

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie

**Analytik von Minorlipiden:
Ferulasäureester von Phytosterolen (γ -Oryzanol) in Reis**

Andreas Miller

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

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Gerhard Rechkemmer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Engel

2. Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle

Die Dissertation wurde am 24.08.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.12.2004 angenommen.

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, für die Überlassung des spannenden Themas. Ganz besonders danke ich ihm für sein mir stets entgegengebrachtes Vertrauen, seine Offenheit sowie seine Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle, der mir während meines Studiums ein ausgezeichneter Lehrer war, bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats. Herrn Prof. Dr. Gerhard Rechkemmer danke ich für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Dem Fraunhofer-Institut für Verpackungstechnik (Freising) danke ich für die Überlassung des on-line LC-GC-Geräts und Herrn Dr. Klaus-Otto Henckel (Henry Lamotte GmbH, Bremen) danke ich für den γ -Oryzanol-Standard. Bei Herrn Robert Kobler (Mühldorfer Naturkornmühle GmbH, Mühldorf/Inn) bedanke ich mich herzlich für die freundliche Bereitstellung von Braunreis und Vollkornreisflocken. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Qingyao Shu (Zhejiang-Universität, Hangzhou, China) und Herrn Prof. Dr. Illimar Altosaar (University of Ottawa, Kanada) für die gentechnisch veränderten Reisproben.

Der Josef Schormüller-Gedächtnisstiftung danke ich für ein Reisestipendium, das mir die Teilnahme an der EUROFOODCHEM XI ermöglicht hat. Für finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danke ich der Dr.-Ing. Leonhard-Lorenz-Stiftung (Freising).

Allen meinen Kollegen am Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie, insbesondere meinen Kollegen an der Arbeitsgruppe „Novel Food“, Dr. Gerhard Gerstner, Dr. Thomas Frenzel, Dr. Willibald Kamm, Andreas Roß, Francisco Moreano, Michaela Mertens, Iulia Cioranu, Alexandra Ehlert, Bertrand Seumo und Richard Röhlig, danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Georg Schmarr, der mich mit viel Begeisterung in die Kunst der on-line LC-GC eingeführt hat. Hetty Machalitzka, Nadine Eichinger, Sebastian Delgado, Lina Majauskaitė, Martin Neumann und Silke Schmechel danke ich für tatkräftige Unterstützung im Rahmen ihrer Semester-, Bachelor- oder Diplomarbeiten. Frau Gabriele Taubert danke ich für die hervorragende Unterstützung bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Irgard und Werner danke ich für stets offene Ohren und tatkräftige Hände.

In ganz besonderer Weise danke ich meinen Eltern, meinen Geschwistern Moni und Wolfi, sowie meinen Großeltern. Sie waren mir stets eine Quelle der Geborgenheit und Unterstützung. Leo Mosses danke ich für seine Gesprächsbereitschaft in kritischen Zeiten.

Ganz besonders danke ich meiner lieben Frau Heike, die die Sonne meiner Tage und der Stern meiner Nächte ist.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	GRUNDLAGEN	3
2.1	Reis (<i>Oryza sativa</i>)	3
2.2	Ferulasäureester von Phytosterolen	5
2.2.1	Struktur, Nomenklatur und Vorkommen	5
2.2.2	Biosynthese	10
2.2.2.1	Phytosterole	10
2.2.2.2	Ferulasäure	14
2.2.3	Biologische Funktion in der Pflanze	15
2.2.4	Verwendung als kosmetischer Wirkstoff	16
2.2.5	Antioxidative Eigenschaft	17
2.2.6	Cholesterinsenkende Wirkung	19
2.2.7	Metabolismus	20
2.2.8	Analysenmethoden	21
2.3	On-line LC-GC	23
2.3.1	Hintergrund	23
2.3.2	Kopplungstechniken	24
2.3.2.1	On-column-Interface	24
2.3.2.2	Loop-type-Interface	26
2.3.2.3	Temperaturprogrammierter Injektor (PTV) als Interface	27

3	MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1	Material.....	29
3.1.1	Chemikalien	29
3.1.2	Enzympräparate.....	30
3.1.3	Probenmaterial	31
3.1.3.1	Reisproben konventioneller Sorten	31
3.1.3.2	Reisproben gentechnisch veränderter Linien	32
3.1.3.3	Vollkornreisflocken.....	32
3.1.4	Geräte und Hilfsmaterialien	33
3.2	Methoden	34
3.2.1	Analytik von γ -Oryzanol mittels on-line LC-GC.....	34
3.2.1.1	Extraktion	34
3.2.1.2	On-line LC-GC.....	35
3.2.1.3	Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung	36
3.2.1.4	Bestimmung von Wiederfindung und Reproduzierbarkeit	36
3.2.2	Bestimmung der Trockenmasse	37
3.2.3	Identifizierung von Sterylferulaten	37
3.2.3.1	GC-MS der LC-Fraktion (off-line LC-GC-MS)	37
3.2.3.2	GC-MS von dünnschichtchromatographisch isoliertem γ -Oryzanol	38
3.2.3.3	GC-MS von <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-Derivaten	39
3.2.4	Bildung von <i>cis</i> -Sterylferulaten aus γ -Oryzanol	39
3.2.5	Chemische Umesterung von γ -Oryzanol.....	39
3.2.6	Studien zur enzymatischen Hydrolyse von γ -Oryzanol	40
3.2.6.1	Lipasen	40
3.2.6.2	Cholesterolesterasen und Pankreas-Acetonpulver	41
3.2.6.3	Künstliche Verdauungssäfte.....	42
3.2.7	Analytik von Sterolen.....	43
3.2.7.1	Silylierung	43
3.2.7.2	Identifizierung mittels GC-MS.....	43
3.2.7.3	Quantifizierung mittels GC-FID	44

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	45
4.1	Analytik von γ-Oryzanol mittels on-line LC-GC	45
4.1.1	Einleitung	45
4.1.2	Entwicklung einer on-line LC-GC-Methode zur Analytik von γ -Oryzanol.....	46
4.1.3	Identifizierung der Sterylferulate	50
4.1.3.1	GC-MS der LC-Fraktion (off-line LC-GC-MS)	51
4.1.3.2	GC-MS von dünnschichtchromatographisch isoliertem γ -Oryzanol	53
4.1.3.3	Charakterisierung von kommerziell erhältlichem γ -Oryzanol	55
4.1.3.4	GC-MS von <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-Derivaten	55
4.1.4	Optimierung der Extraktion von γ -Oryzanol aus Reis	58
4.1.5	Validierung.....	60
4.1.6	Zusammenfassung.....	62
4.2	γ-Oryzanol in Europäischem Braunreis.....	63
4.2.1	Einleitung	63
4.2.2	γ -Oryzanol-Gehalt	63
4.2.3	Sterylferulat-Verteilung	66
4.2.4	Einfluss des Reifegrades	71
4.2.5	Zusammenfassung.....	74
4.3	γ-Oryzanol in gentechnisch veränderten Reislinien	75
4.3.1	Einleitung	75
4.3.2	PHA-E-Reis.....	77
4.3.3	GNA-Reis.....	78
4.3.4	<i>Bt</i> -Reis (KMD1).....	81
4.3.5	Zusammenfassung.....	83
4.4	γ-Oryzanol in Vollkornreisflocken	84
4.4.1	Einleitung	84
4.4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	85

4.5	Enzymatische Hydrolyse von γ-Oryzanol	87
4.5.1	Einleitung	87
4.5.2	Lipasen	88
4.5.3	Cholesterolesterasen	90
4.5.4	Künstliche Verdauungssäfte	93
4.5.5	Pankreas-Acetonpulver	95
4.5.6	Zusammenfassung	96
5	ZUSAMMENFASSUNG	98
6	LITERATUR	100

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CE-CC	Cholesterolesterase aus <i>Candida cylindracea</i>
CE-PS	Cholesterolesterase aus <i>Pseudomonas sp.</i>
CE-RP	Cholesterolesterase aus Rinderpankreas
CE-SP	Cholesterolesterase aus Schweinepankreas
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DPTMDS	1,3-Diphenyl-1,1,3,3-tetramethyldisilazan
EI	Electron Impact Ionization (Elektronenstoß-Ionisation)
FAO	Food and Agricultural Organization
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatograph, Gaschromatographie
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
ha	Hektar
HMGR	β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie)
I.D.	Innerer Durchmesser
IR	Infrarot
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LDL	Low Density Lipoproteins
L-AN	Lipase-Präparat aus <i>Aspergillus niger</i>
L-PC	Lipase-Präparat aus <i>Pseudomonas cepacia</i>
L-SP	Lipase-Präparat aus Schweinepankreas
L-WK	Lipase-Präparat aus Weizenkeimen
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	mmol/l
MS	Massenspektrometer, Massenspektrum
Mt	Megatonne (1 000 000 t)
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
NP-	Normalphasen-

pNPP	p-Nitrophenylpalmitat
PTV	Programmed-temperature Vaporiser (temperaturprogrammierter Injektor)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
R _f	Retarding Factor
RP-	Reversed Phase (Umkehrphasen-)
R _t	Retention time (Retentionszeit)
s	Sekunde
SMT	Sterol-Methyl-Transferase
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasen-Extraktion)
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
TIC	Total Ion Chromatogram (Gesamtionen-Chromatogramm)
TM	Trockenmasse
TMS	Trimethylsilyl-
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v	Volumeneinheit

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Reis enthält Ferulasäureester von Phytosterolen, die unter der Bezeichnung γ -Oryzanol zusammengefasst werden. Als Hauptkomponenten wurden Cycloartenylferulat, 24-Methylcycloartenylferulat, 24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat und β -Sitosterylferulat identifiziert [1]. γ -Oryzanol besitzt antioxidative Aktivität und kann zur Stabilisierung von Kosmetika und Lebensmitteln eingesetzt werden [2 – 5]. Von besonderem ernährungsphysiologischem Interesse ist, dass γ -Oryzanol, ähnlich wie freie Phytosterole und ihre Fettsäureester, cholesterinsenkend wirkt [6 – 12]. Die cholesterinsenkende Wirkung von Reiskleie und Reiskleieöl wird u. a. auf γ -Oryzanol zurückgeführt [13 – 15]. *In-vivo* und *in-vitro* Studien deuten darauf hin, dass sowohl die antioxidative als auch die cholesterinsenkende Wirkung von γ -Oryzanol von seiner Sterylferulat-Verteilung beeinflusst wird [16 – 19]. Daher sind Analysemethoden nötig, mit denen neben dem γ -Oryzanol-Gehalt auch die Sterylferulat-Verteilung in Reis und Reisprodukten bestimmt werden kann.

Bisher beschriebene Methoden zur Bestimmung der Sterylferulat-Verteilung basieren auf der Reversed-Phase HPLC (RP-HPLC). Diese Methoden sind jedoch für die Untersuchung einer größeren Probenanzahl ungeeignet, da vor der HPLC-Analyse eine aufwendige Probenvorbereitung durchgeführt werden muß, um das Minorlipid γ -Oryzanol von störenden Matrixbestandteilen abzutrennen [1, 20 – 26].

In vielen Fällen, in denen Minor Komponenten in komplexen Matrices untersucht werden müssen, kann auf eine off-line Probenvorbereitung verzichtet werden, indem eine flüssigchromatographische Aufreinigung on-line mit der Gaschromatographie gekoppelt wird (on-line LC-GC). Das gesamte System aus flüssigchromatographischer Probenvorbereitung und on-line gekoppelter gaschromatographischer Analyse ist vollständig automatisierbar, so dass der Arbeits- und Zeitaufwand im Vergleich zu off-line Verfahren erheblich reduziert wird. Da Aufreinigung und Analyse in einem geschlossenen System stattfinden, werden außerdem Probenverluste sowie Kontaminationen oder Artefaktbildungen minimiert [27]. On-line LC-GC wurde bereits erfolgreich zur Analyse von Minorlipiden, wie freie Sterole, Sterol-Fettsäureester oder Tocopherole, angewandt [28 – 32].

Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf der on-line LC-GC eine schnelle und einfache Methode zur Analytik von γ -Oryzanol in Reis und Reisprodukten zu entwickeln. Die Methode sollte ohne off-line Probenvorbereitung die Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Steryl-

ferulat-Verteilung in einem aus dem Untersuchungsmaterial extrahierten Lipidextrakt ermöglichen.

Die entwickelte Methode sollte dann zur Untersuchung der natürlichen Schwankungsbreiten von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in Braunreis eingesetzt werden. Obwohl Braunreis den Rohstoff für alle Reisprodukte darstellt, lagen zur Variabilität von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in Braunreis bisher keine Daten vor. In die Untersuchung sollte auch der Einfluss unterschiedlicher Reifegrade einbezogen werden.

Im Rahmen der chemisch-analytischen Charakterisierung von gentechnisch verändertem Reis sollten anschließend γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in Reisproben gentechnisch veränderter Reislinien und ihrer unter identischen Bedingungen angebauten Elternlinien bestimmt werden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen gentechnisch veränderter Linien und ihrer Elternlinien sollten im Lichte der natürlichen Schwankungsbreiten konventioneller Sorten bewertet werden.

Schließlich sollte mit Hilfe der entwickelten on-line LC-GC-Methode der Einfluss eines technologischen Prozesses auf γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung untersucht werden. Als Beispiel für einen Verarbeitungsprozess, der sowohl thermische als auch mechanische Belastungen des Materials umfasst, wurde die Verarbeitung von Braunreis zu Vollkornreisflocken in betrieblichem Maßstab gewählt.

Tierstudien deuten darauf hin, dass die Hydrolyse der Esterbindung einen entscheidenden Schritt im Metabolismus von Sterylferulaten darstellt [33 – 37]. Enzyme, die an einer Hydrolyse beteiligt sind, wurden jedoch noch nicht identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten kommerzielle Enzympräparate auf eine Sterylferulat-hydrolysierende Aktivität untersucht werden. Für den Nachweis einer enzymatisch katalysierten Hydrolyse von Sterylferulaten sollte ebenfalls die on-line LC-GC-Methode eingesetzt werden.

2 GRUNDLAGEN

2.1 REIS (*ORYZA SATIVA*)

Reis (*Oryza sativa*) gehört zu den wichtigsten Grundnahrungsmitteln der Welt: 20 % des täglichen Energiebedarfs werden weltweit durch den Verzehr von Reis gedeckt. Eine besonders große Bedeutung nimmt Reis in asiatischen Ländern ein. So deckt Reis in diesen Ländern bis zu 75 % des täglichen Energiebedarfs (Bangladesh, Kambodscha, Myanmar). Mit Ausnahme der Antarktis wird Reis auf allen Kontinenten angebaut. Über 90 % der Weltproduktion werden in Asien angebaut. Wichtigste Anbaugeländer in Europa sind Italien (ca. 1,4 Mt/Jahr) und Spanien (ca. 0,8 Mt/Jahr) [38].

Die Anzahl an Reis-Sorten ist außerordentlich groß. In nationalen und internationalen Samenbanken sind über 100 000 Samenmuster eingelagert [39]. Im Handel wird Reis anhand der Kornform in Langkorn- und Rundkornreis eingeteilt. Beim Langkornreis sind die Körner 6 – 8 mm lang und etwa viermal so lang wie dick. Langkornreis bleibt beim Kochen körnig und verklebt nicht. Rundkornreis besteht dagegen aus 4 – 5 mm langen Körnern, die etwa doppelt so lang wie dick sind. Im Gegensatz zum Langkornreis verkleben die Körner beim Kochen wesentlich leichter. Verwendung findet Rundkornreis insbesondere für Risotto und Milchreis [40].

Abbildung 1 zeigt den anatomischen Bau eines Reiskorns. Reis gehört wie Hafer und Gerste zu den bespelzten Getreidearten. Die von den Spelzen umgebene Karyopse besteht zu etwa 93 % aus dem stärkehaltigen Endosperm. Die äußerste Schicht des Endosperms ist die proteinreiche Aleuronschicht. Sie macht zusammen mit Fruchtwand und Samenschale etwa 3 % der Karyopse aus. Die restlichen 4 % entfallen auf den Embryo [41, 42].

Bospelzter Reis wird als Paddy-Reis bezeichnet. Aufgrund der weitgehend unverdaulichen Spelzen ist Paddy-Reis für die menschliche Ernährung nicht geeignet. Durch Entspelzen von Paddy-Reis gewinnt man so genannten Braunreis. Braunreis benötigt lange Kochzeiten und wird schnell ranzig, da der Embryo und die äußeren Kornschichten oxidationsempfindliche Lipide enthalten. In der weiteren Verarbeitung von Reis werden daher durch so genanntes Polieren die äußeren Schichten und der Embryo entfernt. Als Produkt werden weiße Körner erhalten, die in erster Linie nur noch aus dem stärkehaltigen Endosperm bestehen. Aufgrund ihrer weissen Farbe werden sie als Weissreis bezeichnet. Reis wird vor allem in dieser Form verzehrt [40, 41].

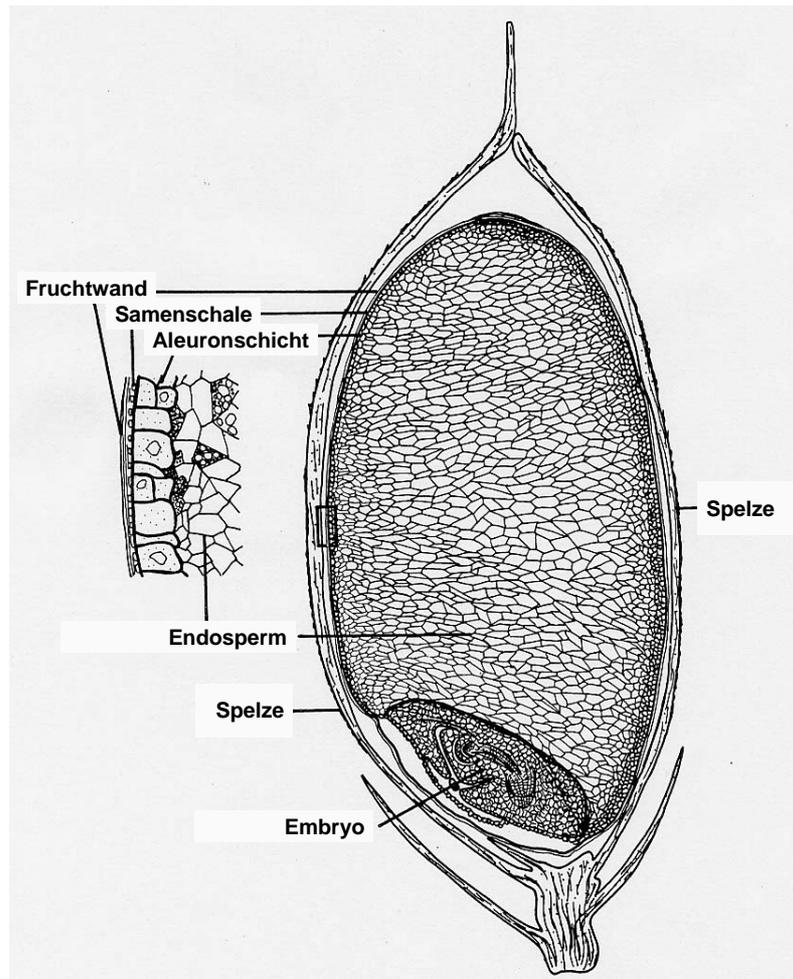


Abb. 1: Anatomischer Bau eines Reiskorns (nach [43]).

Fruchtwand, Samenschale, Aleuronschicht und Embryo fallen beim Polieren von Braunreis als so genannte Reiskleie an. Reiskleie ist sehr vitaminreich (v. a. Thiamin, Riboflavin und Niacin) und zeichnet sich durch hohe Gehalte an Ballaststoffen (25 %), Fett (20 %), Eiweiß (15 %) und Mineralstoffen (8 %) aus [40, 43]. Bisher wurde Reiskleie in erster Linie als Tierfutter verwertet, da sie aufgrund endogener Lipasen und Lipoxygenasen schnell ranzig wird [43, 44]. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, mit denen Reiskleie durch Inaktivierung der Enzyme stabilisiert werden kann [43, 45 – 48], so dass Reiskleie nun auch der menschlichen Ernährung zur Verfügung steht. Stabilisierte Reiskleie eignet sich u. a. als Zutat für Teigwaren, Backwaren, Desserts oder Soßen [40]. Aus stabilisierter Reiskleie gewonnenes Reiskleieöl ist in Japan, China, Thailand und Korea bereits weit verbreitet [49]. Von besonderem ernährungsphysiologischem Interesse ist, dass sowohl Reiskleie als auch Reiskleieöl cholesterinsenkende Wirkung besitzen [13, 15, 50 – 55]. Für die cholesterinsenkende Wirkung der beiden Produkte werden u. a. Ferulasäureester von Phytosterolen, so genanntes γ -Oryzanol, verantwortlich gemacht [13 – 15].

2.2 FERULASÄUREESTER VON PHYTOSTEROLEN (γ -ORYZANOL)

2.2.1 Struktur, Nomenklatur und Vorkommen

Im Jahre 1954 wurde aus Reisöl ein bis dahin unbekanntes Lipid isoliert. Da IR-spektroskopisch eine Alkoholfunktion nachgewiesen wurde, wurde das Lipid in Anlehnung an den systematischen Namen von Reis (*Oryza sativa*) als „ γ -Oryzanol“ bezeichnet [56]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es sich bei γ -Oryzanol nicht um eine Einzelsubstanz, sondern um eine Mischung aus Ferulasäureestern verschiedener Phytosterole handelt. Mit Hilfe chromatographischer und massenspektroskopischer Methoden wurden als Hauptkomponenten Cycloartenylferulat, 24-Methylcycloartenylferulat, 24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat und β -Sitosterylferulat identifiziert (Abb. 2) [1, 21, 23 – 25].

24-Methylcholesterylferulat wird in der Literatur meist als „Campesterylferulat“ bezeichnet. Diese Bezeichnung leitet sich ab von „Campesterol“, dem Trivialnamen für 24(R)-Methylcholesterol. Wie jedoch Untersuchungen mittels $^1\text{H-NMR}$ zeigten, stellt das in γ -Oryzanol identifizierte 24-Methylcholesterylferulat eine Mischung der Ferulasäureester von 24(R)-Methylcholesterol (Campesterol) und 24(S)-Methylcholesterol (22-Dihydrobrassicasterol) dar. (R)- und (S)-Epimer liegen im Verhältnis 3 : 7 vor [57]. Die epimeren Ester unterscheiden sich massenspektroskopisch nicht und konnten in den angewandten chromatographischen Systemen nicht getrennt werden. Die stereochemische Konfiguration von 24-Methylcholestanylferulat, das in der Literatur meist als „Campestanylferulat“ bezeichnet wird, wurde noch nicht bestimmt. In der vorliegenden Arbeit werden daher die genannten Trivialnamen nicht verwendet.

Neben den bereits genannten Sterylferulaten wurden in γ -Oryzanol Spuren von Cycloartenylferulat [21, 23], Cycloeucalenylferulat [58], Δ^7 -24-Methylcholesterylferulat [1, 23], 24-Methylencholesterylferulat [23, 58], Sitostanylferulat [1, 22, 23, 58], Δ^7 -Sitosterylferulat [1, 23], Stigmasterylferulat [1, 21] und Δ^7 -Stigmasterylferulat [1] nachgewiesen.

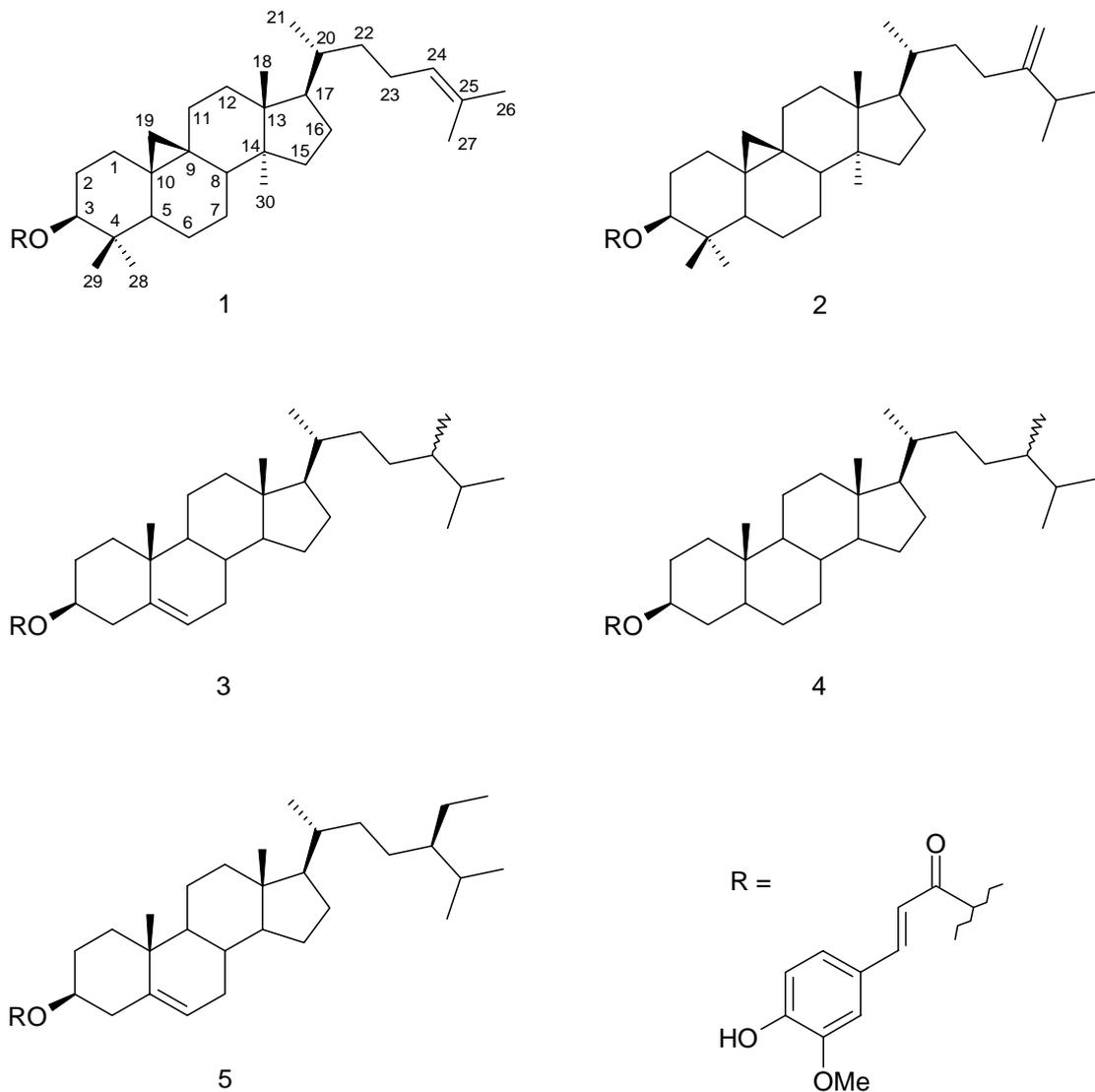


Abb. 2: Strukturen der Hauptkomponenten von γ -Oryzanol: Cycloartenylferulat (1), 24-Methylen-cycloartenylferulat (2), 24-Methylcholesterylferulat (3), 24-Methylcholestanylferulat (4) und β -Sitosterylferulat (5).

