öle sind Ester mit dem dreiwertigen Alkohol Glycerin (propane-1,2,3-triol [9]) [8]. Die Struktur des Glycerin Moleküls ist in Abbildung 7 dargestellt [14].

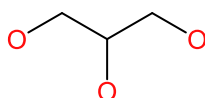


Abbildung 7: Struktur Glycerin Molekül

Jede der drei Hydroxy-Gruppen des Glycerin Moleküls ist mit je einem Molekül einer Fettsäure verestert. Diese Ester nennt man Triglyceride. Je nachdem, welche Fettsäuren an dieser Verbindung beteiligt sind, entstehen unterschiedliche Triglyceride. Bei der Nomenklatur dieser Moleküle kommen, wie bei den Fettsäuren, ein systematischer Name, ein Trivialname und eine Kurzschreibweise zur Anwendung. Bei Triolein (OOO) zum Beispiel verestert das Glycerin Molekül mit drei Ölsäure Molekülen, bei Stearodiolein mit zwei Ölsäure Molekülen und einem Stearinsäure Molekül [8].

In Kapitel 2.5 wird erwähnt, dass einige Lipide verseifbar sind. Als Verseifung wird eine Umsetzung eines Esters bezeichnet. Realisierbar ist das durch die Zugabe nucleophiler Reagenzien (z.B. Natriumhydroxid-Lösung). Bei der Reaktion entsteht Glycerin und die Natriumsalze der beteiligten Fettsäuren, welche auch als Seifen bezeichnet werden (Abbildung 8) [15].

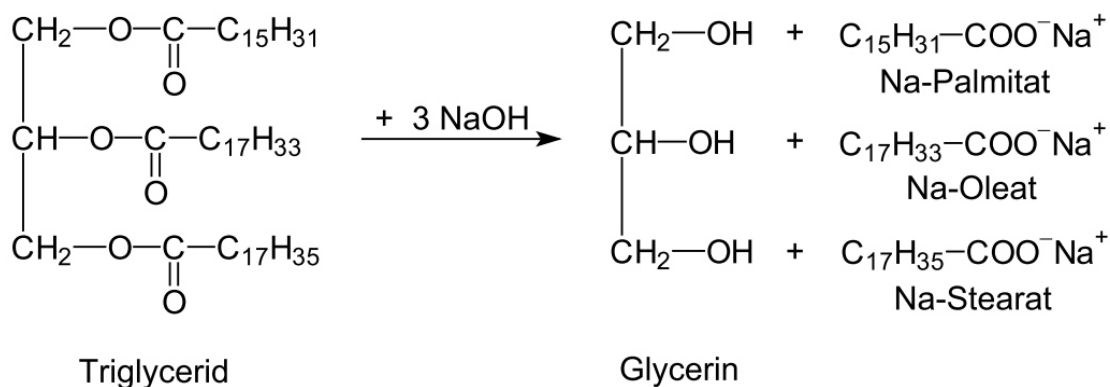


Abbildung 8: Verseifungsreaktion



### 2.5.3 Phospholipide

Die Grundstruktur von Phospholipiden besteht, wie bei den Triglyceriden, aus einem Glycerin Molekül mit 2 veresterten Fettsäuren ( $R_1$  und  $R_2$ ) an der sn-1 und sn-2 Position. An der sn-3 Position des Glycerins befindet sich jedoch keine Fettsäure (wie bei den Triglyceriden), sondern ein Phosphorsäurederivat [13]. Der schematische Aufbau des Moleküls ist in Abbildung 9 dargestellt [7].

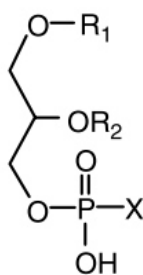


Abbildung 9: Schematischer Aufbau von Phospholipiden

Die variierenden polaren Kopfgruppen (X), welche am Aufbau eines Phospholipid-Moleküls beteiligt sein können, sind in Abbildung 10 dargestellt [16].

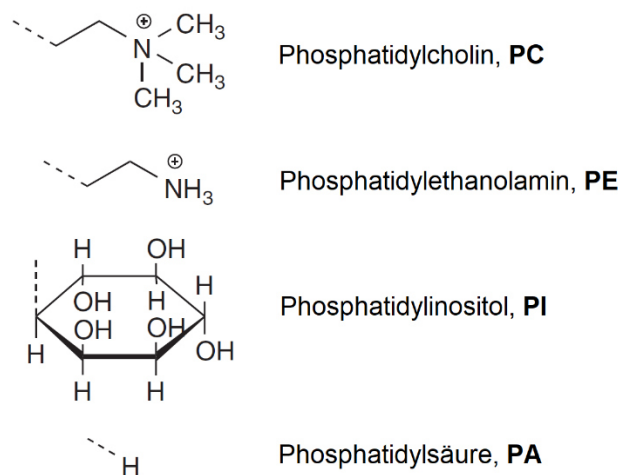


Abbildung 10: Kopfgruppen der Phospholipide

In Zusammenhang mit Phospholipiden findet man immer wieder die Begriffe Lecithin und Kephalin. Im Allgemeinen wird Lecithin als Synonym für Phosphatidylcholin (PC) und Kephalin für Phosphatidylethanolamin (PE) verwendet [8]. Im kommerziellen Sinn wird Lecithin als Bezeichnung für eine Mischung aus verschiedenen Phospholipiden und anderen Substanzen wie z. B. Triglyceriden und Cholesterin verwendet [6, 14].

Dazu wird meist ein Zahlenwert in Prozent angegeben. Dieser bezieht sich, dem Phospholipid Gehalt entsprechend, auf den Gehalt an Aceton-Unlöslichem [18].

Unterschieden wird außerdem in Roh- und Reinlecithine. Rohlecithine werden durch Hydratation aus Extraktionsölen (z. B. aus Pressung von Sojabohnen, Raps, usw.) gewonnen. Sie weisen meist einen Gehalt an Aceton-Unlöslichem von 10-60% auf. Reinlecithine werden anschließend aus dem Rohlecithin hergestellt. Um die Phospholipide von der Hauptmenge des Neutralöls und den freien Fettsäuren zu trennen, wird meist Aceton als Lösemittel verwendet. Reinlecithin weist einen Gehalt an Aceton-Unlöslichem von rund 98% auf [17]. Rohlecithin weist, je nach Zusammensetzung, einen HLB-Wert von ungefähr 3 auf. Der HLB-Wert von Reinlecithin ist höher [8].

Bei der Verwendung von Lecithin im Kosmetikbereich stellt es sowohl Emulgator als auch Wirkstoff dar. Es erhöht die Flexibilität und die Durchlässigkeit der Hornhaut. Zusätzlich fördert es die Penetrationstiefe von Wirkstoffen und reguliert Verhornungsstörungen [18].

Von Interesse ist zudem das Löslichkeitsverhalten der einzelnen Phospholipide in unterschiedlichen Lösemitteln. Jedoch konnten in der bestehenden Literatur keine belastbaren Quellen gefunden werden.

#### 2.5.4 Lyso-Phospholipide

Eine Untergruppe der Phospholipide sind Lyso-Phospholipide. Sie sind dadurch gekennzeichnet, dass am Molekülaufbau nur eine anstatt zwei Fettsäuren, wie bei den Phospholipiden, beteiligt ist (siehe Abbildung 11) [11].

Durch diese Eigenschaft haben jene einen höheren HLB-Wert von 8-11, sind demnach hydrophiler und ein stärkerer Emulgator für O/W Emulsionen [8]. Sie können durch eine enzymatische Umesterung aus Phospholipiden gewonnen werden [7].

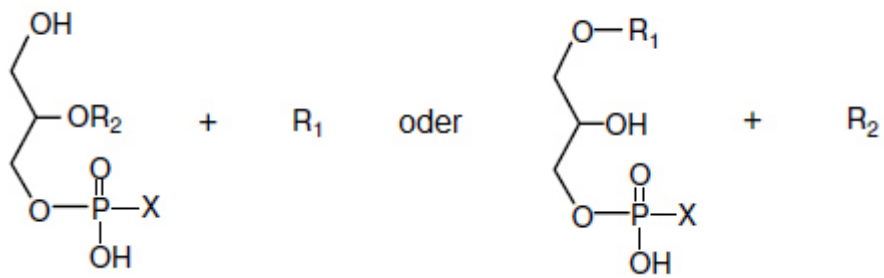


Abbildung 11: Schematische Darstellung Lyso-Phospholipide

### 2.5.4.1 Enzymatische Umesterung

Bei einer enzymatischen Umesterung wird mit Hilfe eines speziellen Enzymes (Katalysator) eine der beiden Fettsäuren abgespalten [19]. Je nachdem, ob Wasser oder Alkohol an der Reaktion beteiligt ist, spricht man von Hydro- oder Alkoholyse [15].

Enzyme werden nach einer vierstelligen EC-Nummer (Enzyme Commission Number) eingeteilt. Dazu werden diese zuerst in 6 Hauptgruppen (erste Ziffer), nach der Art der katalytischen Reaktion, eingeteilt. Jede Hauptgruppe zerfällt in Unterklassen (zweite Ziffer), welche wiederum in Unterunterklassen (dritte Ziffer) unterteilt werden. Die vierte und letzte Ziffer steht schließlich für das spezielle Enzym [20].

Zur Erzeugung von Lyso-Phospholipiden kommen vor allem sogenannte Phospho- und Triacylglycerin-Lipasen zum Einsatz. Sie gehören zur Gruppe der Lipasen und diese wiederum zur Übergruppe der Hydrolasen. [20]

In der nachfolgenden Abbildung 12 sind die 6 Hauptgruppen und die Zugehörigkeit der Phospho- und Triacylglycerin-Lipasen dargestellt [21].

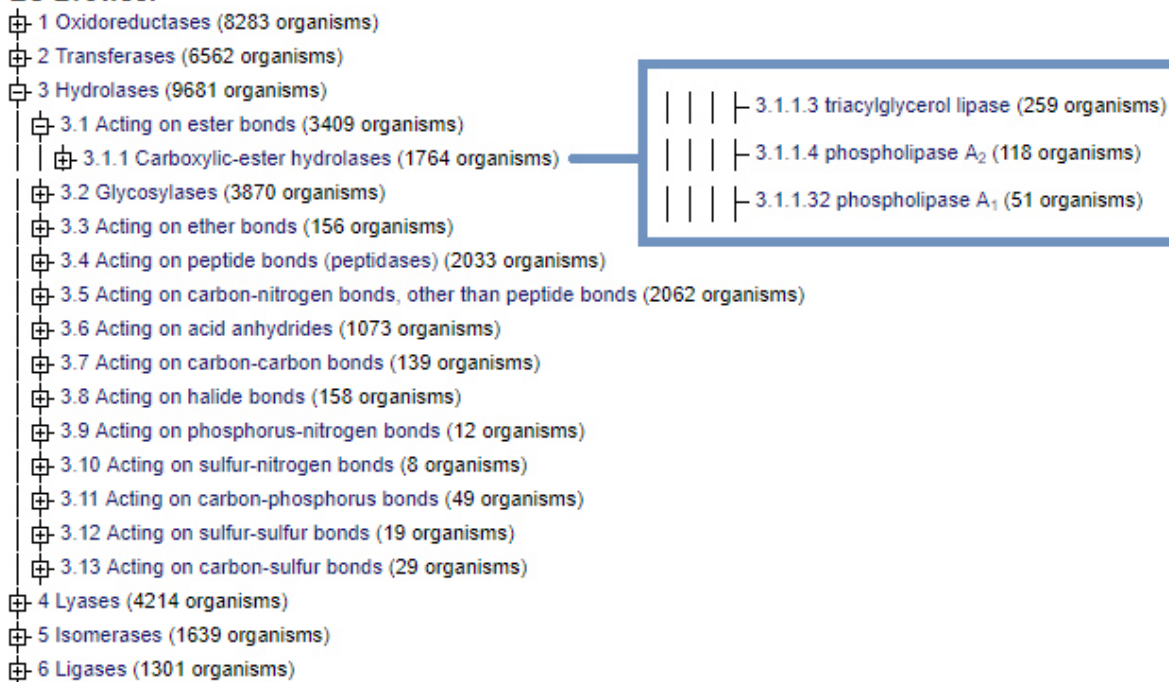
**EC Browser**

Abbildung 12: Übersicht der 6 Hauptgruppen von Enzymen

### 2.5.4.1.1 Phospholipasen

Phospholipasen sind spezielle Enzyme, die als Katalysator bei der Hydrolyse (Umes-terung mit Wasser) von Phospholipiden eingesetzt werden. Phospholipasen werden je nach Angriffspunkt in fünf Untergruppen eingeteilt. Die Phospholipase A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C und D [7, 22].

In Abbildung 13 sind die Reaktionen unter Einsatz der verschiedenen Phospholipasen dargestellt. Die Phospholipasen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> werden eingesetzt, um die Fettsäuren der sn-1 (A<sub>1</sub>) bzw. sn-2 (A<sub>2</sub>) gezielt abzuspalten. Die Phospholipase B kombiniert die Ei-genschaften von A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. Die Phospholipase C trennt das gesamte Phosphorsäure-derivat, welches mit der sn-3 Position verestert ist, ab. Die Phospholipase D spaltet nur die polare Kopfgruppe X ab [20].

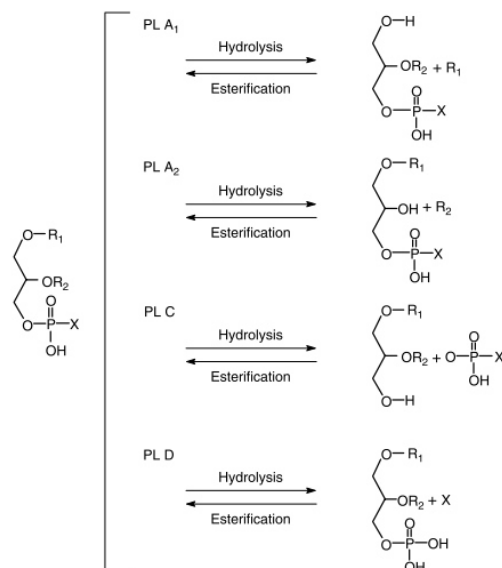


Abbildung 13: Reaktionen mit Phospholipase A1, A2, C und D als Katalysator

In Abbildung 14 ist das Reaktionsschema einer solchen katalytischen Hydrolyse von Phosphatidylcholin dargestellt [22].

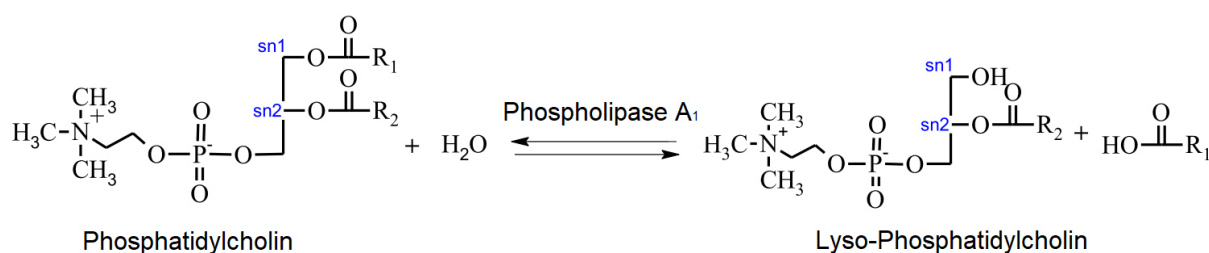


Abbildung 14: Reaktionsschema einer Hydrolyse von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A1 als Katalysator zu Lyso-Phosphatidylcholin

### 2.5.4.1.2 Triacylglycerin-Lipasen

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Lyso-Phospholipiden ist eine Umesterung mit Alkohol (Alkoholyse) und Triacylglycerin-Lipasen als Katalysator. Diese speziellen Enzyme werden aus verschiedenen Pilzen gewonnen und im immobilisierten Zustand vertrieben [20, 24]. In Abbildung 15 ist das Reaktionsschema dieser Umesterungsreaktion dargestellt. Diese Methode ist von besonderem Interesse, wenn ein Alkohol als Lösemittel verwendet wird, um Phospholipide aus einem Ausgangsstoff (Eigelb [25]) zu extrahieren [24].

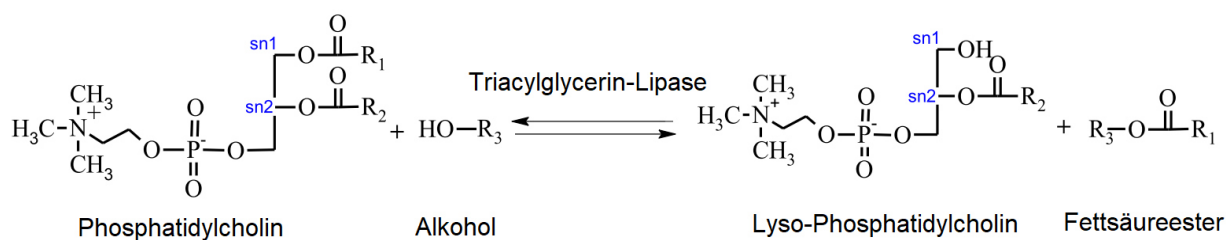


Abbildung 15: Reaktionsschema einer Alkoholylse von Phosphatidylcholin mit einer Triacylglycerin-Lipase als Katalysator zu Lyso-Phosphatidylcholin

## 2.5.5 Cholesterin

Ein weiteres Lipid, welches speziell immer mit Eigelb in Verbindung gebracht wird, ist Cholesterin (genauer Cholesterol). Es gehört zur Gruppe der Steroide und kommt, mit 1011 mg pro 100g in Eigelb, frei und verestert mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren vor. In Abbildung 16 ist die Molekülstruktur von Cholesterin dargestellt [8].

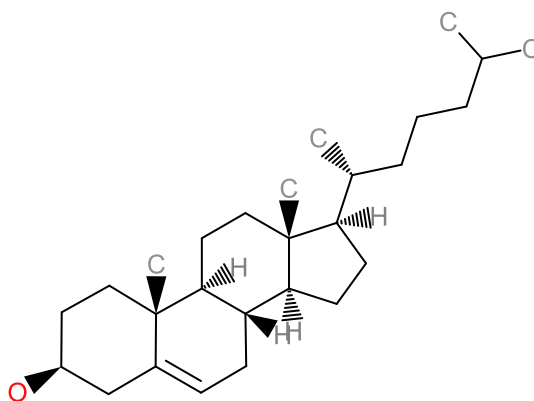


Abbildung 16: Cholesterin

## 2.6 Hühnerei

In diesem Kapitel werden der Aufbau und die Zusammensetzung von Hühnereiern näher beschrieben. Die als Emulgator eingesetzten Phospholipide gehören zur Klasse der Lipide. Da das Eigelb den größten Lipid-Anteil des Hühnereis vorweist, wird diese Fraktion genauer beschrieben. Außerdem wird ein Vergleich zwischen Eigelb und Soja als Phospholipid-Quelle gezogen.

## 2.6.1 Aufbau und Zusammensetzung

Ein Hühnerei wiegt im Durchschnitt 58 g und setzt sich zu 30-33% aus Eigelb, zu 60% aus Eiklar und zu 9-12% aus der Schale zusammen [26].

In der nachfolgenden Abbildung 17 ist der schematische Aufbau eines Hühnereis dargestellt. Eine 0,2-0,4 mm dicke, poröse Kalkschale umgibt das Ei. Im Inneren der Schale befindet sich eine zweischichtige Haut. Diese teilt sich am stumpfen Ende des Eies und bildet eine Luftkammer. Bei frischen Eiern hat diese Luftkammer ungefähr 5 mm Durchmesser und vergrößert sich mit zunehmendem Alter des Eies. Im Inneren liegt die Dotterkugel. Sie ist mit zwei Strängen über die Dotterhaut mit dem Eiklar verbunden. Beim Aufschlagen des Eies bleiben diese beiden Stränge an der Dotterkugel hängen [8].

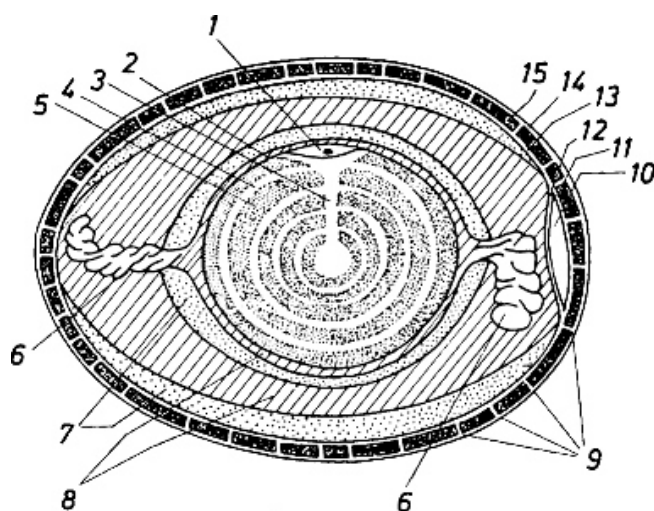


Abbildung 17: Schematischer Schnitt durch ein Hühnerei: 1 Keimscheibe mit Keimbläschen, 2 Dottermembran, 3 Latebra, 4 weißer Dotter, 5 gelber Dotter, 6 Hagelschnur, 7 Eiklar dünnflüssig, 8 Eiklar zähflüssig, 9 Poren, 10 Luftkammer, 11 Schalenmembran, 12 Eimembran, 13 Schalenhaut, 14 Oberhäutchen, 15 Eischale

### 2.6.1.1 Eiweiß

Das Eiweiß oder auch Eiklar macht rund 60% der Gesamtmasse eines Hühnereies aus. Es ist eine wässrige, schwach gelbliche Flüssigkeit, welche aus drei unterschiedlich viskosen Schichten besteht. Die Zusammensetzung der wässrigen Lösung [8] sowie des getrockneten Eiweiß-Pulvers ist in Tabelle 6 angeführt.

Tabelle 6: Zusammensetzung von frischem Eiweiß und Eiweiß Pulver

	Frisches Eiweiß [gew%]	Eiweiß Pulver [gew%]
Wasser	90	-
Lipide	0,03	0,29
Proteine	8,73	84,27
Kohlenhydrate	1	9,65
Mineralstoffe	0,6	5,79

Aus der obigen Verteilung ist ersichtlich, dass Eiweiß zu einem Großteil aus Wasser besteht. Den zweitgrößten Anteil nehmen globuläre Proteine mit unterschiedlichen Denaturierungstemperaturen ein [8]. Der Begriff der Denaturierungstemperatur bzw. der Denaturierung von Proteinen wird in Kapitel 2.7.1.1 erläutert.

