

Enorme Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Fettsäurefraktion von rohem und gekochtem Gemüse

Helmut Spreitzer², Jochen Schmidt¹, Ulrich Kratzel¹ und Gerhard Spiteller^{1,*}

¹ Lehrstuhl Organische Chemie I, Universität Bayreuth, Postfach 101251, D-8580 Bayreuth, Bundesrepublik Deutschland

² Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Wien, A-1090 Wien, Österreich

Great Differences in the Qualitative and Quantitative Composition of the Fatty Acid Fraction of Raw and Boiled Vegetables

Summary. Potato tubers und vegetables, introduced into the body contain – in dependance if boiled or not – very different amounts of multiple unsaturated fatty acids. In boiled vegetables linoleic and linolenic acid remain unchanged. In contrast, if the vegetable is shred and then analysed, the content of multiple unsaturated fatty acids is lowered for a factor of 2–5. If vegetable is shred, lipoxygenases are liberated, resulting in oxidizing the multiple unsaturated acids. The lipoxygenases are destroyed if vegetable is cooked before shredding. An easy comparison of the effect of lipoxygenases on fatty acid can be made by gas chromatography. The effect is especially strong in *cruciferae* e.g. in cabbage or cauliflower.

Keywords. Vegetables; Potato tubers; Fatty acid oxidation; Lipoxygenases; Cruciferae.

Einleitung

Die Beobachtung, daß Furan-Fettsäuren bei Verletzung tierischen oder menschlichen Fettgewebes in Freiheit gesetzt [1] und anschließend zu hochreaktiven Dioxoenen gespalten werden [2], veranlaßte uns zu untersuchen, welche Folgen die Verletzung pflanzlichen Materials bezüglich einer oxidativen Veränderung von Fettsäuren haben könnte.

Zunächst wählten wir als Substrat für unsere Versuche Kartoffelknollen, einerseits, weil diese ganzjährig zugänglich sind, andererseits, weil sie in der Fettfraktion vorwiegend Linolsäure (8) und Linolensäure (9) enthalten, die eine gewisse Verwandtschaft zur Arachidonsäure zeigen, die leicht von Lipoxygenasen angreifbar ist. Außerdem haben Kartoffeln einen hohen Gehalt an Lipoxygenasen. In der Folge dehnten wir die Untersuchung auf zehn Gemüsesorten, davon fünf aus der Familie der Kreuzblütler, aus. Kreuzblütler gelten als besonders hochwertige Nahrungsmittel. Man vermutet, daß sie eine protektive Wirkung bei der Krebsentstehung haben könnten [3]. Die Fettsäurefraktion von Gemüse wurde bisher nur wenig untersucht [4–9].

Bekannt ist, daß das Zerkleinern pflanzlichen Gewebes zu einem sofortigen und extensiven Abbau der Galacto- und Phospholipide in den Membranen führt [10], wobei unter dem Einfluß lipolytischer Acylhydrolasen freie Fettsäuren entstehen [11 – 16]. Theologis und Laties [17] haben bei Untersuchung der Zellatmung von Kartoffelknollen beobachtet, daß beim Zerschneiden der Knollen bereits nach 15 Minuten sowohl der Gehalt an Phospo- und Glycolipiden als auch die Menge an Linol- und Linolensäure deutlich abgesunken ist. Ähnliche Beobachtungen machte Galliard bei der Untersuchung von Kartoffelknollen [12, 18, 19]. Er konnte nachweisen, daß die in Kartoffelknollen enthaltenen Lipoxygenasen Linolensäure in Gegenwart von Luftsauerstoff zu Hydroperoxiden oxidieren, die anschließend je nach Aufarbeitungsbedingungen weiter umgesetzt werden [20 – 24].

Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung der Folgen von Verletzung von pflanzlichem Material wandten wir die gleichen Methoden an, die sich früher beim Studium der Oxidation von F-Säuren mittels Rinderleberhomogenisaten bewährt hatten [1, 2]: Wir analysierten gekochtes Gemüse und zerkleinertes Rohgemüse. Beim Kochen von biologischem Material werden die darin enthaltenen Enzyme zerstört. Man kann dann die daraus erhältliche Lipidfraktion verseifen, die Fettsäuren extrahieren und nach Umsatz mit Diazomethan die erhaltenen Methylester an Glaskapillarsäulen trennen und so die Zusammensetzung der Fettsäuren bestimmen. In gleicher Weise werden die wäßrigen Homogenisate von rohen Gemüse aufgearbeitet und analysiert. Die nach beiden Verfahren bestimmte Fettsäurezusammensetzung unterscheidet sich teilweise enorm. Da gesättigte Fettsäuren nicht von der Lipoxygenase angegriffen werden, können sie als innerer Standard Verwendung finden, um aus der relativen Abnahme der Linol- und Linolensäuremethylesterpeaks in den Gaschromatogrammen das Ausmaß der oxidativen Veränderung festzustellen. Die entstandenen Oxidationsprodukte können an zusätzlichen Peaks erkannt und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden.

Da die entstehenden Oxidationsprodukte schwer flüchtig sind, ist es notwendig, sie durch Trimethylsilylierung der GC/MS-Analyse zugänglich zu machen. Diese Derivatisierung hat zusätzlich den Vorteil, daß die Massenspektren der Derivate meistens leichter zu interpretieren sind als die der freien Fettsäureester.

Werden gekochte Kartoffelknollen geschält und, wie im experimentellen Teil beschrieben, aufgearbeitet, so erhält man aus der Fraktion der hydrolysierten Totallipide nach Veresterung mit Diazomethan das in Abb. 1 (oben) reproduzierte Gaschromatogramm, in dem als Hauptbestandteile ungesättigte und gesättigte Fettsäuren zu erkennen sind. Ein analoges Ergebnis erhält man bei Homogenisierung roher Kartoffelknollen in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$.

Wiederholt man das Experiment, homogenisiert aber geschälte rohe Kartoffeln in Wasser, so sind **8** und **9** nur noch in geringeren Mengen nachweisbar. Dafür treten im Gaschromatogramm (Abb. 1 unten) eine Reihe neuer Signale auf, die Oxidations- und Abbauprodukten von **8** und **9** entsprechen.

In analoger Weise kann Gemüse untersucht werden, wie dies am Beispiel von Weißkraut (Abb. 2) dokumentiert ist.