Die in γ -Oryzanol gebundene Ferulasäure liegt in der *trans*-Konfiguration vor. In Spuren wurden entsprechende *cis*-Ferulasäureester nachgewiesen [23, 58]. Da *trans*-Ferulasäure und ihre Ester unter Einfluss von Licht sehr leicht in die entsprechenden *cis*-Derivate übergehen (Abb. 3) [59 – 61], wird vermutet, dass es sich bei den detektierten *cis*-Ferulaten um Artefakte handelt, die während der Probenvorbereitung aus den entsprechenden *trans*-Ferulaten gebildet wurden [23, 58]. In der vorliegenden Arbeit wird unter der Bezeichnung γ -Oryzanol die Gesamtheit der *trans*-Sterylderivate in Reis verstanden.

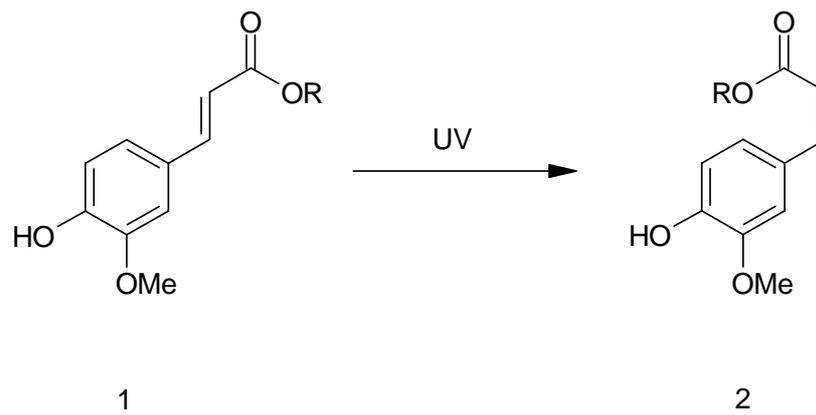


Abb. 3: Isomerisierung von *trans*-Ferulasäureestern (1) unter Lichteinfluss zu den entsprechenden *cis*-Ferulasäureestern (2).

Nach der Entdeckung von Sterylferulaten in Reis wurden Samen anderer Pflanzen ebenfalls auf Sterylferulate untersucht. Während in Samen von Hafer (*Avena sativa*), Milletirise (*Panicum miliaceum*), Rotem Klee (*Trifolium pratense*), Flachs (*Linum usitatissimum*), Distel (*Cirsium arevense*) und Raps (*Brassica napus*) keine Sterylferulate gefunden wurden, wurden in Samen von Mais (*Zea mays*), Weizen (*Triticum aestivum*), Wildreis (*Zizania palustris*), Roggen (*Secale cereale*), Triticale (*Triticum* \times *Secale*), Hiobsträne (*Coix lacryma-jobi*), Gerste (*Hordeum vulgare*) und Sorghumhirse (*Sorghum bicolor*) Sterylferulate nachgewiesen [20, 22, 24 – 26, 62 – 66]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Sterylferulat-Gehalt und die identifizierten Sterylferulate in den untersuchten Samen. Reis (Braunreis) weist nicht nur den mit Abstand höchsten Sterylferulat-Gehalt auf, sondern unterscheidet sich von den Samen anderer Pflanzen auch deutlich bezüglich der mit Ferulasäure veresterten Sterole: 24-Methylcycloartanol und Cycloartenol, deren Ferulasäureester in Reis dominieren [1], wurden in keiner der bisher untersuchten Samen als Ferulat nachgewiesen. Die Ferulasäureester von 24-Methylcholestanol und Sitostanol, die in Mais, Weizen, Roggen, Triticale und Hiobsträne dominieren, stellen dagegen in Reis nur einen geringen Anteil der Sterylferulate. Interessanterweise kommen sowohl 24-Methylcycloartanol und Cycloartenol als auch 24-Methylcholestanol und Sitostanol in pflanzlichen Ölen im Allgemeinen nur in geringen Mengen vor [67].

Tabelle 1: Ferulasäureester von Phytosterolen in Samen: Gesamtgehalt an Sterylferulaten und identifizierte Sterole

Pflanze	Sterylferulate [mg/100 g]	Sterole ¹	Literatur
Reis (<i>Oryza sativa</i>) ²	46	24-Methylencycloartanol Cycloartenol 24-Methylcholesterol β -Sitosterol 24-Methylcholestanol	[1, 21, 23 – 25, 63]
Mais (<i>Zea mays</i>)	4 – 23	Sitostanol 24-Methylcholestanol β -Sitosterol 24-Methylcholesterol	[20, 24 – 26, 63, 65]
Weizen (<i>Triticum aestivum</i>) ²	5 – 12	Sitostanol 24-Methylcholestanol β -Sitosterol 24-Methylcholesterol	[20, 22, 63, 65]
Wildreis (<i>Zizania palustris</i>)	9	n. b. ³	[63]
Roggen (<i>Secale cereale</i>)	3 – 6	Sitostanol 24-Methylcholestanol β -Sitosterol 24-Methylcholesterol	[20, 22, 64, 65]
Triticale (<i>Triticum</i> \times <i>Secale</i>)	5	Sitostanol 24-Methylcholestanol 24-Methylcholesterol	[20]
Hiobsträne (<i>Coix lacryma-jobi</i>)	5	Sitostanol 24-Methylcholestanol	[62, 63, 68]
Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>) ²	0,4	n. b.	[63]
Sorghumhirse (<i>Sorghum bicolor</i>)	Spuren	n. b.	[66]

¹ dominierende Sterole² ohne Spelzen³ nicht bekannt

In Mais wurden neben Phytosterolen, die mit Ferulasäure (3-Methoxy-4-hydroxycimtsäure) verestert sind, in geringen Mengen auch Phytosterole nachgewiesen, die mit *p*-Coumarsäure (4-Hydroxycimtsäure) verestert sind. Bei den mit *p*-Coumarsäure veresterten Sterolen dominieren 24-Methylcholesterol, Sitostanol und 24-Methylcholestanol [25, 26]. Ein weiteres

Steryl-*p*-coumarat, 24-Methylencycloartanyl-*p*-coumarat, wurde in der Orchidee *Cirrhopetalum elatum* gefunden [69].

An Mais- und Weizenkörnern wurde untersucht, in welchen Geweben des Getreidekorns Sterylferulate vorkommen [20, 70, 71]. Die Untersuchungen zeigten, dass die Sterylferulate fast ausschließlich in der Aleuronschicht enthalten sind. Perikarp, Stärkezellen und Keim enthalten nur geringe Mengen Sterylferulate (Abb. 4). Sterylferulate wurden daher als Indikator für eine mechanische Beschädigung von Maiskörnern vorgeschlagen: von der Oberfläche unbeschädigter Maiskörner können nur geringe Mengen Sterylferulate extrahiert werden, weil die äußerste Kornschicht, das Perikarp, die Extraktion der Sterylferulate aus der Aleuronschicht verhindert. Aus mechanisch beschädigten Maiskörnern, in denen das Perikarp verletzt ist, können dagegen große Mengen an Sterylferulaten extrahiert werden [70].

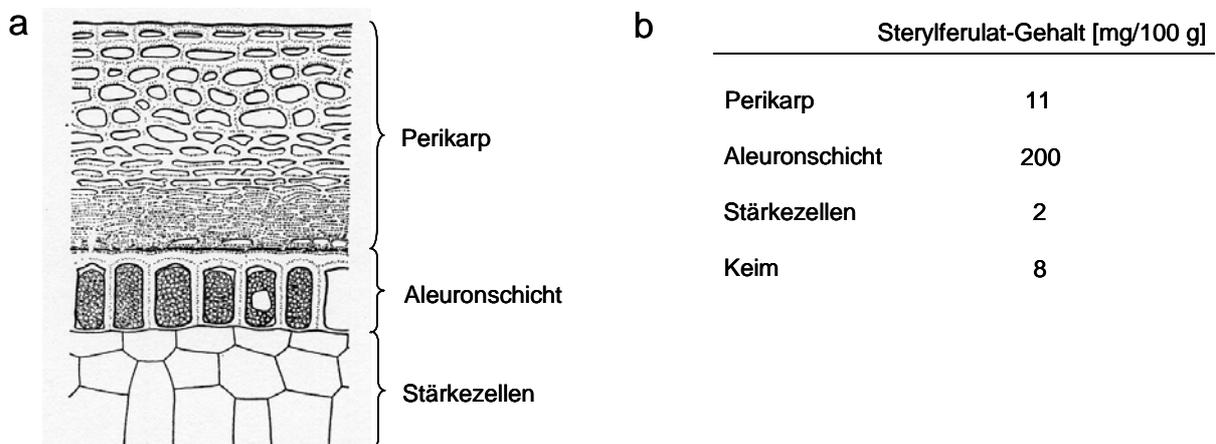


Abb. 4: Verteilung von Sterylferulaten im Maiskorn:

(a) Querschnitt durch den Randteil eines Maiskorns (Vergrößerung 200fach) [72].

(b) Sterylferulat-Gehalt in verschiedenen Geweben eines Maiskorns [70, 71].

2.2.2 Biosynthese

Die Biosynthese von γ -Oryzanol wurde noch nicht näher untersucht. Zahlreiche Arbeiten haben sich jedoch mit der Biosynthese von Ferulasäure und Phytosterolen – den Bestandteilen von γ -Oryzanol – beschäftigt.

2.2.2.1 Phytosterole

Phytosterole werden aus Isopentenylpyrophosphat aufgebaut und gehören daher zur Klasse der Isoprenoide [73]. Isopentenylpyrophosphat kann in Pflanzen auf zwei Wegen synthetisiert werden: in Plastiden erfolgt die Synthese aus Pyruvat und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg). Im Cytoplasma und in den Mitochondrien wird Isopentenylpyrophosphat dagegen aus Acetyl-CoA synthetisiert (Acetat-Mevalonat-Weg; Abb. 5). Für die Biosynthese von Phytosterolen nutzen Pflanzen in erster Linie Isopentenylpyrophosphat aus dem Acetat-Mevalonat-Weg [74 – 77]. Isopentenylpyrophosphat aus dem 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg wird allenfalls in geringem Umfang für die Synthese von Phytosterolen verwendet [78].

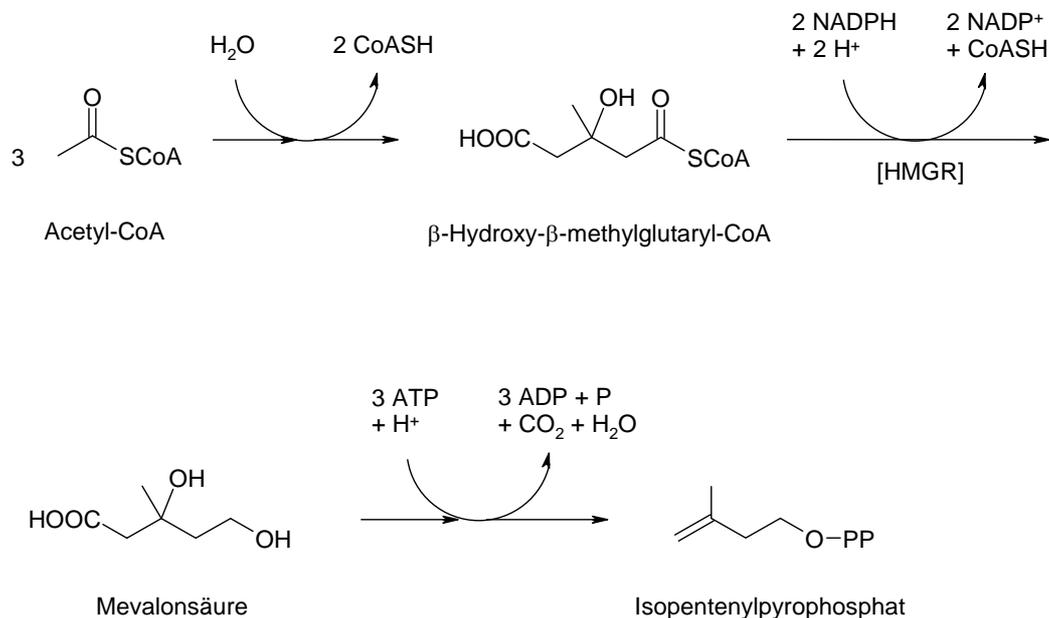


Abb. 5: Schematische Darstellung der Bildung von Isopentenylpyrophosphat auf dem Acetat-Mevalonat-Weg. Bei der Regulation des Acetat-Mevalonat-Weges nimmt das Enzym β -Hydroxy-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR) eine Schlüsselposition ein [74, 75, 79].

Phytosterole werden aus insgesamt sechs Molekülen Isopentenylpyrophosphat aufgebaut (Abb. 6). Aus drei Molekülen Isopentenylpyrophosphat wird zunächst Farnesylpyrophosphat gebildet. Kondensation zweier Moleküle Farnesylpyrophosphat führt zu Squalen. Dieses wird

zu Squalen-2,3-oxid oxidiert [73, 79 – 81]. In photosynthetisch aktiven Organismen (Algen, höhere Pflanzen) wird Squalen-2,3-oxid zum Phytosterol Cycloartenol zyklisiert. Demethylierungen an C-4 bzw. C-14, Öffnung des $9\beta,19$ -Cyclopropanrings, Einführung von Doppelbindungen in die Ringstruktur und Modifikationen der Seitenkette an C-17 führen zu der Vielzahl an Phytosterolen, die in höheren Pflanzen identifiziert wurden. Die Bildung der in γ -Oryzanol dominierenden Phytosterole (Cycloartenol, 24-Methylencycloartanol, 24-Methylcholesterol, 24-Methylcholestanol und β -Sitosterol) ist in Abbildung 6 dargestellt [77, 80 – 87].

Methylierung der Seitenkette in Cycloartenol führt zu 24-Methylencycloartanol. Beide Sterole besitzen zwei Methylgruppen an C-4 und werden daher als 4,4'-Dimethylsterole bezeichnet. Demethylierung von 24-Methylencycloartanol an C-4 führt zur Gruppe der 4-Monomethylsterole. Prominenter Vertreter der 4-Monomethylsterole ist Gramisterol, das aus 24-Methylencycloartanol durch Demethylierung an C-4 und C-14 sowie Öffnung des $9\beta,19$ -Cyclopropanrings gebildet wird. Erneute Methylierung der Seitenkette liefert Citrostadienol, dem Vorläufer der 24-Ethylsterole [77, 80 – 86]. Wie erstmals in Reis (*Oryza sativa*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) gezeigt wurde, werden die beiden Methylierungen der Seitenkette durch zwei unterschiedliche Sterol-Methyl-Transferasen katalysiert (SMT₁ und SMT₂) [88]. Aus Gramisterol bzw. Citrostadienol gehen nach erneuter Demethylierung an C-4 die 4-Desmethylsterole hervor, zu denen die bekannten Phytosterole 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol gehören [77, 80 – 86]. 24-Methylcholestanol wird über mehrere Zwischenstufen aus 24-Methylcholesterol gebildet [87].

Über die Regulation der Sterol-Biosynthese in Pflanzen ist nicht viel bekannt. Eine Regulation scheint bereits auf der Stufe der Isopentenylpyrophosphat-Synthese stattzufinden (Abb. 5): es wurde beobachtet, dass die Aktivität des Enzyms β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR) die Biosynthese der Phytosterole beeinflusst [73, 77, 89 – 91]. Kommt es zu einer Überproduktion von Sterolen, werden Sterole mit Fettsäuren verestert und in Lipidtröpfchen eingelagert. Insbesondere die „frühen“ Phytosterole wie Cycloartenol oder 24-Methylencycloartanol werden durch Veresterung mit Fettsäuren gebunden [90, 91]. Ferner scheint eine Endprodukt-Hemmung auf der Stufe der Sterol-Methyl-Transferase (SMT₁) zu existieren: Untersuchungen der SMT₁ aus Sonnenblumen zeigten, dass 24-Methylencycloartanol und β -Sitosterol die SMT₁-Aktivität hemmen [92].

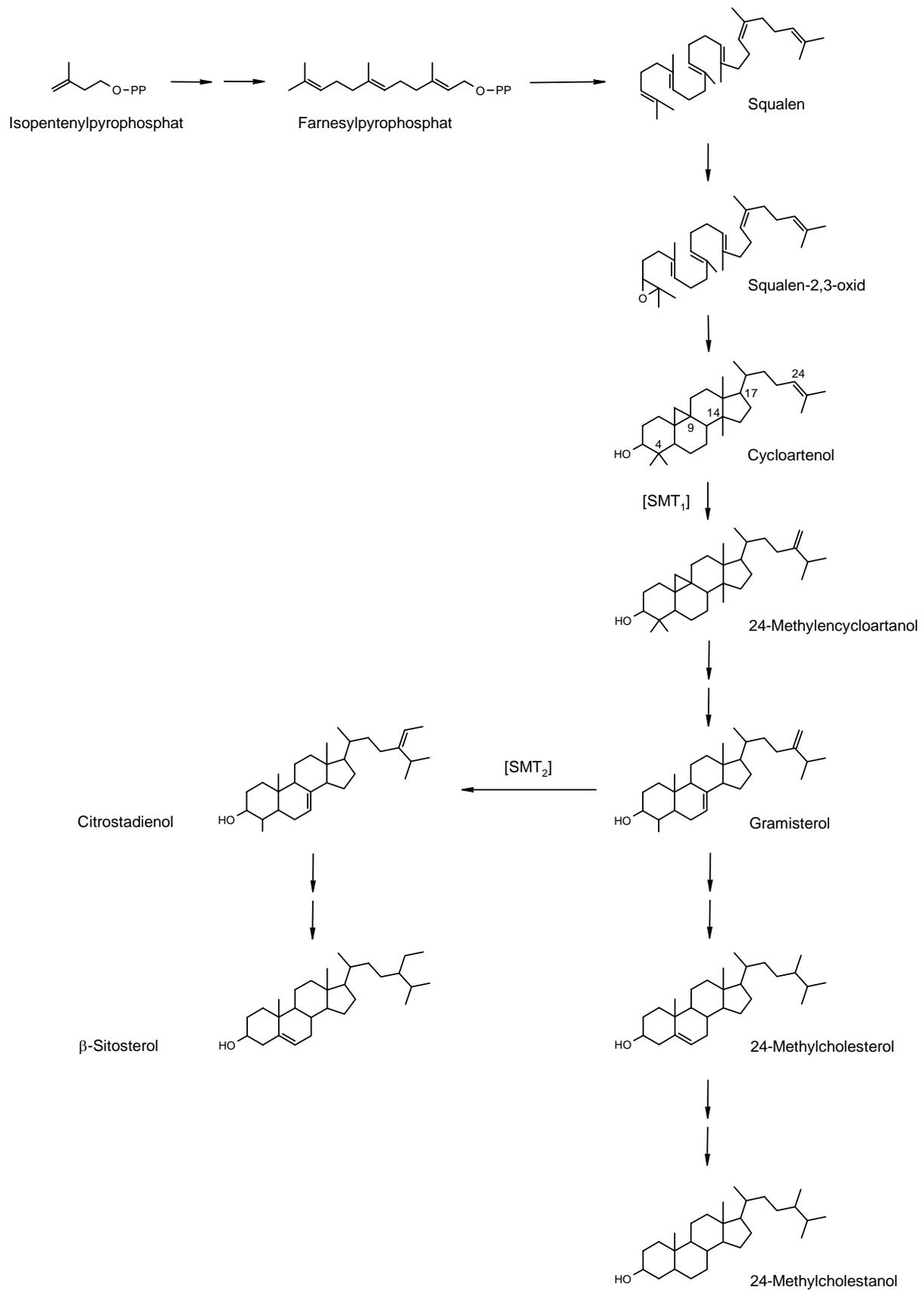


Abb. 6: Schematische Darstellung der Biosynthese von Phytosterolen in höheren Pflanzen [77, 80 – 87]. SMT = Sterol-Methyl-Transferase

Sterole liegen in Pflanzen in unterschiedlichen Formen vor: in freier Form, verestert mit Fettsäuren (Sterol-Fettsäureester) oder phenolischen Säuren (z. B. Sterylferulate) sowie glykosidisch gebunden an Monosaccharide (Sterylglykoside). Ist die C-6-Position des Monosaccharids mit einer Fettsäure verestert, so spricht man von acylierten Sterylglykosiden [81, 93]. Es wird davon ausgegangen, dass Sterole nach Veresterung oder Glykosylierung nicht weiter modifiziert werden [93]. So wurde beispielsweise beobachtet, dass das Enzym SMT₁ Cycloartenol nur dann zu 24-Methylencycloartanol methyliert, wenn die 3 β -Hydroxygruppe nicht verestert ist: Cycloartenylacetat wird nicht methyliert [94].

Der Anteil veresteter oder glykosylierter Sterole am Gesamt-Sterolgehalt variiert in Abhängigkeit von der Pflanzenart, dem Pflanzengewebe und seinem physiologischen Alter. Die Sterol-Profile der freien Sterole, Sterolester und Sterylglykoside können sich deutlich voneinander unterscheiden [93].

Reiskleie enthält neben γ -Oryzanol auch freie Sterole, Sterol-Fettsäureester, Sterylglykoside und acylierte Sterylglykoside. In den so genannten neutralen Sterol-Lipiden (freie Sterole, Sterol-Fettsäureester) wurden sowohl Endprodukte (24-Methylcholesterol, β -Sitosterol) als auch Intermediate der Sterol-Biosynthese (v. a. Cycloartenol, 24-Methylencycloartanol, Citrostadienol, Gramisterol) nachgewiesen. Die so genannten polaren Sterol-Lipide (Sterylglykoside, acylierte Sterylglykoside) enthielten dagegen nur Endprodukte der Sterol-Biosynthese (v. a. β -Sitosterol) [95]. In γ -Oryzanol dominieren die zu Beginn der Sterol-Biosynthese gebildeten 4,4'-Dimethylsterole Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol. 4-Desmethylsterole, wie z. B. 24-Methylcholesterol, 24-Methylcholestanol und β -Sitosterol, die zu den Endprodukten der Sterol-Biosynthese gehören, stellen Minorkomponenten dar. 4-Monomethylsterole wurden mit Ausnahme von Spuren an Cycloeucalenol [58] in γ -Oryzanol nicht nachgewiesen. Daraus kann für die in Reiskleie identifizierten Sterol-Lipide der in Abbildung 7 wiedergegebene Biosynthese-Weg abgeleitet werden.