### 2.6.1.2 Eigelb

Das Eigelb oder Eidotter, das 30-33% der Gesamtmasse eines Hühnereis einnimmt, besteht aus Wasser, Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und Mineralstoffen. In Tabelle 7 ist die prozentuale Zusammensetzung von frischem Eigelb dargestellt [27]. Die Zusammensetzungen für getrocknetes Eigelbpulver sowie für entöltes Eigelb Pulver wurden unter idealen Annahmen umgerechnet. D.h. unter der Annahme, dass bei einem Trocknungs- sowie Entölungsschritt kein Wasser bzw. keine Triglyceride im Pulver verbleiben.

Tabelle 7: Zusammensetzung von frischem, getrocknetem und entöltem Eigelb

	Frisches Eigelb [gew%]	Eigelb Pulver [gew%]	Entöltes Eigelb Pulver [gew%]
Wasser	50,0	-	-
Lipide	31,9	63,3	37,3
Proteine	16,1	32,1	54,8



Kohlenhydrate	0,3	1,2	2,1
Mineralstoffe	1,7	3,4	5,8

Aus der obigen Verteilung ist erkennbar, dass Lipide einen Großteil des Eigelbs darstellen. Die Lipide selbst liegen zu 65,5 gew% als Triglyceride, zu 28,3 gew% als Phospholipide und zu 5,2 gew% als Cholesterin vor [26].

Aus dieser Verteilung und der Zusammensetzung der Lipide lässt sich ein theoretischer Phospholipid Gehalt von 9 gew% für das frische Eigelb, 17,9 gew% für das Eigelb-Pulver und 31,5 gew% für das entölte Eigelb-Pulver errechnen. Diese Werte sind für eine spätere, auf die Phospholipide bezogene, Ausbeute einer Extraktion von Bedeutung.

In Tabelle 8 ist die Fettsäure-Verteilung im Eigelb dargestellt. Dabei werden sowohl die freien Fettsäuren sowie alle Fettsäuren, die an Triglycerid beteiligt sind, angeführt [27].

Tabelle 8: Fettsäure Verteilung im Eigelb

Fettsäure		SFK [27] [gew%]	Privett et al. [28] [gew%]
Ölsäure	18:1	43,7	44,7
Palmitinsäure	16:0	25,1	22,5
Linolsäure	18:2	15,1	15,4
Stearinsäure	18:0	7,3	7,5
Palmitoleinsäure	16:1	4,3	7,3
Arachinsäure	20:0	1,5	-
Linolensäure	18:3	0,9	1,3
Arachidonsäure	20:4	0,8	0,5
Myristinsäure	14:0	0,4	-
Docosapentaensäure	22:5	0,2	0,2
Docosahexaensäure	22:6	-	0,6

Da die Phospholipid-Fraktion des Eigelbs als Emulgator genutzt werden soll, ist eine Phospholipid-Verteilung von enormem Interesse. Am qualitativ hochwertigsten sind dabei Phosphatidylcholin und dessen Lyso-Form. Außerdem besitzen diese beiden Phospholipide die Fähigkeit O/W Emulsionen zu bilden [18]. In Tabelle 9 wird die Phospholipid-Zusammensetzung zwischen Ei und Soja verglichen, in Tabelle 10 die an diesen Phospholipiden beteiligten Fettsäuren [29].

Tabelle 9: Vergleich der Phospholipid-Verteilung von Eigelb und Soja

Phospholipid	Eigelb [gew%]	Soja [gew%]
Phosphatidylcholin (PC)	66-76	33,0
Phosphatidylethanolamin (PE)	15-24	14,1
Phosphatidylserin (PS)	1	0,4
Phosphatidylinositol (PI)	-	16,8
Phosphatidylsäure (PA)	-	6,4
Lysophosphatidylcoline (LPC)	3-6	0,9
Lysophosphatidylethanolamin (LPE)	3-6	0,2
Sphingomyelin (SM)	3-6	-

Tabelle 10: Vergleich der durchschnittlichen Fettsäure Verteilung der Phospholipide von Eigelb und Soja

Fettsäure	Eigelb [gew%]	Soja [gew%]
16:0 Palmitinsäure	30	21
18:0 Stearinsäure	16	4
18:1 Ölsäure	29	12
18:2 Linolsäure	14	57
18:3 Linolensäure	1	6
20:4 Arachidonsäure	5	-
20:6 Docosahexaensäure	3	-

Die Eigenschaften der in den Triglyceriden und Phospholipiden beteiligten Fettsäuren des Eigelbs wirken sich in der Anwendung für Kosmetik positiv aus. Palmitinsäure ist die am meisten vertretene Fettsäure in der menschlichen Hornhaut. Palmitin- und Stearinsäure bilden einen dünnen, leichten Schutzfilm auf der Haut. Sie ergänzen den in Kapitel 2.1 erwähnten Hydro-Lipid-Mantel der Haut. Ölsäure bewirkt in Emulsionen ein angenehm sattes, feuchtes Gefühl. Dadurch lassen sich diese leicht verteilen und halten außerdem die Feuchtigkeit in der Haut [1].

## 2.7 Extraktion

In diesem Kapitel werden der Trennvorgang und die unterschiedlichen Arten der Extraktion näher beschrieben. Außerdem wird die Verwendung dieser verschiedenen Extraktionsmethoden in Bezug auf Phospholipid-Gewinnung aus Eigelb betrachtet.

Ziel aller Trennverfahren ist es, ein Gemisch aus verschiedenen Stoffen in mindestens zwei Produkte, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden, zu trennen. Dies kann entweder durch einen Hilfsstoff (Lösemittel) oder durch Energiezugabe umgesetzt werden. Je nachdem, ob ein heterogenes oder homogenes Stoffgemisch vorliegt, wird in mechanische und physikalisch-chemische Trennverfahren unterschieden [30].

Die Extraktion gehört zur Gruppe der gleichgewichtsbestimmten physikalisch-chemischen Trennverfahren. Hierbei stellt sich ein Gleichgewichtszustand zwischen zwei nicht mischbaren Phasen von verschiedener Zusammensetzung ein [30]. Die Extraktion stellt eine Grundoperation in der Verfahrenstechnik dar. Dabei kann das Ausgangsmaterial im festen oder flüssigen Zustand vorliegen. Je nach Zustand des Lösemittels und des Ausgangsstoffs unterscheidet man in Flüssig-Flüssig-Extraktion, Fest-Flüssig-Extraktion und Hochdruckextraktion mit überkritischen Fluiden. Bei allen Arten der Extraktion wird eine Übergangskomponente mit Hilfe eines Lösungsmittels selektiv herausgelöst. In Abbildung 18 werden die gleichgewichtsbestimmten physikalisch-chemischen Trennverfahren angeführt [31].

Verfahren	Zu trennendes Gemisch	Trennmedium	Trennprinzip
Destillation	Flüssigkeit	Wärmeenergie	Unterschiede im Dampfdruck
Extraktive und azeotrope Destillation	Flüssigkeit	Wärmeenergie + Hilfsstoff (Flüssigkeit)	Unterschiede im Dampfdruck
Wasserdampfdestillation	Feststoff Flüssigkeit	Wärmeenergie + Hilfsstoff (Wasser)	Unterschiede im Dampfdruck
Strippen (Trägergasdestillation)	Flüssigkeit	Gas	Unterschiede in den Flüssigkeiten
Extraktion:			
A) fest - flüssig	Feststoff	Lösungsmittel	Unterschiedliche Löslichkeit im Lösungsmittel
B) flüssig - flüssig	Flüssigkeit	Lösungsmittel (nicht mischbar mit Trenngemisch)	Unterschiedliche Löslichkeit in den flüssigen Phasen
Extraktion mit verdichteten Gasen	Feststoff Flüssigkeit	verdichtetes Gas	Unterschiedliche Löslichkeit im Lösungsmittel, Unterschiede in den Flüchtigkeiten
Absorption	Gas	Flüssigkeit	Unterschiedliche Löslichkeit in der Flüssigkeit
Adsorption	Gas + Flüssigkeit oder 2 Flüssigkeiten	Feststoff	Unterschiedliche Neigung zur Anlagerung an Grenzfläche
Chromatographie	Lösung verschiedener Stoffe	Feststoff oder Flüssigkeit (stationärePhase) + Flüssigkeit (mobile Phase)	multiplikative Adsorption/ Verteilung
Kristallisation	Flüssigkeit	Entzug oder Zuführung von Wärmeenergie	Unterschiede in der Löslichkeit/ Unterschiede im Gefrierpunkt
Trocknen/ Gefriertrocknen	Feuchter Feststoff / Eis und Feststoff	Wärmeenergie	Unterschiede in der Flüchtigkeit von Fest-Verdampfung/Sublimation von Wasser

Abbildung 18: Gleichgewichtsbestimmte physikalisch-chemische Trennverfahren

Zur Bewertung des Extraktionsvorganges wird die sogenannte Ausbeute verwendet.

$$\text{Ausbeute in [\%]} = \frac{m_{\text{Komponente im Extrakt}}}{m_{\text{Komponente im Ausgangsstoff}}} * 100\%$$

In den nachfolgenden Kapiteln wird auf die verschiedenen Arten der Extraktion näher eingegangen sowie ihre Anwendung für die Problemstellung dieser Arbeit erläutert.

### 2.7.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Sowohl das Lösemittel als auch der Ausgangsstoff liegen bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion im flüssigen Zustand vor. In Abbildung 19 ist eine vereinfachte Verfahrensweise für diese Extraktionsmethode dargestellt. Da beide Stoffe pumpfähig sind, kann unter größerem Anlagenaufwand eine kontinuierliche Extraktion realisiert werden [31].

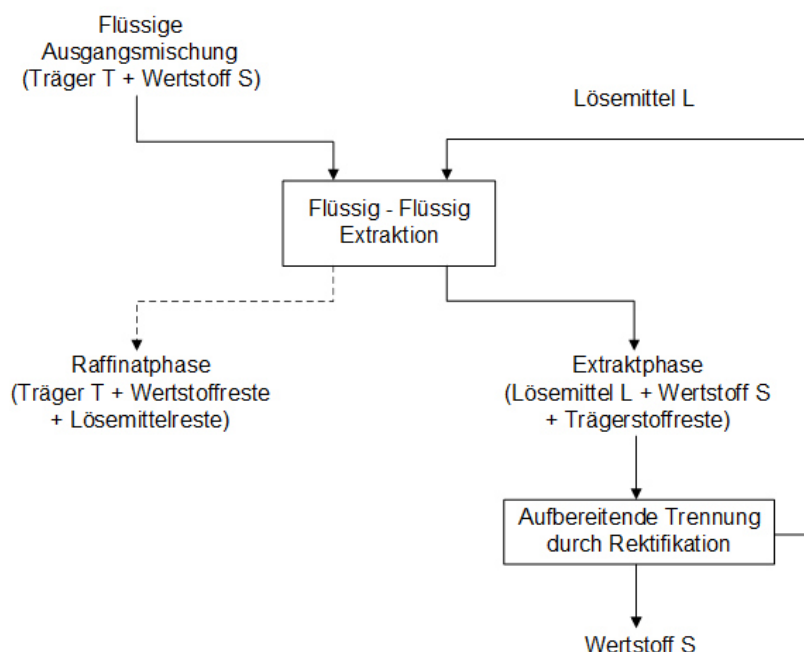


Abbildung 19: Schematisch vereinfachte Verfahrensweise bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion von Phospholipiden aus Eigelb im Labormaßstab kommen meist 2 unterschiedliche Lösemittel zum Einsatz. In einem Entölungsschritt werden die Triglyceride weitgehend mit Aceton aus dem Eigelb entfernt und anschließend, in einem zweiten Extraktionsschritt, die Phospholipide mittels Ethanol von den Proteinen, Kohlenhydraten und Mineralstoffen getrennt. Bei einem Massen-Verhältnis von Ethanol zu Eigelb von 5:1 konnte eine Ausbeute von rund 70% und eine Phospholipid-Reinheit von 35% erreicht werden. Wenn das Eigelb in einem vorhergehenden Schritt (bei gleichem Massenverhältnis) mit Aceton entölt wurde, betrug die Ausbeute 60% und die Phospholipid Reinheit 53% [32].

### 2.7.1.1 Fällung der Proteine (Denaturierung)

Fast alle Proteine besitzen die Fähigkeit zur Denaturierung. Diese tritt meist bei Temperaturerhöhung oder durch Zugabe von Säuren, Alkalien, organischen Lösemitteln, Harnstofflösungen oder Detergenzien auf [15].

Der Vorgang der Denaturierung von Proteinen ist meistens irreversibel, kann jedoch auch reversibel sein. Äußerlich kann eine Koagulation, eine Verringerung der Löslichkeit, beobachtet werden. Chemisch betrachtet verliert das Molekül dabei den hochgeordneten Zustand (Tertiärstruktur und Quartärstruktur). Das Molekül geht in eine ungeordnete Struktur über, dabei bilden sich nach Entfaltung der Ketten zufällige Wasserstoffbrücken aus. Die biologische Wirkung des Proteins geht dabei verloren da diese an die Molekülstruktur gebunden ist. Energetisch kann die Denaturierung mit einem Schmelzvorgang eines Kristalles verglichen werden. Proteine können mit Hilfe von Salzen ausgesalzen oder mit Aceton oder Alkohol ausgefällt werden [13].

### 2.7.2 Fest-Flüssig-Extraktion

Bei der Fest-Flüssig-Extraktion liegen der Ausgangsstoff (Rohgut) im festen Zustand und das Lösemittel im flüssigen Zustand vor. Mit Hilfe eines Lösemittels werden bestimmte Komponenten aus dem Ausgangsstoff herausgelöst. In Abbildung 20 ist ein vereinfachtes Schema einer Fest-Flüssig-Extraktion dargestellt [31].

Im Gegensatz zur Flüssig-Flüssig-Extraktion müssen hier Überlegungen getroffen werden, wie der Feststoff für die Extraktion vorbereitet und nach der Extraktion wieder vom Lösemittel getrennt werden kann.

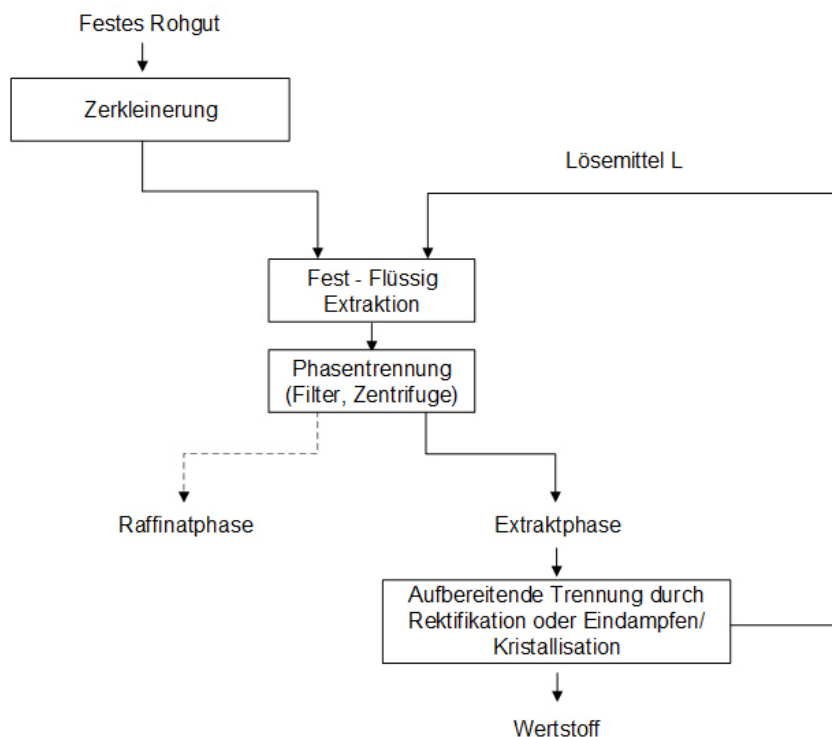


Abbildung 20: Schematisch vereinfachte Verfahrensweise bei der Fest-Flüssig-Extraktion

In Bezug auf die Phospholipid-Gewinnung aus Eigelb kommt bei der Fest-Flüssig-Extraktion meist sprüh- oder gefriergetrocknetes Eigelb-Pulver zum Einsatz. Mit dem Einsatz von Ethanol als Lösemittel und einer Extraktionstemperatur von 60°C konnte eine Ausbeute von 67% und eine Phospholipid Reinheit von 75% erreicht werden [25].

### 2.7.2.1 Soxhlet-Apparatur

Um eine Fest-Flüssig-Extraktion im Labormaßstab durchzuführen, kann eine sogenannte Soxhlet-Apparatur (siehe Abbildung 21) verwendet werden. Dieser Geräteaufbau besteht aus einem beheizbaren Rundkolben, einem Mittelstück inklusive Extraktionshülse und einem Rückflusskühler. Der zu extrahierende Feststoff wird dabei in eine Extraktionshülse gefüllt, die wiederum in das Mittelstück kommt. Das Lösemittel wird in den beheizbaren Rundkolben gefüllt. Es verdampft und steigt über das sogenannte Steigrohr des Mittelstücks bis zum Rückflusskühler auf. An diesem kondensiert es und tropft zurück in das Mittelstück auf den Feststoff. Dort interagiert es mit diesem und extrahiert die löslichen Inhaltsstoffe. Diese Art der Extraktion wird auch Perkolation genannt. Wenn das Niveau des Lösemittels die Höhe des Siphons am Mittelstück

erreicht hat, läuft es über diesen in den Rundkolben ab. Dieser Vorgang wiederholt sich anschließend beliebig oft. Das Lösemittel im Rundkolben wird immer mehr mit der extrahierten Komponente angereichert. Nachdem der Extraktionsvorgang mittels Soxhlet-Apparatur abgeschlossen ist, muss das Lösemittel abgedampft werden, um ein lösemittelfreies Extrakt zu erhalten [33].

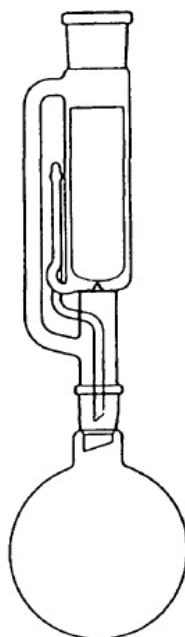


Abbildung 21: Soxhlet-Apparatur

Das Material der Extraktionshülsen ist meist Zellulose. Um etwaige Fehler auszuschließen und um sicherzustellen, dass das Lösemittel keine Komponenten aus dem Hülsenmaterial herauslöst, werden diese meist in einem vorherigen Durchlauf ohne Feststoff extrahiert.

### 2.7.3 Hochdruckextraktion mit verdichteten Gasen

Eine weitere Extraktionsmethode, welche in dieser Arbeit zur Anwendung kam, ist die Hochdruckextraktion mit überkritischem Kohlendioxid. In diesem Kapitel werden zuerst die Eigenschaften und die Definition von überkritischen Fluiden behandelt und anschließend die Vorteile dieser Extraktionsmethode in Kombination mit dem verwendeten Lösemittel aufgezeigt.



### 2.7.3.1 Überkritisches Fluid

Extraktionsmethoden lassen sich nach dem thermodynamischen Zustand des Lösemittels einteilen. Bei der Extraktion mit verdichteten Gasen wird ein Lösemittel verwendet, dessen kritische Temperatur  $T_c$  in der Nähe der Betriebstemperatur des Trennverfahrens liegt. Liegen der Druck und die Temperatur des Lösemittels im Prozess jedoch über dessen kritischem Druck  $P_c$  und kritischer Temperatur  $T_c$ , so spricht man von überkritischem Fluid. Diese Unterscheidung ist einem Phasendiagramm in Abbildung 22 zu erkennen [30].

Überkritische Fluide können bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen eingesetzt werden und bieten daher die Möglichkeit, gewünschte Wertstoffe schonend abzutrennen. Das ist vor allem bei Naturstoffen als Rohmaterial von Bedeutung, da Aromastoffe und andere leicht flüchtige Substanzen oft temperaturempfindlich sind [31].

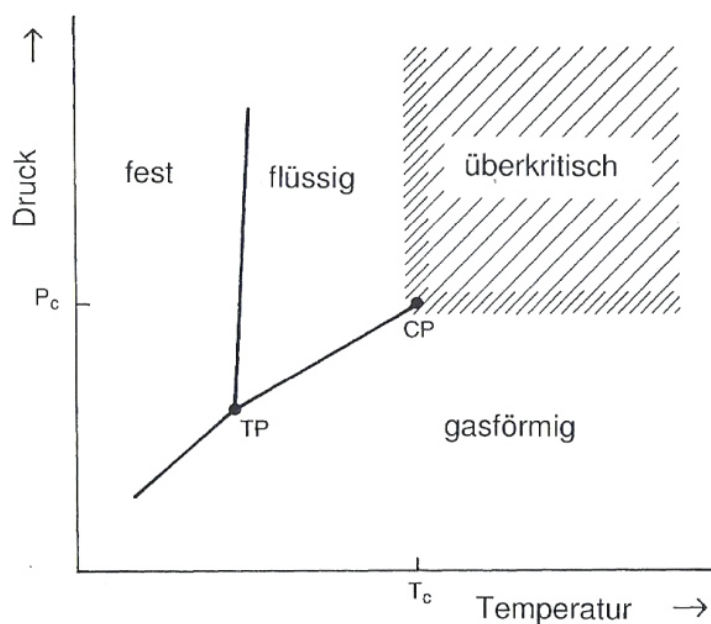


Abbildung 22: Definition des überkritischen Zustands für eine reine Komponente

Hervorzuheben ist auch das schnellere Massentransportverhalten. Hierbei kombinieren überkritische Fluide die Vorteile von flüssigen und gasförmigen Lösemitteln. Diese Gegebenheit ist an den drei Stoffwerten Dichte  $\rho$ , dynamische Viskosität  $\eta$  und Diffusionskoeffizient  $D$  zu erkennen. Trotz einer, im Vergleich zu Flüssigkeiten nur geringfügig niedrigeren Dichte  $\rho$ , entspricht die dynamische Viskosität  $\eta$  komprimierter Gase eher dem Wert des gewöhnlichen gasförmigen Zustandes. Der Diffusionskoeffizient  $D$  eines verdichteten Gases ist in der Nähe des kritischen Punktes um mehr als das

zehnfache höher als jener einer Flüssigkeit. Tabelle 11 zeigt den Größenordnungsvergleich dieser wichtigen Parameter für die verschiedenen Zustandsbereiche.  $D$  bezeichnet dabei den Selbstdiffusionskoeffizienten und  $p_r$  bzw.  $T_r$  den reduzierten Druck bzw. die reduzierte Temperatur. Die beiden reduzierten Parameter stellen den vorliegenden Druck bzw. die vorliegende Temperatur den kritischen Werten gegenüber [34].

$$p_r = \frac{p}{p_c} \text{ bzw. } T_r = \frac{T}{T_c}$$

Tabelle 11: Größenvergleich physikalischer Daten von Gas, verdichtetem Gas und Flüssigkeit

	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\eta$ [g/cm s]	$D$ [cm <sup>2</sup> /s]
Gas, 1 bar 20°C	(0,6-2) · 10 <sup>-3</sup>	(1-3) · 10 <sup>-4</sup>	0,1-0,4
Gas, $T_r=1$ $P_r=3$	0,2-0,5	(1-3) · 10 <sup>-4</sup>	0,7 · 10 <sup>-3</sup>
Gas, $T_r=1$ $P_r=4$	0,4-0,9	(3-9) · 10 <sup>-4</sup>	0,2 · 10 <sup>-3</sup>
Flüssigkeit, 20°C	0,6-1,6	(0,2-3) · 10 <sup>-2</sup>	(0,2-2) · 10 <sup>-5</sup>

### 2.7.3.2 Lösemittel für die Hochdruckextraktion

Zur schonenden Naturstoffextraktion sind Betriebstemperaturen im Bereich von 0-100 °C einzuhalten. Dies erfordert die Verwendung von jenen Gasen als Lösemittel, deren kritische Temperaturen sich ebenfalls in diesem Intervall befinden. Tabelle 12 bietet einen Überblick über diesem Kriterium entsprechende Lösemittel [30].

