

Abbau von Linolsäurehydroperoxyden zu flüchtigen Monocarbonylverbindungen

Werner Grosch

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Leopoldstr. 175, D-8000 München (Bundesrepublik Deutschland)

Breakdown of Linoleic Acid Hydroperoxydes. Formation of Volatile Carbonyl Compounds

Summary. Linoleic acid hydroperoxydes (LOOH) containing 13-hydroperoxyoctadeca-9,11- (75%) and 9-hydroperoxyoctadeca-10,12-dienoic acid (25%) were emulsified at pH 6.5. After addition of hemoglobin, ferrous ions, ferric ions, cysteine or ascorbic acid the emulsions were stored 19 hours at 22° C. The decrease in the diene and peroxyde concentrations and the formation of volatile carbonyl compounds were analysed. Ferrous ions and ascorbic acid were the strongest producers of volatile carbonyl compounds. In the presence of 10^{-3} Mol ascorbic acid 6 μmol volatile aldehydes arise from 75 μmol LOOH. Hexanal (70 mol-%) was the main component of the aldehyde fraction. For plant foodstuffs the significance of the reaction of fatty acid hydroperoxydes with ascorbic acid for the formation of flavour substances is discussed.

Zusammenfassung. Linolsäurehydroperoxyde (LOOH), die zu 75% aus der 13-Hydroperoxyoctadeca-9, 11- und zu 25% aus der 9-Hydroperoxyoctadeca-10, 12-diensäure bestanden, wurden bei pH 6,5 emulgiert und mit Zusätzen von Hämoglobin, Eisen(II)-, Eisen(III)-ionen, Cystein oder Ascorbinsäure 19 Std bei 22° C gelagert. Gemessen wurde die Abnahme der Dien- und Peroxydkonzentration und die Bildung flüchtiger Carbonylverbindungen. Eisen(II)-ionen und Ascorbinsäure fördern am stärksten die Bildung flüchtiger Aldehyde. Aus 75 μmol LOOH entstanden in Gegenwart von 10^{-3} Mol Ascorbinsäure 6 μmol flüchtige Aldehyde. Hexanal (70 Mol-%) war die Hauptverbindung

Abkürzungen: LOOH (Gemisch aus 13-Hydroperoxy-octadeca-9,11- und 9-Hydroperoxyoctadeca-10,12-diensäure); DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin); DNP (2,4-Dinitrophenylhydrazon).

Ich danke der AIF und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Fräulein Marianne Eglseder danke ich für die sehr geschickte Durchführung der Versuche.

der Aldehydfraktion. Die Bedeutung der Ascorbinsäure-Reaktion für die Aromabildung in pflanzlichen Lebensmitteln aus ungesättigten Fettsäuren wird diskutiert.

Einführung

Können die in den Lipiden vorkommenden ungesättigten Fettsäuren autoxydieren, so sind es die dabei entstehenden flüchtigen Monocarbonylverbindungen, die wesentlich die Qualität des Lebensmittels beeinflussen. Vorläufer dieser Aromastoffe sollen die aus der Autoxydation hervorgehenden Hydroperoxyde sein (vgl. Literaturübersicht in [1] und [2]). Der Zerfall von Hydroperoxyden wird durch Schwermetallionen und Hämproteine sehr beschleunigt, wobei Reaktionen gestartet werden, die über radikalische Intermediate verlaufen [3]. Abgebaut werden die Hydroperoxyde auch durch Reduktionsmittel. Die Lebensmittelinhaltsstoffe Cystein und Ascorbinsäure beanspruchen hier besonderes Interesse.

Von den beim Hydroperoxydabbau entstehenden Substanzen sind für die nichtflüchtigen Verbindungen aus den Systemen LOOH/Hämoglobin [4] und LOOH/Cystein/ Fe^{3+} [5] analysiert worden. Identifiziert wurden eine Reihe Ketodien-, Ketoepoxy-, Hydroxyepoxy- und Trihydroxysäuren.