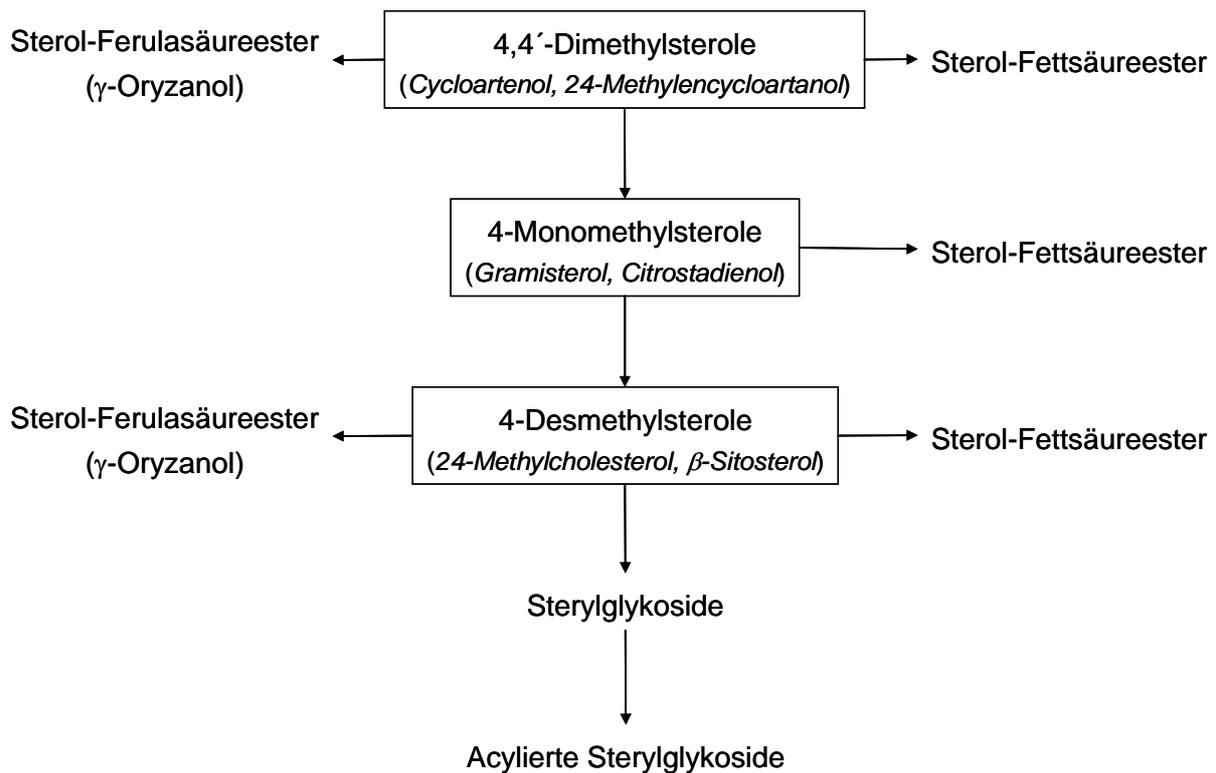


Abb. 7: Schematische Darstellung der Biosynthese von Sterol-Lipiden in Reiskleie

2.2.2.2 Ferulasäure

Die Biosynthese von Ferulasäure ist in Abbildung 8 dargestellt. Ferulasäure kann aus Phenylalanin oder Tyrosin gebildet werden [79, 96, 97]. Beide Aminosäuren sind Produkte des Shikimat-Wegs [79, 97 – 99]. Durch Abspaltung von Ammoniak aus Phenylalanin wird *trans*-Zimtsäure gebildet, die weiter zur *p*-Coumarsäure hydroxyliert wird. Desaminierung von Tyrosin führt direkt zur *p*-Coumarsäure. Hydroxylierung von *p*-Coumarsäure liefert Kaffeesäure, aus welcher durch Methylierung *trans*-Ferulasäure gebildet wird [79, 96, 97].

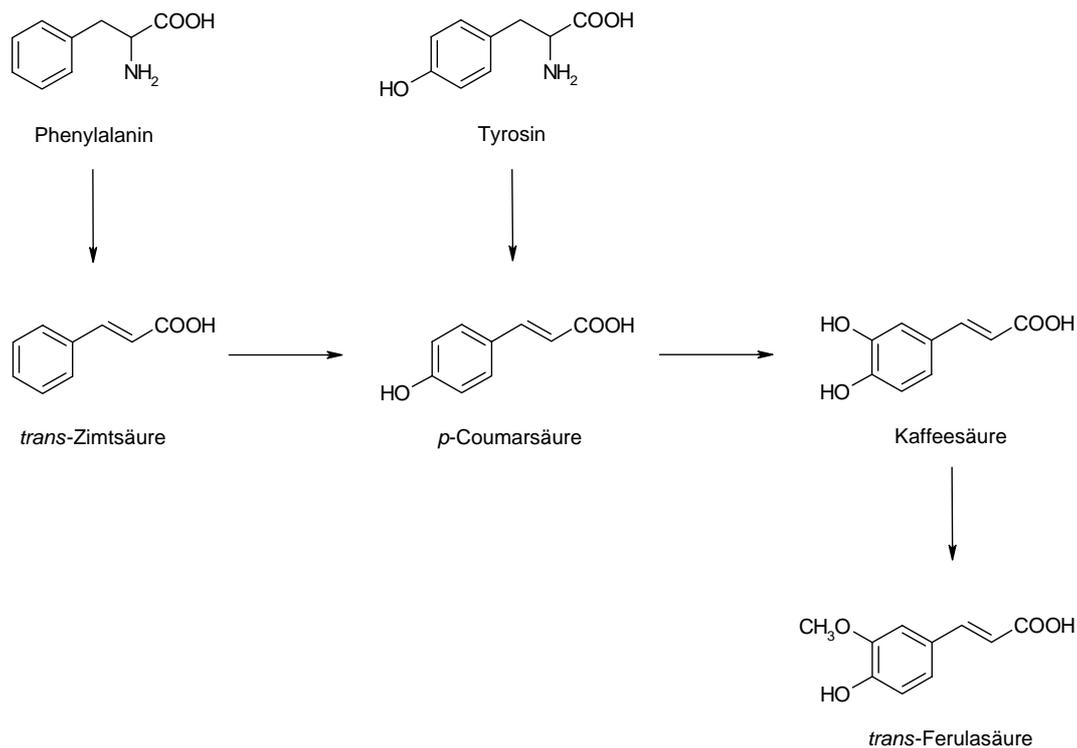


Abb. 8: Schematische Darstellung der Biosynthese von Ferulasäure aus den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin [79, 96, 97].

2.2.3 Biologische Funktion in der Pflanze

Die biologische Funktion von Sterylferulaten ist noch unbekannt. Da Sterylferulate in erster Linie in der Aleuronschicht, einer der äußeren Kornschichten, enthalten sind (vgl. 2.2.1), wird diskutiert, ob sie eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen [20, 100]. Freie Ferulasäure hemmt Wachstum und Aflatoxin-Produktion von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* [101]. Sterylferulate könnten als Speicher für Ferulasäure dienen oder selbst toxisch auf Schädlinge wirken. Studien zur Toxizität von Sterylferulaten gegenüber Pflanzenschädlingen kamen bisher zu unterschiedlichen Ergebnissen: Sterylferulate aus Weizen hatten keinen wachstumshemmenden Effekt auf den Lagerpilz *Aspergillus amstelodami* [20]. Ebenso zeigten Sterylferulate aus Mais keinerlei Toxizität gegenüber den Maisschädlingen *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Diplodia maydis*, Baumwollkapselbohrer (*Helicoverpa zea*) und Backobstkäfer (*Carpophilus hemipterus*). Das Wachstum von Backobstkäfer-Larven wurde sogar gefördert und die Aflatoxin-Produktion von *Aspergillus flavus* NRRL 6536 gesteigert. Der Pflanzenschädling *Sclerotinia sclerotiorum* wurde dagegen durch

Sterylferulate im Wachstum gehemmt. Die untersuchten Sterylferulate waren dabei unterschiedlich wirksam: während Sitostanylferulat keine Auswirkung auf das Wachstum von *Sclerotinia sclerotiorum* hatte, wirkten 24-Methylcholestanylferulat und γ -Oryzanol deutlich wachstumshemmend. Am wirkungsvollsten erwies sich eine Mischung aller Sterylferulate aus Mais [100]. Interessanterweise gibt es auch Hinweise, dass Sterylferulate eine anziehende Wirkung auf Getreideschädlinge haben können: so wurde beobachtet, dass der Rüsselkäfer *Sitophilus zeamidis* durch γ -Oryzanol – insbesondere in Kombination mit freien Sterolen und Diglyceriden – zur Eiablage stimuliert wird [102].

Sterylferulate besitzen aufgrund der phenolischen Hydroxygruppe der veresterten Ferulasäure antioxidative Eigenschaften (vgl. 2.2.5). Sterole wiederum sind als Membranbestandteile bekannt [83, 103]. Daher wäre denkbar, dass Sterylferulate, ähnlich wie Tocopherole, dem antioxidativen Schutz von biologischen Zellmembranen dienen. In Modellversuchen an künstlichen Membranen wurde untersucht, ob Ferulasäurederivate Membran-Phospholipide vor Oxidation schützen. Während Hexylferulat und Octylferulat die Oxidation der Phospholipide deutlich hemmten, zeigten Cycloartenylferulat und 24-Methylcycloartenylferulat keine antioxidative Aktivität bezüglich der Phospholipid-Oxidation [19]. Ob Sterylferulate andere Membranbestandteile vor Oxidation schützen können, wurde noch nicht untersucht.

2.2.4 Verwendung als kosmetischer Wirkstoff

γ -Oryzanol wird als ein multifunktionaler Kosmetik-Wirkstoff bezeichnet [104]. Ein multifunktionaler Wirkstoff stellt eine Substanz dar, die mehrere kosmetisch erwünschte Effekte aufweist. Eine der kosmetisch erwünschten Eigenschaften von γ -Oryzanol ist seine stimulierende Wirkung auf Talgdrüsen [105]. Ferner eignet sich γ -Oryzanol aufgrund seines π -Elektronensystems für den Einsatz als UV-Absorber in Kosmetika. Insbesondere UV-A- (320 – 340 nm) und UV-B-Strahlung (280 – 320 nm) werden von γ -Oryzanol absorbiert [104, 106 – 109]. Sonnenschutzmittel, die γ -Oryzanol enthalten, sind im Handel erhältlich [110]. Eine weitere kosmetisch erwünschte Eigenschaft von γ -Oryzanol ist seine antioxidative Wirkung (vgl. 2.2.5). Die Verwendung von γ -Oryzanol in Haarpflegemitteln zum Schutz von Haar und Kopfhaut vor unerwünschten Oxidationsprozessen ist patentiert [5]. Entsprechende Produkte sind bereits auf dem Markt [111].

2.2.5 Antioxidative Eigenschaft

Oxidativer Stress wird mit der Entstehung einer Reihe von Krankheiten, wie z. B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder neurodegenerativer Leiden, in Verbindung gebracht. Möglicherweise beugt eine Ernährung, die reich an antioxidativ wirkenden Nahrungsmittelbestandteilen ist, derartigen Erkrankungen vor [112].

In verschiedenen *in-vitro* Modellen wurde nachgewiesen, dass γ -Oryzanol eine antioxidative Wirkung besitzt [17 – 19, 113 – 117]. *In-vivo* reduzierte eine tägliche Dosis von 300 mg γ -Oryzanol bei Frauen in der Menopause den Gehalt an Lipidperoxiden im Serum [11].

Die antioxidative Wirkung von Sterylferulaten wird auf die phenolische Hydroxygruppe des Ferulasäure-Rests zurückgeführt: diese kann reaktive Radikale durch Abspaltung eines Wasserstoff-Radikals abfangen (H-Donor). Das gebildete Phenoxy-Radikal ist resonanzstabilisiert (Abb. 9) und somit i. d. R. weniger reaktiv als das abgefangene Radikal [118]. Die Fortsetzung der Radikal-Kettenreaktion wird so gehemmt.

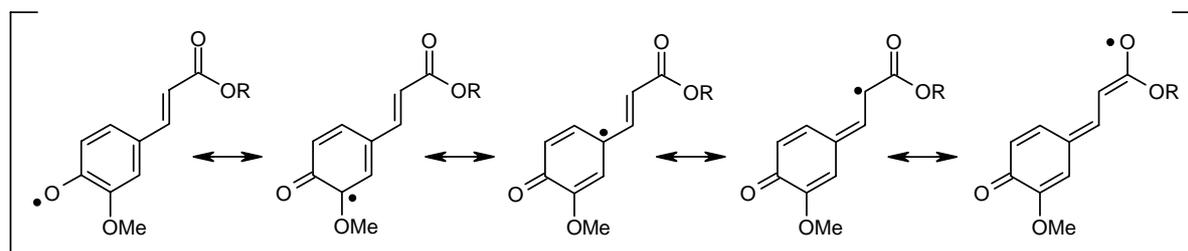


Abb. 9: Resonanzstabilisiertes Phenoxy-Radikal von Ferulasäure und ihren Derivaten.

Da Ferulasäure gemeinsames Strukturelement aller Sterylferulate ist, wäre zu erwarten, dass sich Sterylferulate in ihrer antioxidativen Aktivität nicht unterscheiden. In einigen *in-vitro* Modellen unterschieden sich Sterylferulate jedoch überraschenderweise in ihrer antioxidativen Wirkung: die Oxidation von Linolsäure unter UV-Beleuchtung wurde durch 24-Methylcycloartanylferulat und 24-Methylcholesterylferulat deutlich stärker gehemmt als durch Cycloartenylferulat [17]. Auch unter Lichtausschluss war 24-Methylcycloartanylferulat gegenüber der Autoxidation von Linolsäure wirksamer als Cycloartenylferulat [19]. Die Cholesteroloxidation wurde *in-vitro* durch 24-Methylcycloartanylferulat deutlich stärker gehemmt als durch die Ferulasäureester von Cycloartenol oder 24-Methylcholesterol [18]. Diese Studien zeigen, dass die antioxidative Wirkung von Sterylferulaten nicht allein

von der Aktivität der veresterten Ferulasäure als H^\bullet -Donor abhängt, sondern auch vom Sterol-Rest beeinflusst wird. Es wird diskutiert, ob der Sterol-Rest Einfluss auf die Verteilung des Sterylferulats in heterogenen Systemen hat (z. B. Anreicherung an Grenzflächen) und auf diese Weise die antioxidative Wirkung beeinflusst wird [19]. Da auch Sterole über antioxidative Eigenschaften verfügen [119], könnte der Sterol-Rest direkt an der antioxidativen Aktivität von Sterylferulaten beteiligt sein. Die herausragende antioxidative Wirkung von 24-Methylencycloartanylferulat [17 – 19] kann möglicherweise auf diese Weise erklärt werden. Radikale können sowohl durch Addition an die Methylengruppe als auch durch Abspaltung eines Wasserstoff-Radikals von C-25 abfangen werden. In beiden Fällen bildet sich ein relativ stabiles tertiäres Radikal (Abb. 10).

Auch wenn noch nicht vollständig geklärt ist, auf welche Weise der Sterol-Rest Einfluss auf die antioxidative Wirkung eines Sterylferulats hat, so zeigen die genannten Studien doch deutlich, dass die antioxidative Wirkung von γ -Oryzanol von seiner Zusammensetzung abhängen kann.

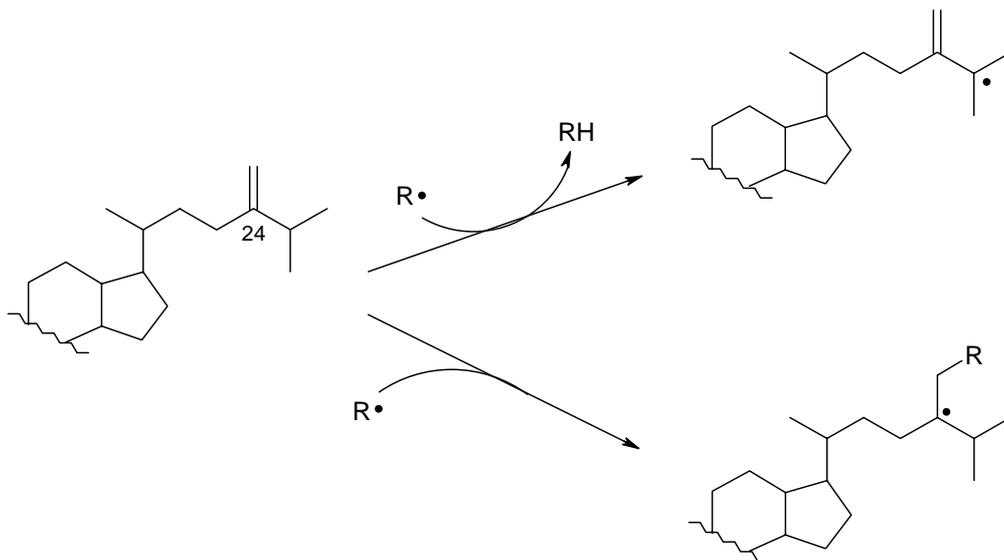


Abb. 10: Antioxidative Wirkung von 24-Methylencycloartanylferulat: die Reaktion mit Radikalen führt zu tertiären Radikalen.

Die antioxidative Wirkung von γ -Oryzanol ist nicht nur aus ernährungsphysiologischer sondern auch aus technologischer Sicht interessant. Als natürliches Antioxidationsmittel eignet sich γ -Oryzanol zur Stabilisierung von Lebensmitteln. So hemmt ein Zusatz zu Speiseöl die Polymerisation von Triglyceriden beim Frittieren [2, 3]. Eine Mischung aus Reiskleieöl, Sonnenblumenöl und Sesamöl ist auf dem europäischen Markt bereits als Stabilisator für

Frittieröl erhältlich. Mit Hilfe dieser Mischung sollen unhydrierte pflanzliche Öle, die reich an oxidationsempfindlichen ungesättigten Fettsäuren sind, zum Frittieren verwendet werden können [120]. Wird bei der Produktion von Milchpulver vor der Sprühtrocknung γ -Oryzanolreiches Reiskleieöl zugesetzt, so wird der oxidative Verderb des Milchpulvers während der Lagerung gehemmt. Das Produkt wird dabei durch den Zusatz von Reiskleieöl (0,1 %) sensorisch nicht beeinflusst [121]. Die Haltbarkeit gebratener Rindfleischpasteten kann durch Zusatz von γ -Oryzanol ebenfalls verbessert werden: γ -Oryzanol reduziert durch Hemmung der Lipidoxidation die Bildung eines ranzigen Fehl aromas („warmed over flavor“). Daneben hemmt γ -Oryzanol die Cholesterol-Oxidation, so dass während der Lagerung weniger toxisches 7-Ketocholesterol entsteht [4].

γ -Oryzanol wird nicht nur als natürliches Antioxidationsmittel für Lebensmittel sondern auch als Stabilisator für Kautschuk und Kunststoffe diskutiert. Insbesondere für Produkte, die in der Medizin eingesetzt werden sollen oder die in Kontakt mit Lebensmitteln kommen, wird angestrebt, synthetische Antioxidationsmittel durch natürliche zu ersetzen. Während Versuche, γ -Oryzanol als Antioxidationsmittel in Polyethylen einzusetzen, nur mäßigen Erfolg brachten [122], konnten bei der Vulkanisation von Kautschuk synthetische Antioxidationsmittel durch γ -Oryzanol-haltiges Reiskleieöl erfolgreich ersetzt werden [123].

2.2.6 Cholesterinsenkende Wirkung

Ein hoher Cholesterinspiegel (Hypercholesterolämie), insbesondere ein erhöhter Gehalt an LDL-Cholesterol, gilt als Risikofaktor für die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [124 – 126]. Kann der Cholesterinspiegel durch eine Änderung von Lebensweise und Ernährung nicht ausreichend gesenkt werden, wird eine medikamentöse Therapie empfohlen [127]. Die Bemühungen, einen erhöhten Cholesterinspiegel zu senken, können durch den Verzehr cholesterinsenkender Lebensmittel unterstützt werden. So ist die cholesterinsenkende Wirkung von Phytosterolen und ihren Fettsäureestern seit langem bekannt und entsprechend angereicherte Lebensmittel sind seit einigen Jahren auf dem europäischen Markt erhältlich [128, 129].

γ -Oryzanol wies in einer Reihe von Tierstudien eine cholesterinsenkende Wirkung auf. So senkte γ -Oryzanol den Cholesterinspiegel in hypercholesterolämischen Ratten und Hamstern. Insbesondere der Gehalt an LDL-Cholesterol wurde signifikant reduziert [6 – 10]. Darüber hinaus hemmte γ -Oryzanol in hypercholesterolämischen Ratten die Blutplättchen-Aggregation [130] und reduzierte in hypercholesterolämischen Hamstern die Ablagerung athero-

sklerotischer Plaque [10]. In Humanstudien senkte eine tägliche Dosis von 300 mg γ -Oryzanol in zwei Monaten den Cholesterinspiegel hypercholesterolämischer Patienten um 8 – 12 % [11, 12].

Der Mechanismus der cholesterinsenkenden Wirkung von γ -Oryzanol ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen an hypercholesterolämischen Ratten und Hamstern zeigten, dass γ -Oryzanol die Cholesterol-Absorption hemmt [10, 131]. In hypercholesterolämischen Ratten wurde beobachtet, dass γ -Oryzanol die fäkale Ausscheidung von Cholesterol und Gallensalzen erhöht [131].

Versuche an hypercholesterolämischen Ratten, in denen die Wirkung zweier γ -Oryzanol-Präparate verglichen wurde, deuten darauf hin, dass die Sterol-Verteilung die cholesterinsenkende Wirkung beeinflussen kann [16]. Der anfängliche Verdacht, Cycloartenylferulat sei in erster Linie für die cholesterinsenkende Wirkung von γ -Oryzanol verantwortlich, konnte nicht bestätigt werden [132]. Weitergehende Untersuchungen sind nötig, um den Mechanismus der cholesterinsenkenden Wirkung von Sterylferulaten aufzuklären und die physiologisch wirksamsten Vertreter dieser Verbindungsklasse zu identifizieren. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund, neben Reis auch andere Cerealien als Quelle für Sterylferulate zu nutzen, interessant, da sich die Sterylferulat-Verteilungen in diesen Cerealien von der in Reis grundlegend unterscheiden (vgl. 2.2.1).

2.2.7 Metabolismus

Über den Metabolismus von oral aufgenommenen γ -Oryzanol ist wenig bekannt. Tierstudien deuten darauf hin, dass die Hydrolyse der Esterbindung einen entscheidenden Schritt im Metabolismus von Sterylferulaten darstellt. Wurde Kaninchen und Ratten ^{14}C -markiertes γ -Oryzanol (3-Position der Ferulasäure) verabreicht, so wurden 84 – 86 % der radioaktiven Dosis im Faeces und 7 – 10 % im Urin ausgeschieden. Intakte Sterylferulate wurden im Urin nicht nachgewiesen. Als Metabolite von γ -Oryzanol wurden Ferulasäure und ihre Stoffwechselprodukte nachgewiesen [33, 35]. Im Plasma von Hunden und Kaninchen wurde ebenfalls Ferulasäure als Metabolit von γ -Oryzanol detektiert [34, 36, 37, 133].

Der Ort der Hydrolyse von γ -Oryzanol und die beteiligten Enzyme wurden noch nicht identifiziert. Versuche am isolierten Dünndarm (Ileum) zeigten, dass in Kaninchen γ -Oryzanol in intakter Form ins Blut aufgenommen wird [33]. In Ratten wurden dagegen 10 – 20 % des resorbierten γ -Oryzanol im Darmgewebe hydrolysiert [35]. Nicht erfasst wurde in den durchgeführten *in-situ*-Experimenten der Einfluss von Verdauungsenzymen der Bauch-

speicheldrüse, da die isolierten Darmabschnitte während der Experimente keine Verbindung zur Bauchspeicheldrüse hatten und vor der Untersuchung gespült wurden. Ebenfalls ungeklärt blieb, ob nicht bereits im Magen ein Abbau der Sterylferulate stattfindet.

2.2.8 Analysenmethoden

Zur Bestimmung des γ -Oryzanol-Gehalts in Reiskleieöl wurden photometrische Methoden beschrieben [134, 135]: nach Verdünnen des Öls mit organischem Lösungsmittel wird die Absorption der Lösung im Absorptionsmaximum von γ -Oryzanol bei 310 – 330 nm bestimmt und daraus mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten oder nach externer Kalibrierung die γ -Oryzanol-Konzentration errechnet. Matrixeinflüsse, wie z. B. die Eigenabsorption der Ölmatrix, können mit Hilfe mathematischer Operationen (2. Ableitung des UV-Spektrums, Multicomponent Analysis) reduziert werden [135].

Neben der Photometrie eignet sich auch die HPLC an Normalphasen zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Sterylferulaten in einer Lipidmatrix [136 – 138]. Die Sterylferulate werden dabei chromatographisch von störenden Matrixbestandteilen abgetrennt, so dass eine zuverlässige Quantifizierung möglich ist [136]. Abhängig von den chromatographischen Bedingungen eluieren die Sterylferulate in einem [136, 138] oder in zwei Peaks [137].

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung von Speiseöl auf Sterylferulate wurde als Verfahren zum Nachweis von Reiskleieöl in Speiseölen vorgeschlagen [139]. Eine Unterscheidung einzelner Sterylferulate ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Da Sterylferulate auch in Maiskeimöl enthalten sind [25], ist davon auszugehen, dass die Methode nicht zur Untersuchung von Maiskeimöl geeignet ist bzw. ein Zusatz von Maiskeimöl zu Speiseölen die Anwesenheit von Reiskleieöl vortäuscht.

Die gaschromatographische Untersuchung von Sterylferulaten in Getreidekörnern erforderte eine aufwendige Probenvorbereitung [24]. Zunächst wurde aus dem Probenmaterial durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittelgemisch ein Lipidextrakt gewonnen, aus welchem dann die Sterylferulate durch Extraktion mit Natronlauge isoliert wurden. Erst nach Aufreinigung der isolierten Sterylferulate mittels präparativer Dünnschichtchromatographie konnten die Sterylferulate gaschromatographisch untersucht werden. Die gaschromatographische Trennung der underivatisierten Sterylferulate bereitete Schwierigkeiten. Durch Acetylierung oder Silylierung der phenolischen Hydroxygruppe wurde die Trennung zwar verbessert, γ -Oryzanol konnte jedoch nur in zwei Peaks (Cycloartenylferulat und 24-Methylencycloartenylferulat) aufgetrennt werden.