Tabelle 12: Physikalisch-chemische Daten verschiedener zur Naturstoffextraktion geeigneter Gase

	$T_c$ [K]	$P_c$ [bar]	$v_c$ [cm <sup>3</sup> /mol]
Kohlendioxid	304.12	73.74	94.07
Ethen	282.34	50.41	131.10
Ethan	305.32	48.72	145.50
Propan	369.83	42.48	200.00

Von diesen Lösemitteln hat sich in der Praxis das Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) klar durchgesetzt. Dafür können folgende Gründe genannt werden:

- Es ist physiologisch unbedenklich.
- Es ist keimfrei und bakterio­statisch.
- Es ist nicht brennbar oder explosiv.
- CO<sub>2</sub> ist umweltfreundlich. Es fallen keine Abluft, keine Abwässer und keine verbrauchten Lösemittel an. Dadurch entfällt ein Großteil der üblichen Folgekosten durch Aufreinigungs­verfahren.
- CO<sub>2</sub> steht in großen Mengen zu günstigen Konditionen aus eigenen Ressourcen und weitgehend unabhängig von der petrochemischen Industrie zur Verfügung.
- Keine giftigen Rückstände im extrahierten Feststoff und Extrakt.

In der nachfolgenden Tabelle 13 sind die wichtigsten physikalisch-chemischen Daten von Kohlendioxid zusammengefasst [35]. MG bezeichnet dabei die molare Masse,  $\omega$  den azentrischen Faktor und MAK die maximale Arbeitsplatz-Konzentration in Österreich [36].

Tabelle 13: Physikalisch-chemische Daten von Kohlendioxid

$T_c$	$p_c$	$v_c$	MG	$\omega$	MAK
$[K]$	$[bar]$	$[cm^3/kg]$	$[g/mol]$	$[-]$	$[ppm]$
304.12	73.74	94.07	44.010	0.225	5000

### 2.7.3.3 Vorteile der Hochdruckextraktion mit Kohlendioxid

Die Entölung von Eigelbpulver kann, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, mit Hilfe einer flüssig-flüssig Extraktion durchgeführt werden. Dabei werden die Triglyceride aus dem Pulver extrahiert. Sehr häufig wird dabei Hexan oder Aceton als Lösemittel verwendet. Diese Prozessführung hat neben den relativ geringen Kosten aber auch einige Nachteile. Speziell bei, für Menschen giftigen Lösemitteln müssen Lösemittelrückstände im Extrakt und Raffinat vermieden werden. Daher werden bei diesem Verfahren häufig nachgeschaltete Prozesse zur Lösemittelentfernung benötigt [2, 31].

Der wichtigste Vorteil der Hochdruckextraktion mit überkritischen Fluiden als Lösemittel ist, dass überkritische Fluide die Vorteile von flüssigen und gasförmigen Lösemitteln kombinieren. Besonders bei der Anwendung von Kohlendioxid als Lösemittel ist ein weiterer Vorteil, dass weder im Extrakt, noch im Raffinat oder Feststoff (nur bei Feststoffextraktion) Lösemittelrückstände verbleiben. Aufgrund der Unbedenklichkeit von  $CO_2$  entfällt dadurch eine in anderen Verfahren benötigte Aufbereitung [37].

Ein weiterer Pluspunkt ist die einfache Trennung des Wertstoffes von dem Lösemittel durch einfache Druckreduzierung oder Temperaturerhöhung. Somit ist eine einfache Lösemittelregeneration gegeben, wodurch dessen Kreislaufführung vereinfacht wird. Verdichtete Gase besitzen eine vergleichsweise hohe Selektivität. Die zur schonenden Naturstoffextraktion verwendbaren Gase sind in verdichtetem Zustand typisch lipophile Lösemittel, die alle polaren und polymeren Substanzen nicht zu lösen vermögen. Durch Variation der Zustandsparameter Druck und Temperatur, sowohl in der Beladungs- als auch in der Entmischungsstufe, können dem Trennproblem die Lösungseigenschaften verdichteter Gase angepasst werden [34].

### 2.7.3.4 Einfluss von Druck und Temperatur

Die Prozess-Parameter Druck und Temperatur haben einen entscheidenden Einfluss auf Extraktionsgeschwindigkeit und Ausbeute. Die Steigerung des Extraktionsdrucks resultiert in einer Zunahme der Kohlendioxid-Dichte. Die Erhöhung der Extraktionstemperatur wirkt sich zum einen negativ auf die Dichte aus, zum anderen bewirkt diese eine Steigerung des Dampfdrucks der zu extrahierenden Komponenten, welche sich positiv auf die Extraktion auswirken kann. Eine Zunahme der Dichte resultiert in einer Zunahme der Lösefähigkeit des Lösemittels [30]. In Abbildung 23 ist der Verlauf der Kohlendioxid-Dichte in Abhängigkeit des Drucks bei 40, 50 und 60°C dargestellt [38].

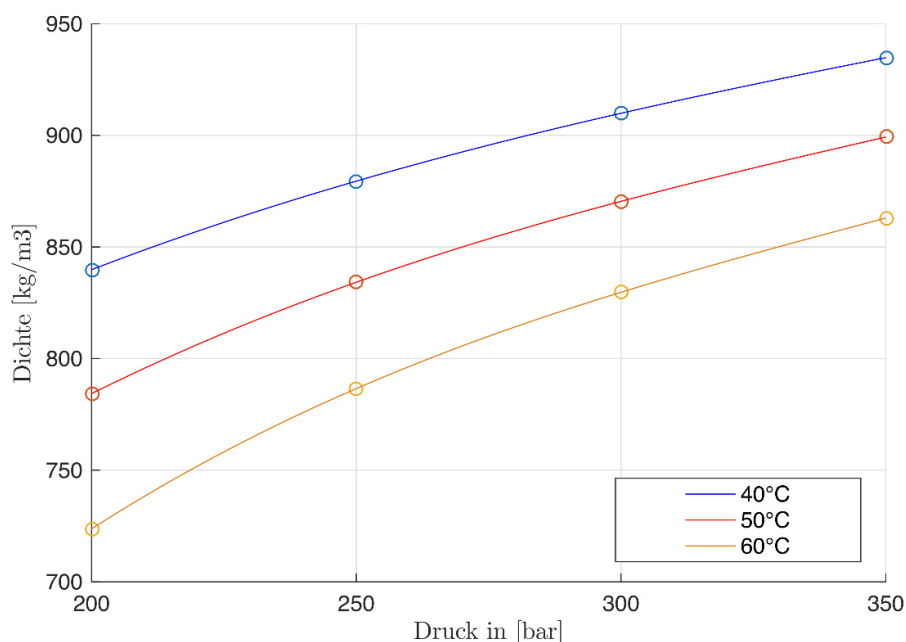


Abbildung 23: Einfluss von Druck und Temperatur auf die Dichte von Kohlendioxid

### 2.7.3.5 Hochdruckextraktion von Eigelb

In Hinblick auf die Phospholipid Gewinnung aus Eigelb, wird dieses in einem vorhergehenden Schritt meist entfettet. Bei dieser Extraktion der Triglyceride kommt Hexan oder Aceton als Lösemittel zum Einsatz [32]. Einige Phospholipide weisen jedoch eine Löslichkeit in Hexan [11] auf und würden dadurch, sofern keine geeigneten Folgeschritte [39] gesetzt werden, verloren gehen.

Bei optimal gewähltem Druck und Temperatur sind Phospholipide in Kohlendioxid unlöslich [40]. Dadurch stellt die Hochdruckextraktion ein geeignetes Verfahren für die Entölung von Eigelb-Pulver dar. Überkritisches Kohlendioxid weist dabei ein selektiveres Löseverhalten in Bezug auf die Triglyceride auf als Hexan, welches die Phospholipide ebenso löst. Die weiteren Vorteile von Kohlendioxid als Lösemittel werden in Kapitel 2.7.3.3 angeführt.

Weiters kann die Hochdruckextraktion eingesetzt werden, um Phospholipide direkt zu extrahieren. Dazu ist aber die Verwendung eines geeigneten Schleppmittels (Ethanol) notwendig [39, 40].

## 2.8 Analysemethoden

Die Analysen bzw. die Auswahl der Analysemethoden sind für die Prozessentwicklung entscheidend. Speziell bei der Analyse von Naturstoffen, welche oft aus mehreren hundert Komponenten bestehen, kann sich die Auswahl eines geeigneten Analyseverfahrens als schwierig erweisen [42].

Die Begriffe qualitativ und quantitativ sind in der analytischen Chemie von besonderer Bedeutung. Eine qualitative Analyse stellt fest, ob ein gewisser Stoff in der Probe vorhanden ist während eine quantitative Analyse die Menge aufzeigt, die von diesem Stoff in der Probe enthalten ist [43].

Im Zuge dieser Masterarbeit wurden drei unterschiedliche instrumentelle Analysemethoden angewandt: die Gaschromatographie, die Hochdruckflüssigkeitschromatographie und die kernmagnetische Resonanzspektroskopie. Diese werden in den nachfolgenden Unterkapiteln genauer beschrieben.

### 2.8.1 Chromatographie

Mittels chromatographischer Methoden können Stoffe effizient getrennt und anschließend identifiziert bzw. quantifiziert werden. Das Analyseprinzip ist die Trennung von Verbindungen. Eine effektive Trennung von chemisch ähnlichen Verbindungen ist nur

bei einer wiederholten Anzahl von Trennschritten möglich. Diese Mehrschritt-Trennung ist mit Hilfe chromatographischer Verfahren realisierbar [43].

Abbildung 24 zeigt eine Übersicht chromatographischer Methoden. Dabei wird zwischen planarer und Säulen-Chromatographie unterschieden. Zur planaren Chromatographie zählen die Papier- und Dünnschichtchromatographie (DC). Die Säulen-Chromatographie unterteilt sich, je nach Zustand der mobilen Phase, in Gaschromatographie (GC) und Flüssigkeitschromatographie (LC). Bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) können Normal- oder Umkehrphasensäulen zum Einsatz kommen. Spezialmethoden der Flüssigkeitschromatographie sind die superkritische Fluidchromatographie (SFC), die Ionenchromatographie (IC), und die Gelpermeationschromatographie (GPC) [44].

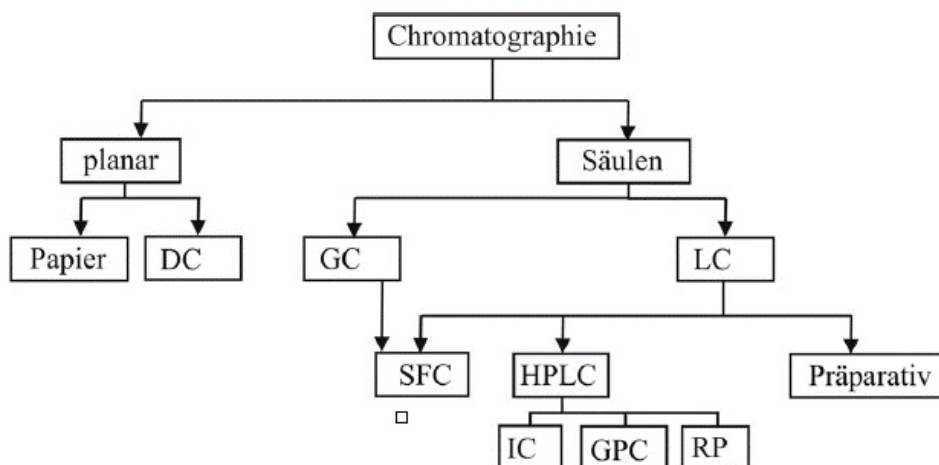


Abbildung 24: Einteilung chromatographischer Methoden

Nachfolgend soll der Trennvorgang anhand der Säulenchromatographie erläutert werden. Für die Trennung sind, je nach Art der Säule und Analyseverfahren, unterschiedliche Mechanismen verantwortlich: Molekülgröße, Adsorptionsverhalten, Verteilung, Ionenaustausch und Affinität. In der Praxis erfolgt die Trennung meist als Kombination von mehreren Mechanismen. Die gängige Umkehrphasen-Säule bei der HPLC kann der Adsorptions- oder auch der Verteilungschromatographie zugeordnet werden [44].

In der nachfolgenden Abbildung 25 ist die schematische Funktionsweise der Säulenchromatographie dargestellt. Die Probe mit den beiden Komponenten A und B wird mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert. In dieser befindet sich die stationäre Phase. Durch die unterschiedlich starke Wechselwirkung zwischen der stationären

Phase und den beiden Komponenten A und B erfolgt die Trennung der Probe. Am Ende der Säule sind die beiden Komponenten bei geeigneter Analyseverfahren so weit getrennt, dass sie vom Detektor separat erfasst werden können. Das detektierte Signal des Detektors über die Zeit aufgetragen nennt man Chromatogramm. Die unterschiedlichen Durchlaufzeiten der Komponenten ( $t_4$  und  $t_5$ ) werden als Retentionszeit bezeichnet. Über die Fläche der einzelnen Peaks kann anschließend auf die Konzentration bzw. die Zusammensetzung rückgeschlossen werden [43].

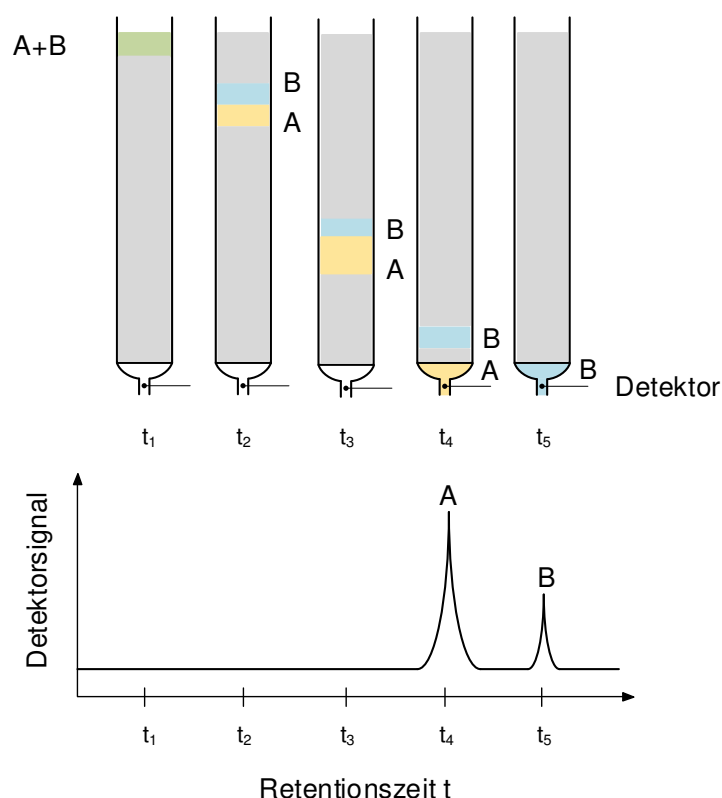


Abbildung 25: Schematische Funktionsweise der Säulenchromatographie mit Chromatogramm

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die beiden angewandten chromatographischen Analyseverfahren näher beschrieben.

### 2.8.1.1 Gaschromatographie (GC)

Bei der Gaschromatographie wird die zu analysierende Probe mit Hilfe eines Gases (mobile Phase) durch die Säule transportiert. Die zu analysierenden Verbindungen in



der flüssigen Probe müssen daher verdampft werden, ohne sich dabei zu zersetzen. Die Konsequenz daraus ist eine eventuell aufwändige Probenvorbereitung [45].

Abbildung 26 stellt den prinzipiellen Aufbau einer Gaschromatographie-Anlage dar [44]. Die mobile Phase wird dabei ausschließlich als Trägergas genutzt. Wechselwirkungen des Gases mit der Probe spielen daher keine Rolle. Die Probe wird in einen Einspritzblock injiziert, sofort verdampft und mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert. Die stationäre Phase in der Säule kann im festen oder flüssigen Zustand vorliegen, wodurch sich verschiedene Trennmechanismen ergeben. Nachdem die verschiedenen Substanzen in der Säule getrennt wurden, wird im Detektor ein Signal aufgezeichnet. Je nach Art des Detektors werden verschiedenste Prinzipien zur Signalergzeugung angewendet. Der Flammenionisationsdetektor (FID) wird dabei am häufigsten eingesetzt. Das Prinzip der Detektion beruht darauf, dass sich bei der Zuführung von organischen Verbindungen die elektrische Leitfähigkeit einer Wasserstoffflamme in einem elektrischen Feld ändert. Außerdem ist die Temperaturkontrolle bei der Gaschromatographie ein wichtiger Faktor. Es muss gewährleistet sein, dass keine der Verbindungen auskondensiert [43].

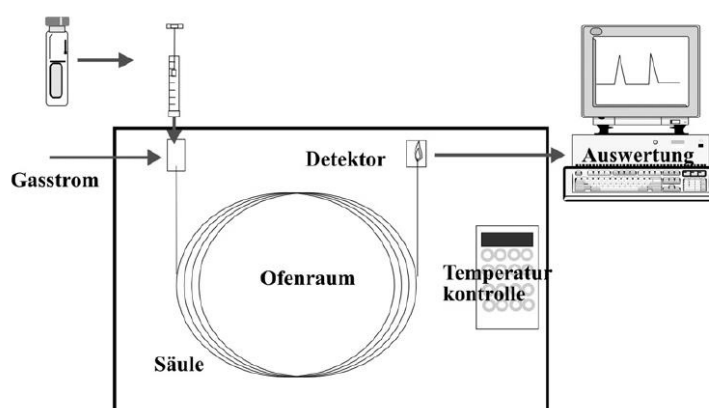


Abbildung 26: Schematischer Aufbau einer Gaschromatographie-Anlage

Die Gaschromatographie kann verwendet werden, um Fettsäuren zu trennen und zu analysieren [46]. Jedoch ist dafür eine vorhergehende Derivatisierung der Fettsäuren zu ihren Fettsäuremethylestern erforderlich. Grund dafür ist, dass Fettsäuren nicht verdampft werden können, ohne sich dabei zu zersetzen [44].

### 2.8.1.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie hat in der heutzutage benötigten Analyse komplexer Gemische eine wichtige Rolle eingenommen. Im Vergleich zur Gaschromatographie wird keine Derivatisierung benötigt, um Stoffe in eine unzersetzbare flüchtige Form zu überführen [45].

In Abbildung 27 ist der schematische Aufbau einer HPLC-Anlage dargestellt [44]. Die mobile Phase ist eine Flüssigkeit (Eluent) und besteht aus einem oder mehreren Lösemitteln. Je nach Art der Hochdruckpumpe kann eine isokratische- oder eine Gradienten-Fahrweise realisiert werden. Bei einer isokratischen Methode ändert sich im Gegensatz zu einer Gradienten-Fahrweise die Zusammensetzung der mobilen Phase nicht. Die Pumpe fördert die mobile Phase und die Proben, welche im Autosampler vollautomatisch injiziert werden, durch das System. In der Säule erfolgt die eigentliche Auftrennung der Probe. HPLC-Säulen werden in Normalphasen- und Umkehrphasen-Säulen unterteilt. Es gibt unterschiedliche Arten von Detektoren, welche nach unterschiedlichen Prinzipien funktionieren. Einer der gängigsten Detektoren ist der UV-VIS Detektor. Dabei wird die Lichtabsorption entweder im ultravioletten (180 – 400nm) oder im sichtbaren (400 – 780nm) Spektrum gemessen. Dieser Vorgang ist als spektroskopische Methode klassifiziert [43].

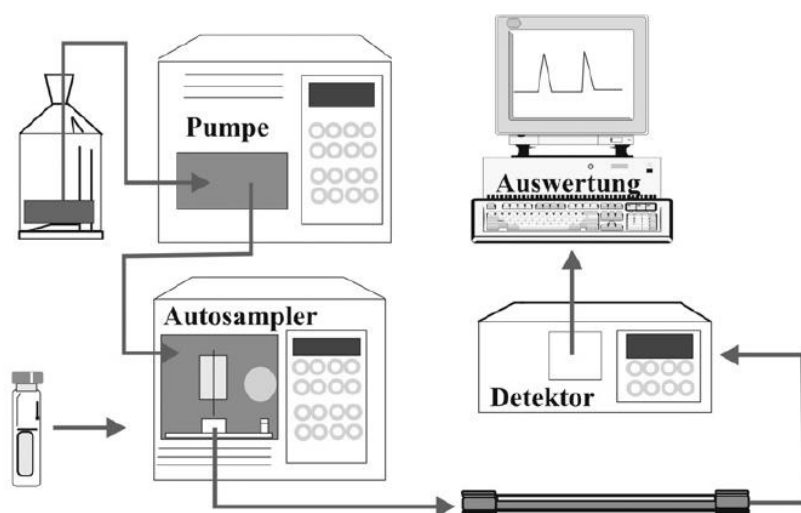


Abbildung 27: Schematischer Aufbau einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Anlage

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie ist ein geeignetes Verfahren, um Phospholipide zu trennen und zu analysieren. Dabei wird meist ein Lichtstredetektor verwendet, die Pumpe fährt dabei ein Gradienten-Programm [36, 37]. Auch der UV/VIS Detektor wird für Phospholipid-Analysen verwendet. Im Vergleich zum Lichtstredetektor liefert er ungenauere Ergebnisse, da einige Phospholipide bei gewissen Wellenlängen ein ähnliches Adsorptionsverhalten aufweisen [38, 39].

## 2.8.2 Spektroskopie

Die Spektroskopie zählt neben der Chromatographie und der Elektroanalytik zu den wichtigsten Analysemethoden. Dabei fasst der Begriff Spektroskopie alle Methoden zusammen, bei denen Wechselwirkungen elektromagnetischer Strahlung (Analyseprinzip) mit der Materie (Probe) ausgenutzt werden. Die Probe muss vor der Detektion, wie bei der Chromatographie, nicht aufgetrennt werden [43].