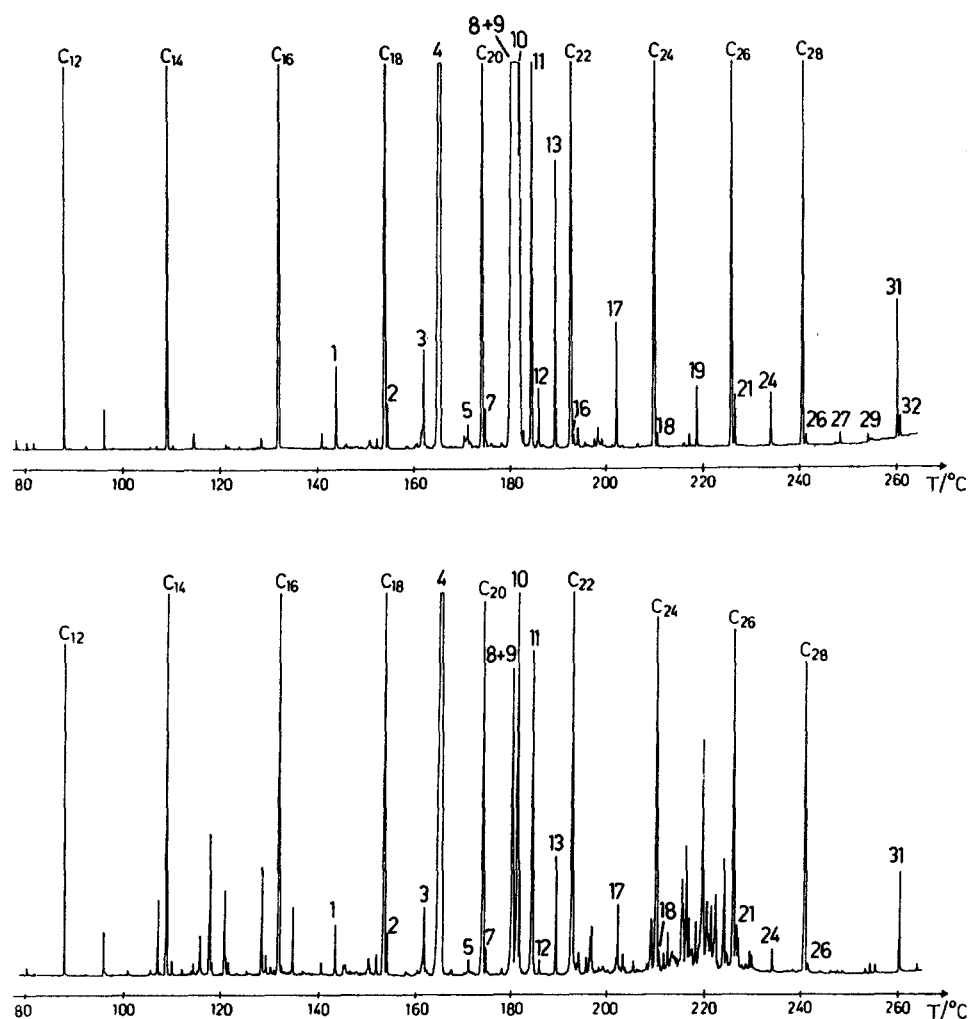


Abb. 1. Gaschromatogramm der Fettsäurefraktion aus Homogenisaten von gekochten (oben) und rohen (unten) Kartoffelknollen nach Behandlung mit Diazomethan und *MSTFA* (Tp 1)

Das Verhältnis der Summe der ungesättigten Fettsäuren 8, 9 und Ölsäure (10) zur Palmitinsäure (4) beträgt für gekochte Kartoffelknollen 3.9 für rohe dagegen nur 0.5. Das bedeutet, daß bei Homogenisierung von rohen Knollen in Wasser 80–90% der ungesättigten C_{18} -Fettsäuren durch Enzyme abgebaut werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam bereits Galliard [19], allerdings unter Verwendung gepackter Säulen mit denen die Oxidationsprodukte nicht faßbar waren. Er beobachtete einen oxidativen Abbau von 64% bei Linolsäure (8) und von 84% bei Linolensäure 9. In wäßrigen Homogenisaten von rohen Kartoffelknollen fanden wir einen Gehalt an enzymatischen Oxidations- und Abbauprodukten zwischen 30 und 40%. Hierbei ist zu bedenken, daß leicht flüchtige Abbauprodukte nicht erfaßt werden, so daß tatsächlich der Anteil der Oxidationsprodukte noch höher sein muß. Als interner Standard für diese Berechnung diente Palmitinsäure 4, deren Gehalt in Übereinstimmung mit Literaturangaben [25] 20% beträgt. Außer den üblichen Fettsäuren können auch 2-Hydroxypalmitinsäure (13) und 1-Octadecanol (14) nachgewiesen werden, die sowohl in Homogenisaten von rohen als auch von ge-