Die RP-HPLC lieferte die besten Ergebnisse bezüglich der Trennung einzelner Sterylferulate. Nach Acetylierung der phenolischen Hydroxygruppe konnten Evershed et al. [24] γ -Oryzanol in Cycloartenylferulat, 24-Methylencycloartanylferulat, 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat auftrennen. In späteren Arbeiten gelang die Trennung underivatisierter Sterylferulate [1, 20 – 23, 25, 26, 140, 141] und nach Optimierung der chromatographischen Bedingungen konnten neben Cycloartenylferulat, 24-Methylencycloartanylferulat, 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat auch Minorbestandteile von γ -Oryzanol detektiert werden [1, 23, 25, 26, 140, 141]. Auf der RP-HPLC basierende Methoden erfordern allerdings eine aufwendige Probenvorbereitung, um die Sterylferulate von störenden Matrixbestandteilen abzutrennen. Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion [20 – 23] wurden Kombinationen aus Flüssig-Flüssig-Extraktion und präparativer Dünnschichtchromatographie [24], Flüssig-Flüssig-Extraktion und Säulenchromatographie [25], Säulenchromatographie und präparativer Normalphasen-HPLC [1] sowie Säulenchromatographie und fliehkraftvermittelter präparativer Chromatographie [26] eingesetzt.

2.3 ON-LINE LC-GC

2.3.1 Hintergrund

Die Gaschromatographie (GC) zeichnet sich durch eine sehr hohe Trennleistung aus und findet in der Lebensmittelanalytik breite Anwendung. Vor einer gaschromatographischen Analyse ist jedoch meist die Isolierung der Analyten aus der vorliegenden Matrix bzw. die Abtrennung störender Matrixbestandteile nötig. Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der Festphasen-Extraktion (SPE) können hierfür ebenfalls chromatographische Methoden angewandt werden. Hierzu zählen die Säulenchromatographie, Dünnschichtchromatographie (DC) und die Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC). Die effektivste Methode zur Probenaufreinigung stellt die HPLC dar. Sie besitzt die höchste Trennleistung der genannten Methoden. Außerdem kann mit Hilfe eines Detektors die Aufreinigung on-line verfolgt werden und dadurch die gewünschte Fraktion sehr präzise von Matrixbestandteilen abgetrennt werden.

Unabhängig von der eingesetzten Methode bedeutet die Probenvorbereitung i. d. R. einen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand. Zusätzlich besteht während der Probenvorbereitung stets die Gefahr, dass ein Teil der Analyten verloren geht, die Probe kontaminiert wird oder durch Umwelteinflüsse Artefakte gebildet werden. Dies wirkt sich auch negativ auf die Reproduzierbarkeit der gesamten Analysenmethode aus. Da nur ein Aliquot der isolierten Fraktion, z. B. einer LC-Fraktion, in den Gaschromatographen injiziert wird, wird die Empfindlichkeit der Analysenmethode reduziert.

Die on-line Kopplung einer Aufreinigung mittels HPLC mit der Gaschromatographie (on-line LC-GC) bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich. Da die gesamte HPLC-Fraktion übertragen werden kann, wird die Empfindlichkeit der Analysenmethode gesteigert. Die gesamte Aufreinigung findet in einem geschlossenen System statt, so dass Verluste von Analyten, Kontaminationen oder Artefaktbildungen minimiert werden. On-line LC-GC-Methoden zeichnen sich daher meist durch eine sehr gute Reproduzierbarkeit aus. Nicht zuletzt ist der Prozess automatisierbar und reduziert so den Arbeits- und Zeitaufwand der gesamten Analysenmethode erheblich.

Die Herausforderung in der Kopplung von HPLC und GC liegt darin, zwei chromatographische Systeme miteinander zu verbinden, deren mobile Phasen in unterschiedlichen physikalischen Zuständen vorliegen. Während des on-line Transfers der (flüssigen) LC-Fraktion müssen Analyten und Fließmittel voneinander getrennt werden, wobei die Analyten

als scharfe Bande auf der stationären Phase der GC-Säule zurückbleiben sollen. In der herkömmlichen Gaschromatographie werden i. d. R. Volumina von wenigen Mikrolitern injiziert. In der on-line LC-GC müssen dagegen Volumina von mehreren hundert Mikrolitern in den GC transferiert werden. Für den Transfer derart großer Volumina wurden eine ganze Reihe spezieller Kopplungstechniken entwickelt. Durchgesetzt haben sich das On-column-Interface, das Loop-type-Interface und die Verwendung eines temperaturprogrammierten Injektors (PTV) als Interface [142, 143]. Die Prinzipien dieser Kopplungstechniken sollen im folgenden Kapitel beschrieben werden.

2.3.2 Kopplungstechniken

2.3.2.1 On-column-Interface

Abbildung 11 zeigt schematisch den Aufbau eines On-column-Interface. Nach Umlegen eines Schaltventils befördert die HPLC-Pumpe den Eluenten nicht mehr in das Abfallgefäß, sondern über einen On-column-Injektor in eine unbelegte Vorsäule („retention gap“) des GC-Säulensystems [144]. Die Ofentemperatur befindet sich während des Transfers unterhalb des auf den Säuleneingangsdruck korrigierten Siedepunkts des Eluenten. Der Eluent flutet die Vorsäule und bildet einen Film auf deren Innenwand. Nach Beendigung des Transfers beginnt der Film von hinten (Injektorseite) abzdampfen. Leichtflüchtige Analyten verdampfen ebenfalls, werden jedoch vom Flüssigkeitsfilm, der als stationäre Phase fungiert, zurückgehalten. Auf diese Weise werden flüchtige Verbindungen aufkonzentriert und befinden sich nach dem Abdampfen an der Stelle, an der der letzte Rest des Eluenten abgedampft ist. Dieser Effekt wird als „solvent trapping“ bezeichnet [145]. Schwerflüchtige Verbindungen bleiben auf der gesamten Länge der Vorsäule zurück („band broadening in space“ [146, 147]). Startet das Temperaturprogramm, so dampfen die schwerflüchtigen Verbindungen von der unbelegten Vorsäule ab und werden zu Beginn der Trennsäule auf deren stationären Phase fokussiert („phase ratio focusing“ [148]). Unterstützt wird dies dadurch, dass die stationäre Phase der Trennsäule durch die Lösungsmitteldämpfe quillt und so über eine gesteigerte Retentionskraft verfügt („phase soaking“ [149]).

Durch den Transfer mehrerer hundert Mikroliter Eluent werden große Mengen Lösungsmitteldampf freigesetzt. Um den Abfluss der Lösungsmitteldämpfe zu beschleunigen, ist vor der Trennsäule ein Lösungsmitteldampfausgang installiert („solvent vapour exit“ [150, 151]). Auf diese Weise wird der Abdampfvorgang beschleunigt und der Detektor vor den großen Mengen Lösungsmitteldampf geschützt. Kurz vor Ende des Abdampfvorgangs wird der

Lösungsmitteldampfausgang auf eine Restriktionskapillare umgelegt, um einen Verlust an Analyten während der GC-Analyse zu verhindern.

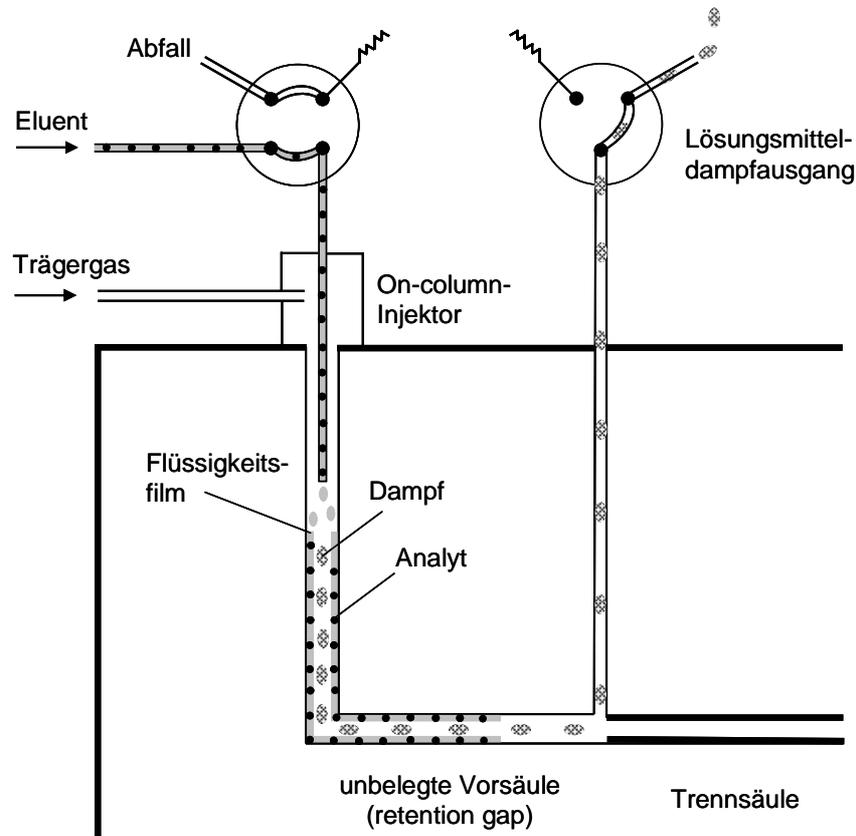


Abb. 11: Schematische Darstellung des On-column-Interfaces

Das On-column-Interface ist insbesondere für den Transfer leicht flüchtiger Analyten geeignet, da diese durch das beschriebene „solvent trapping“ beim Transfer nicht verloren gehen. Ein Nachteil der beschriebenen Technik ist, dass nur relativ kleine Volumina (10 – 250 μl) transferiert werden können, da die Vorsäule nur eine begrenzte Menge Flüssigkeit aufnehmen kann. Wird bereits während des Transfers Flüssigkeit abgedampft („concurrent evaporation“), so kann das transferierbare Volumen auf bis zu 1000 μl gesteigert werden [152]. Die Optimierung des On-column-Interface ist anspruchsvoll, da eine Reihe von Parametern den Transfer beeinflussen, insbesondere die Fließgeschwindigkeit des Eluenten, die Transfertemperatur, der Trägergasdruck und der Zeitpunkt für das Schließen des Lösungsmitteldampfausgangs.

2.3.2.2 Loop-type-Interface

Beim Loop-type-Interface [153] durchfließt der Eluent eine Probenschleife ehe er im Abfallgefäß aufgefangen wird (Abb. 12). Befindet sich die zu transferierende Fraktion in der Probenschleife, wird die Probenschleife mit Hilfe eines Schaltventils vom Eluentenstrom abgekoppelt und Trägergas drückt den Inhalt der Probenschleife in eine unbelegte Vorsäule des GC-Säulensystems. Die Ofentemperatur befindet sich während des Transfers über dem auf den Säuleneingangsdruck korrigierten Siedepunkt des Eluenten. Der Eluent verdampft deshalb beim Eintritt in den Gaschromatographen. Der resultierende Dampfdruck übersteigt den Säuleneingangsdruck des Trägergases, so dass ein weiteres Eindringen des Eluenten in die Vorsäule verhindert wird. Das Trägergas ist flussgeregelt und schiebt nur soviel Flüssigkeit nach, wie im Gaschromatograph abdampft („fully concurrent solvent evaporation“). Auf diese Weise regelt sich das System selbst und verhindert ein Fluten der GC-Säule. Die Lösungsmitteldämpfe werden über einen Lösungsmitteldampfausgang abgeführt.

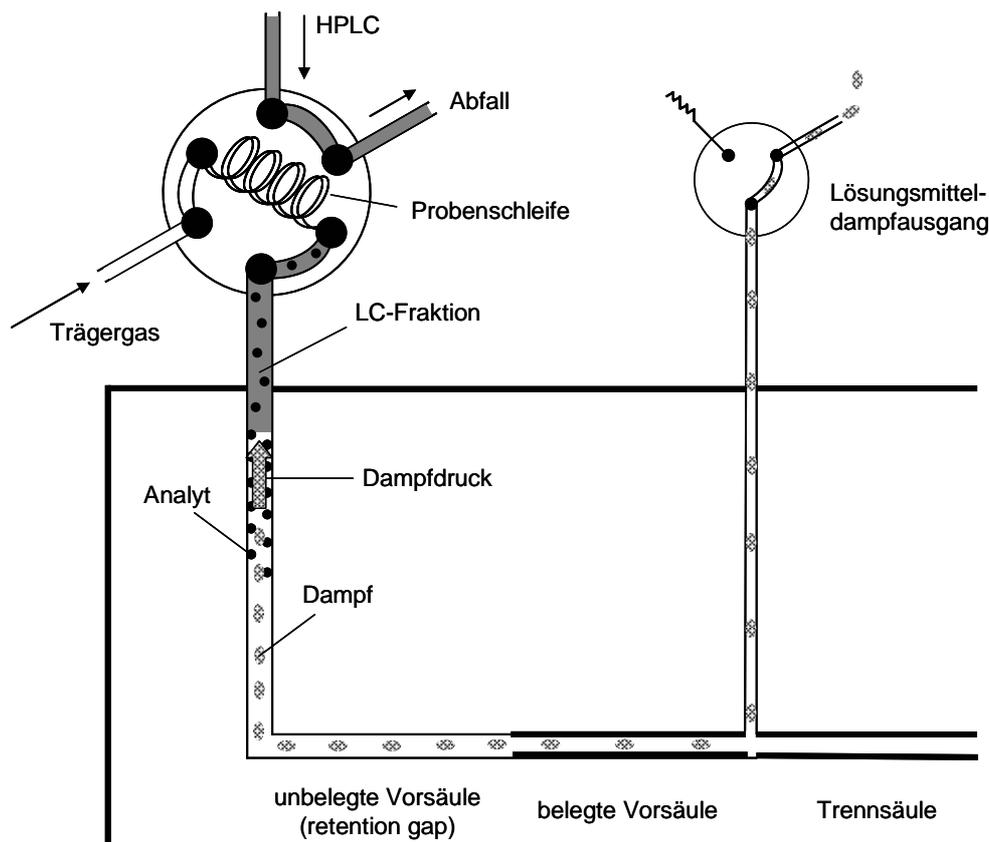


Abb. 12: Schematische Darstellung des Loop-type-Interface

Die Analyten bleiben auf der unbelegten Vorsäule zurück und bilden eine breite Bande („band broadening in space“). Durch das bereits beschriebene „phase ratio focusing“ werden sie schließlich auf eine schmale Bande fokussiert.

Das Loop-type-Interface eignet sich nur für Verbindungen, deren (gaschromatographische) Elutionstemperatur 60 – 100 °C über der Transfertemperatur liegt [142, 143]. Leicht flüchtige Verbindungen dampfen zusammen mit dem Lösungsmittel ab. Da im Gegensatz zum On-column-Interface kein Flüssigkeitsfilm existiert, der leicht flüchtige Verbindungen zurückhalten kann (kein „solvent trapping“), gehen leicht flüchtige Verbindungen beim Transfer verloren. Mäßig flüchtige Verbindungen können mit Hilfe einer zweiten, belegten Vorsäule retardiert werden.

Mit Hilfe des Loop-type-Interface können bedeutend größere Volumina als mit dem On-column-Interface transferiert werden (20 – 20000 µl) [143]. Da sich das System beim Transfer selbst regelt, ist das Loop-type-Interface relativ einfach zu handhaben.

2.3.2.3 Temperaturprogrammierter Injektor (PTV) als Interface

Temperaturprogrammierte Injektoren (PTV) sind zur Injektion großer Flüssigkeitsmengen in der Gaschromatographie weit verbreitet und können ohne großen apparativen Aufwand zur on-line Kopplung von HPLC und GC verwendet werden. Für den Einsatz eines PTV als Interface wurden zahlreiche Techniken beschrieben. Einen Überblick bietet [142, 143]. Exemplarisch soll an dieser Stelle die so genannte „vapour overflow“-Technik beschrieben werden.

Ein PTV stellt eine beheizbare Kammer dar, die mit einem inerten Füllmaterial (Glasswolle, CarboFrit) oder einem Adsorbens (z. B. Tenax) gefüllt ist (Abb. 13). Bei der „vapour overflow“-Technik liegt die Temperatur in der Kammer über dem Siedepunkt des Eluenten, so dass der Eluent beim Eintritt in die heiße Kammer verdampft. Die Lösungsmitteldämpfe entweichen über den Ausgang für den Septum-Spülfluss (Septum-Purge). Während leicht flüchtige Verbindungen mit dem Lösungsmittel verloren gehen, bleiben schwerflüchtige Verbindungen auf dem Füllmaterial zurück. Während des Transfers ist die Zuleitung des Trägergases geschlossen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird der Septum-Spülfluss geschlossen und die Zuleitung für das Trägergas geöffnet. Durch Aufheizen der Kammer werden die Analyten vom Füllmaterial abgedampft und in die GC-Säule transferiert. Ein PTV eignet sich als Interface insbesondere dann, wenn der Eluent nicht verdampfbare Rückstände enthält. Da das Abdampfen des Lösungsmittels außerhalb des GC-Säulensystems stattfindet, wird eine Kontamination der GC-Säule verhindert.

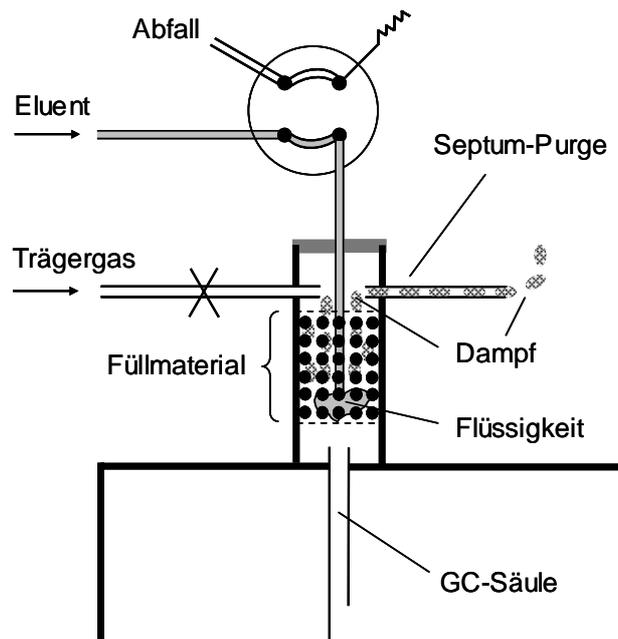


Abb. 13: Schematische Darstellung der on-line Kopplung von HPLC und GC mit Hilfe eines temperaturprogrammierten Injektors (PTV): „vapor overflow“-Technik.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

Aceton (puriss.)	Riedel-de Haën, Taufkirchen
Argon (4.6)	Messer Griesheim, Maisach
<i>N-tert</i> -Butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoracetamid (purum)	Fluka, Taufkirchen
5 α -Cholestan-3 β -ol (95 %)	Fluka, Taufkirchen
Cholesterol (99 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dichlormethan (DAB, 25 mg 1-Penten/l)	Riedel-de Haën, Taufkirchen
Ethylacetat	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Helium (5.0)	Messer Griesheim, Maisach
Hexan (p. a.)	VWR International, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (Reag. Ph. Eur.)	Riedel-de Haën, Taufkirchen
di-Kaliumhydrogenphosphat (LiChropur [®])	VWR International, Darmstadt
Methanol (LiChrosolv [®])	VWR International, Darmstadt
Methyl- <i>tert</i> -butylether (Driveron S)	Oxeno Olefinchemie, Marl
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid (zur Synthese)	VWR International, Darmstadt
Natriumchlorid (p. a.)	VWR International, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (reinst)	VWR International, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (LiChropur [®])	VWR International, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen (rein)	VWR International, Darmstadt
Natriummethylat in Methanol (5,4 M)	Fluka, Taufkirchen
Natriumsulfat, wasserfrei (p. a.)	VWR International, Darmstadt
Natriumtaurocholat (97 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>p</i> -Nitrophenol (p. a.)	Fluka, Taufkirchen
<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat (BioChemika)	Fluka, Taufkirchen
γ -Oryzanol (99,9 %)	Henry Lamotte, Bremen
<i>iso</i> -Propanol (LiChrosolv [®])	VWR International, Darmstadt
Pyridin (puriss., über Molekularsieb)	Fluka, Taufkirchen

Stickstoff (5.0)	Messer Griesheim, Maisach
Toluol (ROTIPURAN [®])	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (PUFFERAN [®])	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (c. p.)	Acros, Geel, Belgien
β-Sitosterol (75 %)	W. Kamm, Nestlé Research Center, Lausanne, Schweiz
Wasserstoff (5.0)	Messer Griesheim, Maisach

Dichlormethan, Ethylacetat und Methyl-*tert*-butylether wurden vor der Verwendung destilliert.

3.1.2 Enzympräparate

Die Enzympräparate wurden ohne weitere Behandlung eingesetzt. Die angegebenen Enzymaktivitäten beziehen sich auf Herstellerangaben. Dabei ist zu beachten, dass die Hersteller unterschiedliche Methoden zur Aktivitätsmessung eingesetzt haben.

Cholesterolesterase-Präparate aus:

<i>Candida cylindracea</i> (55 U/mg, Produkt-Nr. 393916)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pseudomonas sp.</i> (245 U/mg, Produkt-Nr. C1403)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderpankreas (6,3 U/mg, Produkt-Nr. C3766)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schweinepankreas (34 U/mg, Produkt-Nr. 26745)	Fluka, Taufkirchen

Lipase-Präparate aus:

<i>Aspergillus niger</i> (0,2 U/mg, Produkt-Nr. 62307)	Fluka, Taufkirchen
<i>Pseudomonas cepacia</i> (53 U/g, Produkt-Nr. L9156)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schweinepankreas (10 U/mg, Produkt-Nr. L3126)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Weizenkeimen (8 U/mg, Produkt-Nr. L3001)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Rohpräparate:

Pankreatin (8 x USP, Produkt-Nr. P7545)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderpankreas-Acetonpulver (Produkt-Nr. P3006)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schweinepankreas-Acetonpulver (Produkt-Nr. P4251)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Pepsin (471 U/mg, Produkt-Nr. 7000)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
-------------------------------------	----------------------------

3.1.3 Probenmaterial

3.1.3.1 Reisproben konventioneller Sorten

Reisproben konventioneller Sorten wurden von der Mühldorfer Naturkornmühle (Mühldorf am Inn) erhalten. Die Proben stammten aus ökologischem Anbau und waren wie in Tabelle 2 angegeben spezifiziert.

Tabelle 2: Spezifikationen der Reisproben konventioneller Sorten

Sorte	Kornform ¹	Anbauort	Erzeuger	Erntejahr
<i>Ambra</i>	RK	Italien	Darghetta	2002
<i>Balilla</i>	RK	Spanien	k. A. ²	2000
		Italien	Übelhör	2000
		Italien	Greppi	2002
		Italien	Falzone	2002
<i>Cripto</i>	RK	Italien	k. A.	2000
		Frankreich	k. A.	2000
		Italien	Falzone	2001
		Italien	Darghetta	2001
		Italien	Darghetta	2002
<i>Elio</i>	RK	Italien	Falzone	2001
<i>Gladio</i>	RK	Italien	Greppi	2001
		Italien	Greppi	2002
<i>Helene</i>	RK	Frankreich	k. A.	2000
<i>Loto</i>	LK	Italien	k. A.	2001
		Italien	Greppi	2002
		Italien	Betarre	2002
		Italien	Darghetta	2002
<i>Perla</i>	RK	Italien	k. A.	2000
		Italien	Falzone	2001
		Italien	Falzone	2002
<i>Savio</i>	LK	Frankreich	Société Thomas	2000
<i>Selenio</i>	RK	Frankreich	k. A.	2000
		Italien	Greppi	2000
		Italien	Greppi	2001
		Italien	Greppi	2002
		Italien	Betarre	2002
		Italien	Darghetta	2002
<i>Sigalon</i>	LK	Italien	k. A.	2000
<i>Thaibonnet</i>	LK	Italien	Übelhör	2000

¹ RK = Rundkorn, LK = Langkorn;

² k. A. = keine Angaben

3.1.3.2 Reisproben gentechnisch veränderter Linien

Reisproben gentechnisch veränderter Linien und ihrer Elternlinien wurden von Qingyao Shu (Zhejiang-Universität, Hangzhou, China) erhalten (Tabelle 3). Das Material stammte aus Feldversuchen in China, in denen gentechnisch veränderte Linie und ihre Elternlinie jeweils parallel unter identischen Bedingungen angebaut worden waren.

Tabelle 3: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte gentechnisch veränderte Reislinien (GV-Linien) und ihre Elternlinien.