### 2.8.2.1 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR...eng: Nuclear Magnetic Resonance) arbeitet im Spektralbereich der Radiowellen (0,6 – 10m) [43]. Gemessen wird die Absorption von Strahlungsenergie, die mit Übergängen zwischen magnetischen Zuständen eines Atomkerns, hervorgerufen durch ein äußeres Magnetfeld, verknüpft ist [45].

Der Aufbau eines NMR-Spektrometers ist in Abbildung 28 dargestellt. Es besteht aus einem Magneten, einem oder mehreren Radiofrequenzsendern, einem Empfänger der Radiofrequenzen und der zu analysierenden Probe im Probehalter [43].

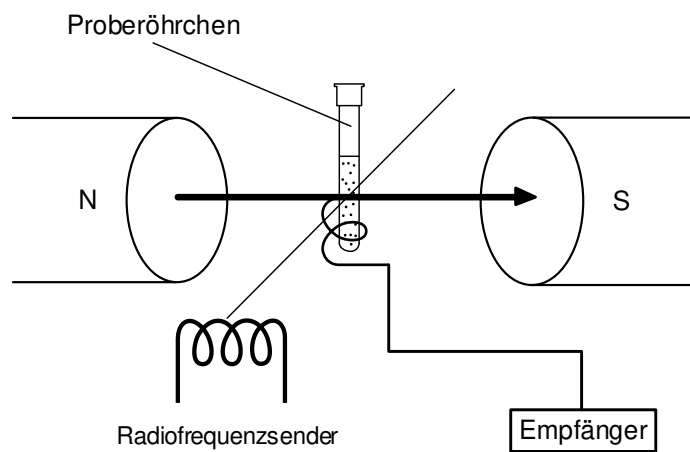


Abbildung 28: Schematischer Aufbau eines NMR-Spektrometers

## 3 Experimenteller Teil

Die Phospholipid-Gewinnung aus Eigelb ist prozesstechnisch aufwendiger als jene aus Ölsaaten. Daraus resultiert eine komplexere Prozessgestaltung [2]. Daher müssen Entscheidungen bezüglich Ausgangsmaterial, Verfahrensschritte und deren Kombination getroffen werden. Diese Entscheidungen, die verwendeten Anlagen sowie die Durchführung der Versuche werden in diesem Kapitel zusammengefasst. Den letzten Punkt dieses Kapitels stellen die Analyse der Produkte sowie deren Verwendung als Emulgator für O/W Emulsionen dar.

### 3.1 Ausgangsmaterial

Es wurden zwei unterschiedliche Ausgangsmaterialien für die Phospholipid-Gewinnung untersucht. Zum einen flüssiges Eigelb und zum anderen sprühgetrocknetes Eigelb-Pulver. Beim flüssigen Eigelb sind Bio Freiland Eier der Supermarktkette Spar verwendet worden. Das Eigelb-Pulver wurde von der Firma Ei Vita zugekauft.

Ei Vita nutzt zur Gewinnung des Eigelb-Pulvers eine leistungsstarke Anlage von Sano. Dabei werden die Eier vollautomatisch aufgeschlagen, Eidotter von Eiweiß getrennt und anschließend werden diese in zwei separaten Trocknern bei einer Temperatur von 130°C sprühgetrocknet. Die Verweilzeit des Eigelbs im Trockner beträgt dabei zwei Sekunden. Dadurch kann dessen schonende Trocknung sichergestellt werden [50].

### 3.2 Flüssig-Flüssig Extraktion

In einem ersten Schritt wurde flüssiges Eigelb als Ausgangsstoff für die Extraktion verwendet. Die frischen Eier wurden aufgeschlagen, das Eigelb vom Eiweiß getrennt und anschließend das Eigelb über ein Filterpapier in ein Becherglas abgerollt. Durch das Filterpapier konnte auch der letzte Rest an Eiweiß, sowie die Hagelschnur besser entfernt werden.

Je nach gewähltem Massenverhältnis von Eigelb zu Lösemittel wurde eine bestimmte Menge Ethanol bei Umgebungstemperatur zugegeben. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Proteine, wie in Kapitel 2.7.1.1 erwähnt, sofort ausfallen. Anschließend wurde die Mischung für 20 Minuten bei 500 Umdrehungen pro Minute gerührt. Dadurch, dass das Becherglas anschließend für 30 Minuten stehengelassen wurde, konnten sich die ausgefallenen Proteine absetzen. Die Extrakt-Phase wurde anschließend mit Hilfe einer Nutsche durch ein Filterpapier filtriert.

Das gewonnene Extrakt musste außerdem vom Lösemittel befreit werden. Dabei wurden zwei unterschiedliche Methoden untersucht. Das Ziel war, herauszufinden, ob eine höhere Temperatur einen Einfluss auf das gewonnene Extrakt hat. Dazu wurde das Becherglas einerseits mit dem gewonnenen Extrakt bei Umgebungsdruck in ein Wasserbad bei 78°C gestellt. Zum anderen wurde das Lösemittel in einem Rotationsverdampfer (Heidolph Hei-VAP) in Kombination mit einer Vakuumpumpe (ILMVAC LVS 210) bei einem Druck von 100 mbar rückgewonnen. Ethanol hat bei 100 mbar eine Siedetemperatur von 29,2°C [51]. Auf dem Gerät wurden 30°C eingestellt.

### 3.3 Fest-Flüssig-Extraktion

Die Fest-Flüssig-Extraktion kann in unterschiedlichen Apparaturen durchgeführt werden. Im Labormaßstab findet vor allem die Apparatur nach Soxhlet häufig Anwendung. In Hinblick auf eine mögliche Erhöhung der Menge des Aufgabegutes pro Batch, wurden auch Rührkessel-Versuche durchgeführt. Die Durchführung dieser Versuche ist in den nachfolgenden Unterkapiteln näher beschrieben.

#### 3.3.1 Soxhlet

Die Funktionsweise einer Soxhlet-Apparatur wurde in 2.7.2.1 beschrieben. Bei den durchgeführten Extraktions-Vorgängen wurden das Eigelb-Pulver und das entölte Eigelb-Pulver als Aufgabegut eingesetzt. Dabei kamen zwei unterschiedliche Lösemittel zum Einsatz.

Um einen Vergleichswert für die Entölung mit überkritischem Kohlendioxid zu erhalten, wurden Soxhlet-Versuche mit Hexan durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde das

sprühgetrocknete Eigelb-Pulver und als Lösemittel Hexan mit einer Reinheit von 99+% verwendet. Bio Ethanol (99%, 1% MEK (Butanon)) wurde verwendet, um die Phospholipide aus dem Eigelb-Pulver sowie dem entölten Eigelb-Pulver zu extrahieren.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Soxhlet-Versuche immer auf dieselbe Art und Weise bei Umgebungsdruck durchgeführt. Es wurde ein 500 ml Rundkolben verwendet. Dieser wurde, um das Lösemittel zu verdampfen, in einen Heizpilz gestellt. Die Soxhlet-Apparatur hatte ein Volumen von 150 ml und die verwendeten Extraktionshülsen waren aus Zellulose. Um zu verhindern, dass feine Pulverpartikel aufschwimmen und eventuell mit dem Lösemittel über den Siphon in den Rundkolben gelangen, wurde unter der Extraktionshülse zusätzlich Glaswolle platziert. Ein Rücklaufkühler wurde verwendet, um das Lösemittel zu kondensieren. Die Dauer dieser Versuche betrug immer 12 Lösemitteldurchläufe.

Um den Temperatureinfluss zu überprüfen, wurden zusätzlich folgende zwei Experimente durchgeführt. Nach abgeschlossenem Soxhlet-Versuch mit Ethanol als Lösemittel wurde die Extraktionshülse entfernt und eine neue Hülse inklusive entöltem Eigelb-Pulver in die Soxhlet-Apparatur gegeben. Das Lösemittel mit den gelösten Phospholipiden verblieb im Rundkolben und der Extraktionsvorgang wurde wieder gestartet. Dieser Vorgang wurde insgesamt für vier Extraktionshülsen durchgeführt. Dadurch wurde die Dauer der Temperaturbelastung ( $T=78^{\circ}\text{C}$ ) vervierfacht. Der zweite Ansatz war den Soxhlet-Versuch mittels Wasserstrahlpumpe bei Unterdruck durchzuführen. Dadurch kann eine niedrigere Betriebstemperatur sichergestellt werden.

### 3.3.2 Rührkessel-Versuche

Für die Rührkessel-Versuche wurden ein beheizbarer Zwei-Hals-Rundkolben und ein Magnetrührer verwendet. An einem der beiden Hälse wurde ein Rücklaufkühler angeschlossen. Der andere Hals wurde zur Entnahme von Proben mittels Pipette in gewissen Zeitabständen verwendet. Das Aufgabegut war bei diesen Versuchen  $\text{CO}_2$  entöltes Eigelb-Pulver. Als Masse-Lösemittel zu Masse-Aufgabegut wurde ein Verhältnis von 4:1 gewählt. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von  $20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die gezogenen Proben wurden sofort mittels Spritzenfilter filtriert und mit der HPLC-Anlage analysiert.

## 3.4 Hochdruckextraktion

Für den Entölungsschritt mittels Hochdruckextraktion wurden zwei unterschiedliche Extraktionsanlagen verwendet. Diese werden im folgenden Kapitel näher beschrieben und dabei wird speziell auf die Unterschiede der beiden Anlagen näher eingegangen.

### 3.4.1 Versuchs-Anlage

Die Hochdruckextraktionsanlage am Institut für Chemische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik der Technischen Universität Graz wurde verwendet, um Aufschluss über die optimalen Parameter (Druck und Temperatur) für die Extraktion zu erhalten. Aus dem kleineren Extraktor-Volumen ergibt sich im Vergleich zur Pilot-Anlage eine kürzere Extraktionsdauer. Dadurch konnten mehr Druck-Temperatur Kombination bei gleichbleibender Zeit untersucht werden.

Das Fließbild der Versuchsanlage ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Kohlendioxid Gasflasche ist außerhalb der Labor-Box in einem Sicherheitsschrank gelagert. Das Gas strömt bei geöffnetem Ventil in die Hochdruckpumpe. Die Pumpe selbst wird mit Hilfe eines Kryostaten auf 5°C gekühlt, um zu gewährleisten, dass das Kohlendioxid im flüssigen Zustand vorliegt. Bei der Pumpe handelt es sich um eine Kolbenpumpe. Der erforderliche Druck wird über einen Druckübersetzer mit Hilfe von Druckluft erzeugt und kann über diese geregelt werden. Der Extraktor wird mit dem Aufgabegut gefüllt. Um zu verhindern, dass feine Partikel mit dem Gasstrom mitgerissen werden, wurde zusätzlich am oberen und unteren Ende des Extraktors Watte platziert. Der Extraktor wird anschließend in einem temperierten Ofen verschraubt, dieser verfügt außerdem über einen Druck- und Temperatursensor. Das beladene Lösemittel strömt über ein beheiztes Ventil in eine Sichtzelle, in der sich das Probefläschchen befindet. Durch den Umgebungsdruck in der Sichtzelle fällt das gewonnene Extrakt aus, da das Lösemittel durch die Entspannung seine Lösefähigkeit verliert. Das reine Kohlendioxid verlässt die Versuchshalle anschließend über einen Durchflussmesser (Rotameter) und eine Gasuhr. Der Durchfluss des Lösemittels wird über das beheizte Ventil und den Durchflussmesser eingestellt. Die Probenahmen erfolgten in einem Intervall von 15 Minuten. Die Daten dieser Anlage sind nachfolgend angegeben.



Hersteller: Applied Separations

Bezeichnung: Spe-ed SFE

Baujahr: 2004

CO<sub>2</sub> Flow: 0-1 kg/h

Maximaler Betriebsdruck: 690 bar

Maximale Betriebstemperatur: 200°C

Extraktor-Volumen: 80 ml

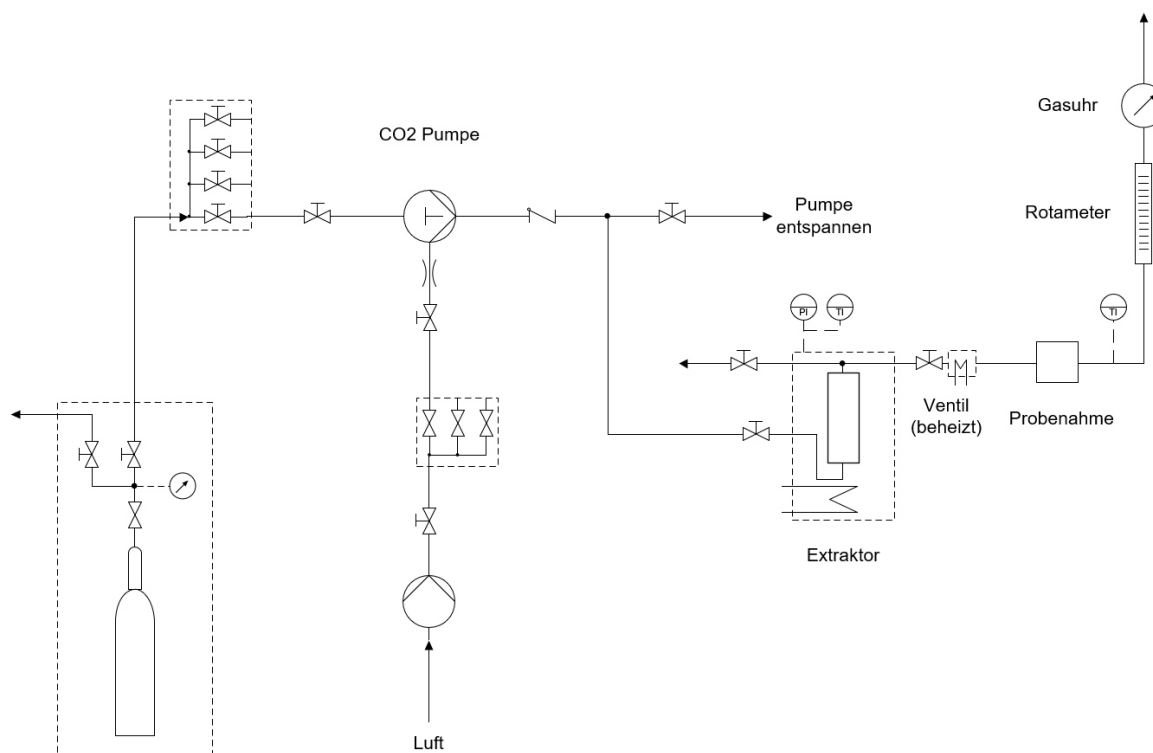


Abbildung 29: Fließbild der Versuchsanlage

### 3.4.2 Pilot-Anlage

Das Fließbild der verwendeten Pilot-Anlage der Firma Prozess Optimal ist in Abbildung 30 dargestellt. Im Vergleich zur Versuchsanlage der TU Graz weist sie zum einen ein größeres Extraktor-Volumen auf und zum anderen kann durch die beiden Abscheider eine fraktionierte Abscheidung bei unterschiedlichen Drücken realisiert werden. Durch das größere Extraktor-Volumen kann in einem Extraktionsvorgang mehr Produkt gewonnen werden. Die Probenahme erfolgte in 15-minütigen Zeitabständen. Diese Proben wurden verwendet, um Aufschluss über die Fettsäure-Verteilung zu erhalten. Da

die Probemenge zu gering war, wäre das mit der Versuchsanlage der TU Graz in diesen Zeitabständen nicht möglich gewesen.

Außerdem wird das Lösemittel während der Extraktion recycelt. Der einzige Lösemittelverlust entsteht bei den Probenahmen sowie der Entspannung der Anlage. Der Extraktor, der Vorlagebehälter sowie beide Abscheider sind als Doppelmantel-Behälter ausgeführt und werden mittels Thermostaten beheizt. Die Pumpe und der Vorlagebehälter werden mit Hilfe eines externen Kühlaggregates unter- bzw. gekühlt. Die Anlage verfügt zusätzlich über eine Schleppmittel-Pumpe. Das Fließbild der Anlage ist in der nachfolgenden Abbildung 30 dargestellt. Der eingestellte Lösemittel-Durchfluss betrug bei allen Versuchen 15 l/h.

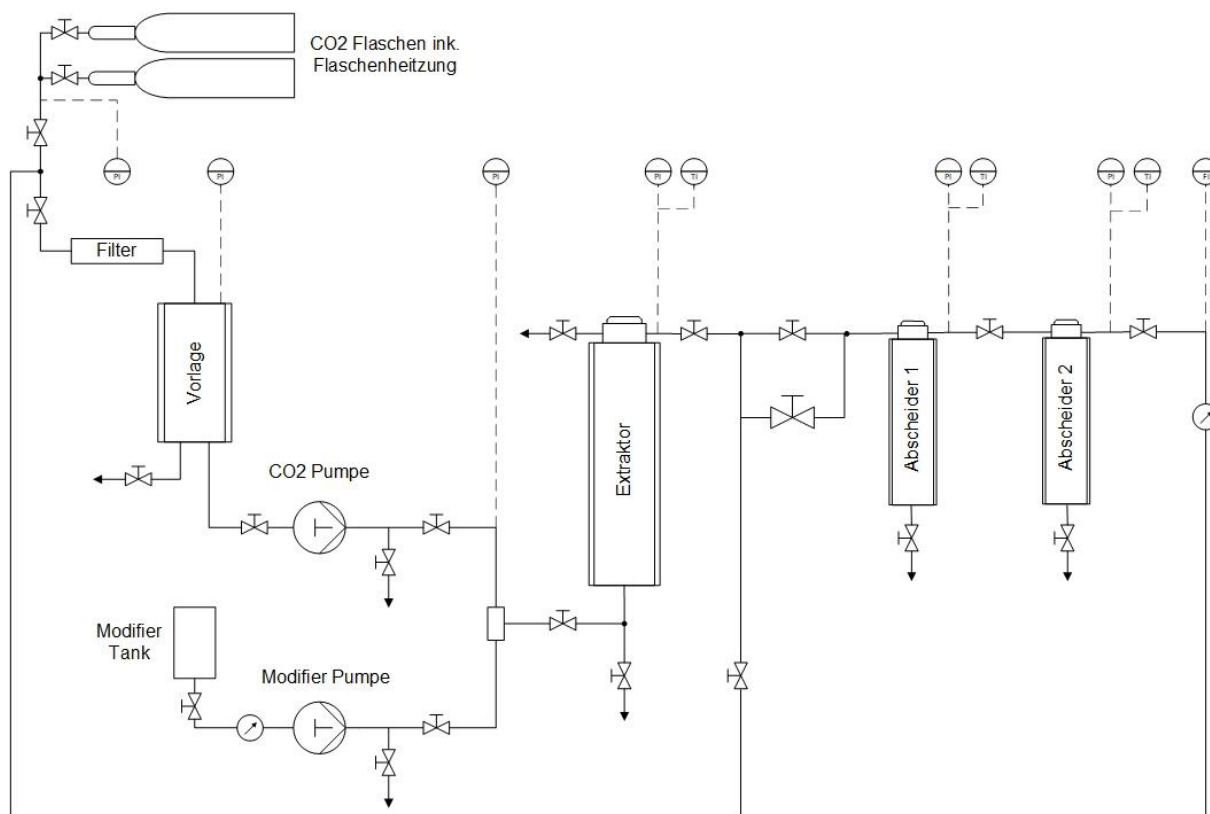


Abbildung 30: Fließbild der Pilot-Anlage

Die Daten dieser Anlage sind folgende:

Hersteller: Better-Shanghai

Bezeichnung: HSFE 5

Baujahr: 2017

Maximale Leistungsaufnahme: 18 kW

CO<sub>2</sub> Durchfluss: 0-50 l/h

Schleppmittel Durchfluss: 0-4 l/h

Maximaler Betriebsdruck: 700 bar

Maximale Betriebstemperatur: 85°C

Energiezufuhr: 400 V

Extraktor-Volumen: 5 l

Abscheider-Volumen: je 3 l

## 3.5 Analyse

Um die durchgeführten Versuche bzw. die gewonnenen Extrakte bewerten zu können, wurden unterschiedliche Analysen durchgeführt. Diese werden im folgenden Kapitel beschrieben.

Von besonderem Interesse waren dabei der Gesamtgehalt und die Verteilung der Phospholipide im Extrakt. Dazu können verschiedenste Analyseverfahren eingesetzt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Verfahren angewendet. Im ersten Schritt wurde der Phospholipid-Gehalt mit Hilfe einer Einheitsmethode der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaften (DGF) ermittelt. Da im Naturstoff-Labor in Wenigzell eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Anlage zur Verfügung steht, wurde für dieses Analyseverfahren eine geeignete Methode ermittelt. Zusätzlich wurde der Phospholipid-Gehalt und die Verteilung des entölten Eigelb-Pulvers (Aufgabegut) sowie des gewonnenen Extraktes mit einer Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) von der Firma Spectral Service AG untersucht.

Eine weitere angewandte Analyseverfahren stellt die Gaschromatographie (GC) dar. Damit wurde von dem, durch Hochdruckextraktion des sprühgetrockneten Eigelb-Pulvers gewonnenen Ei-Öls eine Fettsäureverteilung erstellt. Durch eine sequentielle Probenahme sollte überprüft werden, ob sich dieses Spektrum über die Extraktionsdauer verändert.

### 3.5.1 Phospholipid-Gehalt über Aceton Unlösliches

Von den oben erwähnten Analyseverfahren stellte die DGF-Einheitsmethode Abteilung FI – 5 Teil 1 (indirektes Verfahren) das einfachste Verfahren zur Ermittlung des Phospholipid-Gehalts dar. Es werden keine speziellen Laboranlagen und Probenvorbereitung benötigt. Der Phospholipid-Gehalt der gewonnenen Extrakte wurde über den Gehalt an Aceton Unlöslichem festgestellt. Dabei wird Aceton mit einer Temperatur von 0°C verwendet, um sicherzustellen, dass die Phospholipide und Glykolipide

ungelöst zurückbleiben und das sogenannte Lecithin-Öl (Triglyceride, Cholesterin) gelöst wird. Nachdem das Aceton abgedampft wurde, konnten die Rückstände gewogen und mit Hilfe der Formel 1 der Gehalt an Aceton Unlöslichem errechnet werden [17]. Der Wassergehalt wurde mittels Trockensubstanzmessung bei 110°C mit dem Gerät Gibertini Eurotherm festgestellt.

$$w = 100 - \frac{(A - G) * 100}{E} - W$$

A...Auswaage des Kolbens mit dem Lecithin-Öl in Gramm

G...Auswaage des leeren Kolbens

W...Wassergehalt der Probe in g/100g

E...Einwaage der Probe in Gramm

Formel 1: Aceton Unlösliches (indirektes Verfahren)

## 3.5.2 Phospholipid-Analyse mittels HPLC

Um eine relativ schnelle Aussage darüber machen zu können, ob sich in bestimmten Extrakten Phospholipide befinden, wurde eine HPLC-Methode erstellt. Die verwendeten Geräte, die entwickelte Methode sowie die dafür benötigten Maßnahmen werden in diesem Unterkapitel zusammengefasst.