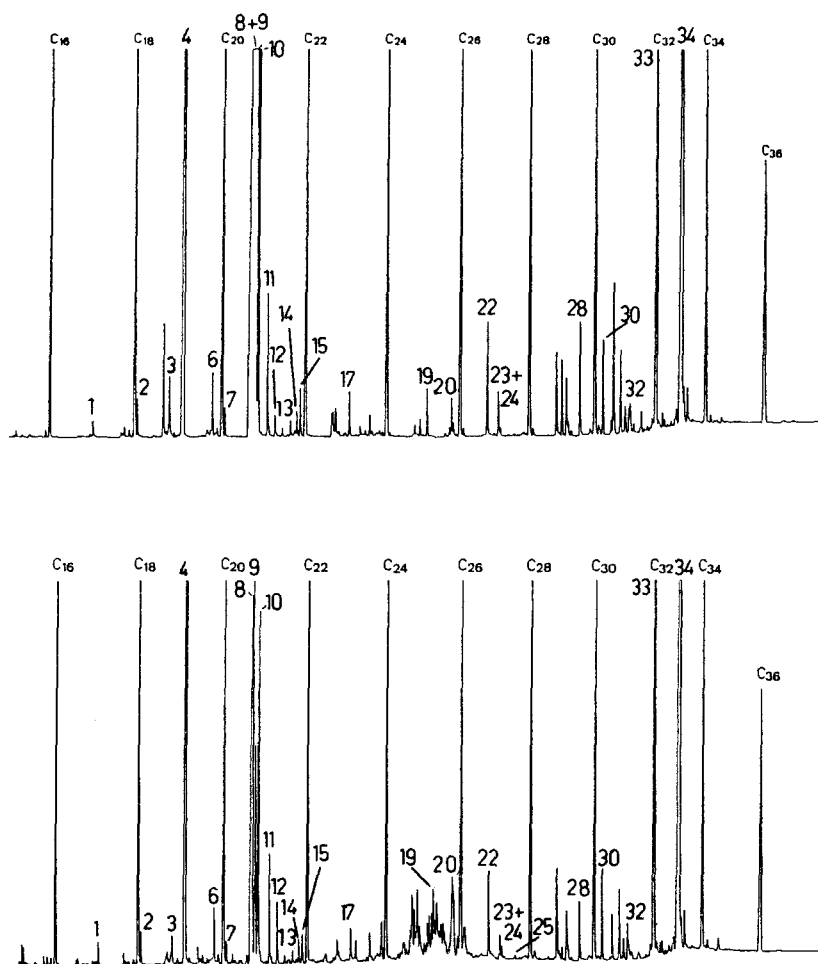


Abb. 2. Gaschromatogramm der Fettsäurefraktion aus Homogenisaten von gekochtem (oben) und rohem (unten) Weißkraut nach Behandlung mit Diazomethan und *MSTFA* (Tp 2)

gekochten Kartoffelknollen vorliegen und in der angegebenen Literatur nicht erwähnt werden [19, 25, 26]. Diese Verbindungen liegen nach der Umsetzung mit *MSTFA* als Trimethylsilylether vor und können an Hand ihrer Massenspektren leicht identifiziert werden [27, 28].

Die Zusammensetzung der Fettsäurefraktionen von rohem und gekochtem Weißkraut sowie von rohen und gekochten Kartoffelknollen ist in Tabelle 1 dargestellt.

In Tabelle 2 sind die entsprechenden Abbauraten für die untersuchten Gemüsesorten angegeben, wobei Palmitinsäure (4) als interner Standard fungierte.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, zeigen die Cruciferen-Arten überdurchschnittlich hohe Lipoxygenaseaktivitäten, wobei Kohlrabi den schwächsten Effekt aufweist. Wird geschälter Kohlrabi homogenisiert, zeigen die Extrakte der rohen bzw. gekochten Proben kaum einen Unterschied.

Ungeschälter Kohlrabi liefert jedoch einen Rohextrakt mit deutlich weniger Gehalt an den ungesättigten Fettsäuren [7–9], ein Beweis, daß die Enzyme vorwiegend in der Schale lokalisiert sind. Dieser Befund steht mit ähnlichen Beob-

Tabelle 1. Zusammensetzung der Lipidfraktion aus Homogenisaten von rohem und gekochtem Weißkraut (Wk) sowie rohen und gekochten Kartoffelknollen (Kk)