GV-Linie	Elternlinie	Genprodukt	Literatur
PHA-E	EYI105	PHA-E-Lektin aus <i>Phaseolus vulgaris</i>	[154]
GNA	ASD16	Lektin aus <i>Galanthus nivalis</i>	[155]
<i>Bt</i> (KMD1)	Xiushui 11	CryIAb aus <i>Bacillus thuringiensis</i>	[156]

3.1.3.3 Vollkornreisflocken

Braunreis (Sorte Sigalon, Frankreich 2002) und daraus hergestellte Vollkornreisflocken wurden von der Mühldorfer Naturkornmühle (Mühldorf am Inn) für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der Vollkornreisflocken aus Braunreis wurde wie folgt beschrieben [157]:

Gereinigter Braunreis wurde in einem Säulendämpfer unter Wasserdampfzugabe gedämpft. Die Korntemperatur wurde dabei eine Stunde lang auf 100 °C gehalten. Anschließend wurde der Braunreis mit Hilfe eines Walzenstuhls flockiert. Die Vollkornreisflocken wurden mittels Fließbettrockner bei einer Lufttemperatur von 80 °C auf einen Wassergehalt von ca. 13 % getrocknet. Die gesamte Herstellung nahm 75 min in Anspruch.

Um den Einfluss des Prozesses auf γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung zu untersuchen, wurden Braunreisproben und 75 min später Proben der Vollkornreisflocken aus der Anlage entnommen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Vollkornreisflocken und der Braunreis aus derselben Charge stammten.

3.1.4 Geräte und Hilfsmaterialien

Folgende Geräte und Hilfsmittel wurden verwendet:

Analysenwaage Sartorius research R300S	Sartorius, Göttingen
Cyclonmühle Cyclotec 1093 mit Siebeinsatz 0,5 mm	Foss Tecator, Hamburg
DC-Platten Polygram SIL G/UV ₂₅₄ (20 × 20 cm)	Macherey-Nagel, Düren
Faltenfilter (595 ½, Ø = 90 mm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Glasspritze (5 ml)	VWR International, Darmstadt
Holzscheiben zum manuellen Entspelzen von Paddy-Reis	Q. Shu, Zhejiang University, Hangzhou, China
Membranfilter Spartan (0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikro-Magnetührstäbchen (l = 5 mm)	VWR International, Darmstadt
Photometer Uvikon 941	Bio-Tek, Neufahrn
Rotationsverdampfer Serie 2001	Heidolph, Schwabach
Ultraschallbad Sonorex RK 100 H	Bandelin Electronic, Berlin
UV-Transilluminator Biometra TI1	Biometra, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q plus	Millipore, Eschborn
Wasserbad, bestehend aus:	
• Heizbarer Magnetührer MRI	Heidolph, Schwabach
• Becherglas (250 ml)	VWR International, Darmstadt
• Probenglashalterung	Eigenbau aus Aluminium
• Thermometer (−10 bis +150 °C; ±1 °C)	VWR International, Darmstadt
• Magnetührstab (l = 15 mm)	VWR International, Darmstadt

3.2 METHODEN

3.2.1 Analytik von γ -Oryzanol mittels on-line LC-GC

3.2.1.1 Extraktion

Um eine Isomerisierung der *trans*-Doppelbindung in γ -Oryzanol zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass während der gesamten Aufarbeitung die Proben möglichst wenig Licht ausgesetzt wurden.

Bespelzte Reisproben (Paddy-Reis) wurden mit Hilfe zweier geriffelter Holzscheiben manuell entspelzt. Grüne Körner wurden aussortiert. Braunreis und Vollkornreisflocken wurden ohne weitere Vorbehandlung zur Analyse eingesetzt.

Das Untersuchungsmaterial wurde in einer Cyclonmühle zu Mehl vermahlen. 100 – 150 mg Mehl wurden in ein Probengläschen (10 ml) eingewogen und ein Mikro-Magnetührstäbchen sowie 10 ml Extraktionsmittel (Dichlormethan/Methanol; 2 + 1; v + v) zugegeben. Nach dem Verschließen des Probengläschens wurde das Mehl 45 min in einem auf 50 °C temperierten Wasserbad bei maximaler Rührstufe extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde der Überstand über einen Faltenfilter in einen mit Aluminiumfolie umwickelten Spitzkolben (20 ml) filtriert. Zum Rückstand im Probenglas wurden 5 ml Extraktionsmittel gegeben. Nach Verschließen des Probenglases wurde kräftig geschüttelt und der Überstand nach Absetzen des Mehls über den Faltenfilter filtriert. Der Rückstand wurde auf diese Weise zweimal nachextrahiert und anschließend verworfen. Die vereinigten Extrakte wurden bei 40 °C im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde mit Hilfe eines Ultraschallbades in 2,0 ml Hexan aufgenommen und anschließend membranfiltriert (0,45 μ m). Die Probelösung wurde bis zur Analyse bei 5 – 8 °C aufbewahrt.

Der Einfluss des Extraktionsmittels auf die Ausbeute an γ -Oryzanol wurde untersucht, indem gemahlener Paddy-Reis mit Aceton, Ethylacetat, Hexan, *iso*-Propanol, Hexan/*iso*-Propanol (1 + 1; v + v), Hexan/Ethylacetat (7 + 3; v + v) und Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) wie beschrieben extrahiert wurde und das extrahierte Reisöl nach Aufnahme in Hexan mittels on-line LC-GC auf γ -Oryzanol untersucht wurden. Zur Ermittlung der optimalen Extraktionstemperatur wurden Extraktionen mit Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) bei 20, 50, 80 und 100 °C durchgeführt und bezüglich der Ausbeute an γ -Oryzanol miteinander verglichen.

3.2.1.2 On-line LC-GC

Die Analysen wurden mit einem vollautomatischen on-line LC-GC-Instrument (Dualchrom 3000, ThermoFinnigan, Egelsbach) durchgeführt. Das gesamte System wurde mit der Dualchrom-Software Version 1.6 gesteuert.

LC-Bedingungen:

Probenaufgabe:	10 µl-Schleife
Säule:	250 × 2 mm I.D. Eurospher [®] -100 Si (5 µm) mit einer 20 × 2 mm I.D. Vorsäule gleicher Spezifikation, Knauer, Berlin
Fließmittel:	Hexan/MTBE/ <i>iso</i> -Propanol (95 + 5 + 0,5; v + v + v)
Pumpe:	20 ml-Spritzenpumpe Phoenix 30 CU
Flussrate:	0,20 ml/min
Detektor:	UV/VIS-Detektor microUVIS20
Detektion:	Simultane Detektion von Reislipiden und γ -Oryzanol: $\lambda_1 = 200$ nm ($r = 0,5$) und $\lambda_2 = 290$ nm ($r = 0,1$) Spezifische Detektion von γ -Oryzanol: $\lambda = 325$ nm ($r = 0,08$)
Schreiber:	Integrator SP4290, Spectra-Physics, San-Jose, USA 0,10 mm/s; Att = 512
Backflush:	20 min nach Injektion mittels integriertem Rückspülventil mit 1 ml MTBE für 7 min

Als ungeeignete LC-Säule zur Chromatographie von γ -Oryzanol erwies sich:

150 × 2 mm I.D. Spherisorb[®] Si (5 µm), CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe

Transfer-Bedingungen:

Transfertechnik:	Loop-type Interface
Transfervolumen:	560 µl
Start:	12 min nach Injektion
Ende:	20 s nach einem Druckabfall von $\Delta p = 80$ kPa
Lösungsmitteldampfausgang:	Öffnen bei Transferbeginn, Schließen 40 s nach Transferende

GC-Bedingungen:

1. Vorsäule: 3 m × 0,53 mm I.D. Fused-Silica Kapillarsäule, deaktiviert mit DPTMDS (BGB Analytik Vertrieb, Schloßböckelheim)
2. Vorsäule: 3 m × 0,25 mm I.D. Rtx-200MS, 0,1 µm Filmdicke (Resteck, Bad Homburg)
- Trennsäule: 27 m × 0,25 mm I.D. Rtx-200MS, 0,1 µm Filmdicke (Resteck, Bad Homburg)

Erste und zweite Vorsäule wurden mit Hilfe eines Glas-Press-Fit (BGB Analytik Vertrieb, Schloßböckelheim) verbunden. An die zweite Vorsäule wurde über ein T-Glas-Press-Fit die Trennsäule und der Lösungsmitteldampfausgang angeschlossen. In geschlossenem Zustand endete der Lösungsmitteldampfausgang in einer Restriktionskapillare (1 m × 0,05 mm I.D.).

- Temperaturprogramm: 140 °C (5 min), mit 15 °/min auf 310 °C (5 min), mit 2,5 °/min auf 340 °C (3 min)
- Trärgas: Wasserstoff; max. Vordruck für den Flussregler: 250 kPa
- Flussregler: „,022“
- Detektor: FID (320 °C)
- Elektrometer: EL980, ThermoFinnigan, Egelsbach
- Datenaufzeichnung: Chrom-Card 32-bit, Version 2.01 (ThermoFinnigan, Egelsbach)

3.2.1.3 Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung

Der Gesamtgehalt an γ -Oryzanol wurde durch Auswertung des bei 325 nm aufgezeichneten LC-Chromatogramms bestimmt. Das Chromatogramm wurde kopiert, der γ -Oryzanol-Peak ausgeschnitten und gewogen. Standardlösungen von γ -Oryzanol in Hexan (10, 20, 30 und 40 µg/ml) wurden für eine externe Kalibrierung verwendet.

Die Sterylferulat-Verteilung wurde durch Auswertung des GC-Chromatogramms ermittelt. Aus den Peakflächenverhältnissen wurden die Anteile der einzelnen Sterylferulate berechnet.

3.2.1.4 Bestimmung von Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde Reismehl vor und nach Zusatz einer bekannten Menge γ -Oryzanol untersucht. Drei Proben gemahlener Paddy-Reis (je 200 mg) wurden mit je 500 µl einer Lösung von γ -Oryzanol in Hexan (25,6 µg/ml) versetzt. Dies entsprach einem γ -Oryzanol-Zusatz von 6,4 mg/100 g. Nach Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff wurden

die Proben wie beschrieben extrahiert und mittels on-line LC-GC analysiert. Zusätzlich wurden drei Proben desselben Reismehls ohne γ -Oryzanol-Zusatz untersucht.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde bestimmt, indem sechs Teilproben einer Braunreisprobe einzeln extrahiert und mittels on-line LC-GC untersucht wurden.

3.2.2 Bestimmung der Trockenmasse

Etwa 5 g der zuvor gemahlene Probe wurden in ein bei 130 °C getrocknetes und tariertes Wägegefäß eingewogen und 2 h Stunden im Trockenschrank bei 130 °C getrocknet. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur im Exsikkator wurden die Proben nochmals gewogen. Aus der Massenabnahme wurde die Trockenmasse der untersuchten Probe berechnet [158].

3.2.3 Identifizierung von Sterylferulaten

3.2.3.1 GC-MS der LC-Fraktion (off-line LC-GC-MS)

1 ml eines aus Paddy-Reismehl gewonnenen Lipidextrakts (siehe 3.2.1.1) wurde mit Stickstoff auf etwa 500 μ l abgeblasen. Die Kopplung des on-line LC-GC-Geräts wurde nach dem UV-Detektor aufgehoben und die HPLC-Anlage zur Isolierung von γ -Oryzanol aus dem konzentrierten Lipidextrakt eingesetzt (LC-Bedingungen siehe 3.2.1.2). Die γ -Oryzanol-enthaltenden Fraktionen von insgesamt 18 Injektionen wurden gesammelt und vereinigt. Nach Ablasen des Lösungsmittels mit Stickstoff wurde der Rückstand in 100 μ l Hexan aufgenommen und in einen Probenglas-Einsatz (100 μ l) überführt. Das Hexan wurde mit Stickstoff abgeblasen, der Rückstand in 25 μ l MTBE gelöst und die Lösung zur GC-MS eingesetzt.

GC-MS

Gaschromatograph:	Finnigan GC8000 ^{Top} (ThermoFinnigan, Egelsbach)
Injektion:	3 μ l; Splitinjektion (280 °C, Splitverhältnis 1:10)
GC-Säule:	27 m \times 0,25 mm I.D. Rtx-200MS, 0,1 μ m Filmdicke (Resteck, Bad Homburg)
Trärgas:	Helium (75 kPa)
Temperaturprogramm:	250 °C (2 min), 15 °C/min auf 310 °C (2 min), 1,5 °C/min auf 340 °C (3 min)
Interface-Temperatur:	300 °C

Massenspektrometer:	Voyager (ThermoFinnigan, Egelsbach)
Ionisation:	EI (70 eV)
Temperatur der Quelle:	280 °C
Massenbereich:	20 – 750 Da (Full Scan Mode, Unit Resolution)
Scan-Time:	0,7 s
Inter-Scan Delay:	0,05 s
Software:	MassLab 1.4V (ThermoFinnigan, Egelsbach)

3.2.3.2 GC-MS von dünnenschichtchromatographisch isoliertem γ -Oryzanol

Ca. 40 g gemahlener Paddy-Reis wurden in einer Schraubdeckel-Flasche (200 ml; Teflonverschluss) mit 100 ml einer Mischung aus Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) versetzt. Nach Zugabe eines Rührfisches wurde die Flasche dicht verschlossen und das Mehl 60 min in einem auf 50 °C temperiertem Wasserbad unter Rühren extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde der Überstand über einen Faltenfilter in einen Rundkolben (250 ml) filtriert. Der Rückstand in der Flasche wurde mit 50 ml Extraktionsmittel versetzt, die Flasche verschlossen und kräftig geschüttelt. Nach dem Absetzen des Mehls wurde der Überstand filtriert. Der Rückstand wurde auf diese Weise zweimal nachextrahiert und anschließend verworfen. Die vereinigten Filtrate wurden bei 40 °C im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wurde mit Hilfe eines Ultraschallbads in 10 ml Hexan gelöst. Die Lösung wurde im Scheidetrichter (25 ml) mit 10 ml Natronlauge (4 M) extrahiert und die Hexanphase verworfen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 10 ml Hexan gewaschen. Nach Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure wurde die wässrige Phase mit 10 ml Hexan extrahiert und anschließend verworfen. Der Hexan-Extrakt wurde bei 40 °C im Vakuum abgedampft und der Rückstand in 1 ml Hexan aufgenommen. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit einer Mischung aus Hexan, MTBE und *iso*-Propanol (80 + 20 + 1; v + v + v) als mobile Phase. Zur Detektion von γ -Oryzanol wurden die DC-Platten unter einer UV-Lampe (254 nm) betrachtet. γ -Oryzanol löscht die Fluoreszenz des im Kieselgel enthaltenen Fluoreszenzindikators und konnte so als dunkle Bande detektiert werden ($R_f = 0,29$). Die γ -Oryzanol-Bande wurde abgekratzt und γ -Oryzanol mit Hilfe eines Ultraschallbads mit MTBE extrahiert. Der MTBE-Extrakt wurde zur GC-MS-Analyse eingesetzt (siehe 3.2.3.1).

3.2.3.3 GC-MS von *tert*-Butyldimethylsilyl-Derivaten

50 μl einer Lösung von γ -Oryzanol in Hexan (3 mg/ml) wurden in einen Probenglas-Einsatz (100 μl) gegeben. Nach Abblasen des Lösungsmittels mit Stickstoff wurde der Rückstand unter Argon in 25 μl Pyridin und 25 μl *N-tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid gelöst. Die Mischung wurde mit Hilfe eines Drahtes umgerührt, 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen und anschließend zur GC-MS-Analyse eingesetzt (siehe 3.2.3.1).

3.2.4 Bildung von *cis*-Sterylferulaten aus γ -Oryzanol

cis-Sterylferulate wurden generiert, indem eine Standardlösung von γ -Oryzanol in Hexan (10 $\mu\text{g/ml}$) 60 min auf dem Transilluminator mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt wurde.

3.2.5 Chemische Umesterung von γ -Oryzanol

0,5 mg γ -Oryzanol wurden in einem Probengläschen in 300 μl MTBE gelöst. Nach Zugabe von 500 μl methanolischer Natriummethylat-Lösung (5,4 M) wurde das Probengläschen verschlossen, die Lösung auf dem FID eines Gaschromatographen (320 °C) bis zum Sieden erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann erneut bis zum Sieden erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml Dichlormethan und 4 ml Salzsäure (0,7 M) wurde kräftig geschüttelt und nach der Phasentrennung die organische Phase mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, anschließend filtriert und dann das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Der Rückstand wurde nach Silylierung gaschromatographisch auf Sterole untersucht (siehe 3.2.7).

3.2.6 Studien zur enzymatischen Hydrolyse von γ -Oryzanol

3.2.6.1 Lipasen

Einphasensysteme

Je 1,5 mg γ -Oryzanol wurden in folgenden Medien suspendiert:

- 450 μ l 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 („Puffer pH 7,0“)
- 450 μ l „Puffer pH 7,0“ + 50 μ l Aceton („Puffer pH 7,0 + 10 % Aceton“)
- 450 μ l 200 mM TRIS-Puffer pH 8,5 + 50 μ l Aceton („Puffer pH 8,5 + 10 % Aceton“)
- 1000 μ l 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 mit 80 mM Natriumchlorid und 6 mM Natriumtaurocholat + 50 μ l Aceton („Puffer pH 7,0 + Taurocholat“)

5 mg Lipase (10 mg im Falle von „Puffer pH 7,0 + 10 % Aceton“) wurden zugegeben und anschließend die Ansätze 24 h unter Schütteln (140 rpm) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 μ g Cholesterol, gelöst in 50 μ l Aceton, als interner Standard zugegeben und freigesetzte Sterole zweimal mit je 600 μ l MTBE extrahiert. Der MTBE-Extrakt wurde bei 40 °C im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde wie unter 3.2.7 beschrieben silyliert und gaschromatographisch auf Sterole untersucht.

Die Wiederfindung an β -Sitosterol wurde bestimmt, indem 200 μ g β -Sitosterol an Stelle von γ -Oryzanol zu den Medien gegeben wurden und die Menge extrahierbaren β -Sitosterols quantifiziert wurde. Wiederfindungen > 84 % zeigten, dass die angewandte Analysenmethode geeignet ist, freigesetzte Sterole zu detektieren.

p-Nitrophenylpalmitat wurde als Positivkontrolle für eine Lipase-Aktivität verwendet: 0,38 mg *p*-Nitrophenylpalmitat wurden in 900 μ l Medium suspendiert. 5 mg Lipase (10 mg im Falle von „Puffer pH 7,0 + 10 % Aceton“) wurden zugegeben und der Ansatz anschließend 2 h unter Schütteln (140 rpm) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz membranfiltriert. 600 μ l der klaren Lösung wurden mit 1,9 ml Millipore-Wasser verdünnt und die Absorption der verdünnten Lösung bei 400 nm mit einem Photometer bestimmt. Freigesetztes *p*-Nitrophenol wurde durch externe Kalibrierung quantifiziert. Dazu wurde *p*-Nitrophenol (7, 35 und 70 μ g) an Stelle von *p*-Nitrophenylpalmitat in 900 μ l Medium – ohne Enzymzusatz – gelöst und wie oben angegeben membranfiltriert, verdünnt und die Absorption der verdünnten Lösung gemessen. Eine nicht enzymatisch katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat konnte nach Inkubation ohne Enzym ausgeschlossen werden.

Zweiphasensystem

5 mg Lipase wurden in 450 µl eines 100 mM Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 suspendiert. 1,5 mg γ -Oryzanol, gelöst in 600 µl Toluol, wurden zugegeben und anschließend das Zweiphasensystem 24 h unter Schütteln (140 rpm) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 µg Cholesterol, gelöst in 50 µl Aceton, als interner Standard zugegeben. Das Zweiphasensystem wurde kräftig geschüttelt und die organische Phase nach der Phasentrennung mit Hilfe einer Pasteurpipette abgetrennt. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 600 µl Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden bei 40 °C im Vakuum zur Trockene eingengt und der Rückstand wie unter 3.2.7 beschrieben silyliert und gaschromatographisch auf Sterole untersucht.

Die Wiederfindung an β -Sitosterol wurde bestimmt, indem 200 µg β -Sitosterol an Stelle von γ -Oryzanol zum Zweiphasensystem gegeben wurde (ohne Enzymzusatz) und die Menge extrahierbaren β -Sitosterols quantifiziert wurde. Eine Wiederfindung von 100 % zeigte, dass die angewandte Analysenmethode geeignet ist, freigesetzte Sterole zu detektieren.

p-Nitrophenylpalmitat wurde als Positivkontrolle für eine Lipase-Aktivität verwendet: 0,19 mg *p*-Nitrophenylpalmitat wurden an Stelle von γ -Oryzanol eingesetzt und das Zweiphasensystem 2 h unter Schütteln (140 rpm) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zweiphasensystem membranfiltriert und anschließend bei 40 °C im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 2,5 ml eines 100 mM Kaliumphosphat-Puffers pH 7,0 aufgenommen und die Absorption der Lösung bei 400 nm mit einem Photometer bestimmt. Freigesetztes *p*-Nitrophenol wurde durch externe Kalibrierung quantifiziert. Dazu wurde *p*-Nitrophenol (3,5, 17,5 und 35 µg) an Stelle von *p*-Nitrophenylpalmitat eingesetzt (ohne Enzymzusatz) und wie oben angegeben membranfiltriert, eingengt, gelöst und die Absorption der Lösung gemessen. Eine nicht enzymatisch katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat konnte nach Inkubation ohne Enzym ausgeschlossen werden.

3.2.6.2 Cholesterolesterasen und Pankreas-Acetonpulver

485 µg γ -Oryzanol, gelöst in 50 µl Aceton, wurden zu 800 µl eines 100 mM Natriumphosphat-Puffers pH 7,0 (mit 100 mM Natriumchlorid und 7,5 mM Natriumtaurocholat) gegeben. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurden 200 µl Cholesterolesterase-Lösung (55 U/ml 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,0 mit 3 M Natriumchlorid) zugegeben. Pankreas-Acetonpulver wurde in fester Form (5 mg) zusammen mit 200 µl 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 (mit 3 M Natriumchlorid) zugesetzt. Zur Untersuchung der Stabilität von γ -Oryzanol gegenüber einer chemischen

Hydrolyse wurde eine Probe ohne Enzymzusatz angesetzt. Die Ansätze wurden 24 h unter Schütteln (140 rpm) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 63 µg 5α-Cholestan-3β-ol, gelöst in 50 µl Aceton, als interner Standard zugegeben und 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Die Ansätze wurden zweimal mit je 400 µl MTBE extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels bei 40 °C im Vakuum wurde der Rückstand wie unter 3.2.7 beschrieben silyliert und anschließend gaschromatographisch auf freigesetzte Sterole untersucht. Zur Bestimmung nicht hydrolysierter Ferulasäureester wurde der Rückstand in 2,0 ml Hexan aufgenommen, membranfiltriert und nach Verdünnen mit Hexan (1 + 9, v/v) zur on-line LC-GC eingesetzt (siehe 3.2.1.2).

3.2.6.3 Künstliche Verdauungssäfte

Je 485 µg γ -Oryzanol, gelöst in 50 µl Aceton, wurden in 1000 µl der folgenden künstlichen Verdauungssäfte gegeben:

Künstlicher Magensaft:

320 mg Pepsin, 8 ml 1 M Salzsäure und 0,2 g Natriumchlorid wurden in 100 ml Millipore-Wasser gelöst.

Künstlicher Darmsaft I:

1,0 g Pankreatin wurde in 100 ml eines 450 mM Natriumphosphat-Puffers pH 7,5 (mit 0,9 mM Natriumtaurocholat) gelöst.

Künstlicher Darmsaft II:

wie Darmsaft I, aber mit 6 mM Natriumtaurocholat im Puffer

Die Stabilität von γ -Oryzanol gegenüber einer chemischen Hydrolyse in den Verdauungssäften wurde untersucht, indem γ -Oryzanol zu Verdauungssäften ohne Pepsin- bzw. Pankreatinzusatz gegeben wurde. Die Ansätze wurden 1, 2, 6, 24 und 48 h unter Schütteln (140 rpm) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 63 µg 5α-Cholestan-3β-ol, gelöst in 50 µl Aceton, als interner Standard zugegeben. Die Suspension wurde 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit je 350 µl MTBE extrahiert. Der MTBE-Extrakt wurde bei 40 °C im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde wie unter 3.2.7 beschrieben silyliert und gaschromatographisch auf Sterole untersucht.

Die Wiederfindung an β -Sitosterol wurde bestimmt, indem 28 μg β -Sitosterol an Stelle von γ -Oryzanol zu den künstlichen Verdauungssäften gegeben wurden und die Menge extrahierbaren β -Sitosterols quantifiziert wurde. Wiederfindungen $> 97\%$ zeigten, dass die angewandte Analysenmethode geeignet ist, freigesetzte Sterole zu detektieren.

3.2.7 Analytik von Sterolen

3.2.7.1 Silylierung

Sterole wurden silyliert, indem zur trockenen Probe in einem Probengläschen 100 μl Pyridin und 50 μl *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid gegeben wurden. Das Probengläschen wurde mit Argon gefüllt und in geschlossenem Zustand 15 min bei 70 °C im Ölbad erhitzt. 1 μl der abgekühlten Lösung wurde zur Gaschromatographie eingesetzt.