### 3.5.2.1 Verwendete Geräte

Die Komponenten der zur Verfügung stehenden HPLC-Anlage sind nachfolgend aufgelistet.

<u>Pumpe:</u>	Merck Hitachi LaChrom Pump L-7110 (isokratisch)
<u>Autosampler:</u>	Merck Hitachi LaChrom Autosampler L-7200
<u>Detektor:</u>	Merck Hitachi LaChrom UV Detector L-7400
<u>Säule:</u>	Agilent SB C18 (4,6 x 250 mm, 3,5 µm)

<u>Säulenofen:</u>	Jetstream 2 Plus
<u>Entgaser:</u>	Uni Flow DEGASYS DG-2410
<u>Kommunikations Modul:</u>	Shimadzu CBM-201m
<u>Software:</u>	Shimadzu LabSolutions 5.87 SP1

### 3.5.2.2 Verwendete Methode

Aus Kapitel 3.5.2.1 ist ersichtlich, dass bei der zur Verfügung stehenden HPLC-Anlage ein UV-Detektor verbaut ist. Dementsprechend wurde auch die Methode gewählt [49]. Diese Methode führte nicht beim ersten Versuch zum gewünschten Erfolg und wurde daher in mehreren Schritten angepasst. Die Methoden-Parameter sind nachfolgend angegeben.

Mobile Phase: 65 vol% 2-Propanol, 27 vol% Wasser, 8 vol% Methanol

Durchfluss: 0,5 ml/min

Säulentemperatur: 50 °C

Wellenlänge: 205 nm

Analysedauer: 60 min

Zur Bewertung der Analyse wurden folgende Phospholipid Standards von Sigma Aldrich zugekauft: PC, PE und LPC. Außerdem wurde von der Firma Lipoid ein Ei-Phospholipid-Extrakt zugekauft, welches als weiterer Standard behandelt wurde. Als Lösemittel wurde bei allen Analysen Ethanol verwendet.

Es wurde für jeden Standard eine Kalibrierungsgerade erstellt. Dabei sind für jeden dieser Standards drei Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen erstellt worden. Um die Analyse-Standards einzuwiegen, wurde eine Analysenwaage (0,0001g) verwendet und mit Lösemittel immer auf dasselbe Volumen aufgefüllt. Das Lösemittel war dabei Ethanol mit HPLC Reinheit (100%). Diese Lösungen wurden anschließend analysiert und die Ergebnisse in einem Diagramm aufgetragen. Die x-Achse zeigt die Konzentration eines bestimmten, gelösten Phospholipid-Standards im Lösemittel und die y-Achse die Fläche unter dem im Chromatogramm erhaltenen Peaks. Dadurch ist man in der Lage jeden Peak einer Probe über die Retentionszeit einem Standard zuzuteilen und mit der jeweiligen Kalibrierungsgerade eine Konzentration zu bestimmen.

### 3.5.2.3 Löslichkeitsversuche

In Hinblick auf eine spätere Steigerung der Produktionsmenge der gewonnenen Phospholipide wurden Löslichkeitsversuche durchgeführt. Dabei wurde das gewonnene Extrakt wie ein, im vorherigen Kapitel erwähnter HPLC Standard behandelt und eine Kalibrierungsgerade erstellt. Es wurden dreizehn Mischungen mit unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von 1-135 mg/ml hergestellt. Als Lösemittel wurde Bio Ethanol verwendet. Zur Kontrolle wurde bei den letzten beiden Lösungen die Konzentrationen hoch genug gewählt, um die Sättigungskonzentration mit Sicherheit zu erreichen.

Durch diese Überlegungen sollte das Löseverhalten beobachtet und daraus eine Sättigungskonzentration bestimmt werden.

### 3.5.3 Phospholipid-Gehalt und Verteilung mittels NMR-Spektroskopie

Um einen Vergleich mit den gewonnenen Analyseergebnissen aufstellen zu können, wurde nach einem Labor gesucht, welches eine Analyse des Phospholipid-Gehalts und dessen Verteilung durchführen konnte. Die Spectral Service AG aus Köln ist in der Lage solche Analysen durchführen und hat sich dazu bereit erklärt diese Forschungstätigkeit zu unterstützen. Die verwendete Methode, Instrumente und Standards sind nachfolgend angeführt.

#### 3.5.3.1 Probenvorbereitung

Es sollten zwei unterschiedliche Proben bezüglich ihres Gesamtgehalts und Verteilung der Phospholipide untersucht werden: Das mittels CO<sub>2</sub> Hochdruckextraktion entölte Eigelbpulver und das daraus mittels Ethanol Extraktion gewonnene Extrakt.

Dazu wurden die Proben in deuteriertem Chloroform, Methanol und in wässriger Caesium-Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung aufgelöst, geschüttelt und die organische Phase anschließend mittels einer Zentrifuge abgeschieden. Als interner Standard wurde Triphenylphosphat verwendet und auf gleiche Art wie die Proben vorbereitet.

### 3.5.3.2 Verwendete Geräte

Analysemethode: quantitative P-NMR-Spektroskopie gemäß SAA-MET002-04

Instrument: Bruker Avance III 600 MHz mit automatischem Probengeber und BBO Kryo-Messkopf

### 3.5.4 Fettsäureverteilung mittels GC

Durch den Prozessschritt der Entölung des sprühgetrockneten Eigelb-Pulvers mit überkritischem Kohlendioxid konnte die Triglyceride des Eigelb-Pulvers gewonnen werden. Dieses Nebenprodukt sollte auch auf seine Zusammensetzung untersucht werden.

Unterstützt wurde ich dabei von Prof. Erich Leitner vom Institut für analytische Chemie und Lebensmittelchemie. Die Analysen sowie die dafür notwendige Probenvorbereitung wurden nach der Arbeitsvorschrift des Institutes durchgeführt [52].

Wie in Kapitel 2.8.1.1 erwähnt, lassen sich Triglyceride nicht direkt chromatographisch analysieren. Um eine Fettsäureverteilung mittels Gaschromatographie zu erhalten, müssen die Proben speziell vorbereitet werden. Um die Fettsäuren vom Glycerin Molekül abzuspalten, werden sie zuerst verseift. Dadurch werden die Ester-Verbindungen aufgebrochen. Die dadurch erhaltenen Salze der Fettsäuren müssen anschließend zu Fettsäuremethylestern derivatisiert werden. Im Gegensatz zu den jeweiligen Fettsäuren sind diese unpolar und moderat flüchtig und eignen sich für die GC-Analyse [42] [46]. Die genaue Vorgehensweise wird nachfolgend beschrieben.

#### 3.5.4.1 Probenvorbereitung

Es wurden 20 mg der Probe (CO<sub>2</sub> extrahiertes Ei-Öl) in einem 40 ml Glasvial eingewogen. Als interner Standard wurde Triundecanoin, 35 µl von 30 g/L in Heptan entsprechen 1 mg, hinzu pipettiert.

Anschließend wurden die Proben einer Verseifungsreaktion unterzogen. Dazu wurden 6 ml 0,5M methanoloische NaOH hinzu pipettiert. Für die Verseifung wird über eine Zeitspanne von 30 Minuten in einem thermostatisierten Heizblock bei 80°C unter Rühren hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur ausgekühlt.

Alle Proben mussten noch derivatisiert werden. Dazu wurden sie mit 4,5 ml 20%igem methanolischen Bortriflourid versetzt und 15 Minuten lang im thermostatisiertem Heizblock bei 80°C gerührt.

Die Extraktion der Fettsäuremethylester erfolgte bei Raumtemperatur unter Zugabe von 10 ml gesättigter, wässriger NaCl Lösung und 10 ml Heptan. Nachdem die Proben über eine Minute am Vortex gemischt wurden, wurde die Heptanphase (obere) in Microvilas abgefüllt und anschließend direkt auf dem GC-FID analysiert.

### 3.5.4.2 Verwendete Geräte

Die im Zuge dessen verwendeten Geräte sind nachfolgen angeführt.

GC HP 5890 Series II

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)

Säule: polaren GC Säule (WAX, 30m x 0.25mm x 0.25µm)

Von den Proben und den Fettsäuremethylester-Standards (FAME oder GLC 68 C, 2g/L in Heptan) wird je 1 µL per Injektor injiziert.

Injektor Temperatur: 220°C

Detektor Temperatur: 260°C

Einlass Druck: 145 kPa

Ofenprogramm: Von 50°C auf 140°C mit 15°C/min und anschließend mit 8°C/min auf die Endtemperatur von 250°C



### 3.6 Herstellung der O/W Emulsion

Um die Emulsion bzw. die Wirkung des Emulgator vergleichen und bewerten zu können, wurden alle Test-Emulsionen nach derselben standardisierten Herstellvorschrift des Naturstofflabors hergestellt [53].

Wie in Kapitel 2.2 erwähnt, besteht eine solche Feuchtigkeitsemulsion (O/W) aus einer Öl- und Wasser-Phase, einem Emulgator und unterschiedlichen Wirkstoff-Phasen (ölig und wässrig). Lecithin stellt dabei zugleich einen Emulgator und einen Wirkstoff dar (Kapitel 2.5.3).

Es wurden außerdem Emulsionen mit Lyso-Lecithin aus Soja (Kosmetik Manufaktur Sturmberger) und Bio-Lecithin aus der Sonnenblume (Ivovital) hergestellt. Dadurch konnte der gewonnene Emulgator aus Eigelb mit gängigen Produkten aus dem Handel verglichen werden.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche und Analysen dargestellt und diskutiert. Dadurch kann der optimale Ausgangsstoff, die benötigten Verfahrensschritte und das dadurch gewonnene Produkt festgelegt werden. Durch die Kombination dieser gewonnenen Ergebnisse kann zudem der Prozess für die Phospholipid-Gewinnung aus Eigelb dargestellt werden.

### 4.1 Flüssig-Flüssig Extraktion

Bei der Flüssig-Flüssig Extraktion wurde das flüssige Eigelb als zu extrahierender Ausgangsstoff verwendet. Im Vergleich zum Eigelb Pulver brachte diese Methode jedoch einige Nachteile mit sich. Zu Beginn musste das Eigelb von Schale und Eiweiß getrennt werden. Diese Vorbereitungsschritte sind zeitaufwändig und bei der Verwendung von Eigelb-Pulver nicht notwendig. Ein Entölungsschritt mit überkritischem Kohlendioxid war mit der vorhandenen Anlage des Naturstofflabors in Wenigzell nicht realisierbar, da das Aufgabegut im festen Zustand vorliegen muss. Ein weiterer Nachteil ist der Wassergehalt von 51%. Durch diesen musste nach dem Extraktionsvorgang nicht nur das Lösemittel (Ethanol), sondern auch das Wasser entfernt werden.

Bei einem Massenverhältnis von Eigelb zu Lösemittel von 1:2 konnte eine Phospholipid Ausbeute von 41% und eine Reinheit an Phospholipiden von 43% festgestellt werden. Für den Phospholipid-Gehalt wurde die DGF Einheitsmethode verwendet. Anhand dieser Ergebnisse ist ersichtlich, dass im Versuch zu wenig Lösemittel verwendet wurde. Nachdem das Eigelb-Pulver als Ausgangsmaterial geeigneter ist, wurden jedoch keine weiteren Versuche mit dem flüssigen Eigelb durchgeführt.

Aus diesen Versuchen und den entsprechenden Resultaten konnten die Vorteile des Eigelb-Pulvers gegenüber dem flüssigen Eigelb bewiesen werden. Es kann direkt zugekauft, muss nicht weiter aufgetrennt, kann mittels CO<sub>2</sub> Extraktion entölt und anschließend mit Ethanol extrahiert werden. Dadurch konnte untersucht werden, ob eine vorhergehende Entölung des Ausgangsmaterials einen positiven Einfluss auf die nachfolgende Extraktion mit Ethanol aufweist. Die Kriterien dafür sind die Reinheit der gewonnenen Phospholipide und damit ihre Eigenschaften als Emulgator.

## 4.2 Fest-Flüssig Extraktion

Durch die Vorteile des Eigelb-Pulvers wurden unterschiedliche Fest-Flüssig Extraktionen durchgeführt. Dabei wurden Soxhlet Versuche mit verschiedenen Lösemitteln und Ausgangsstoffen untersucht. Zusätzlich wurde noch ein Rührkessel im Labormaßstab für die Extraktion verwendet. Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefasst.

### 4.2.1 Soxhlet-Versuche

#### 4.2.1.1 Hexan

Bei den durchgeführten Versuchen konnten 48% der Masse des zu extrahierenden Eigelb Pulvers extrahiert werden. In Kapitel 2.6.1.2 wurde jedoch ein Triglyceride-Anteil im Eigelb-Pulver von 41% angegeben [26].

Mit Hilfe der DGF Einheitsmethode (Kapitel 3.5.1) konnte der Gehalt an Aceton Unlöslichem (Phospholipide) mit 14,6% festgestellt werden. Dadurch lässt sich der oben erwähnte Triglycerid-Gehalt von 41% berechnen, welcher die Referenz für die Hochdruckextraktion darstellt. Zusätzlich wurden mit der entwickelten HPLC-Methode Phospholipid Peaks in diesem Extrakt nachgewiesen. Hexan stellt dadurch nicht das geeignete Lösemittel für den Entölungsschritt dar, da es neben den Triglyceriden auch Phospholipide löst.

#### 4.2.1.2 Ethanol

Bei der eigentlichen Extraktion der Phospholipide wurde Bio-Ethanol (99% ETOH, 1% Butanon) als Lösemittel verwendet. Als Ausgangsmaterial wurde das sprühgetrocknete sowie das mittels Hochdruck-Extraktion entölte Eigelb-Pulver verwendet und verglichen. In Abbildung 31 werden die beiden Ausgangsmaterialien bezüglich Phospholipid-Ausbeute und Gehalt verglichen. Außerdem wurde die Schüttdichte des Eigelb-Pulvers mit  $312 \text{ kg/m}^3$  und die des entölte Pulvers mit  $272 \text{ kg/m}^3$  festgestellt.

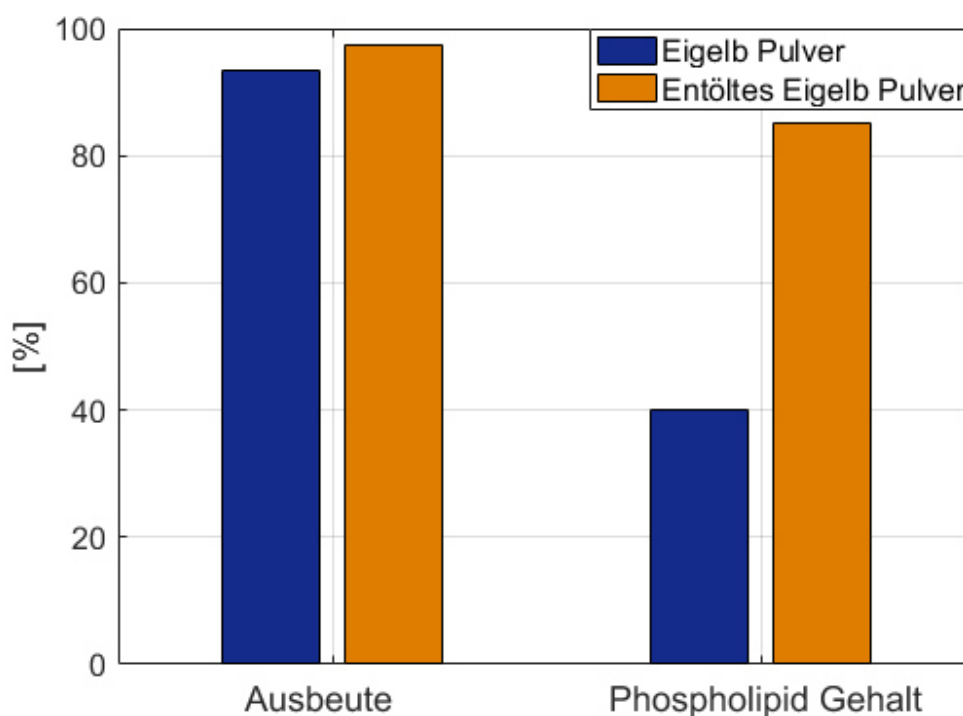


Abbildung 31: Vergleich von Ausbeute und Reinheit der beiden Ausgangsmaterialien

Aus diesen Ergebnissen ist erkennbar, dass bei der Extraktion des Eigelb-Pulvers neben den Phospholipiden auch andere Komponenten mitextrahiert werden. Mit dem Ziel eine maximale Reinheit an Phospholipiden im Extrakt zu gewinnen, ist ein vorhergehender Entölungsschritt mit überkritischem Kohlendioxid von Vorteil.

#### 4.2.2 Löslichkeitsversuche

Die Ergebnisse der untersuchten Löslichkeitsversuche sind in Abbildung 32 dargestellt. Wie in Kapitel 3.5.2.3 erwähnt, wurde für die Erstellung der Geraden zur Kalibrierung der Messung das gewonnene Extrakt verwendet. Bei einer Kalibrierung mit hochreinen Analysestandards würde man eine Kalibrierungsgerade erhalten, welche bis zur Sättigungskonzentration unter einer gleichbleibenden Steigung zunimmt und anschließend einen konstant bleibenden Wert annimmt.

Das Extrakt, welches bei dieser Analyse als Standard verwendet wurde, ist jedoch eine Mischung aus verschiedenen Phospholipiden, die eine unterschiedliche Löslichkeit in Ethanol aufweisen. Dadurch ergeben sich verschiedene Kalibrierungsgeraden mit

unterschiedlichen Steigungen für unterschiedliche Bereiche. Mit Hilfe der Software Table-Curve wurde eine Kalibrierungskurve angepasst.

Bei den letzten beiden Lösungen wurden die Konzentrationen ausreichend hoch gewählt, um sicherzustellen, dass die Sättigungskonzentration erreicht ist.

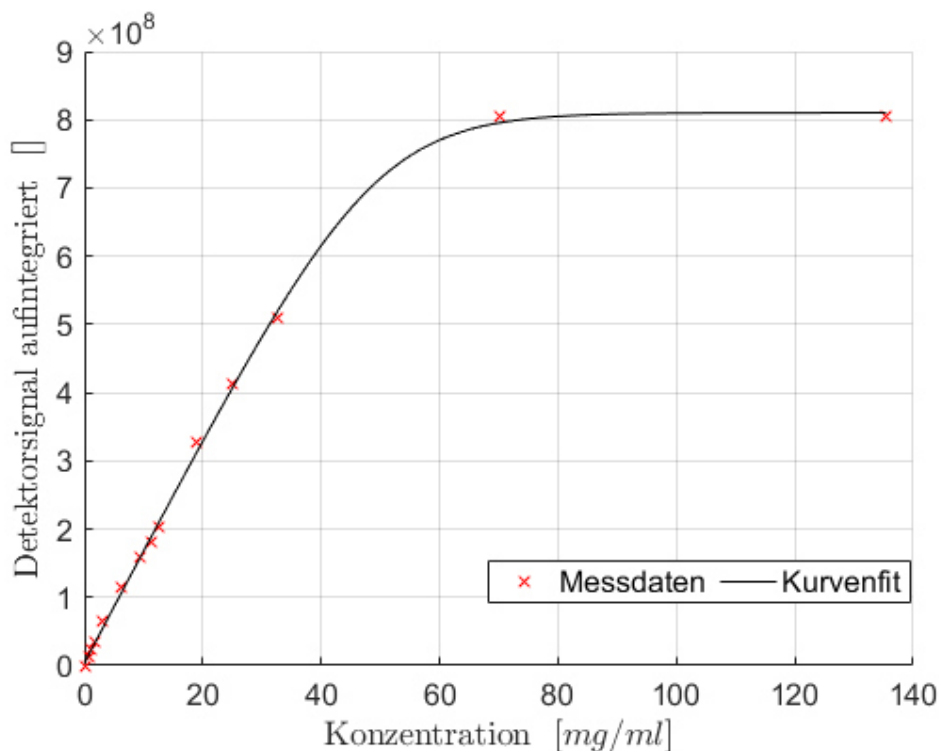


Abbildung 32: Ergebnisse der Löslichkeitsversuche

Mit Hilfe dieser Analysen konnte eine Sättigungskonzentration von 72  $mg/ml$  festgestellt werden. Diese erhaltene Information ist für die spätere Auslegung einer Pilot-Anlage (Folgeforschung) von Bedeutung. Mit Hilfe der Sättigungskonzentration und dem Phospholipid Gehalt im Ausgangsstoff lässt sich auf die benötigte Lösemittelmenge schließen.

### 4.2.3 Rührkesselversuche

Die durchgeführten Rührkesselversuche ergeben zusätzlichen Aufschluss über die Sättigungskonzentration und die Geschwindigkeit des Extraktionsvorganges. Die Ergebnisse beziehen sich auf eine bestimmte Temperatur ( $20^{\circ}C$ ) und auf ein bestimmtes Massenverhältnis (1:4) von Aufgabegut zu Lösemittel. In Abbildung 33 sind die

gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Die mittels HPLC gewonnenen Werte wurden mit Hilfe der zuvor erwähnten Löslichkeitsversuche und der daraus resultierenden Löslichkeitskurve bewertet.

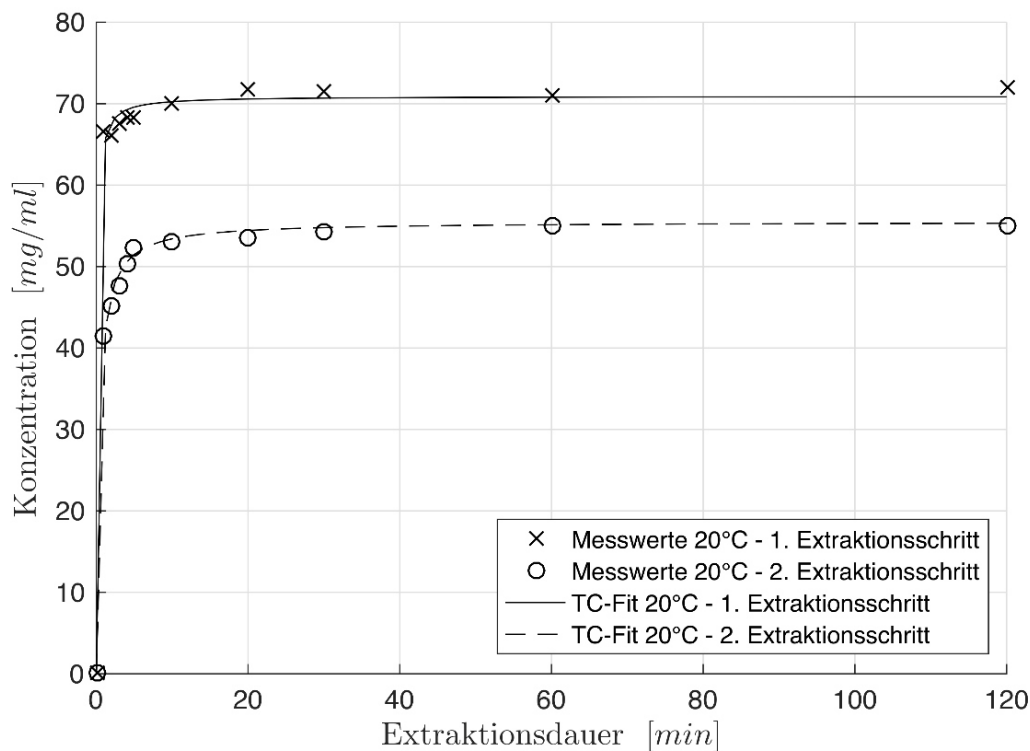


Abbildung 33: Ergebnisse der Rührkesselversuche

Diese Versuche geben Aufschluss über die benötigte Lösemittelmenge. Bei dem gewählten Massenverhältnis von Aufgabegut zu Lösemittel konnten in einem zweiten Extraktionsschritt erneut Phospholipide extrahiert werden. Um eine höhere Ausbeute zu erzielen, muss demzufolge eine größere Menge an Lösemittel verwendet werden.