Im Hinblick auf das Aroma fetthaltiger Lebensmittel ist die Kenntnis der Menge und der Art der flüchtigen Carbonylverbindungen, die beim Hydroperoxydzerfall bei Zimmertemperatur in Gegenwart von Luft entstehen, von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wird über den Einfluß von Fe-Ionen, Hämoglobin, Cystein und Ascorbinsäure auf die Bildung flüchtiger Carbonylverbindungen bei der Lagerung wäßriger LOOH-Emulsionen berichtet.

Experimenteller Teil

Material und Reagentien

Linolsäure (>99% Nu Chek Prep); Hämoglobin (Serva); Tween 80 (Schuchardt), Piperazin-N, N'-bis (2-äthansulfonsäure) (PIPES-Puffer, Sigma), Ascorbinsäure pro anal. (Merck), L(+)-Cystein für biochem. Zwecke (Merck), Lipoxxygenase (Typ I, Sigma); DNPH, umkristallisiert aus Benzol. Carbonylfreie Lösungsmittel: 11 Benzol (Merck) mit 2 g DNPH und 3 g Trichloressigsäure am Rückfluß kochen und Benzol abdestillieren. Methanol wie Benzol, doch 3 ml H_2SO_4 an Stelle von Trichloressigsäure. 11 Diäthyläther mit 2 g DNPH und 3 g Trichloressigsäure über Nacht stehen lassen, Äther abdestillieren. n-Heptan reinigen, wie in [8] beschrieben.

Gewinnung der LOOH

200 mg Linolsäure in 8 ml 0,001% Tween 80 durch Zugabe von NaOH lösen. Mit 0,02 m-Na-Borat-Puffer pH 9,5 auf 210 ml verdünnen und mit verd. HCl pH 9,5 nachstellen. In das auf 2° C gekühlte Substrat 2 mg Lipoxxygenase gelöst in 1 ml 0,02 m-Na-Borat-Puffer pH 9,5 hinzugeben. In offenem Becherglas (1 l) 2 Std bei 2° C unter Rühren incubieren.

Zur Bestimmung des Umsatzes 0,1 ml aus dem Ansatz in 3 ml Methanol pipettieren. Auf 5 ml verdünnen und Extinktion bei 234 nm messen. Gebildete Menge an Hydroperoxyden mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten $E_{234} = 25000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [6] berechnen. Incubationsansatz mit verd. HCl auf pH 3,0 ansäuern und mit $3 \times 100 \text{ ml}$ Methanol extrahieren. Nach Trocknung über Na_2SO_4 ätherische Lösung konzentrieren und auf Dünnschichtplatten (Kieselgel HF_{234} ; 0,5 mm) auftragen. Platten $2 \times$ mit Heptan/Äther/Eisessig (50 + 50 + 1) entwickeln. Hydroperoxydzone unter UV-Licht lokalisieren und mit Äther eluieren. Äther mit N_2 vorsichtig vertreiben und sofort in kaltem Methanol lösen. Hydroperoxyd-Konzentration über Messung von E_{234} bestimmen (vgl. oben).

Gehalt der LOOH an 9- und 13- Isomeren

Dünnschichtchromatographisch isolierte LOOH methylieren, mit NaBH_4 reduzieren und zu Hydroxystearinsäuremethylestern hydrieren wie in [11] beschrieben. Das Verhältnis 9-/13- massenspektrometrisch bestimmen [11].