3.2.7.2 Identifizierung mittels GC-MS

Gaschromatograph:	Finnigan GC8000 ^{Top} (ThermoFinnigan, Egelsbach)
Injektion:	1 μl ; Splitinjektion (280 °C, 20 ml/min Splitfluss)
GC-Säule:	15 m \times 0,25 mm I.D. SE-54, 0,10 – 0,15 μm Filmdicke (Agilent J&W, Waldbronn)
Trärgas:	Helium (25 kPa)
Temperaturprogramm:	160 °C (2 min), 15 °C/min auf 280 °C (2 min), 5 °C/min auf 300 °C (9 min)
Interface-Temperatur:	300 °C
Massenspektrometer:	Voyager (ThermoFinnigan, Egelsbach)
Ionisation:	EI (70 eV)
Temperatur der Quelle:	280 °C
Massenbereich:	20 – 800 Da (Full Scan Mode, Unit Resolution)
Scan-Time:	0,7 s
Inter-Scan Delay:	0,05 s
Software:	MassLab 1.4V (ThermoFinnigan, Egelsbach)

3.2.7.3 Quantifizierung mittels GC-FID

Gaschromatograph:	Finnigan GC6000 Vega Series 2 (ThermoFinnigan, Egelsbach)
Injektion:	1 µl; Splitinjektion (280 °C, 30 ml/min Splitfluss)
GC-Säule:	30 m × 0,25 mm I.D. DB-5, 0,25 µm Filmdicke (Agilent J&W, Waldbronn)
Trärgas:	Wasserstoff (90 kPa)
Temperaturprogramm:	160 °C (2 min), 15 °C/min auf 280 °C (2 min), 5 °C/min auf 300 °C (9 min)
Detektor:	FID (300 °C)
Datenaufzeichnung:	Chrom-Card 32-bit Vers. 2.01 (ThermoFinnigan, Egelsbach)

Die Quantifizierung der Sterole erfolgte mit Hilfe des internen Standards.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 ANALYTIK VON γ -ORYZANOL MITTELS ON-LINE LC-GC

4.1.1 Einleitung

Zur Bestimmung des γ -Oryzanol-Gehalts wurden photometrische Methoden [134, 135] und Methoden basierend auf der NP-HPLC [136 – 138] beschrieben. Da es jedoch Hinweise gibt, dass die Zusammensetzung von γ -Oryzanol einen Einfluss auf seine antioxidative und cholesterinsenkende Wirkung hat [16 – 19], ist in Reis und Reisprodukten nicht allein der γ -Oryzanol-Gehalt, sondern auch die Sterylferulat-Verteilung von Interesse.

Die Trennung einzelner Sterylferulate gelingt mit RP-HPLC [1, 20 – 26, 140, 141]. Bei der Untersuchung von Reis und Reisprodukten ist allerdings vor der chromatographischen Analyse eine aufwendige Probenvorbereitung nötig, um γ -Oryzanol von störenden Matrixbestandteilen abzutrennen. Neben der Flüssig-Flüssig-Extraktion [20 – 23] werden Kombinationen aus Flüssig-Flüssig-Extraktion und präparativer Dünnschichtchromatographie [24], Flüssig-Flüssig-Extraktion und Säulenchromatographie [25], Säulenchromatographie und präparativer Normalphasen-HPLC [1] sowie Säulenchromatographie und präparativer fließkraftvermittelter Chromatographie [26] eingesetzt. Jeder dieser Arbeitsschritte bedeutet nicht nur einen erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand, sondern birgt auch das Risiko einer Artefakt-Bildung oder eines Probenverlusts in sich.

In vielen Fällen, in denen Minorkomponenten in komplexen Matrices untersucht werden müssen, kann auf eine off-line Probenvorbereitung verzichtet werden, indem eine flüssigchromatographische Aufreinigung on-line mit der Gaschromatographie gekoppelt wird (on-line LC-GC) [27]. So wurde die on-line LC-GC erfolgreich zur Analytik von Sterolen und deren Fettsäureestern in Fetten und Ölen angewandt [30 – 32, 159 – 163]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, basierend auf der on-line LC-GC eine Methode für die schnelle Analytik von γ -Oryzanol in Reis und Reisprodukten zu entwickeln. Die Methode sollte ohne off-line Probenvorbereitung die Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in einem aus dem Untersuchungsmaterial extrahierten Lipidextrakt ermöglichen.

4.1.2 Entwicklung einer on-line LC-GC-Methode zur Analytik von γ -Oryzanol

Die Entwicklung einer on-line LC-GC-Methode erfordert die Entwicklung einer geeigneten flüssigchromatographischen Methode zur Isolierung der Analyten aus einer Probelösung, die Auswahl und Optimierung des Interface für den on-line Transfer der Analyten in den Gaschromatographen sowie die Entwicklung einer gaschromatographischen Methode zur Trennung und Detektion der transferierten Analyten.

Für die flüssigchromatographische Isolierung von γ -Oryzanol aus einem Lipidextrakt bietet sich die HPLC an einer Normalphase (NP-HPLC) an. Wie Abbildung 14a am Beispiel eines γ -Oryzanol-Standards zeigt, neigt γ -Oryzanol jedoch aufgrund seiner sauren Phenolgruppe dazu, in Form eines tailenden Peaks zu eluieren. Durch derart starkes Tailing wird das Volumen der zu transferierende Fraktion stark vergrößert. Das Tailing saurer Analyten kann i. d. R. unterdrückt werden, indem dem Fließmittel Säure zugesetzt wird [164]. Im Falle der on-line LC-GC wird beim on-line Transfer des Analyten jedoch Fließmittel in den Gaschromatographen transferiert. Dem Fließmittel zugesetzte Säure würde die stationäre Phase der GC-Säule schädigen. Ein Säurezusatz ist daher in der on-line LC-GC nicht möglich. Als Alternative zu einem Säurezusatz ist die Verwendung gepufferter Säulen [165] oder saurer Kieselgelsorten [166] beschrieben. Wird ein als saures Kieselgel charakterisiertes Material als stationäre Phase eingesetzt (Eurospher[®], [167]), eluiert γ -Oryzanol in zufrieden stellender Peakform (Abb. 14b).

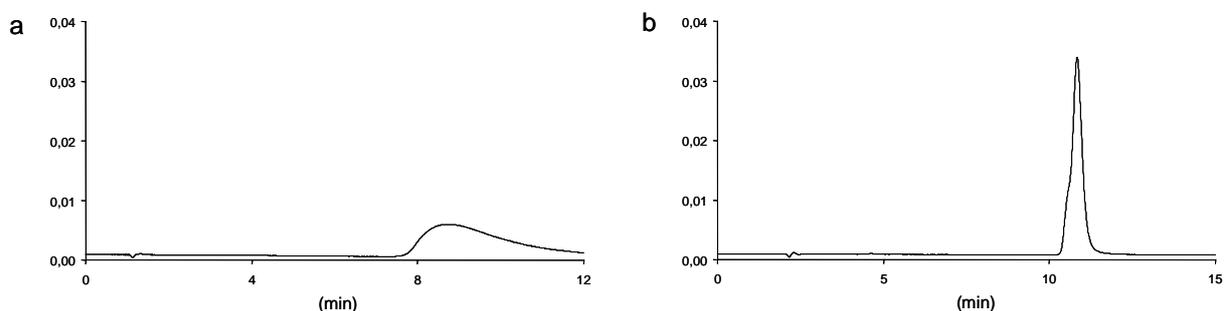


Abb. 14: HPLC von γ -Oryzanol: Einfluss der stationären Phase auf die Peakform. HPLC eines γ -Oryzanol-Standards mit Spherisorb[®] (a) bzw. Eurospher[®] (b) als stationäre Phase und einer Mischung aus Hexan/MTBE/*iso*-Propanol (95 + 5 + 0,5; v + v + v) als mobile Phase. Detektion bei 325 nm. Weitere Bedingungen: siehe Material und Methoden.

Mit einer Mischung aus Hexan, MTBE und *iso*-Propanol (95 + 5 + 0,5; v + v + v) als Fließmittel gelang die Isolierung von γ -Oryzanol aus einem Reis-Lipidextrakt. Durch UV-Detektion bei 200 nm (λ_1) konnte die Abtrennung von γ -Oryzanol von anderen Lipiden verfolgt werden (Abb. 15). Die Identifizierung des γ -Oryzanol-Peaks erfolgte auf der Grundlage der Retentionszeit eines kommerziell erhältlichen γ -Oryzanol-Standards. Der eingesetzte UV-Detektor bot die Möglichkeit, simultan bei einer zweiten Wellenlänge ($\lambda_2 = \lambda_1 + \Delta\lambda$; $\Delta\lambda$ max. 99 nm) zu detektieren. Simultane Detektion bei 290 nm (λ_2) ermöglichte eine spezifische Detektion von γ -Oryzanol (Abb. 15).

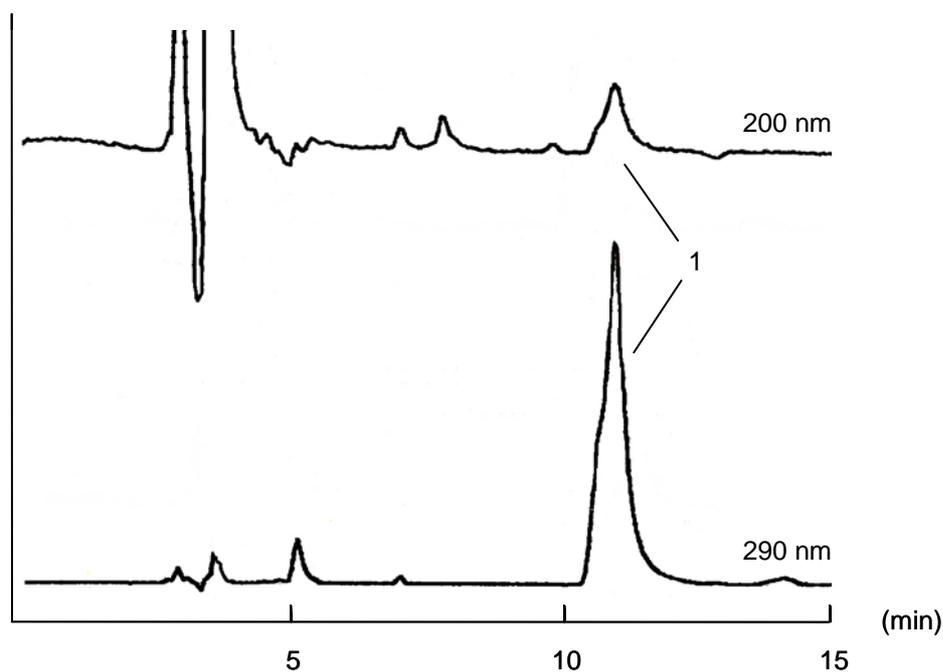


Abb. 15: Isolierung von γ -Oryzanol (1) aus einem Reis-Lipidextrakt mittels Normalphasen-HPLC: UV-Detektion bei 200 und 290 nm. Bedingungen: siehe Material und Methoden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nur noch bei einer Wellenlänge detektiert: im Absorptionsmaximum von γ -Oryzanol bei 325 nm (Abb. 16a). Anhand des bei 325 nm detektierten γ -Oryzanol-Peaks kann der γ -Oryzanol-Gehalt der injizierten Lösung bestimmt werden. Standardlösungen von γ -Oryzanol in Hexan wurden zur externen Kalibrierung eingesetzt.

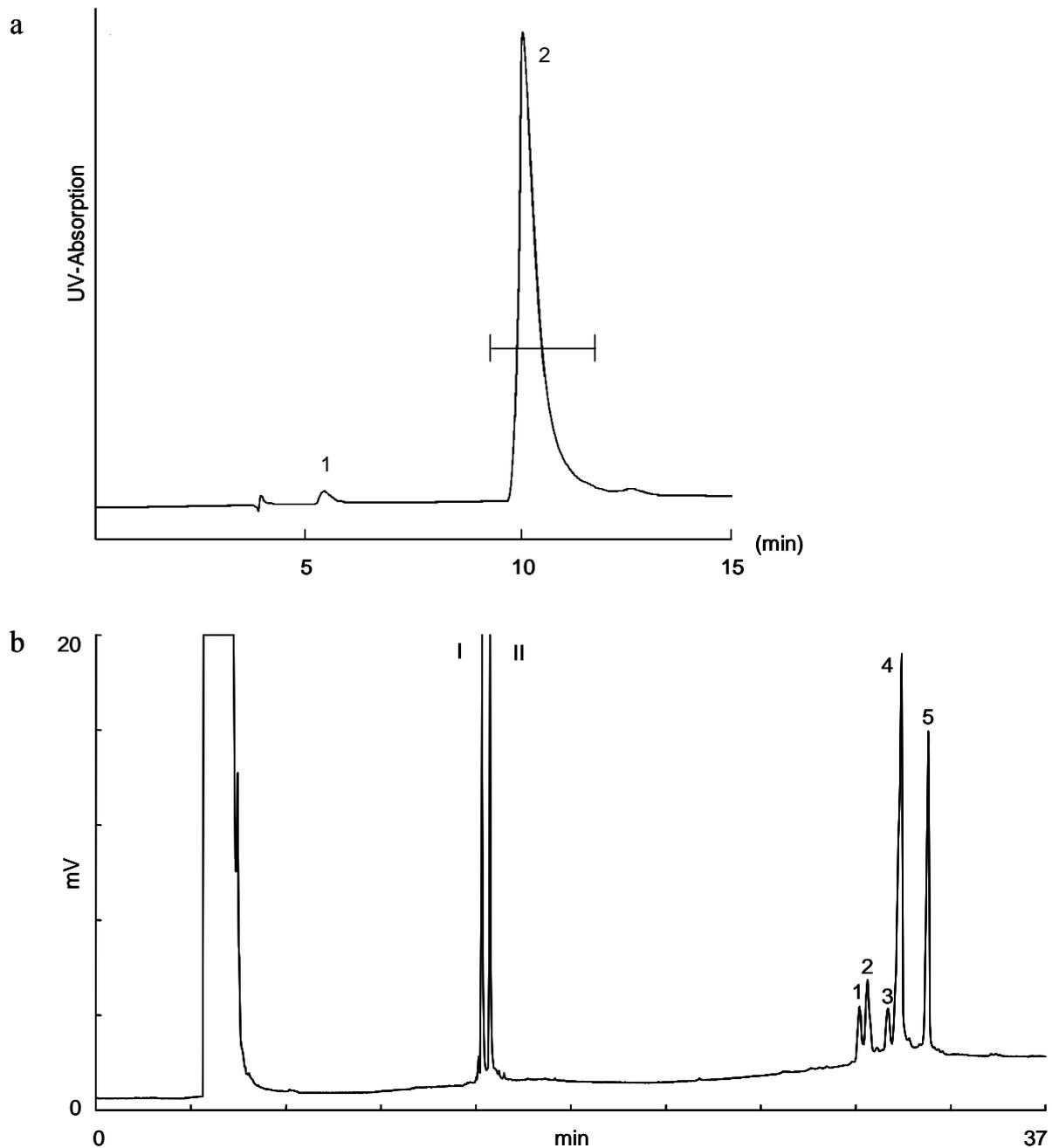


Abb. 16: Analytik von γ -Oryzanol in einem Reis-Lipidextrakt mittels on-line LC-GC.

- (a) LC-Chromatogramm: selektive Detektion von *cis*- (1) und *trans*-Sterylferulaten (2) bei 325 nm. Die on-line transferierte Fraktion ist durch einen Balken gekennzeichnet.
- (b) GC-Chromatogramm der on-line transferierten Fraktion:
 24-Methylcholesterylferulat (1), 24-Methylcholestanylferulat (2), β -Sitosterylferulat (3), Cycloartenylferulat (4) und 24-Methylencycloartenylferulat (5).
 Mittransferiert wurden die freien Sterole Cycloartenol (I) und 24-Methylencycloartenol (II).

Bedingungen: siehe Material und Methoden.

Neben γ -Oryzanol ($R_t = 10,3$ min) wurden im Reis-Lipidextrakt auch geringe Mengen *cis*-Sterylerferulate ($R_t = 5,4$ min) detektiert (Abb. 16a). Die Identifizierung der *cis*-Sterylerferulate erfolgte anhand der Retentionszeit von *cis*-Sterylerferulaten, die in Anlehnung an die Literatur [58] aus γ -Oryzanol durch Bestrahlung mit UV-Licht generiert wurden. Wie in der Literatur beschrieben, weisen die *cis*-Sterylerferulate bei Chromatographie an einer Normalphase eine geringere Retentionszeit als γ -Oryzanol auf [26, 58].

Die Doppelbindung in *trans*-Ferulasäure und ihren Estern isomerisiert sehr leicht im UV- und Tageslicht [59 – 61]. Bei der Analytik von Ferulasäureestern im Pressrückstand von Jojobaöl wurde beobachtet, dass sich während der Probenaufarbeitung aus originär vorhandenen *trans*-Ferulasäureestern *cis*-Isomere bildeten. In Lösung isomerisierten im Tageslicht innerhalb von drei Stunden bereits 47 % der *trans*-Ferulasäureester [61]. Soweit in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet wurde, dass die Proben während der Extraktion möglichst wenig Licht ausgesetzt waren, war der Anteil der *cis*-Sterylerferulate gering (Abb. 16a). Die on-line Probenaufreinigung im geschlossenen System des on-line LC-GC verhinderte, dass größere Mengen *cis*-Sterylerferulate gebildet wurden.

Das von anderen Lipiden abgetrennte γ -Oryzanol wurde on-line in den Gaschromatographen transferiert. Da Sterylerferulate schwerflüchtige Analyten darstellen, konnte ein Loop-type Interface zur Kopplung von HPLC und Gaschromatograph eingesetzt werden [168]. Während des Transfers freigesetzte Fließmitteldämpfe wurden mit Hilfe eines frühen Lösungsmitteldampfausgangs abgeführt [150].

Bisherige Versuche, γ -Oryzanol gaschromatographisch in seine Komponenten zu trennen, verliefen wenig erfolgreich: underivatisiertes γ -Oryzanol konnte an einer unpolaren Dimethylpolysiloxan-Phase nur in zwei Peaks (Cycloartenylferulat, 24-Methylencycloartenylferulat) aufgetrennt werden. Acetylierung oder Silylierung verbesserte die Trennung der beiden Peaks [24]. Eine Derivatisierung der polaren Phenolgruppe vor einer LC-GC-Analyse würde aber die Isolierung von γ -Oryzanol aus dem Lipidextrakt mittels NP-HPLC erschweren. Das Ziel war daher, für die Gaschromatographie eine stationäre Phase zu finden, an der γ -Oryzanol in underivatisiertem Zustand in seine Bestandteile getrennt werden kann. Als geeignet erwies sich eine Trifluorpropylmethylpolysiloxan-Phase (Rtx-200MS) – eine mittelpolare Phase mit großer Temperaturbeständigkeit. On-line transferiertes γ -Oryzanol konnte in 24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat, β -Sitosterylferulat, 24-Methylencycloartenylferulat und Cycloartenylferulat aufgetrennt werden (Abb. 16b; Identifizierung: siehe 4.1.3). Aus den Peakflächenverhältnissen kann die Sterylerferulat-Verteilung berechnet werden.

Neben γ -Oryzanol wurden in der transferierten Fraktion auch die freien Sterole Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol nachgewiesen (Identifizierung: siehe 4.1.3.1). Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol werden folglich flüssigchromatographisch nicht von γ -Oryzanol abgetrennt. Die Bestimmung des γ -Oryzanol-Gehalts durch Detektion bei 325 nm wird jedoch nicht beeinträchtigt, da die freien Sterole bei dieser Wellenlänge nicht absorbieren. Gaschromatographisch können die freien Sterole von den Sterylferulaten gut abgetrennt werden, so dass die Bestimmung der Sterylferulat-Verteilung ebenfalls nicht beeinflusst wird.

4.1.3 Identifizierung der Sterylferulate

Die mittels on-line LC-GC detektierten Sterylferulate wurden massenspektroskopisch identifiziert. Die Fragmentierung von Sterylferulaten im EI-Massenspektrometer [24, 169] ist mit der von Sterylacetaten vergleichbar [170 – 172]. Wichtige Fragmente sind in Abbildung 17 dargestellt. Molekülionen werden nur bei 24-Methylcholestanylferulat und Sitostanylferulat beobachtet [24]. Die aus der Ferulasäure gebildeten Ionen m/z 194, m/z 177 und m/z 149 weisen dagegen alle Sterylferulate auf [24, 169]. Bleibt die Ladung bei Abspaltung der Ferulasäure (FS) im Sterol-Rest zurück, so entsteht ein für das Sterol charakteristisches Fragment $[M - FS]^+$. 24-Methylcholestanylferulat und Sitostanylferulat bilden nach Eliminierung von Ferulasäure und einer retro-Diels-Alder-Reaktion jeweils das Fragment $[M - FS - 54]^+$ [26]. Δ^5 -Sterylferulate weisen in Analogie zu Δ^5 -Sterylacetaten [171, 172] das charakteristische Fragment $[M - FS - 121]^+$ auf [169]. Verlust von Ferulasäure und der Sterol-Seitenkette (SK) führt zu $[M - FS - SK]^+$ [169]. Wird außerdem Ring D abgespalten, so wird $[M - FS - SK - 42]^+$ gebildet [169].

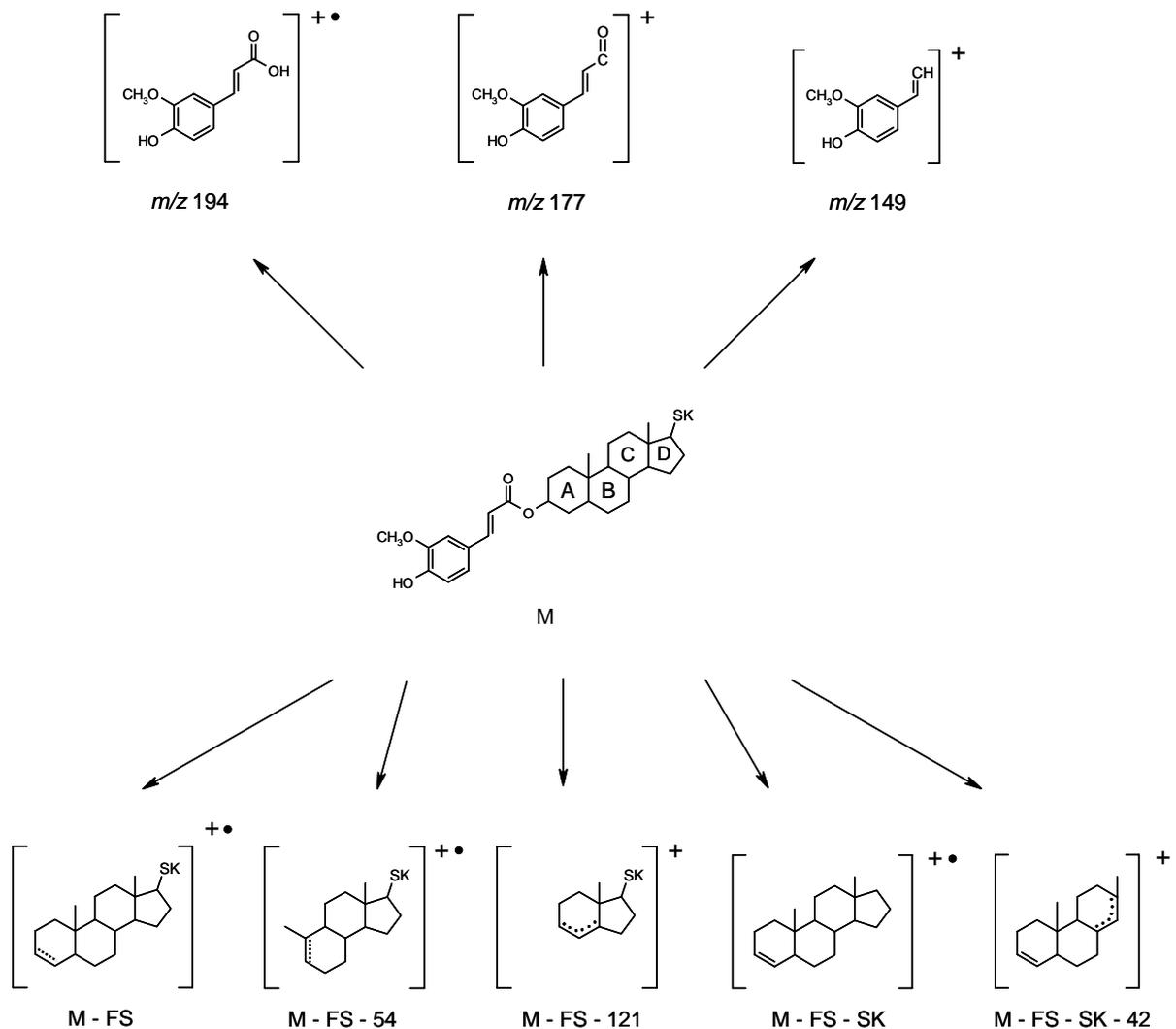


Abb. 17: Charakteristische Fragmente von Sterylferulaten im EI-Massenspektrometer (FS = Ferulsäure, SK = Sterol-Seitenkette).

4.1.3.1 GC-MS der LC-Fraktion (off-line LC-GC-MS)

Zur Identifizierung der Sterylferulate wurde die LC-Fraktion, die in der on-line LC-GC in den Gaschromatographen transferiert wird, mittels GC-MS untersucht. Hierzu wurde die Kopplung des LC-GC-Geräts aufgehoben, ein Reis-Lipidextrakt injiziert und die γ -Oryzanol enthaltende LC-Fraktion manuell gesammelt. Die LC-Fractionen von insgesamt 18 Injektionen wurden vereinigt, abgedampft und in MTBE aufgenommen. Auf diese Weise wurden ca. 1 μ g γ -Oryzanol aus Reis gewonnen, das mittels GC-MS untersucht werden konnte. Als stationäre Phase wurde dieselbe stationäre Phase wie im LC-GC-Gerät verwendet. Durch Vergleich mit Literaturdaten [24] wurden Cycloartenylferulat und 24-Methylencycloartenylferulat anhand ihrer EI-Massenspektren (Abb. 18) identifiziert (Peak 4 und 5 in Abb. 16b). Für eine Identifizierung der in geringeren Mengen vorliegenden Steryl-

ferulate (Peak 1 – 3 in Abb. 16b) war die auf diese Weise aus Reis isolierte Menge γ -Oryzanol zu gering.