Die Motivation, diese Versuche durchzuführen waren apparatebautechnischer Natur. Die Ergebnisse dieser Versuche sollen dabei helfen, Entscheidungen in Hinblick auf eine spätere Steigerung der Produktmenge zu treffen. Dazu wurden zusätzlich Laborversuche bezüglich des Druckverlustes durchgeführt. Der Druckverlust, welcher durch die Schüttung des feinen, porösen Pulvers hervorgerufen wird, ist jedoch sehr hoch. Dadurch gestaltet sich die Abtrennung des Feststoffes vom Lösemittel und dem darin gelösten Extrakt als überaus aufwendig.

## 4.2.4 Temperatureinfluss

Zusätzlich sollte die Temperaturbeständigkeit des Lecithins überprüft werden. Dabei wurde beobachtet, dass sich das Extrakt, wenn es für längere Zeit 78°C (Siedetemperatur Ethanol) ausgesetzt war, dunkel verfärbte und einen unangenehmen Geruch entwickelte. Durch die Kombination von Soxhlet-Versuchen, durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck und einer späteren schonenden Lösemittel Rückgewinnung mittels Rotationsverdampfer und Vakuumpumpe, konnte dieses Problem nicht beobachtet werden. In Abbildung 34 sind die Dampfdruckkurven von Ethanol und Butanon dargestellt. Sie wurden mit Hilfe der nachfolgenden Antoine-Gleichung berechnet. Die dafür verwendeten Antoine-Parameter für Ethanol [51] und Butanon [54] sind ebenfalls in der Abbildung angegeben. Bei einem Unterdruck von 100 mbar reicht eine Temperatur von 30°C aus, um das Lösemittel zu verdampfen.

$$\log_{10} p_s = A - \frac{B}{C + T}$$

$p_s$  ... Sättigungsdampfdruck in [bar]

T ... Temperatur in [K]

A, B, C ... Antoine Parameter

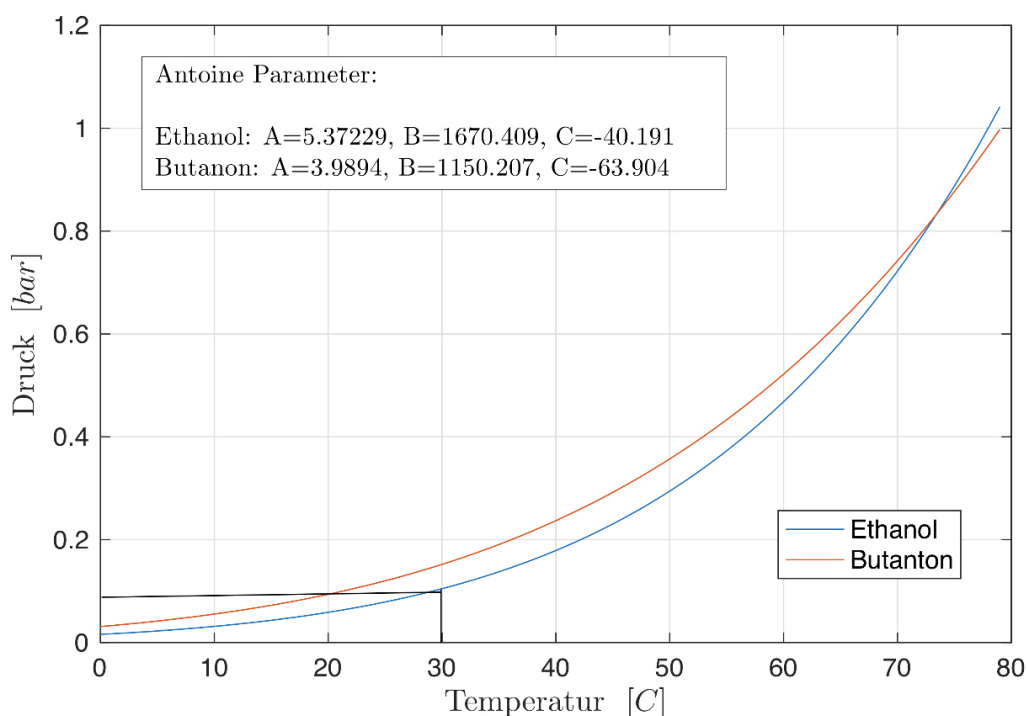


Abbildung 34: Dampfdruckkurve von Ethanol und Butanon

## 4.3 Hochdruckextraktion

Bei der Hochdruckextraktion mit überkritischem Kohlendioxid als Lösemittel sind neben der maximalen Ausbeute vor allem der optimale Druck, die optimale Temperatur und die Extraktionsdauer von Interesse. Außerdem kann mit Hilfe der Gaschromatographie ein Fettsäure-Spektrum des gewonnenen Extraktes erstellt werden.

### 4.3.1 Druck- und Temperatureinfluss

Die Prozess-Parameter Druck und Temperatur haben einen entscheidenden Einfluss auf Extraktionsgeschwindigkeit und Ausbeute. Wie in Kapitel 2.7.3.4 erwähnt, resultiert die Steigerung des Extraktionsdrucks in einer zunehmenden Kohlendioxid-Dichte. Die Erhöhung der Extraktionstemperatur wirkt sich zum einen negativ auf die Dichte aus. Zum anderen bewirkt die Erhöhung eine Steigerung des Dampfdrucks der zu extrahierenden Komponenten, welche sich positiv auf die Extraktion auswirken kann.

In Abbildung 35 und Abbildung 36 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurden alle Versuche mit einem CO<sub>2</sub> Durchfluss von 4 l/min durchgeführt. Die blauen Linien stellen einen Referenzwert für die Extraktion dar. Als Lösemittel wurde Hexan verwendet. Bei der blau strichlierten Linie ist erkennbar, dass 48% der Masse des Aufgabeguts extrahiert wurden. In Kapitel 4.2.1.1 wurde ein Triglycerid-Gehalt von 41% (blaue Linie) berechnet. Diese 41% stellen also eine 100%ige Triglycerid-Ausbeute dar.



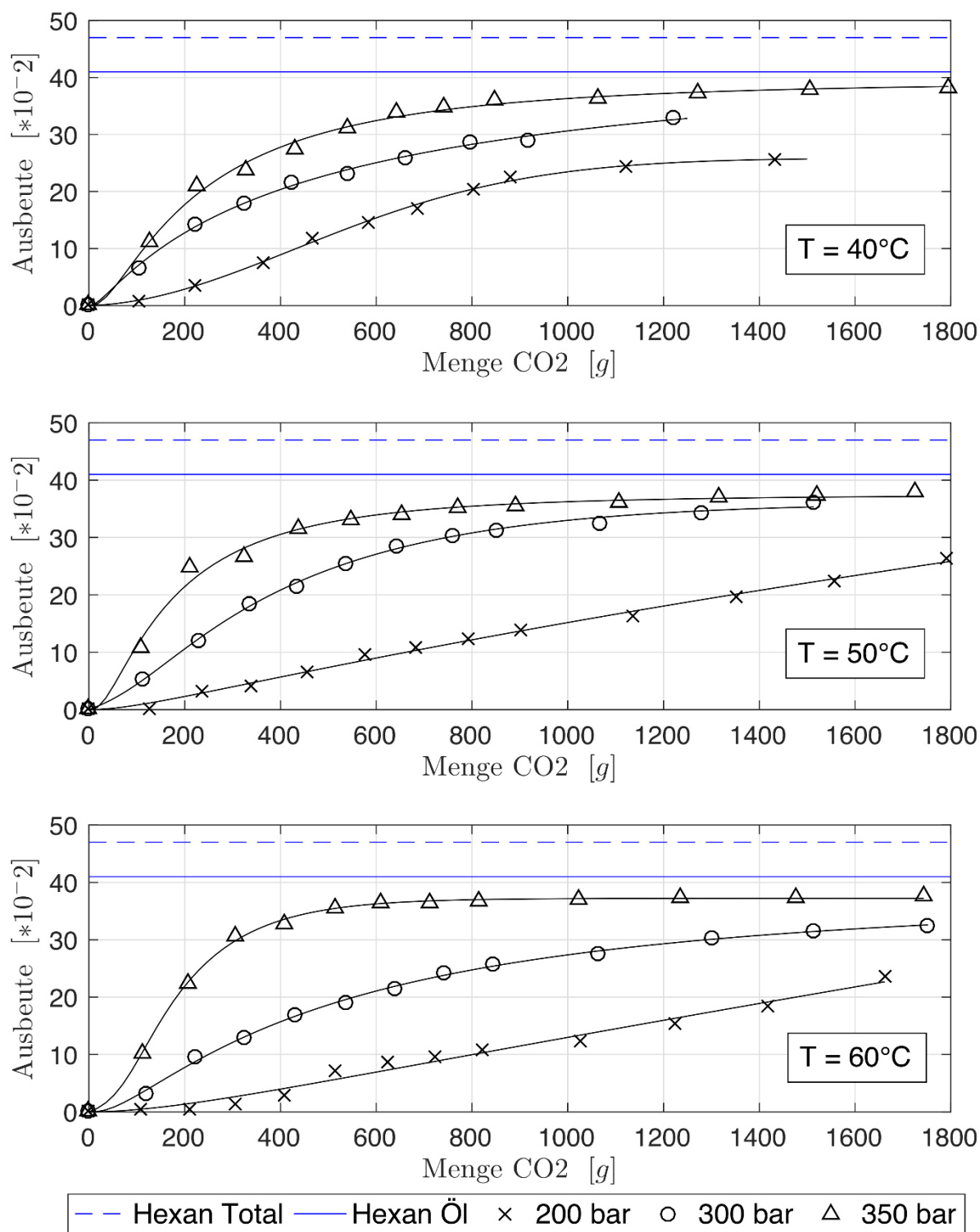


Abbildung 35: Druckabhängigkeit bei konstanter Temperatur

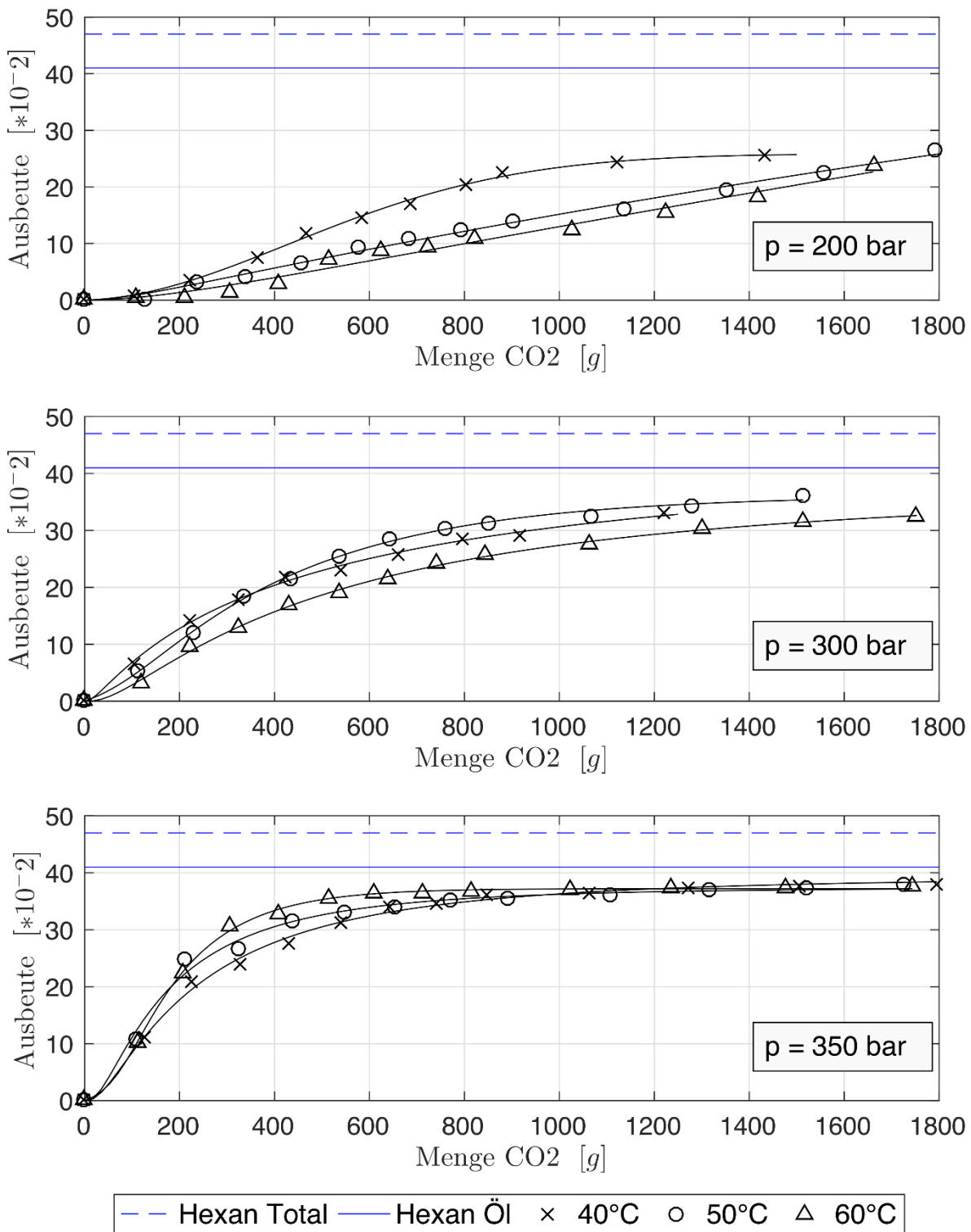


Abbildung 36: Temperaturabhängigkeit bei konstantem Druck

Die gewonnenen CO<sub>2</sub> Extrakte wurden mittels DGF Einheitsmethode und der entwickelten HPLC Methode auf Phospholipide untersucht. Dabei konnten mit beiden Methoden keine Phospholipide nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.1.1 stellt überkritisches Kohlendioxid einen schonenderen Entölungsschritt dar, als die Extraktion mit Hexan.

Basierend auf den erlangten Ergebnissen konnten nun die optimalen Extraktionsparameter Druck und Temperatur für eine geforderte Ausbeute festgestellt werden. Dabei soll die dafür benötigte Lösemittelmenge so gering wie möglich sein. Diese Menge muss mit dem Aufgabegut in Kontakt treten. Je höher diese ist, desto mehr Pumpleistung ist dafür erforderlich. Demnach beeinflusst der Energiebedarf der Pumpe direkt die Herstellungskosten für den Emulgator.

Die besten Ergebnisse konnten bei 350 bar erreicht werden. Eine Temperaturerhöhung hatte bei dem festgelegten Druck nur einen geringfügig positiven Einfluss auf die Extraktion. Somit wurde die Extraktion bei einer naturstoffschonenden Temperatur von 40°C durchgeführt. Bei einem Extraktionsdruck von 350 bar konnte die maximale Ausbeute an Triglyceriden von 93% bei einer vergleichsweise niedrigen benötigten Lösemittelmenge erreicht werden. Durch die geringere benötigte Lösemittelmenge ergibt sich ein schnellerer Extraktionsvorgang.

### 4.3.2 Fettsäureverteilung

Bei den Versuchen mit der Pilot-Anlage wurde die Probennahme alle 15, und gegen Ende der Extraktion, alle 30 Minuten durchgeführt. Anhand der Analyse aller Proben konnte die jeweilige Fettsäurezusammensetzung bei einer zugehörigen Extraktionszeit festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Fettsäureverteilung aller Proben blieb nahezu ident. Es konnten keine signifikanten Trends bezüglich der Selektivität der einzelnen Fettsäuren in Bezug auf das Lösemittel festgestellt werden.

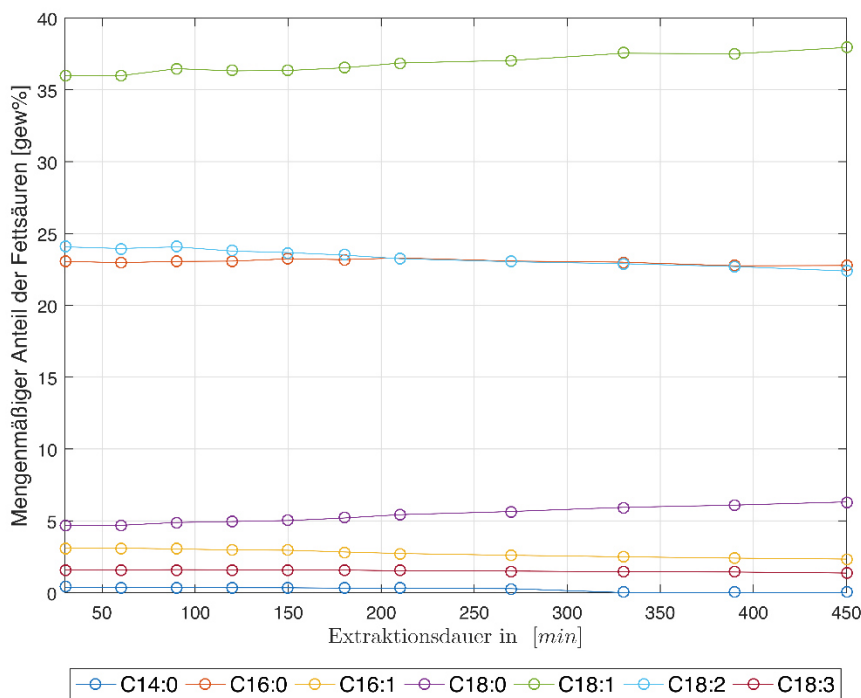


Abbildung 37: Fettsäurezusammensetzung (gew%) von sequentiellen CO<sub>2</sub> Extrakten von Eigelb-Pulver (p=300 bar, T=40°C,  $\dot{V}$ =15 l/h)

Mit den erhaltenen Werten aus Abbildung 37 konnten Durchschnittswerte für die einzelnen Fettsäuren errechnet werden. Dieses Fettsäure-Spektrum ist in Abbildung 38 dargestellt.

Zusätzlich wurde die entwickelte HPLC-Methode und die DGF-Einheitsmethode verwendet, um sicherzustellen, dass keine Phospholipide mittels CO<sub>2</sub> extrahiert wurden. Es konnten bei beiden Methoden keine Phospholipide im CO<sub>2</sub> Extrakt gefunden werden.

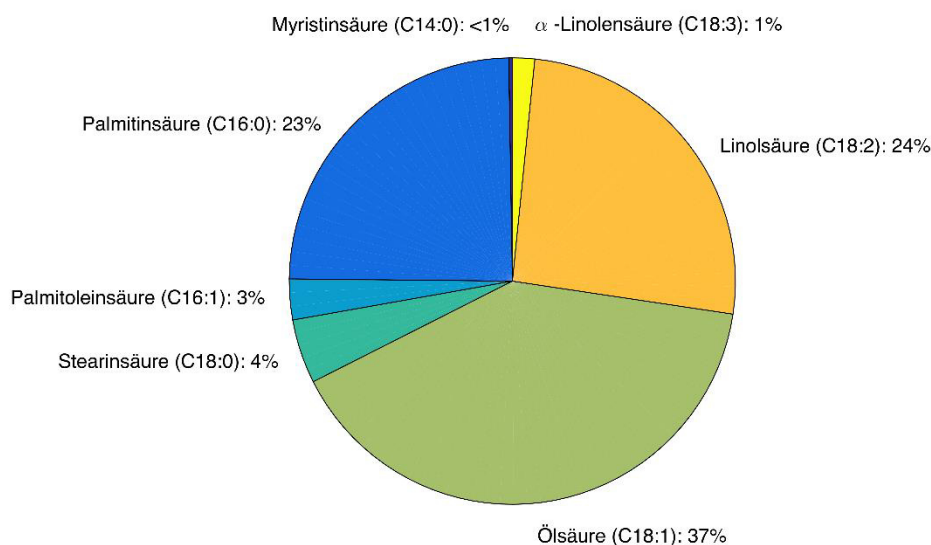


Abbildung 38: Durchschnittliches Fettsäure-Spektrum des CO<sub>2</sub>-Extrakts

## 4.4 Phospholipid-Gehalt und Verteilung mittels NMR-Spektroskopie

Von Interesse ist außerdem die Phospholipid-Verteilung im Ausgangsmaterial vor der Extraktion und im gewonnenen Extrakt. Durch den Vergleich dieser beiden Verteilungen kann eine Aussage über die Selektivität der einzelnen Phospholipide auf das verwendete Lösemittel gemacht werden.

Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 39 dargestellt und werden anschließend erläutert. Der Anteil der Phospholipide betrug dabei im entöltem Eigelb-Pulver 30,26% und im gewonnenen Extrakt 82,86%.