Herstellung der LOOH-Emulsionen und Lagerung

In 250-ml-Becherglas 100 ml 0,01 m-Pipes-Puffer pH 6,5 vorlegen, der 0,7 μl Tween 80 und die in Tab. 1 aufgeführten Zusätze enthält. 75 μmol LOOH gelöst in 2 ml Methanol unter Rühren langsam hinzupipettieren. Becherglas mit Aluminiumfolie verschließen und im Dunkeln bei 22° C lagern. Nach 19 Std zuerst Proben zur Dien- und Hydroperoxyd-Bestimmung entnehmen, dann 5 ml BaCl_2 -Lösung (3 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ gelöst in 10 ml Wasser) zugeben, mit n-NaOH pH 8 einstellen, und Niederschlag über Faltenfilter abfiltrieren. Filtrat mit 5 ml kalter 85% H_3PO_4 ansäuern und 50 mg DNPH gelöst in 15 ml 85% H_3PO_4 zugeben.

Bestimmung der Dien-Konzentration

Nach der Lagerung 0,5 ml der Probe in 3 ml Methanol pipettieren. Nach Verdünnung mit 60% Methanol die Extinktion bei 234 nm messen. Dien-Konzentration mit $E_{234} = 25000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ berechnen.

Bestimmung der Hydroperoxyd-Konzentration

Das photometrische Verfahren von Ames u. King (7) wurde modifiziert. 1,0 ml der LOOH-Emulsion in 3 ml Methanol pipettieren und mit 1,0 ml Wasser verdünnen. Von dieser Lösung 0,2 ml in 4 ml Methanol/ $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ (3+7+0,125) pipettieren. 0,01 ml 1% Eisen(II)-sulfat in 3,6% HCl zugeben. Zu der gut geschüttelten Probelösung 30 sec danach 0,01 ml 30% KSCN pipettieren. Nach 30 min bei Zimmertemperatur 0,1 ml H_2O zugeben und Extinktion bei 505 nm messen. Nach Abzug des Reagentien-Blindwertes Hydroperoxyd-Konz. in der Ausgangslösung mit dem Faktor¹ 1,55 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ LOOH entsprechen $E_{505}^{1\text{cm}} = 1,0$ berechnen.

Analyse der Carbonylverbindungen

Sie erfolge über die 2,4-DNP wie in [9, 10] beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Die LOOH bestanden zu 75% aus der 13-Hydroperoxyoctadeca-9,11- und zu 25% aus der 9-Hydroperoxyoctadeca-10,12-diensäure. In wäßriger Emulsion sind die LOOH bei 22° C in Gegenwart von Luft relativ stabil, denn nur etwa 10% zerfielen in 19 Std im Experiment 1 (Tab. 1), wobei aber die Diengruppe erhalten blieb. Nachgewiesen wurden in diesem Kontrollversuch 1,3 μmol Carbonylverbindungen. Da Analysen frisch hergestellter LOOH-Emulsionen denselben Wert ergaben, haben sich diese 1,3 μmol Carbonylverbindungen nicht während der Lagerung gebildet, sondern sind Bestandteil der LOOH-Präparation. Hämoglobin, gewählt als Typ eines Häm-Katalysators, beschleunigt den Abbau der LOOH (Exp. 2 in Tab. 1), wobei in Gegenwart von 10^{-6} Mol Hämoglobin eine um 1,4 μmol gegenüber dem Kontrollversuch erhöhte Menge an Carbonylverbindungen auftrat. In Experiment 3 führte eine Steigerung der Hämoglobin-Konzentration auf 10^{-5} Mol zwar zu einem weiteren Absinken der LOOH, doch verringerten sich auch die Monocarbonylverbindungen. Ihr Gehalt sank sogar unter den Wert des Kontrollversuchs. Möglicherweise bewirkt diese Abnahme die Proteinkomponente des Katalysators, in dem sie die LOOH und auch deren Reaktionsprodukte bindet. In den Experimenten 4 und 5 wird das Fe^{2+} durch den Überschuß an LOOH zum Fe^{3+} oxydiert. Ein Vergleich beider Versuche zeigt,

¹ In dem Faktor ist die Verdünnung der Probe (1:5 und 0,2:4,2) berücksichtigt.