Die Analyse der LC-Fraktion mittels GC-MS ergab, dass auch die freien Sterole Cycloartenol und 24-Methylcycloartanol enthalten waren (Peak I und II in Abb. 16b). γ -Oryzanol kann mit dem entwickelten LC-System folglich nicht von Cycloartenol und 24-Methylcycloartanol getrennt werden. Die beiden Sterole werden zusammen mit γ -Oryzanol in den Gaschromatographen transferiert.

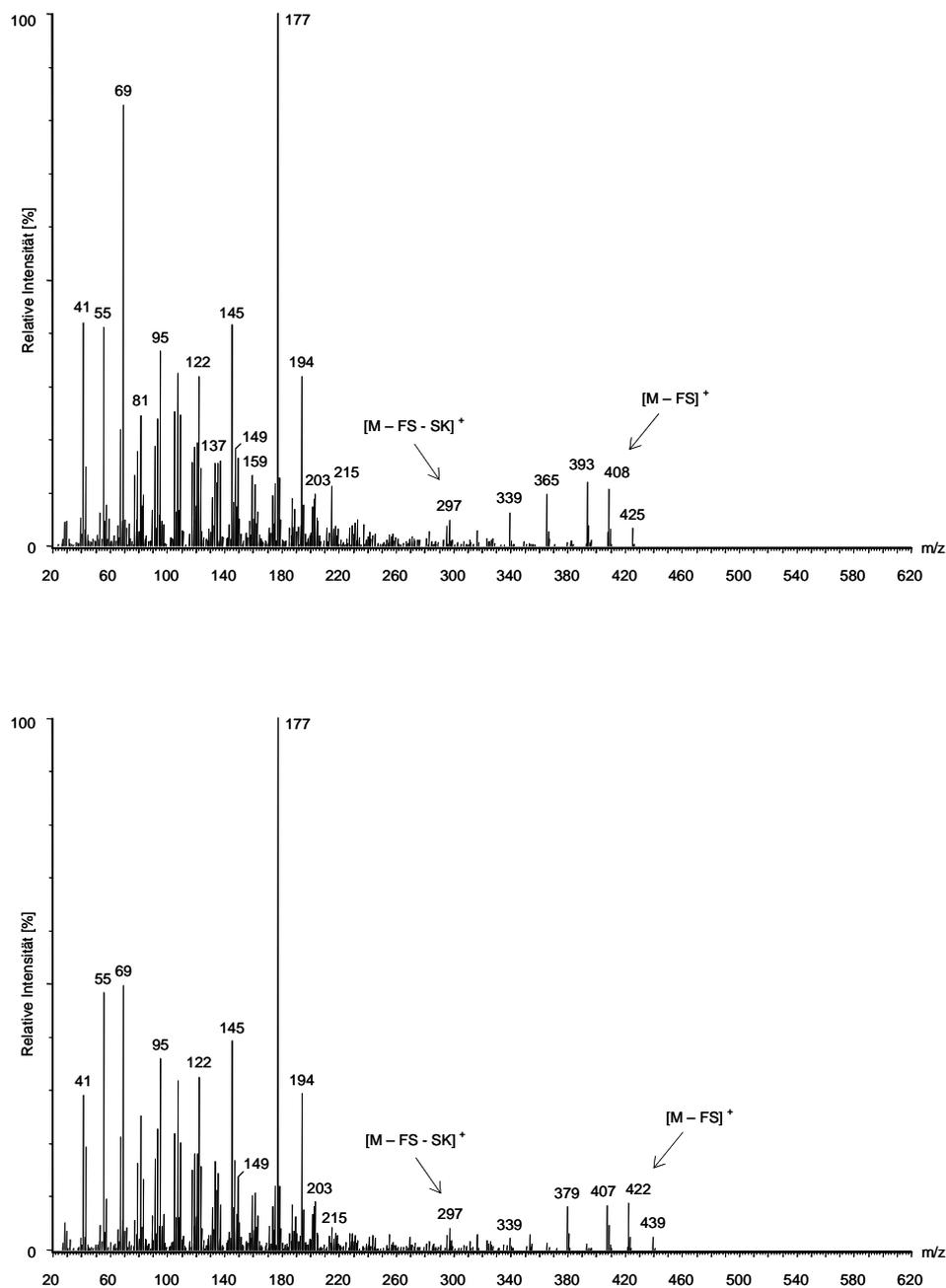


Abb. 18: Off-line LC-GC-MS von γ -Oryzanol in Reis. EI-Massenspektrum von Cycloartenylferulat (a) und 24-Methylcycloartanylferulat (b) (FS = Ferulasäure, SK = Sterol-Seitenkette).

4.1.3.2 GC-MS von dünnenschichtchromatographisch isoliertem γ -Oryzanol

Die mittels HPLC aus einem Reis-Lipidextrakt isolierte Menge γ -Oryzanol (ca. 1 μg) war zu gering, um Minorkomponenten mittels GC-MS identifizieren zu können. Daher wurde in Anlehnung an die Literatur durch Flüssig-Flüssig-Extraktion in Kombination mit präparativer Dünnschichtchromatographie eine größere Menge γ -Oryzanol aus einem Reis-Lipidextrakt isoliert und mittels GC-MS untersucht [24].

γ -Oryzanol wurde durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Natronlauge von neutralen Lipiden abgetrennt und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie weiter aufgereinigt. Chloroform als mobile Phase [24] wurde durch ein weniger toxisches Fließmittel bestehend aus Hexan, MTBE und *iso*-Propanol ersetzt. Auf diese Weise wurden ca. 460 μg γ -Oryzanol gewonnen. Die GC-MS-Analyse ergab ein Chromatogramm (TIC), das dem FID-Chromatogramm entsprach, welches durch on-line LC-GC-Analyse des Lipidextrakts erhalten wurde. Die freien Sterole Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol waren im isolierten γ -Oryzanol nicht enthalten, da diese bereits bei der alkalischen Flüssig-Flüssig-Extraktion abgetrennt worden waren. Die Menge isolierten γ -Oryzanol reichte aus, um alle γ -Oryzanol-Komponenten mittels GC-MS zu identifizieren: durch Vergleich mit Literaturdaten [24, 169] konnten neben den beiden Hauptkomponenten Cycloartenylferulat und 24-Methylen-cycloartanylferulat, β -Sitosterylferulat, 24-Methylcholesterylferulat und 24-Methylcholestanylferulat als Minorkomponenten von γ -Oryzanol identifiziert werden (Peak 1 – 3 in Abb. 16b). Charakteristische Fragmente und ihre Intensitäten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: GC-MS von dünnschichtchromatographisch isoliertem γ -Oryzanol: charakteristische Fragmente der identifizierten Sterylferulate

Fragment ²	24-Methylchole- sterylferulat	24-Methylchole- stanylferulat	β -Sitostenyl- ferulat	Cycloartenyl- ferulat	24-Methylencyclo- artanylferulat
$[M]^+$	m/z 576 (-) ¹	m/z 578 (4)	m/z 590 (-)	m/z 602 (-)	m/z 616 (-)
$[M - FS]^+$	m/z 382 (72)	m/z 384 (1)	m/z 396 (19)	m/z 408 (8)	m/z 422 (7)
$[M - FS - 121]^+$	m/z 261 (17)	- ³	m/z 275 (6)	-	-
$[M - FS - SK]^+$	m/z 255 (26)	m/z 257 (2)	m/z 255 (11)	m/z 297 (3)	m/z 297 (4)
$[M - FS - 54]^+$	-	m/z 330 (1)	-	-	-
$[M - FS - SK - 42]^+$	m/z 213 (21)	m/z 215 (2)	m/z 213 (8)	m/z 255 (2)	m/z 255 (2)
m/z 194	(88)	(100)	(100)	(69)	(25)
m/z 177	(72)	(25)	(82)	(100)	(100)
m/z 149	(23)	(6)	(17)	(18)	(14)

¹ relative Intensitäten in Klammern² vgl. Abb. 17³ Bildung des Fragments aufgrund der Struktur nicht möglich

4.1.3.3 Charakterisierung von kommerziell erhältlichem γ -Oryzanol

Neben den 460 μg γ -Oryzanol, die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion und präparativer Dünnschichtchromatographie aus Reis isoliert wurden (siehe 4.1.3.2), standen aus kommerzieller Quelle mehrere Gramm γ -Oryzanol für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Mittels GC-MS wurden Cycloartenylferulat, 24-Methylencycloartanylferulat, 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat anhand ihrer EI-Massenspektren als Bestandteile des γ -Oryzanol-Präparats identifiziert. 24-Methylcholestanylferulat wurde nicht nachgewiesen.

Die Identifizierung der Sterylferulate wurde weiter abgesichert, indem γ -Oryzanol mit Natriummethylat umgeestert wurde und die freigesetzten Sterole nach Silylierung mittels GC-MS untersucht wurden. Durch Vergleich mit Literaturdaten [173] wurden die TMS-Derivate von Cycloartenol, 24-Methylencycloartanol, 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol identifiziert. Daneben wurde der durch Umesterung gebildete Ferulasäuremethylester nachgewiesen.

4.1.3.4 GC-MS von *tert*-Butyldimethylsilyl-Derivaten

In EI-Massenspektren von Sterylferulaten wurden Molekülionen nur bei 24-Methylcholestanylferulat und Sitostanylferulat beobachtet [24]. Alle anderen Sterylferulate fragmentieren nach der Ionisation so schnell, dass deren Massenspektren nur Fragmente der Ferulasäure und des Sterols, aber keine Molekülionen aufweisen. Es wurde daher kritisiert, dass bei der Identifizierung von Sterylferulaten mittels EI-Massenspektrometrie eine Absicherung der Identifizierung anhand von Molekülionen nicht möglich ist [23].

Die Fragmentierung labiler Substanzen wird unterdrückt, wenn sie in Form ihrer *tert*-Butyldimethylsilyl-Derivate (TBDMS-Derivate) untersucht werden [174]: aus einem TBDMS-Derivat spaltet sich nach Ionisation ein *tert*-Butylradikal ab, welches dem Molekül genügend Energie entzieht, um eine weitere Fragmentierung des Moleküls zu verhindern (Abb. 19). Ein Ion mit m/z $[M - 57]$ wird daher i. d. R. in großer Intensität erhalten und kann zur Absicherung der Identifizierung herangezogen werden.

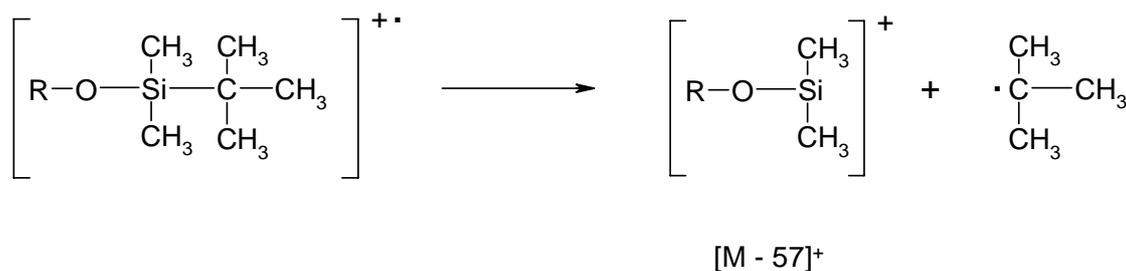


Abb. 19: EI-Massenspektrometrie von TBDMS-Derivaten: durch Abspaltung eines *tert*-Butylradikals wird dem Molekül genügend Energie entzogen, um eine weitere Fragmentierung zu verhindern. Das Fragment [M - 57]⁺ wird i. d. R. in großer Intensität erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals TBDMS-Sterylferulate synthetisiert und massenspektroskopisch untersucht. Anhand des charakteristischen Fragments [M - 57]⁺ sollte die vorangegangene massenspektroskopische Identifizierung der underivatisierten Sterylferulate (vgl. 4.1.3.1 – 4.1.3.3) abgesichert werden.

TBDMS- γ -Oryzanol wurde synthetisiert, indem kommerziell erhältliches γ -Oryzanol mit *N*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid umgesetzt wurde. Die gaschromatographische Auftrennung von TBDMS- γ -Oryzanol ergab ein Peakmuster, das dem Peakmuster von underivatisiertem γ -Oryzanol entsprach. Lediglich die Retentionszeiten der TBDMS-Sterylferulate waren länger. Die EI-Massenspektren der TBDMS-Sterylferulate bestätigten die vorangegangene Identifizierung von 24-Methylcholesterylferulat, β -Sitosterylferulat, Cycloartenylferulat und 24-Methylencycloartanylferulat im kommerziell erhältlichen γ -Oryzanol (vgl. 4.1.3.3): die erwarteten Ionen [M - 57]⁺ wurden in großer Intensität erhalten (Abb. 20).

Neben dem Ion [M - 57]⁺ dominierten die Ionen m/z 219, m/z 236, m/z 251 und m/z 291 die Massenspektren der TBDMS-Sterylferulate. Da diese Ionen in den Massenspektren aller TBDMS-Sterylferulate enthalten waren, ist es nahe liegend, dass sie auf das gemeinsame Strukturelement Ferulasäure zurückzuführen sind. Die Ionen m/z 251 und m/z 291 können mit den Strukturen in Abbildung 21 erklärt werden. Abspaltung von 2,2-Dimethylpropan aus Fragment m/z 291 bzw. aus TBDMS-Ferulasäure führt zu den cyclischen Dimethylsilylethern m/z 219 bzw. m/z 236 (Abb. 22). Die Bildung eines cyclischen Dimethylsilylethers wurde bereits für Trimethylsilyl-Sterylferulate beschrieben [24].

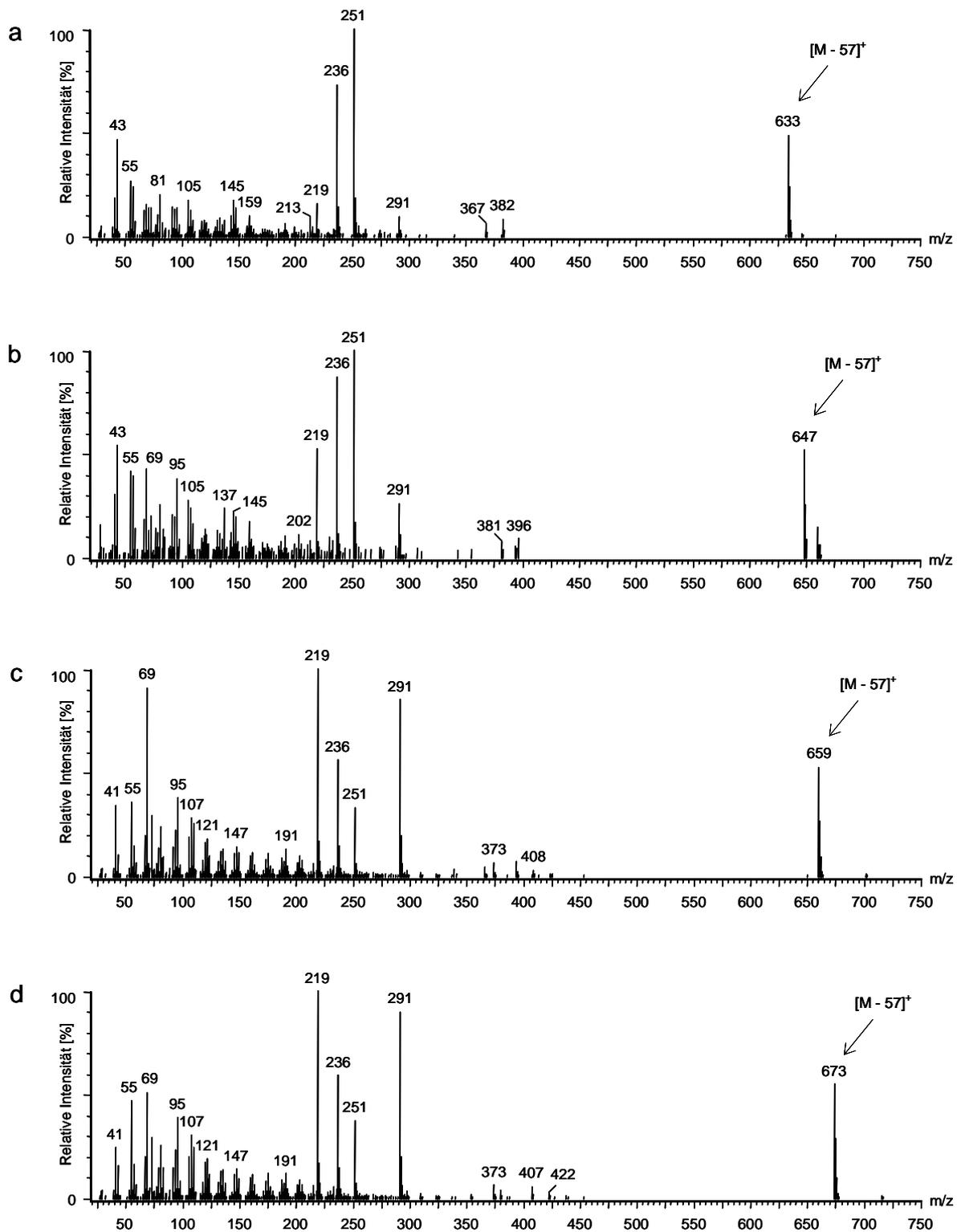


Abb. 20: EI-Massenspektren von TBDMS-24-Methylcholesterylferulat (a), TBDMS- β -Sitosterylferulat (b), TBDMS-Cycloartenylferulat (c) und TBDMS-24-Methylencycloartenylferulat (d).

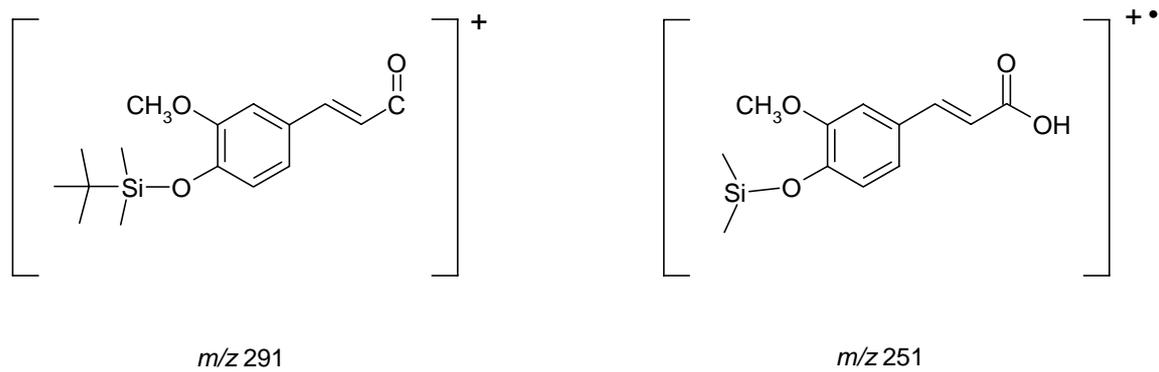


Abb. 21: EI-Massenspektrometrie von TBDMS-Sterylferulaten: charakteristische Fragmente der Ferulasäure.

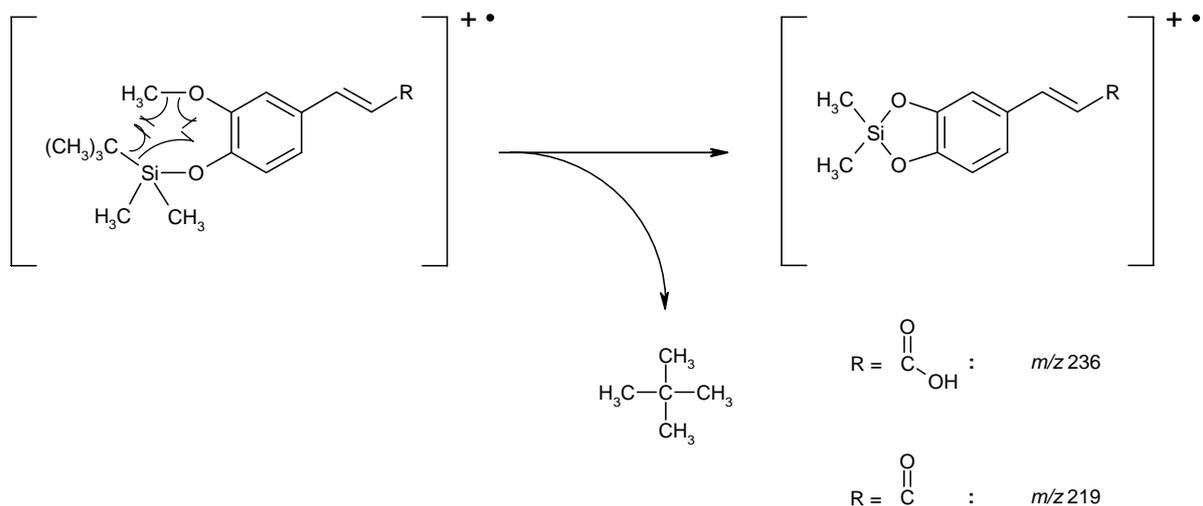


Abb. 22: EI-Massenspektrometrie von TBDMS-Sterylferulaten: Bildung cyclischer Dimethylsilyl-ether.

4.1.4 Optimierung der Extraktion von γ -Oryzanol aus Reis

Bei der Extraktion von Sterylferulaten aus Weizen und Mais wurde die Extraktionsausbeute signifikant vom verwendeten Extraktionsmittel beeinflusst [20]. Während bei der Extraktion von Weizen die höchste Ausbeute mit Aceton erzielt wurde, lieferte bei der Extraktion von Mais Hexan die höchste Ausbeute. Für die Extraktion von Sterylferulaten aus Getreide wurden neben Aceton [20, 22, 24] und Hexan [20, 25, 26, 63] auch Mischungen aus Hexan

und *iso*-Propanol [175], Hexan und Ethylacetat [1], Chloroform und Methanol [24] sowie Dichlormethan und Methanol [176] verwendet.

Um den Einfluss des Extraktionsmittels auf die γ -Oryzanol-Ausbeute bei der Extraktion von Reis zu untersuchen, wurden Teilproben einer Probe Paddy-Reismehl mit unterschiedlichen Lösungsmitteln extrahiert. Die Lipidextrakte wurden mit on-line LC-GC auf γ -Oryzanol untersucht und die Ausbeuten miteinander verglichen. Als Extraktionsmittel wurden Aceton, Ethylacetat, Hexan, *iso*-Propanol, Hexan/Ethylacetat (7 + 3; v + v), Hexan/*iso*-Propanol (1 + 1; v + v) sowie Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) eingesetzt. Verglichen mit den bei der Extraktion von Weizen und Mais beobachteten Unterschieden zwischen unterschiedlichen Extraktionsmitteln [20] waren die bei der Extraktion von Reis beobachteten Unterschiede gering (Abb. 23). Eine Mischung aus Dichlormethan und Methanol (2 + 1; v + v) lieferte die höchsten Extraktionsausbeuten bezüglich γ -Oryzanol.

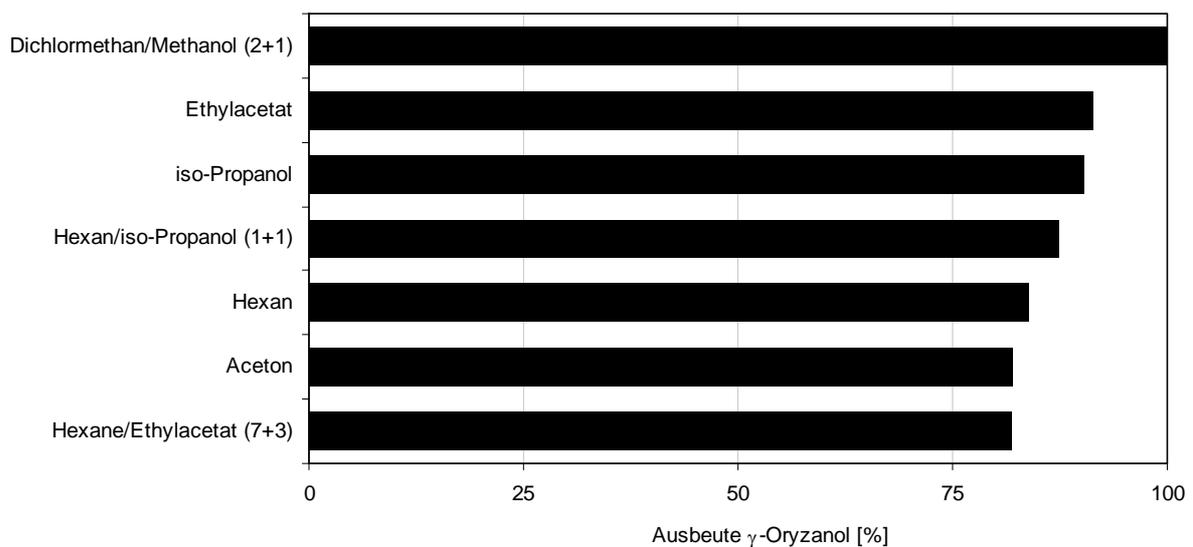


Abb. 23: Einfluss des Extraktionsmittels auf die Ausbeute an γ -Oryzanol bei Extraktion aus Paddy-Reis (Extraktionstemperatur: 60 °C; n = 2). Die mit Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) extrahierte Menge γ -Oryzanol wurde gleich 100 % gesetzt.