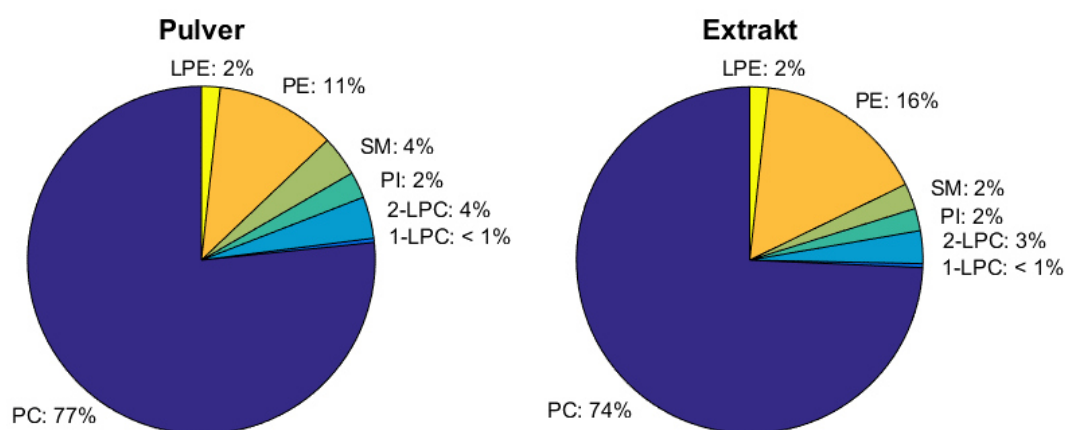


Abbildung 39: Phospholipid Verteilung des entölten Eigelb-Pulvers und des Extraktes in mol%

In Kapitel 2.6.1.2 wurde der Phospholipid Gehalt des entölten Eigelb-Pulvers unter der Annahme, dass das gesamte Wasser und alle Triglyceride entfernt wurden, mit 31,5% berechnet. Die Abweichung zum, mittels NMR analysiertem PL-Gehalt von 30,26%, beträgt 1,3%. Der Wassergehalt im entölten Eigelb-Pulver wurde mittels Trockensubstanz Messung festgestellt und beträgt 0,1%. Die Ausbeute der CO<sub>2</sub> Hochdruckextraktion beträgt 93%. Daraus ist erkennbar, dass sich noch Triglyceride im entölten Eigelb-Pulver befinden. Dadurch kann diese Abweichung begründet werden. Wie bei Naturprodukten üblich, kann außerdem eine natürliche Abweichung unter den verwendeten Eiern auftreten.

Durch die zusätzliche Analyse eines unbeteiligten Labors konnte außerdem festgestellt werden, dass die DGF-Einheitmethode zum Nachweis des Phospholipid

Gehalts, belastbare Ergebnisse liefert. Im Vergleich mit der NMR-Analyse trat eine Abweichung von 2,26% auf.

## 4.5 Bewertung der Emulsionen

Die Bewertung der hergestellten Test-Emulsionen wurde nach verschiedenen Kriterien bewertet. Für die Herstellung sind die Verarbeitbarkeit und die Dosierfähigkeit des Emulgators von Interesse. Für die spätere Verwendung sind vor allem die Haltbarkeit, der Geruch, die Verträglichkeit, das Tragegefühl und die Schmierfähigkeit entscheidend.

Verglichen wurden die hergestellten Emulgatoren mit zugekauftem Soja Lyso-Lecithin und Sonnenblumen-Lecithin.

Es konnte rasch festgestellt werden, dass der Emulgator aus den Phospholipiden des Eigelbs im Vergleich mit dem Lyso-Lecithin aus Soja die gewünschten Ergebnisse liefert. Daher konnte auf eine zeitaufwändige und kostenintensive enzymatische Umwandlung zu Lyso-Lecithin verzichtet werden. Im Vergleich dazu wurden zusätzlich Versuche mit Sonnenblumen-Lecithin durchgeführt. Jedoch konnten dabei keine stabilen Emulsionen erzeugt werden.

In Abbildung 40 sind drei der hergestellten Emulsionen dargestellt und werden nachfolgend kurz beschrieben (v.l.n.r.). Alle Emulsionen wurden für mindestens 30 Tage stehen gelassen, um eine eventuelle Phasentrennung beobachten zu können. Bei der ersten Emulsion erkennt man, dass keine Stabilität der Emulsion gegeben ist. Der verwendete Emulgator war dabei eine, aus dem flüssigen Eigelb gewonnene Phospholipid-Fraktion mit einem zu geringen Anteil an Phospholipiden. Die weiteren zwei Emulsionen wurden mit dem, aus entöltem Eigelb-Pulver gewonnen Extrakt hergestellt. Bei der Emulsion 2 treten Konsistenzprobleme auf, welche direkt mit der Menge an verwendetem Emulgator in Verbindung stehen. Die letzte Emulsion stellt das Endprodukt mit der gewünschten Konsistenz und Farbe dar.



Abbildung 40: Optischer Vergleich der hergestellten Emulsionen

## 4.6 Prozess

Mit Hilfe der Ergebnisse aus diesem Kapitel konnte die Phospholipid-Gewinnung aus Eigelb optimiert werden. Eine schematische Darstellung des realisierten Prozesses ist in Abbildung 41 dargestellt.

Als Ausgangsmaterial für die Phospholipid-Gewinnung kommt sprühgetrocknetes Eigelb Pulver zum Einsatz. Dieses wird zu Beginn mittels Hochdruckextraktion mit überkritischem Kohlendioxid entölt. Bei diesem Vorgang konnten bei 350 bar und 40°C, 93% der Triglyceride extrahiert werden. In Bezug auf eine Minimierung der benötigten Lösemittelmenge und eine Maximierung der Ausbeute sind das die optimalen Parameter. Mit Hilfe einer NMR-Analyse des entölten Pulvers konnte ein Phospholipid-Gehalt von 30,3 gew% festgestellt werden. Den nächsten Schritt stellt die Extraktion der Phospholipide mit Bio Ethanol dar. Dabei konnte bei Umgebungsdruck eine Phospholipid Ausbeute von 98% erreicht werden. Dieser Schritt sowie die anschließende Lösemittelrückgewinnung sollen jedoch bei einem Unterdruck von 100 mbar durchgeführt werden. Dadurch kann eine schonende Bedingung für die Naturstoffe sichergestellt werden. Bei Lecithin konnte, wenn es für längere Zeit hohen Temperaturen ausgesetzt war, eine Veränderung der Farbe und des Geruchs beobachtet werden. Das Endprodukt weist eine Reinheit an Phospholipiden von 82,8% (NMR-Analyse) auf.

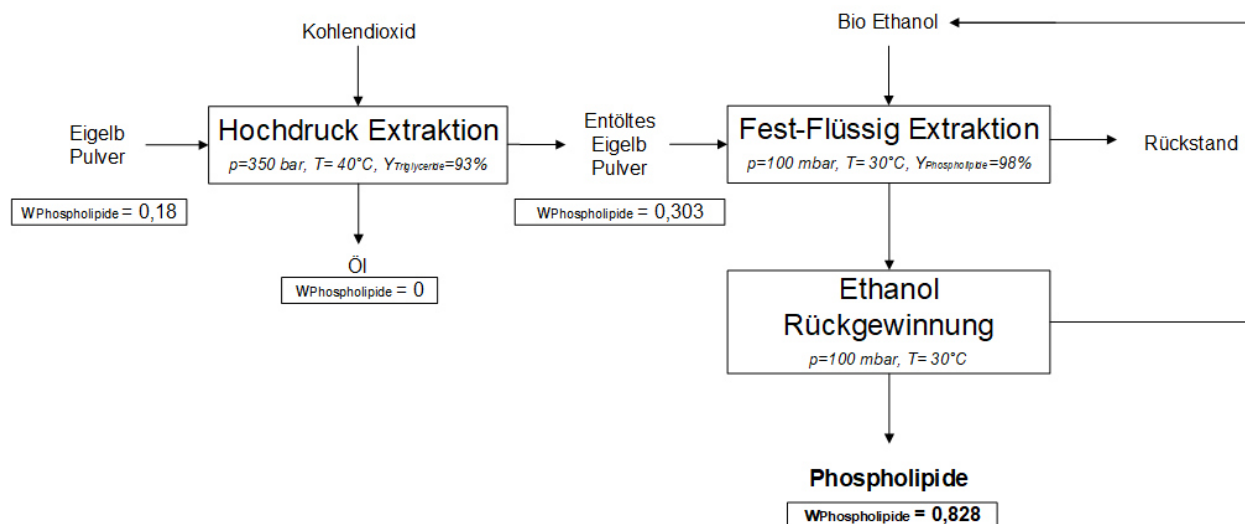


Abbildung 41: Gewinnungsprozess

Das Hauptprodukt sind Phospholipide, welche als Emulgator verwendet werden. Jedoch fallen bei der Verwendung dieses Prozesses noch zwei weitere Produkte an, die für Naturkosmetik und als Nahrungsergänzungsmittel genutzt werden können. Das Öl, welches durch die Hochdruckextraktion gewonnen wird, ist frei von jeglichem Lösemittel und kann zur Seifenherstellung genutzt werden. Nach der Extraktion mit Ethanol bleiben größtenteils Proteine, kleinere Mengen an Kohlenhydraten und Spuren von Mineralstoffen zurück. Diese Nebenprodukte können ebenso im Bereich der Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden.



## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit, einen geeigneten Emulgator für die Naturkosmetik aus Eigelb herzustellen, konnte erfolgreich realisiert werden. Dazu wurden die Ergebnisse unterschiedlicher Versuche ausgewertet, interpretiert und daraus ein geeignetes Gewinnungsverfahren erarbeitet. Es wurde ein geeigneter Ausgangsstoff gewählt und der kaskadische Einsatz von Lösemittlextraktion in Verbindung mit CO<sub>2</sub> Hochdruckextraktion zur Produktgewinnung angewandt.

Die Vorteile des sprühgetrockneten Eigelb-Pulvers gegenüber dem flüssigen Eigelb sind vor allem die direkte Verwendbarkeit ohne benötigte Vorbereitungsschritte. Zudem stand für diese Forschung eine Hochdruckextraktionsanlage zur Verfügung, für welche das zu extrahierende Gut im festen Zustand vorliegen musste.

Mit Hilfe der durchgeführten Versuche konnte bewiesen werden, dass eine vorhergehende Entölung mit überkritischem Kohlendioxid durchführbar ist und sich diese positiv auf die Reinheit des Endproduktes auswirkt. Für diesen Prozessschritt betragen die idealen Parameter Druck und Temperatur 350 bar und 40 °C in Bezug auf die maximal mögliche Ausbeute. Dabei kann eine Triglycerid-Ausbeute von 93% erreicht werden.

Die anschließende Fest-Flüssig Extraktion mit Ethanol eignet sich, um die Phospholipide aus dem entölten Eigelb-Pulver zu extrahieren. Es wurden, mit Hinblick auf eine spätere mögliche Steigerung der Produktionsmenge, unterschiedliche Extraktionsmethoden, der Temperatureinfluss auf das Produkt und Löslichkeitsversuche durchgeführt. Dadurch können negative Auswirkungen auf das Produkt beobachtet werden. Wenn es beispielsweise für längere Zeit zu hoher Temperatur ausgesetzt war. Zusätzlich kann ein enormer Druckverlust, der durch das entölte Pulver zustande kommt, experimentell veranschaulicht werden. Durch die Interpretation dieser Ergebnisse kann, bei einer zukünftig zum Einsatz kommenden Pilot-Anlage unter Unterdruck und mittels Perkolation extrahiert werden.

Der Phospholipid-Gehalt und die Verteilung der Phospholipide im Endprodukt stellen die wichtigsten Bewertungsfaktoren für den Emulgator dar. Um diese Faktoren in einem späteren Produktionsprozess testen zu können, wurde eine HPLC-Methode für das Labor erstellt. Außerdem stellt die DGF-Einheitmethode ein schnelles Verfahren

zur Analyse des Phospholipid-Gehalts dar. Die Ergebnisse dieser Methode wurden mit jenen einer NMR-Analyse verglichen und dadurch konnte die DGF-Methode als geeignet anerkannt werden.

Der hergestellte Emulgator konnte eine Reinheit an Phospholipiden von 83% (davon 76% Phosphatidylcholin) bei einer Ausbeute von 98% aufweisen und die Funktion als Emulgator für eine O/W Emulsion gewährleisten. Dazu wurde auch der Vergleich mit einem in der Naturkosmetik üblichen Emulgator aufgestellt. Aufgrund des höheren Anteiles des qualitativ hochwertigeren Phosphatidylcholins und dessen Lyso-Form im Eigelb im Vergleich zur Sojabohne, war keine enzymatische Umwandlung zu Lyso-Phosphatidylcholin notwendig, um dieselben Ergebnisse bezüglich der Fähigkeit O/W Emulsionen zu bilden, zu erzielen.

## 5.1 Persönliche Erfahrungen

Die Forschungstätigkeit dieser Masterarbeit war von Beginn bis zum Ende sehr informativ und interessant. Vor allem konnte durch die Zusammenarbeit mit der Firma Prozess Optimal und der Technischen Universität Graz eine Kombination von Theorie und Praxis geschaffen werden. Die Herausforderung im Rahmen des Projekts war zum einen die Definition und Einteilung eines Zeitplans und zum anderen ein verwertbares Produkt aus einem Ausgangsstoff mit mehreren hundert Komponenten zu entwickeln.

Für mich persönlich war es vor allem eine außergewöhnliche Erfahrung an allen Phasen einer Produktentwicklung eines regionalen Start-Up Unternehmens teilnehmen zu können.

## 5.2 Motivation für weitere Forschungen

Das Themengebiet der Naturstoffe stellt ein enormes Potential für weitere Forschungen dar. Vor allem der Bereich Simulation bietet dafür unzählige Möglichkeiten.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Masterarbeit wird derzeit eine Konstruktionsübung am Institut für Chemische Verfahrenstechnik und Umwelttechnik der TU Graz

realisiert. Dabei wird der Fest-Flüssig-Extraktionsprozess apparatebautechnisch ausgelegt. Ziel ist es, eine Pilot-Anlage zu planen und statisch und wärmetechnisch zu berechnen, um die Extraktion und die anschließende Lösemittelrückgewinnung zu kombinieren.

Die durch den festgelegten Gewinnungsprozess anfallenden Nebenprodukte bieten zusätzlich großes Potential für weitere Forschungsarbeiten.

## 6 Anhang

### 6.1 Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Bezeichnung
A	-	Antoine Parameter
B	-	Antoine Parameter
C	-	Antoine Parameter
D	m <sup>2</sup> /s	Diffusionskoeffizient
m	kg	Masse
MG	g/mol	molare Masse
p	bar	Druck
r	-	Verhältnis Lösemittel zu Feed
T	°C	absolute Temperatur
V	m <sup>3</sup>	Volumen
$\dot{V}$	m <sup>3</sup> /s	Volumenstrom
v	m <sup>3</sup> /kg	spezifisches Volumen
w	-	Massenbruch
Y	-	Ausbeute

### Griechische Symbole

$\eta$	kg/m s	dynamische Viskosität
$\lambda$	m (meist nm)	Wellenlänge
$\omega$	-	Azentrischer Faktor
$\omega_n$	-	Bezeichnung für Fettsäuren
$\rho$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte

### Tiefgestellte Indizes

c	kritisch
r	reduziert
s	Sättigung

## 6.2 Abkürzungen

EtOH	-	Ethanol
GC	-	Gaschromatographie
HLB	-	Hydrophile-Lipophile Balance
HPLC	-	Hochdruckflüssigkeitschromatographie bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LC	-	Flüssigkeitschromatographie
L-PC	-	Lyso-Phosphatidylcholin
L-PE	-	Lyso-Phosphatidylethanolamin
MAK	-	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MEK	-	Methylethylketon, Butanon
NMR	-	Kernspinresonanz Spektroskopie
O/W	-	Öl - in - Wasser
PA	-	Phosphatidylsäure
PC	-	Phosphatidylcholin
PE	-	Phosphatidylethanolamin
PI	-	Phosphatidyllinositol
PL	-	Phospholipid
PS	-	Phosphatidylserin
SM	-	Sphingomyelin
W/O	-	Wasser in Öl

## 6.3 Analysezertifikate

Analysezertifikat

INT72525-1



Spectral Service AG Postfach 560122 D-50986 Köln

Spectral Service AG  
Emil-Hoffmann-Str.33  
D-50996 Köln

Tel.: +49/(0)2236/96947-0

Fax: +49/(0)2236/96947-11

eMail: Info@spectralservice.de

Analyse-Methode: quantitative  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie gemäß SAA-MET002-04

Instrument: Bruker Avance III 600 MHz mit autom. Probengeber und BBO Kryo-Messkopf

Interner Standard: Triphenylphosphat

Gehalt [%]: 99,9 MG [g/mol]: 326,29

Einwaage Prüfgegenstand [mg]: 101,46

Einwaage Interner Standard [mg]: 31,22

Probenname: Probe 1 EXT\_1, Ch.-B.: 1

Labor-Nr.:

Spectral Service Code: INT72525-1 (A)

Eingang: 03.04.2018

Phospholipide	Gew.-%	Mol.-%	MG [g/mol]
PC	62,78	74,31	775,4
1-LPC	0,21	0,37	505,5
2-LPC	1,64	2,98	505,5
PI	1,87	2,05	835,0
LPI	---*)	---*)	570,0
PS-Na	---*)	---*)	797,2
LPS	---*)	---*)	517,0
SPH	1,94	2,31	770,0
PE	13,52	16,28	762,5
LPE	0,87	1,70	470,0
APE	---*)	---*)	990,0
PG	---*)	---*)	758,0
DPG	---*)	---*)	682,5
PA	---*)	---*)	685,0
LPA	---*)	---*)	430,0
Andere PL	---*)	---*)	770,0
Summe	82,83	100,00	
Phosphor	3,37		

Kommentar: Integrale von Phospholipid-Signalen, die nicht auswertbar sind bzw. zu nicht aufgelisteten Phospholipiden gehören, werden unter „Andere“ angegeben. \*) = nicht detektiert, keine Signalzuordnung

Das Ergebnis bezieht sich ausschließlich auf die von Spectral Service AG analysierte Probe. Da der Spectral Service AG für diesen Analysenauftrag keine Spezifikation vorlag, liegt die Bewertung der Plausibilität des Ergebnisses in der Verantwortung des Auftraggebers.

Seattle, den 20. April 2018

Thorsten Buchen  
Prüfleiter

Das Zertifikat ist durch Original-Unterschrift autorisiert. Eine auszugsweise Verwendung oder Veröffentlichung ist von Spectral Service grundsätzlich nicht autorisiert und darf mit unserem Namen oder einer Unterschrift unserer Mitarbeiter nicht in Zusammenhang gebracht werden. Missbräuchliche Verwendung wird von uns rechtlich verfolgt.

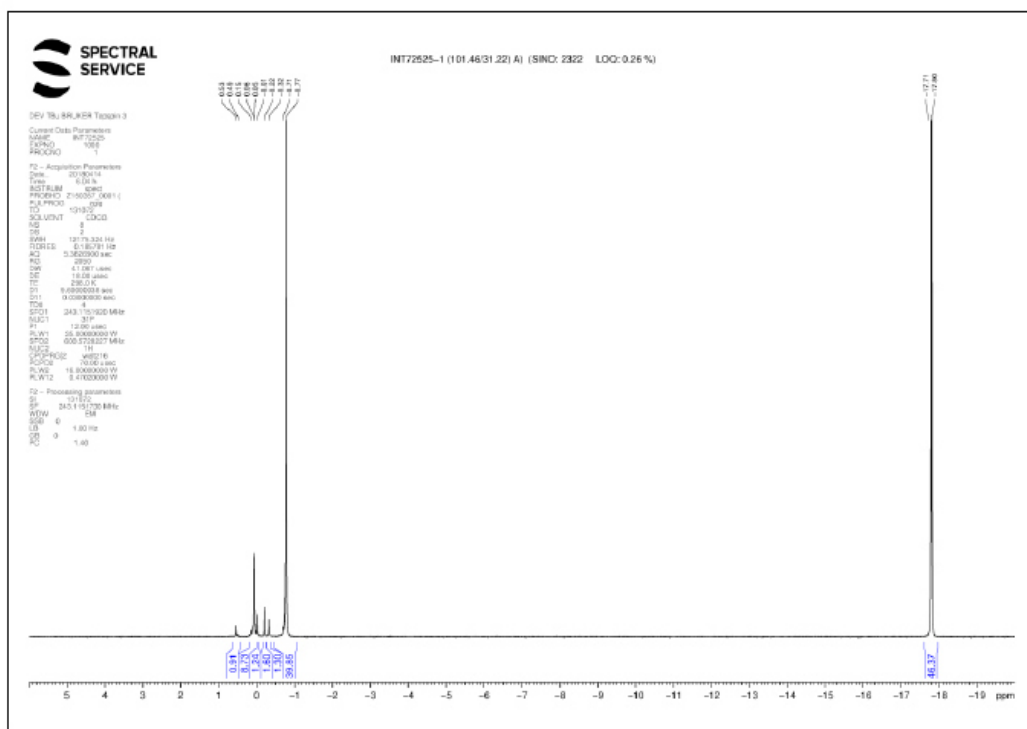
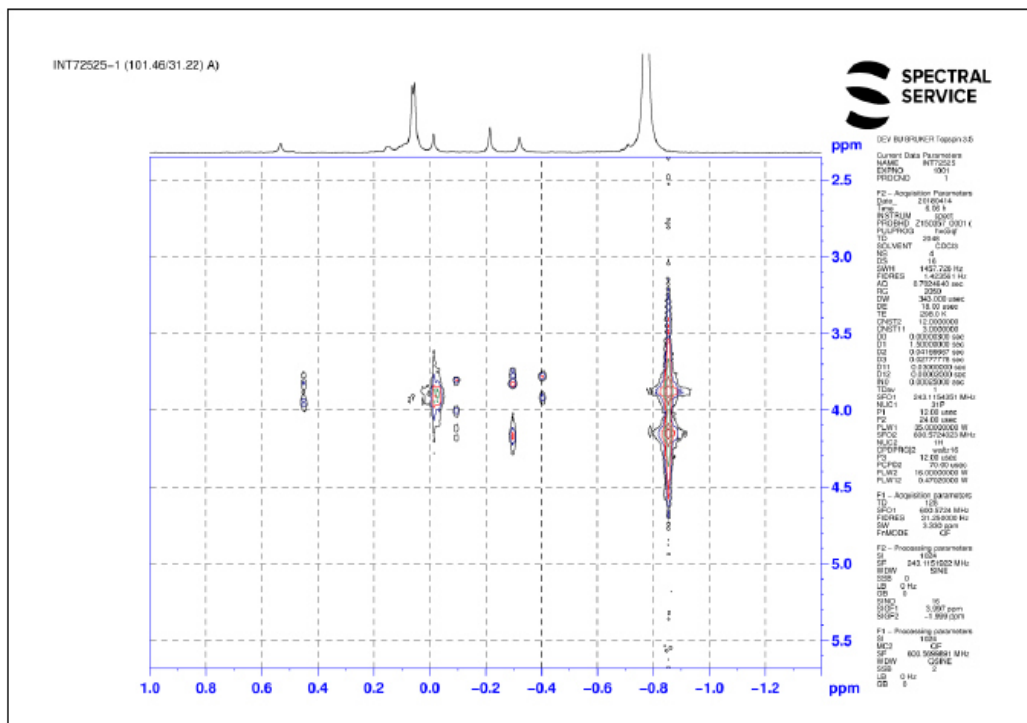


Abb. 1 <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum des Prüfgegenstandes INT72525-1 (A) + TPP



**Analysenzertifikat**  
INT72525-1



Spectral Service AG Postfach 560122 D-50986 Köln

Spectral Service AG  
Emil-Hoffmann-Str.33  
D-50996 Köln

Tel.: +49/(0)2236/96947-0  
Fax: +49/(0)2236/96947-11  
eMail: Info@spectralservice.de

Analysen-Methode: quantitative <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie gemäß SAA-MET002-04

Instrument: Bruker Avance III 600 MHz mit autom. Probengeber und BBO Kryo-Messkopf

Interner Standard: Triphenylphosphat

Gehalt [%]: 99,9 MG [g/mol]: 326,29

Einwaage Prüfgegenstand [mg]: 106,88

Einwaage Interner Standard [mg]: 30,81

**Probenname:** Probe 1 EXT\_1, Ch.-B.: 1

**Labor-Nr.:**

**Spectral Service Code:** INT72525-1 (B)

**Eingang:** 03.04.2018

Phospholipide	Gew.-%	Mol-%	MG [g/mol]
PC	62,87	74,33	775,4
1-LPC	0,20	0,36	505,5
2-LPC	1,72	3,11	505,5
PI	1,94	2,13	835,0
LPI	---*)	---*)	570,0
PS-Na	---*)	---*)	797,2
LPS	---*)	---*)	517,0
SPH	2,07	2,46	770,0
PE	13,18	15,85	762,5
LPE	0,90	1,76	470,0
APE	---*)	---*)	990,0
PG	---*)	---*)	758,0
DPG	---*)	---*)	682,5
PA	---*)	---*)	685,0
LPA	---*)	---*)	430,0
Andere PL	---*)	---*)	770,0
Summe	82,87	100,00	
Phosphor	3,38		

Kommentar: Integrale von Phospholipid-Signalen, die nicht auswertbar sind bzw. zu nicht aufgelisteten Phospholipiden gehören, werden unter „Andere“ angegeben.