Nr.	RI ^a	Substanz ^b	Literatur		Nr.	RI ^a	Substanz ^b	Literatur	
			Wk	Kk				Wk	Kk
1	1707	14:0 me	[29]	[25]	19	2511	22:0 me	[29]	[25]
2	1809	15:0 me	[29]	[25]	20	2582	23:1 me	[29]	—
3	1884	16:1 me	[29]	[25]	21	2612	23:0 me	—	[25]
4	1910	16:0 me	[29]	[25]	22	2681	24:1 me	[29]	—
5	1973	i-17:0 me	—	[30]	23	2712	2-OH-22:0 me ^c	[27] ^d	—
6	1979	ai-17:0 me	[29]	—	24	2712	24:0 me	[29]	[25]
7	2010	17:0 me	[29]	[25]	25	2755	1-Tetracosanol ^c	[31] ^d	—
8+9	2067	18:2+18:3 me	[29]	[25]	26	2810	25:0 me	—	[25]
10	2075	18:1 me	[29]	[25]	27	2911	26:0 me	—	[25]
11	2111	18:0 me	[29]	[25]	28	2955	1-Hexacosanol ^c	[31] ^d	—
12	2123	2-OH-16:0 me ^c	[27] ^d	[27] ^d	29	3016	27:0 me	—	[25]
13	2162	1-Octadecanol ^c	[28] ^d	[28]	30	3027	ai-1-Heptacosanol ^c	[31] ^d	—
14	2181	ai-19:0 me	[29]	—	31	3105	Cholesterin ^c	—	[32] ^d
15	2190	19:1 me	[29]	—	32	3115	28:0 me	[29]	[25]
16	2210	19:0 me	—	[25]	33	3200	Campesterin ^c	[33] ^d	—
17	2308	20:0 me	[29]	[25]	34	3298	β -Sitosterin ^c	[34] ^d	—
18	2410	21:0 me	—	[25]					

^a RI = Retentionsindex (Kovatsindex [35]).

^b Zur Kurzschreibweise von Fettsäuren siehe Hitchcock und Nichols [36].

^c Verbindung liegt als Trimethylsilyl ether vor.

^d Referenzmassenspektrum.

Tabelle 2. Verhältnis der Peakflächen von Palmitinsäure zur Summe von 18:3, 18:2 und 18:1

	gekocht	roh	$\frac{\text{gekocht}}{\text{roh}}$
Weißkraut: <i>Brassica oleraceae</i> var. <i>capitata</i> f. <i>alba</i> , <i>Cruciferae</i>	4.98	1.18	4.22
Karfiol: <i>Brassica oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> var. <i>botrytis</i> , <i>Cruciferae</i>	4.46	1.41	3.09
Rosenkohl: <i>Brassica oleraceae</i> convar. <i>oleraceae</i> var. <i>gemmifera</i> , <i>Cruciferae</i>	3.81	1.49	2.57
Wirsingkohl: <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> , <i>Cruciferae</i>	4.08	1.76	2.32
Kohlrabi: <i>Brassica oleraceae</i> convar. <i>acephala</i> var. <i>gongylodes</i> , <i>Cruciferae</i>	4.51 ^a 4.39 ^b	2.98 ^a 4.53 ^b	1.51 ^a 0.97 ^b
Karotte: <i>Daucus carota</i> ssp. <i>sativus</i> , <i>Umbelliferae</i>	5.50	4.30	1.28
Tomate: <i>Lycopersicon lycopersicum</i> , <i>Solanaceae</i>	5.33	4.41	1.21
Zucchini: <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>giromontiina</i> , <i>Cucurbitaceae</i>	2.73	2.28	1.20
Spinat: <i>Spinacia oleraceae</i> , <i>Chenopodiaceae</i>	8.89	8.18	1.09
Rote Rübe: <i>Beta vulgaris</i> var. <i>conditiva</i> , <i>Chenopodiaceae</i>	4.75	5.76	0.83

^a Ungeschält.^b Geschält.

achtungen von Mihaly in Einklang [37]. Bei den übrigen Gemüsesorten zeigte sich kaum ein Unterschied zwischen Lipidextrakten von rohen bzw. gekochten Gemüseproben.

Die Tatsache, daß Kreuzblütler-Gemüsearten beim Zerkleinern des Rohgemüses infolge ihrer hohen Lipoxygenaseaktivität zahlreiche Oxidationsprodukte bilden, erscheint hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs mit der protektiven Wirkung gegen Krebsentstehung überprüfenswert.

Der teilweise enorme Unterschied im Fettsäuregehalt von Kartoffeln und Gemüse je nach Zellverletzung ist im Hinblick auf unsere Ernährung insofern bemerkenswert, da die einzelnen Oxidationsprodukte noch kaum auf ihre Wirkung in unserem Organismus getestet werden. Über die genaue Zusammensetzung der Lipidfraktionen und über die entstehenden Oxidationsprodukte wird in einer Folgearbeit berichtet werden.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Dr.-Robert-Pfleger-Stiftung für Sachbeihilfen. Herrn D. Laatsch danken wir für die Herstellung der Glaskapillarsäulen, Herrn Dr. J. Reiner für die Aufnahme von NMR-Spektren, Herrn M. Gläbner für die Aufnahme von Massenspektren.