Tabelle 1. Bildung flüchtiger Monocarbonylverbindungen bei der Lagerung von Linolsäurehydroperoxyd-Emulsionen. Reaktions-System: 100 ml 0,02 m-PIPES-Puffer pH 6,5; 75 μmol LOOH, 2 ml Methanol, 0,7 μl Tween 80, Zusätze

| Zusatz | Nach 19 Std Lagerung bei 22° C | | | |
|--|--------------------------------|-----------------------------|--|-----------------------------------|
| | Dien ^{a,b} | Hydroperoxyd ^{a,b} | Flüchtige Monocarbonylverb. ^a | |
| | | | total | Zunahme gegenüber Kontrollversuch |
| | Mol.-% | Mol.-% | (μmol) | (μmol) |
| 1. Kein Zusatz (Kontrollversuch) | 100 | 88 | 1,3 | |
| 2. 6,5 mg Hämoglobin (10^{-6} mol/l) | 41 | 37 | 2,7 | 1,4 |
| 3. 65 mg Hämoglobin (10^{-5} mol/l) | 45 | 17 | 0,7 | |
| 4. 27,8 μg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10^{-6} mol/l) | 83 | 80 | 1,9 | 0,6 |
| 5. 278 μg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10^{-5} mol/l) | 56 | 80 | 3,5 | 2,2 |
| 6. 270 μg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10^{-5} mol/l) | 95 | 78 | 2,3 | 1,0 |
| 7. 17,6 mg L(+)-Ascorbinsäure (10^{-3} mol/l) ^a | 57 | 16 | 6,0 | 4,7 |
| 8. 12,2 mg L(+)-Cystein (10^{-3} mol/l) | 100 | 47 | 0,7 | |

^a Mittelwerte aus 3 Ansätzen. — ^b 75 μmol LOOH = 100%. — ^c Durch Zugabe der Ascorbinsäure sank der pH auf 6,3.

daß ein Anstieg in der Fe^{2+} -Konzentration die Abnahme der Diengruppe und die Bildung von Monocarbonylverbindungen begünstigen. Im Experiment 5 mit der erhöhten Konzentration an Fe^{2+} sinkt der Diengehalt wesentlich stärker ab als die Hydroperoxyd-Konzentration. Offensichtlich entstehen aus den LOOH durch Wechselwirkung mit Fe^{2+} -ionen und Luftsauerstoff sekundäre Hydroperoxyde ohne Diengruppe. Der Start der Reaktion im Experiment 6 mit Fe^{3+} an Stelle von Fe^{2+} hat nur eine geringe Veränderung in den LOOH bei leichtem Anstieg der Menge an Monocarbonylverbindungen zur Folge. Wahrscheinlich verursacht in erster Linie die Redox-Reaktion des Systems LOOH/ Fe^{2+} den Abbau der LOOH.

Einem Vergleich der Experimente 7 und 8 ist zu entnehmen, daß die LOOH von der Ascorbinsäure in einem größeren Umfang abgebaut werden als durch das Cystein. Auch verursacht die Ascorbinsäure eine vielschichtige Reaktion, denn es sinkt die Diengkonzentration, und es entstehen flüchtige Monocarbonylverbindungen in relativ hohen Konzentrationen. Demgegenüber bleibt in Gegenwart des Cysteins die Diengruppierung erhalten. Offensichtlich reduziert das Cystein — wie schon von O'Brien [3] vermutet — die LOOH nur zu den entsprechenden Hydroxysäuren. Das Absinken der Carbonylverbindungen unter den Wert des Kontrollversuchs beruht hier wahrscheinlich auf einer Reaktion des Cysteins mit den vorhandenen Aldehyden zu Thioacetalen. Die Reaktion der LOOH mit der Ascorbinsäure wurde in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. 30 min nach Beginn war noch kein Anstieg in den Carbonylverbindungen meßbar. Nach 4 Std betrug die Zunahme gegenüber dem Kontrollversuch 3 μmol ; die Diengkonzentration war um etwa 30% gesunken.