\*) = nicht detektiert, keine Signalzuordnung

Das Ergebnis bezieht sich ausschließlich auf die von Spectral Service AG analysierte Probe. Da der Spectral Service AG für diesen Analysenauftrag keine Spezifikation vorlag, liegt die Bewertung der Plausibilität des Ergebnisses in der Verantwortung des Auftraggebers.

Seattle, den 20. April 2018

Thorsten Buchen  
Prüfleiter

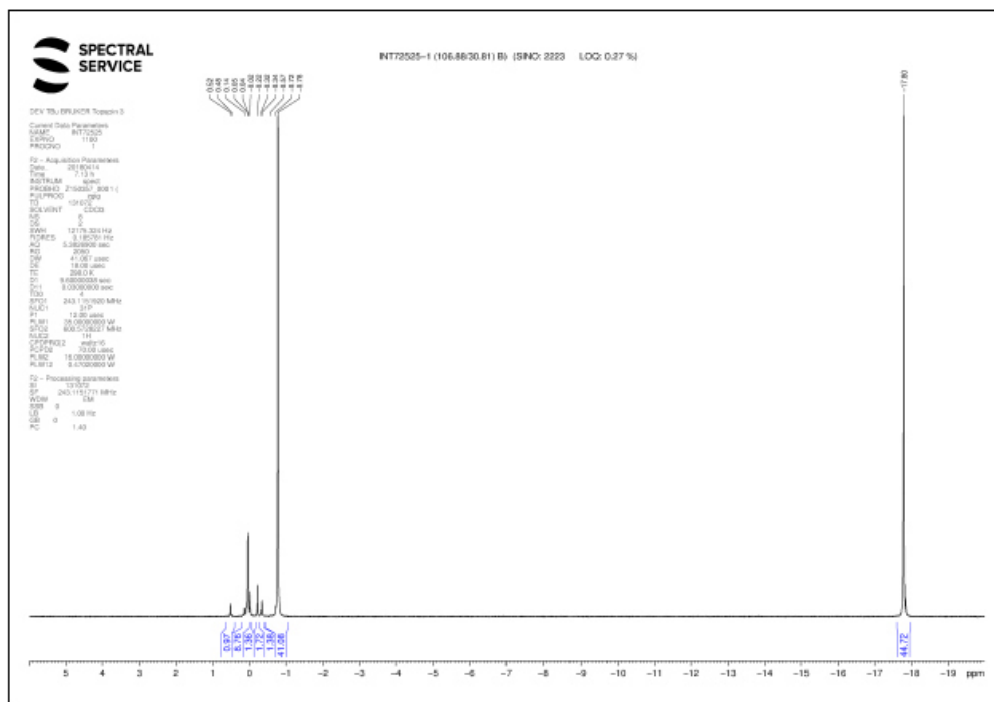
Das Zertifikat ist durch Original-Unterschrift autorisiert. Eine auszugsweise Verwendung oder Veröffentlichung ist von Spectral Service grundsätzlich nicht autorisiert und darf mit unserem Namen oder einer Unterschrift unserer Mitarbeiter nicht in Zusammenhang gebracht werden. Missbräuchliche Verwendung wird von uns rechtlich verfolgt.



Spectral Service AG

Analysezertifikat

INT72525-1

Abb. 1  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Prüfgegenstandes INT72525-1 (B) + TPP

**Analysenzertifikat**  
INT72525-2



Spectral Service AG Postfach 560122 D-50986 Köln

Spectral Service AG  
Emil-Hoffmann-Str.33  
D-50996 Köln

Tel.: +49/(0)2236/96947-0  
Fax: +49/(0)2236/96947-11  
eMail: Info@spectralservice.de

Analysen-Methode: quantitative  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie gemäß SAA-MET002-04

Instrument: Bruker Avance III 600 MHz mit autom. Probengeber und BBO Kryo-Messkopf

Interner Standard: Triphenylphosphat      Gehalt [%]: 99,9      MG [g/mol]: 326,29  
Einwaage Prüfgegenstand [mg]: 1006,28      Einwaage Interner Standard [mg]: 40,78

**Probenname:** Probe 2 Pulv\_1, Ch.-B.: 1      **Labor-Nr.:**  
**Spectral Service Code:** INT72525-2 (A)      **Eingang:** 03.04.2018

Phospholipide	Gew.-%	Mol-%	MG [g/mol]
PC	23,72	76,41	775,4
1-LPC	0,08	0,39	505,5
2-LPC	0,79	3,89	505,5
PI	0,84	2,52	835,0
LPI	---*)	---*)	570,0
PS-Na	---*)	---*)	797,2
LPS	---*)	---*)	517,0
SPH	1,22	3,97	770,0
PE	3,35	10,96	762,5
LPE	0,35	1,86	470,0
APE	---*)	---*)	990,0
PG	---*)	---*)	758,0
DPG	---*)	---*)	682,5
PA	---*)	---*)	685,0
LPA	---*)	---*)	430,0
Andere PL	---*)	---*)	770,0
Summe	30,35	100,00	
Phosphor	1,24		

Kommentar: Integrale von Phospholipid-Signalen, die nicht auswertbar sind bzw. zu nicht aufgelisteten Phospholipiden gehören, werden unter „Andere“ angegeben. \*) = nicht detektiert, keine Signalzuordnung

Das Ergebnis bezieht sich ausschließlich auf die von Spectral Service AG analysierte Probe. Da der Spectral Service AG für diesen Analysenauftrag keine Spezifikation vorlag, liegt die Bewertung der Plausibilität des Ergebnisses in der Verantwortung des Auftraggebers.

Seattle, den 20. April 2018

Thorsten Buchen  
Prüfleiter

Das Zertifikat ist durch Original-Unterschrift autorisiert. Eine auszugsweise Verwendung oder Veröffentlichung ist von Spectral Service grundsätzlich nicht autorisiert und darf mit unserem Namen oder einer Unterschrift unserer Mitarbeiter nicht in Zusammenhang gebracht werden. Missbräuchliche Verwendung wird von uns rechtlich verfolgt.

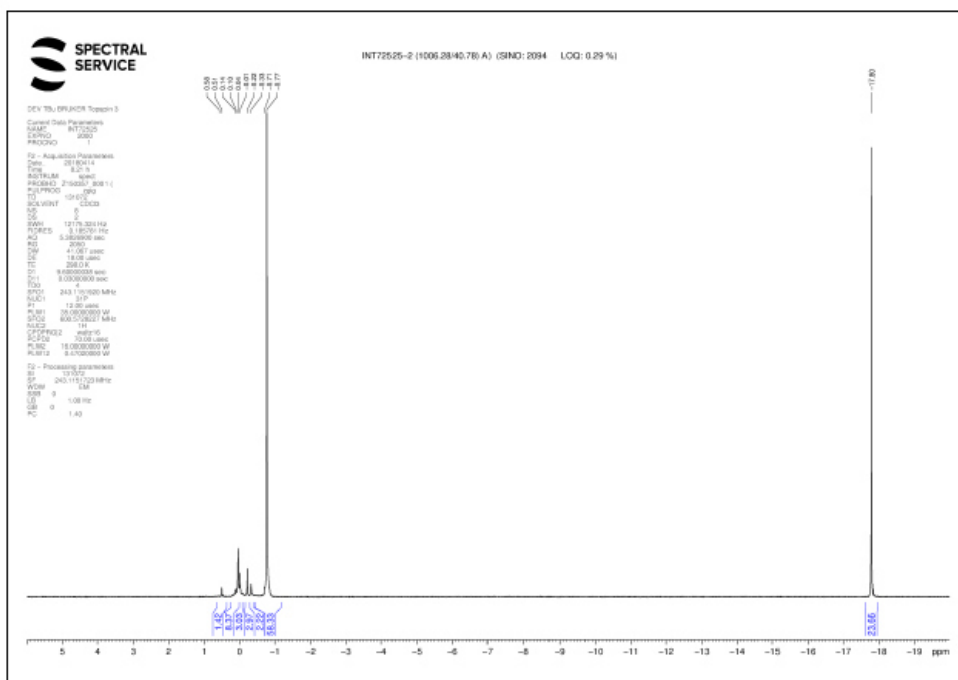


Abb. 1  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Prüfgegenstandes INT72525-2 (A) + TPP

**Analysenzertifikat**  
INT72525-2



Spectral Service AG Postfach 560122 D-50996 Köln

Spectral Service AG  
Emil-Hoffmann-Str.33  
D-50996 Köln

Tel.: +49/(0)2236/96947-0  
Fax: +49/(0)2236/96947-11  
eMail: Info@spectralservice.de

Analysen-Methode: quantitative <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie gemäß SAA-MET002-04

Instrument: Bruker Avance III 600 MHz mit autom. Probengeber und BBO Kryo-Messkopf

Interner Standard: Triphenylphosphat Gehalt [%]: 99,9 MG [g/mol]: 326,29  
Einwaage Prüfgegenstand [mg]: 1012,97 Einwaage Interner Standard [mg]: 40,54

Probenname: **Probe 2 Pulv\_1, Ch.-B.: 1** Labor-Nr.:  
Spectral Service Code: **INT72525-2 (B)** Eingang: **03.04.2018**

Phospholipide	Gew.-%	Mol.-%	MG [g/mol]
PC	23,69	76,84	775,4
1-LPC	0,08	0,39	505,5
2-LPC	0,78	3,86	505,5
PI	0,79	2,38	835,0
LPI	---	---	570,0
PS-Na	---	---	797,2
LPS	---	---	517,0
SPH	1,09	3,55	770,0
PE	3,44	11,36	762,5
LPE	0,30	1,62	470,0
APE	---	---	990,0
PG	---	---	758,0
DPG	---	---	682,5
PA	---	---	685,0
LPA	---	---	430,0
Andere PL	---	---	770,0
Summe	30,16	100,00	
Phosphor	1,23		

Kommentar: Integrale von Phospholipid-Signalen, die nicht auswertbar sind bzw. zu nicht aufgelisteten Phospholipiden gehören, werden unter „Andere“ angegeben. \*) = nicht detektiert, keine Signalzuordnung

Das Ergebnis bezieht sich ausschließlich auf die von Spectral Service AG analysierte Probe. Da der Spectral Service AG für diesen Analysenauftrag keine Spezifikation vorlag, liegt die Bewertung der Plausibilität des Ergebnisses in der Verantwortung des Auftraggebers.

Seattle, den 20. April 2018

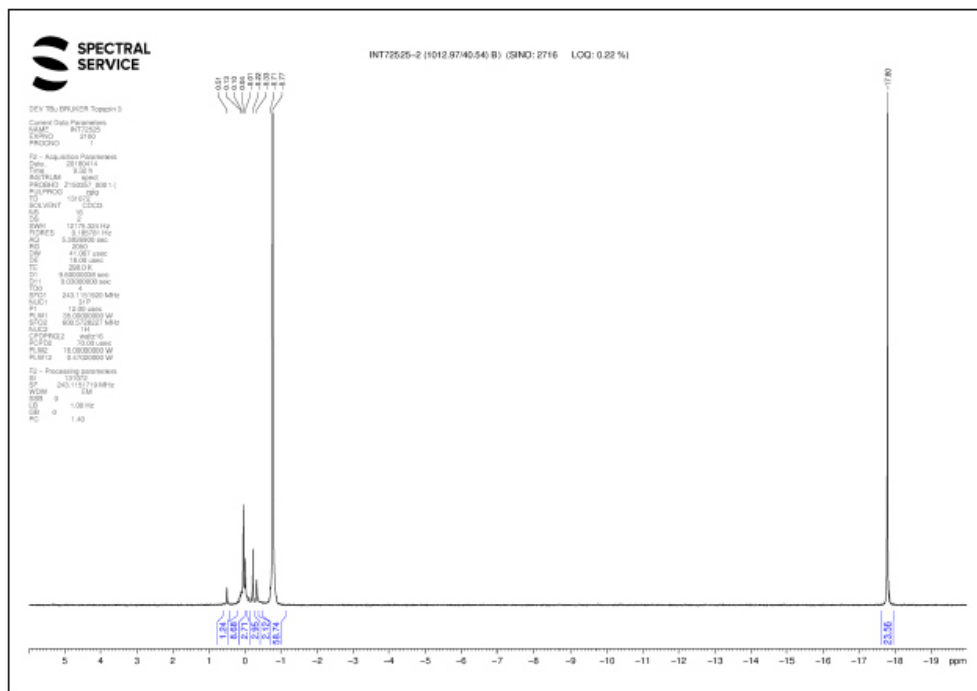
Thorsten Buchen  
Prüfleiter

Das Zertifikat ist durch Original-Unterschrift autorisiert. Eine auszugsweise Verwendung oder Veröffentlichung ist von Spectral Service grundsätzlich nicht autorisiert und darf mit unserem Namen oder einer Unterschrift unserer Mitarbeiter nicht in Zusammenhang gebracht werden. Missbräuchliche Verwendung wird von uns rechtlich verfolgt.

Spectral Service AG

Analysezertifikat

INT72525-2

Abb. 1  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Prüfgegenstandes INT72525-2 (B) + TPP

## 6.4 Literaturverzeichnis

- [1] H. Käser, *Naturkosmetik selber machen : das Handbuch*. Freya-Verl, 2012.
- [2] R. J. Whitehurst, *Emulsifiers in Food Technology*, First Edit. Blackwell Publishing Ltd, 2004.
- [3] H. Mollet and A. Grubenmann, Eds., *Formulierungstechnik*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999.
- [4] Europäische Union, "Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über kosmetische Mittel," *Amtsblatt der Eur. Union*, vol. L342, no. 1223, pp. 59–209, 2009.
- [5] "Österreichisches Lebensmittelbuch IV. Auflage - Codexkapitel B33 - Kosmetische Mittel," pp. 1–17, 2017.
- [6] Matthias Stieß, *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie 1*. 2009.
- [7] C. C. Akoh and D. B. Min, *Food Lipids*, Third Edit., vol. II. Tylor & Francis Group, 2008.
- [8] H.-D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, 2008.
- [9] A. D. McNaught and A. Wilkinson, *IUPAC - Compendium of Chemical Terminology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2014.
- [10] C. E. Mortimer and U. Müller, "Chemie," p. 292, 2010.
- [11] G. Cevc, *Phospholipids Handbook*. Marcel Dekker Inc., 1993.
- [12] "NIST Webbook - Oleicacid." [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=oleicacid&Units=SI>. [Accessed: 06-Sep-2018].
- [13] G. Habermehl, P. Hammann, H. C. Krebs, and W. Ternes, *Naturstoffchemie: Eine Einführung*. 2008.
- [14] "NIST Webbook - Glycerol." [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=glycerol&Units=SI>. [Accessed: 06-Sep-2018].
- [15] A. Lützen, *Chemie für Biologen*. 2005.
- [16] V. Norn, *Emulsifiers in Food Technology*, Second Edi. John Wiley & Sons Ltd, 2015.
- [17] D. G. für Fettwissenschaften, *DGF-Einheitsmethoden Abteilung F*. .
- [18] H. Käser, *Naturkosmetische Rohstoffe : Wirkung, Verarbeitung, kosmetischer Einsatz*. .
- [19] C. E. Mortimer, J. Beck, and U. Müller, *Chemie : das Basiswissen der Chemie*. Thieme, 2015.
- [20] H. Bisswanger, *Enzyme Struktur, Kinetik und Anwendungen*. Wiley-VCH, 2015.
- [21] "BRENDA - EC Explorer." [Online]. Available: [https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer.php?browser=1&f\[nodes\]=&f\[action\]=open&f\[change\]=170](https://www.brenda-enzymes.org/ecexplorer.php?browser=1&f[nodes]=&f[action]=open&f[change]=170). [Accessed: 21-Mar-2018].
- [22] T. Mnasri *et al.*, "Lipase-catalyzed production of lysophospholipids," *Ocl*, vol. 24, no. 4, p. D405, 2017.
- [23] "Lipase immobilized from *Candida antarctica* beads, slightly brown, &gt;2 U/mg | Sigma-Aldrich." [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/73940?lang=de&region=AT>. [Accessed: 09-Sep-2018].
- [24] D. B. Sarney, G. Fregapane, and E. N. Vulfson, "Lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a continuous bioreactor," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 71, no. 1, pp. 93–96, 1994.
- [25] H. Wang, L. Yao, S. L. Lee, and T. Wang, "Extraction of Phospholipids from Egg Yolk Flakes Using Aqueous Alcohols," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 94, no. 2, pp. 309–314, 2017.
- [26] W. J. Stadelman and O. J. Cotterill, *Egg Science and Technology*, Third Edit. Macmillan Publishers, 1986.

- [27] S. W. 1904- Souci, G. 1972- Andersen, W. Fachmann, H. Kraut, and Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie <Freising>, *Lebensmitteltabelle für die Praxis der kleine Souci-Fachmann-Kraut*. Wiss. Verl.-Ges, 2011.
- [28] O. S. PRIVETT, M. L. BLANK, and J. A. SCHMIT, "Studies on the Composition of Egg Lipid," *J. Food Sci.*, vol. 27, no. 5, pp. 463–468, 1962.
- [29] R. Huopalahti, E. López-Fandino, M. Anton, and R. S. (Eds.), *Bioactive Egg Compounds*, First Edit. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- [30] R. Goedecke and Wiley InterScience (Online service), *Fluidverfahrenstechnik : Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis*. Wiley-VCH, 2006.
- [31] K. Sattler, *Thermische trennverfahren : Grundlagen, Auslegung, Apparate*. Wiley-VCH, 2001.
- [32] T. Wang, L. E. Palacios, and T. Wang, "Extraction of Egg-Yolk Lecithin," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, no. January 2005, 2005.
- [33] H. G. Maier, *Lebensmittel- und Umweltanalytik: Methoden und Anwendungen*. Steinkopff Verlag Darmstadt, 1990.
- [34] E. Stahl, K. W. Quirin, and D. Gerard, *Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination*. 1987.
- [35] B. E. Poling, J. M. Prausnitz, and J. P. (John P. O'Connell, *The properties of gases and liquids*. McGraw-Hill, 2001.
- [36] Bundesministerium für Arbeit Soziales und Konsumnetenschutz, *Grenzwerteverordnung 2011*. 2018, p. 134.
- [37] R. Goedecke and Wiley InterScience (Online service), *Fluidverfahrenstechnik : Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis*. Wiley-VCH, 2006.
- [38] "NIST Chemistry WebBook." [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>. [Accessed: 21-Mar-2018].
- [39] T. Wang, L. E. Palacios, and T. Wang, "Egg yolk lecithin fractionation and characterization Egg-Yolk Lipid Fractionation and Lecithin Characterization," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, no. May, 2005.
- [40] H. Aro, E. P. Järvenpää, K. Könkö, M. Sihvonen, V. Hietaniemi, and R. Huopalahti, "Isolation and purification of egg yolk phospholipids using liquid extraction and pilot-scale supercritical fluid techniques," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 228, no. 6, pp. 857–863, 2009.
- [41] N. R. Bulley, L. Labayb, and S. D. Arntfield, "Extraction/fractionation of egg yolk using supercritical CO<sub>2</sub> and alcohol entrainers," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 5, no. 1, pp. 13–18, 1992.
- [42] R. Matissek and G. Steiner, *Lebensmittelanalytik: Grundzüge, Methoden, Anwendung*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2006.
- [43] M. Otto, *Analytische Chemie*. Wiley-VCH, 2011.
- [44] K. Kaltenböck, *Chromatographie für Einsteiger*. Wiley-VCH, 2008.
- [45] G. Schwedt, T. C. Schmidt, O. J. Schmitz, and Wiley-VCH, *Analytische Chemie : Grundlagen, Methoden und Praxis*. Wiley-VCH, 2017.
- [46] Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften, *DGF-Einheitmethoden Abteilung C*. .
- [47] W. S. Letter, "A rapid method for phospholipid class separation by HPLC using an evaporative light-scattering detector," *J. Liq. Chromatogr.*, vol. 15, no. 2, pp. 253–266, 1992.
- [48] A. A. Carelli, M. I. V. Bredan, and G. H. Crapiste, "Quantitative Determination of Phospholipids in Sunflower Oil," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996.
- [49] R. D. Jangle, R. V Galge, V. V Patil, and B. N. Thorat, "Selective HPLC method development for soy phosphatidylcholine Fatty acids and its mass spectrometry.," *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 75, no. 3, pp. 339–45, May 2013.
- [50] "Eivita - Willkommen bei Eivita - Österreichs erste und einzige Ei-Aufschlaganlage samt Pasteurisierung." [Online]. Available: <http://www.eivita.at.html>. [Accessed: 15-May-2018].

- 
- [51] C. B. Kretschmer and R. Wiebe, "Liquid-Vapor Equilibrium of Ethanol--Toluene Solutions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 71, no. 5, pp. 1793–1797, May 1949.
- [52] Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, "Allgemeine Arbeitsvorschrift - Bestimmung von Fettsäuren Mustern in biologischen Proben," 2017.
- [53] Naturstofflabor Wenigzell, "GMP Herstellvorschrift Gesichtscreme," 2017.
- [54] J. K. Nickerson, K. A. Kobe, and J. J. McKetta, "THE THERMODYNAMIC PROPERTIES OF THE METHYL KETONE SERIES," *J. Phys. Chem.*, vol. 65, no. 6, pp. 1037–1043, Jun. 1961.