Experimenteller Teil

Falls nicht anders vermerkt, stammen sämtliche Reagenzien von Merck, Darmstadt. Alle verwendeten Lösungsmittel waren technischer Qualität und wurden vor Gebrauch destilliert. *MSTFA* (N-Methyl, N-Trimethylsilyltrifluoracetamid) wurde von Macherey/Nagel, Düren geliefert.

Gaschromatographie: Analytischer Gaschromatograph Packard 438 S mit Network Manager und Integrator Shimadzu Chromatopac CR-3A; Splitverhältnis 1 : 10; Trägergas Wasserstoff (2 ml/min); Injektionstemp.: 270 °C; Detektortemp.: 280 °C (FID); Temperaturprogramme: Tp 1: 80–280 °C; 3 °C/min – Tp 2: 110–280 °C; 3 °C/min; Säule: WCOT-Glaskapillarsäule; 30 m Länge, 0,3 mm Innendurchmesser, belegt mit OV 101. Zur Berechnung der Retentionsindices (Kovatsindices [36]) wurde mit jeder Probe ein Kohlenwasserstoffgemisch eingespritzt. In den Gaschromatogrammen sind diese Peaks mit C₁₂ bis C₃₆ bezeichnet. Homogenisator: Braun, Bundesrepublik Deutschland, Modell MX 32. Zentrifuge: Hermle ZK 400.

GC-EI/MS-Kopplung: Gaschromatograph: Varian 3700; Trägergas Helium (2 ml/min); Injektortemp.: 270 °C; Temperaturprogramm 80–280 °C, 2 °C/min; Säule: WCOT-Glaskapillarsäule, 25 m Länge, 0,3 mm Innendurchmesser, belegt mit OV 101. Massenspektrometer: Varian MAT 312 mit umgekehrter Nier-Johnson-Geometrie, kombinierte EI/CI-Ionenquelle; Datensystem MAT SS 300; Ionisierungsenergie 70 eV, TIC-Signal bei 20 eV registriert.

Aufarbeitung der Gemüse- und Kartoffelproben: Jeweils 60 g geschälte rohe und gekochte (30 min) Kartoffelknollen werden grob zerkleinert und in drei Portionen mit je 30 ml destilliertem Wasser im Homogenisator 5 min bei 35 000 Umdrehungen/min homogenisiert. Die vereinigten Homogenisate werden nach Zugabe von 150 ml Methanol/Dichlormethan 2 : 1 (v : v) [38] und 400 ml destilliertem Wasser vorsichtig geschüttelt. Es werden weitere 50 ml Dichlormethan zugegeben und die gut durchgeschüttelte Mischung bei 5 000 g und 5 °C 15 min zentrifugiert. Die Dichlormethanphase (Gesamtlipidextrakt) wird abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt (Rotationsverdampfer, *T* < 40 °C). Der Rückstand wird in 50 ml Methanol gelöst, 5 ml konz. Salzsäure zugesetzt, 1 h unter Rückfluß erhitzt und die Lösung nach Abkühlen und Zugabe von 100 ml destilliertem Wasser dreimal mit 50 ml Ether extrahiert. Nach Entfernen des Ethers im Vakuum wird der Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen, mit etherischer Diazomethanlösung nachbehandelt, der Diazomethanüberschuß im Stickstoffstrom abgeblasen und die Lösung zur Trockene gebracht.

100 g des betreffenden rohen oder gekochten (30 min) Gemüses werden in 150 ml dest. Wasser 5 min homogenisiert. Das Homogenisat wird anschließend wie angegeben aufgearbeitet.

Derivatisierung mit MSTFA: Ca. 1 mg der resultierenden Lipidfraktion wird in ein Schmelzpunktröhrchen eingebracht, mit 20 µl *MSTFA* versetzt, das Röhrchen zugeschmolzen und die Lösung ca. 15 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird die Probe direkt mit GC bzw. GC/MS untersucht.