In Tab. 2 sind die flüchtigen Carbonylverbindungen zusammengestellt, die aus der Reaktion der LOOH mit Ascorbinsäure hervorgehen. Hauptverbindung mit

Tabelle 2. Flüchtige Aldehyde aus dem System LOOH/Ascorbinsäure

| Verbindung | Mol.-% |
|---------------------|--------|
| n-Pentanal | 5 |
| n-Hexanal | 70 |
| Hept-2-enal | 4 |
| Oct-2-enal | 4 |
| Nicht identifiziert | 17 |

einem Anteil von 70% ist das Hexanal. Vorläufer des Hexanals dürfte die 13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-diensäure sein. Der Anteil dieses Hydroperoxyds an den LOOH stimmt mit 75 Mol.-% recht gut überein mit dem Anteil des Hexanals an den flüchtigen Carbonylverbindungen. Welche Aldehyde aus den 9-LOOH hervorgehen, bedarf noch der Klärung.

Zusammenfassend ergibt sich, daß aromaaktive Aldehyde nicht nur durch Schwermetalle und Hämverbindungen, sondern auch durch eine Reaktion mit Ascorbinsäure aus Fettsäurehydroperoxyden entstehen können. Nach den Beobachtungen von Haase u. Dunkley [12] wird die Oxydation einer Linolsäure-Emulsion (pH 7) schon von $1,8 \cdot 10^{-6}$ Mol Ascorbinsäure beschleunigt. Im Hinblick auf den Fettverderb muß demnach bei wasserhaltigen Lebensmitteln mit einer zweifachen Wirkung der Ascorbinsäure gerechnet werden. Als Prooxydant kann sie die Fettoxydation starten, und sie kann entstandene Monohydroperoxyde zu aromaaktiven Aldehyden abbauen.

Der Ascorbinsäuregehalt vieler pflanzlicher Lebensmittel liegt in der Größenordnung der hier beschriebenen Modellversuche. Mit 24 mg/100 g sei als Beispiel die Kartoffel [13] genannt. Reaktionen der Ascorbinsäure, die zu Aromastoffen führen, sind hier mit Fettsäurehydroperoxyden möglich, die aus der Lipoxygenase-Katalyse hervorgehen oder die bei Kartoffelprodukten aus einer Autoxydation zugesetzter Fette stammen können.

Weitere Einzelheiten über die Wechselwirkung von Fettsäurehydroperoxyden mit Ascorbinsäure und auch mit Endiolverbindungen aus der Maillard-Reaktion sollten geklärt werden.

Literatur

- Gardner, H. W.: Agr. Food Chem. **23**, 129 (1975)
- Grosch, W.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **157**, 70 (1975)
- O'Brien, P. J.: Can. J. Biochem. **47**, 485 (1969)
- Gardner, H. W., Kleiman, R., Weisleder, D.: Lipids **9**, 696 (1974)
- Hamberg, M.: Lipids **10**, 87 (1975)
- Johnston, A. E., Zilch, K. T., Selke, E., Dutton, H. J.: J. Am. Oil Chemists Soc. **38**, 367 (1961)
- Ames, G. R., King, T. A.: J. Sci. Food Ag. **17**, 301 (1966)
- Barthel, G., Laskawy, G., Grosch, W.: Deut. Lebensm. Rundsch. **70**, 201 (1974)
- Grosch, W., Laskawy, G., Fischer, K. H.: Lebensmittel-Wiss. Technol. **7**, 335 (1974)
- Grosch, W., Laskawy, G.: J. Agr. Food Chem. **23**, 791 (1975)
- Grosch, W., Senser, F., Fischer, K.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. **147**, 140 (1971)
- Haase, G., Dunkley, W. L.: J. Lipid Res. **10**, 561 (1969)
- Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Hrsg. von der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1974

Eingegangen am 30. Oktober 1975