Literatur

- [1] Schödel R., Spiteller G. (1985) *Helv. Chim. Acta* **68**: 1624
- [2] Schödel R., Spiteller G. (1987) *Liebigs Ann. Chem.*: 459
- [3] Cohen L. A. (1988) *Spektrum der Wissenschaft*: 108
- [4] Fricker A. (1973) *Fette und Lipide in Obst und Gemüse*. In: Zöllner N. (Hrsg.) *Unsichtbare Fette und Lipoide in Lebensmitteln*. Steinkopff, Darmstadt, S. 74
- [5] Fricker A., Koller W. D. (1974) *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **76**: 466
- [6] Gregor H. D. (1977) *Phytochemistry* **16**: 953; Kamanna V. S., Chandrasekhara N. (1980) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **57**: 175; Harwood J. L. (1980) In: Stumpf P. K., Conn E. E. (eds.) *The Biochemistry of Plants*, Vol. 4. Academic Press, New York London, p. 24
- [7] Kamanna V. S., Chandrasekhara N. (1980) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **57**: 175
- [8] Harwood J. L. (1980) In: Stumpf P. K., Conn E. E. (eds.) *The Biochemistry of Plants*, Vol. 4. Academic Press, New York London, p. 24
- [9] Nasirullah, Werner G., Seher A. (1984) *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **86**: 264

- [10] Laties G. G. (1975) In: Abstr. Int. Symp. Biochem. Cytol. Wounded Plant Tissues. Karlsruhe
- [11] Galliard T. (1970) *Phytochemistry* **9**: 1725
- [12] Galliard T. (1971) *Biochem. J.* **121**: 379
- [13] Galliard T. (1971) *Eur. J. Biochem.* **21**: 90
- [14] Galliard T., Dennis S. (1974) *Phytochemistry* **13**: 1731
- [15] Galliard T., Rayward-Smith M. P. (1977) *J. Food Biochem.* **1**: 351
- [16] Wardale D. A. (1980) *Phytochemistry* **19**: 173
- [17] Theologis A., Laties G. G. (1981) *Plant Phys.* **68**: 53
- [18] Galliard T. (1972) *Phytochemistry* **11**: 1899
- [19] Galliard T. (1973) *J. Sci. Fd. Agric.* **24**: 617
- [20] Galliard T., Phillips D. R. (1972) *Biochim. J.* **129**: 743
- [21] Galliard T., Phillips D. R., Matthew J. A. (1975) *Biochem. Biophys. Acta* **409**: 157
- [22] Galliard T., Phillips D. R., Frost D. J. (1973) *Chem. Phys. Lipids* **11**: 173
- [23] Galliard T., Matthew J. A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **398**: 1
- [24] Galliard T., Wardale D. A., Matthew J. A. (1974) *Biochem. J.* **138**: 23
- [25] Fricker A. (1970) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **142**: 24
- [26] Fricker A. (1972) *Potato Res.* **15**: 365
- [27] Eglinton G., Hunneman D. H., McCormick A. (1968) *Org. Mass Spectrochem.* **1**: 593
- [28] Vetter W., Meister W. (1981) *Org. Mass Spectrom.* **16**: 118
- [29] Ryhage R., Stenhagen E. (1963) In: McLafferty F. W. (ed.) *Mass Spectrom. of Organic Ions*. Academic Press, New York, p. 399
- [30] Schmidt J. (1987) Dissertation, S. 72
- [31] Reiter-Reners M., Baltus W. (1986) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **183**: 186
- [32] Brooks C. J. W., Horning E. C., Young J. S. (1968) *Lipids* **3**: 391
- [33] Schuette H. A., Link W. E. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*: 4192
- [34] Jain T. C., Banks C. M. (1968) *Can. J. Chem.*: 2325
- [35] Kovats E. (1958) *Helv. Chim. Acta* **41**: 1915
- [36] Hitchcock C., Nichols E. C. (1971) *Plant Lipid Biochemistry*. Academic Press, New York
- [37] Mihaly K., Vamos-Vigyazo L. (1976) *Ellemez Ipar* **30**: 314
- [38] Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Phys.* **37**: 911

Eingegangen 7. August 1988. Angenommen 6. September 1988