Der Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute an γ -Oryzanol wurde untersucht, indem Teilproben einer Probe Paddy-Reismehl mit Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) bei 20, 50, 80 und 100 °C extrahiert wurden und die Lipidextrakte mit on-line LC-GC auf γ -Oryzanol untersucht wurden. Eine Extraktionstemperatur von 50 °C lieferte die größte Ausbeute an γ -Oryzanol (Abb. 24). Sowohl eine Erniedrigung, als auch eine Erhöhung der Extraktionstemperatur führte zu niedrigeren Ausbeuten. Untersuchungen zur Extraktion von

γ -Oryzanol aus Reiskleie mit Hexan-*iso*-Propanol-Mischungen bei 30, 45 und 60 °C ergaben, dass die Konzentration an γ -Oryzanol im extrahierten Reisöl von der Extraktionstemperatur abhängt [175]: je höher die Extraktionstemperatur, desto größer war die Konzentration an γ -Oryzanol im Reiskleieöl. Die Autoren der Studie führten dies auf eine niedrigere Viskosität des Extraktionsmittels bei höheren Temperaturen und damit verbundener besseren Penetration der Reiskleie zurück. Offensichtlich dominiert bei der Extraktion von γ -Oryzanol aus Reismehl bei Temperaturen über 50 – 60 °C ein Effekt, der sich negativ auf die Ausbeute an γ -Oryzanol auswirkt.

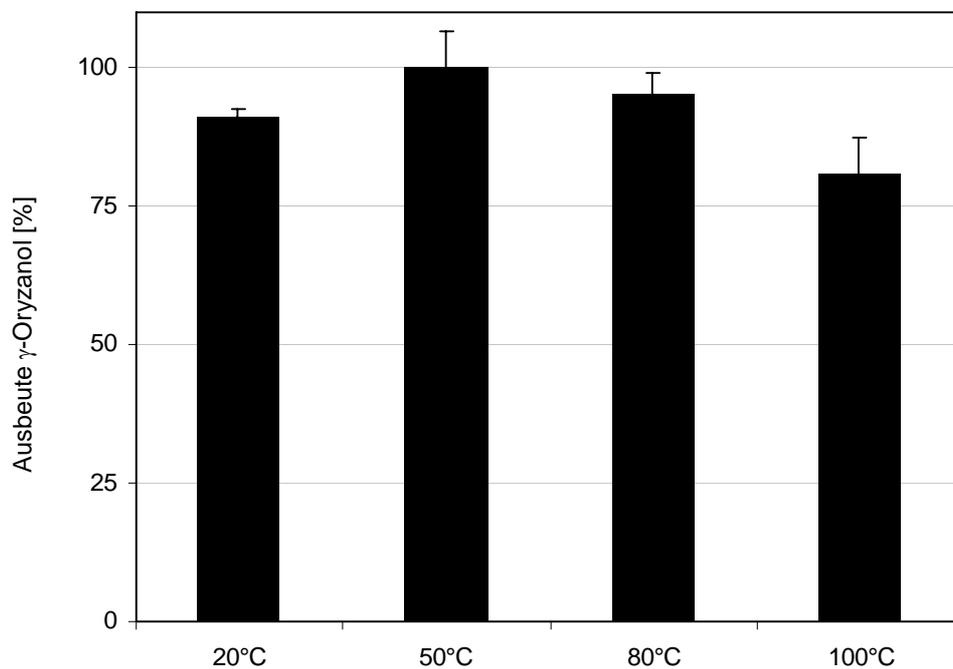


Abb. 24: Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute an γ -Oryzanol bei Extraktion mit Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) aus Paddy-Reis. Die bei 50 °C extrahierte Menge γ -Oryzanol wurde gleich 100 % gesetzt (Fehlerbalken repräsentieren das Konfidenzintervall, n = 3, p < 0,05).

4.1.5 Validierung

Die entwickelte on-line LC-GC-Methode ermöglicht es, γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in Reis zu bestimmen. Zur Validierung der neuen Analysenmethode wurden Linearität, Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der Methode bestimmt.

Der γ -Oryzanol-Gehalt wird durch Auswertung des γ -Oryzanol-Peaks im LC-Chromatogramm bestimmt (vgl. Abb. 16a). Das LC-Chromatogramm wird kopiert und der γ -Oryzanol-

Peak ausgeschnitten und gewogen. Standardlösungen von γ -Oryzanol in Hexan (10 – 40 $\mu\text{g/ml}$) wurden für eine externe Kalibrierung verwendet. Zwischen der γ -Oryzanol-Konzentration der injizierten Standardlösungen und der Masse des γ -Oryzanol-Peaks wurde ein linearer Zusammenhang beobachtet ($r^2 \geq 0,993$; Abb. 25).

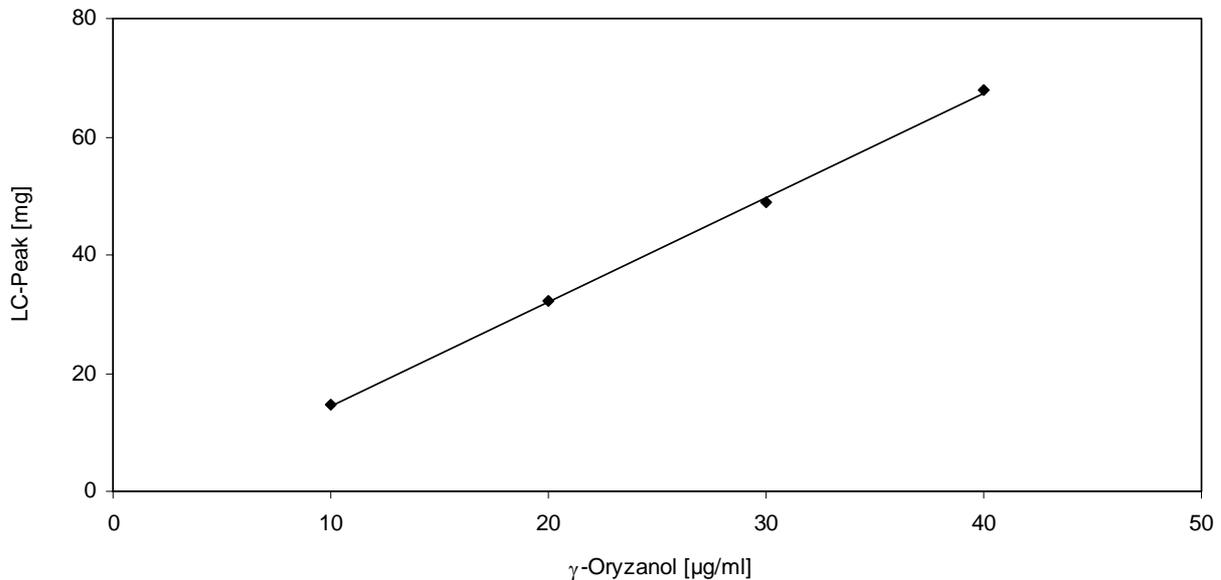


Abb. 25: Eichgerade zur Quantifizierung von γ -Oryzanol mittels on-line LC-GC: Konzentration der Eichlösungen vs. Masse des ausgeschnittenen LC-Peaks

Die Untersuchung einer Probe Braunreis mit der neuen Analysenmethode ergab einen γ -Oryzanol-Gehalt von $43,2 \pm 1,1 \text{ mg/100 g}$ (Mittelwert \pm Konfidenzintervall, $n = 6$, $p < 0,05$). Der ermittelte Wert ist im Einklang mit dem γ -Oryzanol-Gehalt, den Moreau et al. in einer Probe Braunreis bestimmten (46 mg/100 g) [63]. Die relative Standardabweichung der Bestimmung betrug 2,3 %.

Die Wiederfindung der on-line LC-GC-Methode wurde bestimmt, indem Teilproben einer Probe Reismehl vor und nach Zusatz von γ -Oryzanol ($6,4 \text{ mg/100 g}$) untersucht wurden. Es wurden $95,6 \pm 4,5 \%$ des zugesetzten γ -Oryzanol wieder gefunden (Mittelwert \pm Konfidenzintervall, $n = 3$, $p < 0,05$).

Die Sterylferulat-Verteilung wird durch Auswertung des GC-Chromatogramms ermittelt (vgl. Abb. 16b). Aus den Peakflächenverhältnissen werden die Anteile der einzelnen Sterylferulate berechnet. In der untersuchten Braunreisprobe wurden Cycloartenylferulat ($33,9 \pm 0,3 \%$) und 24-Methylcycloartenylferulat ($35,5 \pm 0,3 \%$) als Hauptkomponenten von γ -Oryzanol bestimmt. Minorkomponenten waren 24-Methylcholesterylferulat ($16,7 \pm 0,2 \%$), β -Sito-

sterylferulat ($8,9 \pm 0,2$ %) und 24-Methylcholestanylferulat ($5,0 \pm 0,1$ %). Die mit der on-line LC-GC-Methode in Braunreis bestimmte Sterylferulat-Verteilung war mit der für Reiskleie berichteten Sterylferulat-Verteilung vergleichbar [25]. Die Anteile der einzelnen Sterylferulate konnten mit relativen Standardabweichungen zwischen 0,8 und 2,3 % bestimmt werden.

4.1.6 Zusammenfassung

Basierend auf der on-line gekoppelten Flüssigchromatographie–Gaschromatographie (on-line LC-GC) wurde eine Methode zur schnellen Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in Reis und Reisprodukten entwickelt. Zunächst wird γ -Oryzanol aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert. Extraktion mit einer Mischung aus Dichlormethan/Methanol (2 + 1; v + v) bei einer Temperatur von 50 °C ergab die größten Ausbeuten an γ -Oryzanol. Der Extrakt kann ohne weitere Aufreinigung zur on-line LC-GC eingesetzt werden. Im Flüssigchromatograph des on-line LC-GC-Geräts wird γ -Oryzanol mittels Normalphasen-HPLC von Matrixbestandteilen abgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Loop-type Interfaces on-line in den Gaschromatographen transferiert. Dort erfolgt die Auftrennung von γ -Oryzanol in die einzelnen Sterylferulate 24-Methylcycloartenylferulat, Cycloartenylferulat, 24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat und β -Sito-sterylferulat.

Die Identität der Sterylferulate wurde bestimmt, indem off-line isoliertes γ -Oryzanol mit GC-MS untersucht wurde. Die off-line Isolierung von γ -Oryzanol aus einem Reisextrakt gelang durch Normalphasen-HPLC oder durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit anschließender präparativer Dünnschichtchromatographie.

Mit der entwickelten on-line LC-GC-Methode ist die Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung ohne aufwendige Probenvorbereitung möglich. Der γ -Oryzanol-Gehalt wird durch Auswertung des γ -Oryzanol-Peaks im LC-Chromatogramm bestimmt. Die Sterylferulat-Verteilung kann aus der Peakflächenverteilung im GC-Chromatogramm berechnet werden. Die entwickelte Methode zeichnete sich durch eine hohe Wiederfindung (ca. 96 %) und gute Reproduzierbarkeit aus. Die Anwendung der neuen Analysenmethode auf die Untersuchung einer Braunreisprobe lieferte für γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung Werte, die im Einklang mit Literaturdaten sind.

4.2 γ -ORYZANOL IN EUROPÄISCHEM BRAUNREIS

4.2.1 Einleitung

Bisherige Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von γ -Oryzanol konzentrierten sich auf die Bestimmung des γ -Oryzanol-Gehalts in Reiskleie und Reiskleieöl: unterschiedliche Reiskleie-Fractionen [48] sowie Reiskleie unterschiedlicher Sorten aus verschiedenen Anbaugebieten [177] wurden bezüglich ihres γ -Oryzanol-Gehalts verglichen. Daneben wurde der Einfluss technologischer Prozesse auf den γ -Oryzanol-Gehalt in Reiskleie [45 – 48, 178, 179] und Reiskleieöl [180 – 189] untersucht.

Über den γ -Oryzanol-Gehalt in Braunreis ist nur sehr wenig bekannt: Moreau et al. [63] bestimmten den γ -Oryzanol-Gehalt einer Braunreisprobe zu 46 mg/100 g. Über die natürliche Schwankungsbreite des γ -Oryzanol-Gehalts in Braunreis ist nichts bekannt. Ebenso wenig sind Informationen über die Sterylferulat-Verteilung und ihre natürliche Schwankungsbreite in Braunreis vorhanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die natürliche Variabilität von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung durch Anwendung der neu entwickelten on-line LC-GC-Methode (siehe 4.1) untersucht. Als Untersuchungsmaterial standen aus kommerziellem Anbau 30 Proben europäischer Sorten zur Verfügung. Die Proben stammten aus Italien, Frankreich oder Spanien und wurden in den Jahren 2000 – 2002 angebaut.

4.2.2 γ -Oryzanol-Gehalt

Der mittlere γ -Oryzanol-Gehalt der untersuchten Braunreisproben (42 mg/100 g) entsprach in etwa dem γ -Oryzanol-Gehalt, den Moreau et al. [63] bei der Untersuchung einer einzigen Braunreisprobe ermittelten (46 mg/100 g). In Abbildung 26 sind die γ -Oryzanol-Gehalte der einzelnen Proben dargestellt. Der γ -Oryzanol-Gehalt lag zwischen 26 und 63 mg/100 g. Die natürliche Schwankungsbreite des γ -Oryzanol-Gehalts in Braunreis ist mit der natürlichen Schwankungsbreite des γ -Oryzanol-Gehalts, wie sie in US-amerikanischer Reiskleie (251 – 684 mg/100 g) beobachtet wurde, vergleichbar [177]. Weizen und Mais wiesen ähnliche Schwankungen im Sterylferulat-Gehalt auf (6,2 – 12,3 mg/100 g bzw. 3,1 – 7,0 mg/100 g) [20]. Trotz der Variabilität des γ -Oryzanol-Gehalts war der Sterylferulat-Gehalt aller

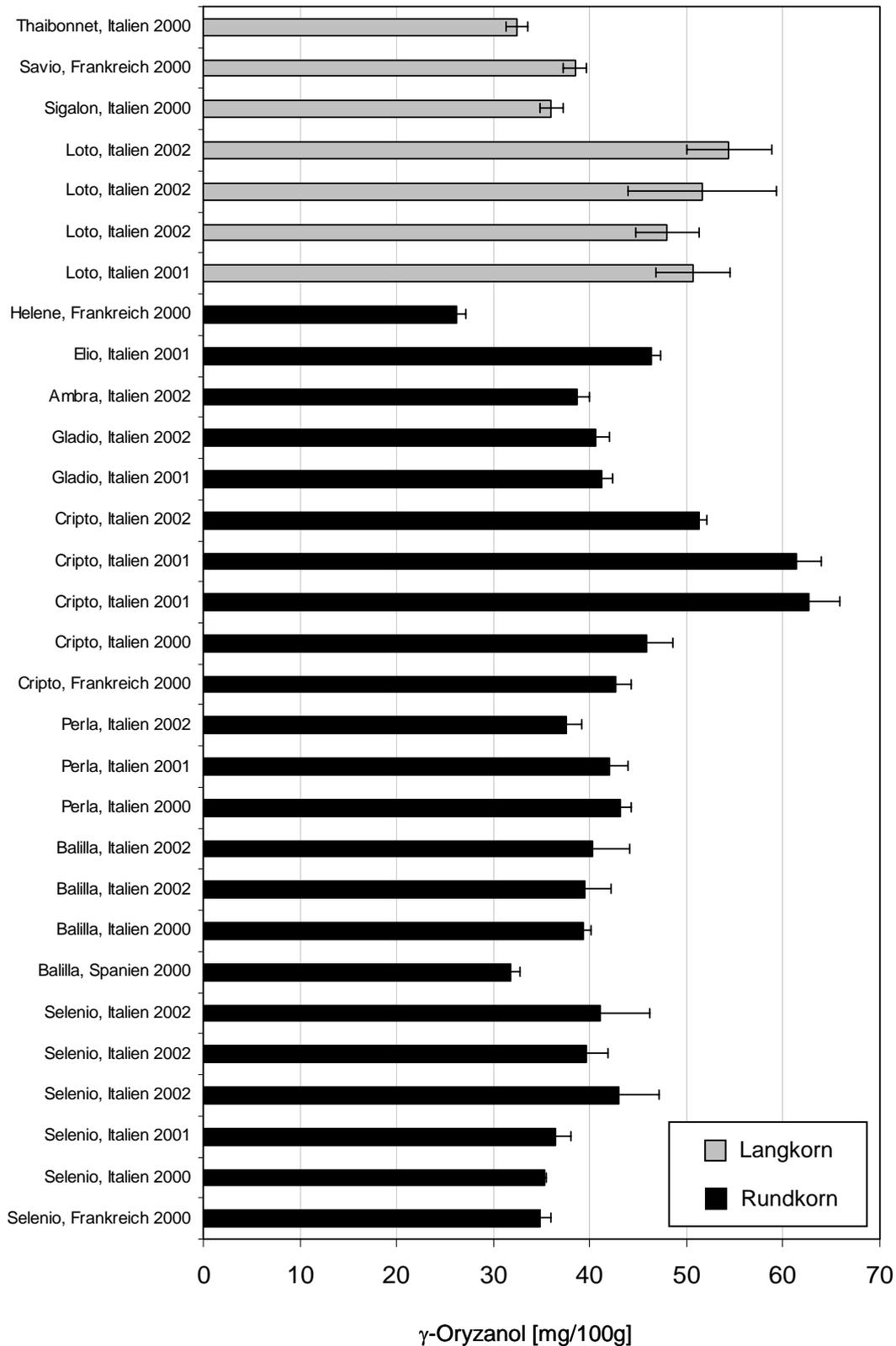


Abb. 26: γ -Oryzanol-Gehalte in Braunreisproben Europäischer Sorten aus den Jahren 2000 – 2002. Proben gleicher Sorte, Anbauort und Erntejahr stammen von unterschiedlichen Erzeugern. Fehlerbalken repräsentieren Konfidenzintervalle ($p < 0,05$).

untersuchten Braunreisproben deutlich höher als in Mais (4 – 23 mg/100 g), Weizen (5 – 12 mg/100 g), Wildreis (9 mg/100 g), Roggen (3 – 6 mg/100 g), Triticale (5 mg/100 g), Hiobsträne (5 mg/100 g) und Gerste (0,4 mg/100 g) [20, 22, 63].

Zwischen Langkorn- und Rundkornreis wurde kein Unterschied im γ -Oryzanol-Gehalt festgestellt (Abb. 26): der mittlere γ -Oryzanol-Gehalt der Langkornreis-Proben (45 mg/100 g) unterschied sich nicht wesentlich vom mittleren γ -Oryzanol-Gehalt der Rundkornreis-Proben (42 mg/100 g).

Proben derselben Reissorte, zu unterschiedlichen Zeiten an unterschiedlichen Orten angebaut, wiesen Unterschiede im γ -Oryzanol-Gehalt auf. Dies zeigt, dass der γ -Oryzanol-Gehalt von Umwelteinflüssen beeinflusst wird. Besonders deutlich war dies bei Proben der Sorte Cripto (Abb. 27). Von dieser Sorte standen Proben aus Frankreich (Jahrgang 2000) und Italien (Jahrgänge 2000, 2001 und 2002) zur Verfügung. Aufgrund unterschiedlichen Jahrgangs und/oder Anbauorts kann davon ausgegangen werden, dass die Reispflanzen unterschiedlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren. Wie Abbildung 27 zeigt, unterschieden sich die Proben signifikant hinsichtlich ihres γ -Oryzanol-Gehalts.

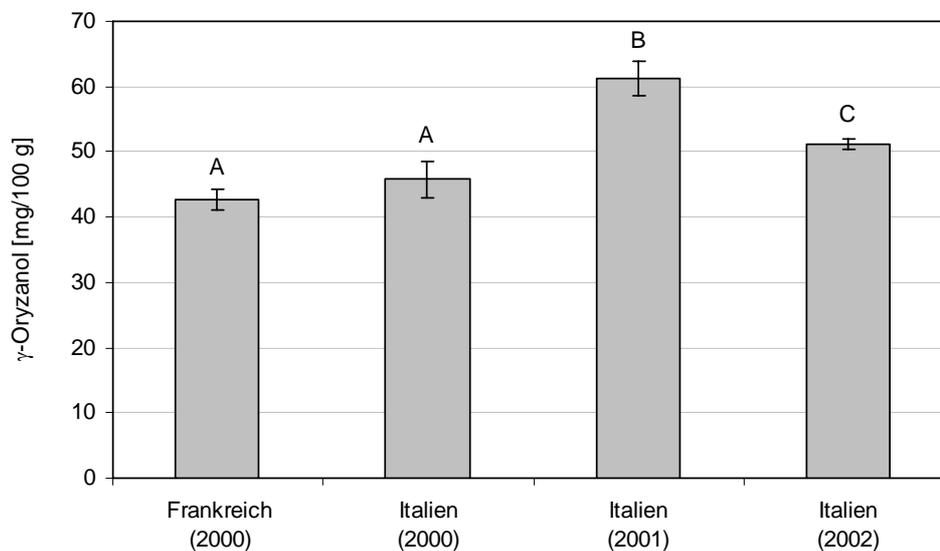


Abb. 27: γ -Oryzanol-Gehalt in Braunreis der Sorte Cripto in Abhängigkeit von Anbauort und Anbaujahr. Fehlerbalken repräsentieren Konfidenzintervalle ($p < 0,05$). Proben, die sich statistisch signifikant im γ -Oryzanol-Gehalt unterscheiden ($p < 0,05$) sind mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

4.2.3 Sterylferulat-Verteilung

Die Sterylferulat-Verteilung in den untersuchten Braunreisproben ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Cycloartenylferulat und 24-Methylcycloartanylferulat wurden in allen Proben als Hauptkomponenten von γ -Oryzanol nachgewiesen. Als Minorkomponenten wurden 24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat und β -Sitosterylferulat detektiert. Dies entspricht der Sterylferulat-Verteilung wie sie in Reiskleie und rohem Reiskleieöl beobachtet wurde [1, 22, 23, 45, 137].

Tabelle 5: Sterylferulat-Verteilung in Braunreisproben Europäischer Sorten.

Sorte	Anbauort (Erntejahr)	Anteile einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol [%]				
		24-Methyl- cholesteryl- ferulat	24-Methyl- cholestanyl- ferulat	β -Sitosteryl- ferulat	Cycloartenyl- ferulat	24-Methylen- cycloartanyl- ferulat
Thaibonnet	Italien (2000)	9,9 \pm 0,3 ¹	7,5 \pm 0,3	8,2 \pm 0,3	47,5 \pm 0,6	26,9 \pm 0,5
Savio	Frankreich (2000)	6,7 \pm 0,2	13,1 \pm 0,2	7,1 \pm 0,3	44,8 \pm 0,5	28,3 \pm 0,3
Sigalon	Italien (2000)	6,0 \pm 0,2	12,4 \pm 0,2	7,3 \pm 0,1	48,0 \pm 0,3	26,3 \pm 0,3
Loto	Italien (2001)	7,4 \pm 0,1	14,2 \pm 0,3	7,9 \pm 0,3	44,1 \pm 0,3	26,4 \pm 0,3
	Italien (2002)	7,8 \pm 0,1	12,6 \pm 0,5	7,8 \pm 0,4	44,8 \pm 1,1	27,1 \pm 0,4
	Italien (2002)	7,4 \pm 0,2	12,0 \pm 0,2	7,6 \pm 0,2	43,7 \pm 0,2	29,4 \pm 0,4
	Italien (2002)	7,4 \pm 0,5	11,9 \pm 0,5	7,6 \pm 0,5	44,4 \pm 0,6	28,7 \pm 0,8
Helene	Frankreich (2000)	4,7 \pm 0,1	13,1 \pm 0,3	6,7 \pm 0,1	47,7 \pm 0,2	27,8 \pm 0,2
Elio	Italien (2001)	7,1 \pm 0,1	12,6 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	42,2 \pm 0,4	31,7 \pm 0,4
Ambra	Italien (2002)	6,7 \pm 0,7	10,7 \pm 0,5	7,0 \pm 0,1	44,8 \pm 0,9	30,8 \pm 0,4
Gladio	Italien (2001)	5,8 \pm 0,2	12,4 \pm 0,3	7,8 \pm 0,2	50,6 \pm 0,3	23,4 \pm 0,2
	Italien (2002)	5,7 \pm 0,2	11,6 \pm 0,2	7,5 \pm 0,2	51,8 \pm 0,5	23,3 \pm 0,4
Cripto	Frankreich (2000)	16,4 \pm 0,3	5,0 \pm 0,2	8,8 \pm 0,1	35,0 \pm 0,5	34,9 \pm 0,4
	Italien (2000)	8,8 \pm 0,3	9,8 \pm 0,2	6,2 \pm 0,2	45,4 \pm 0,3	29,8 \pm 0,4
	Italien (2001)	7,3 \pm 0,2	12,5 \pm 0,4	5,4 \pm 0,3	47,2 \pm 0,7	27,8 \pm 0,4
	Italien (2001)	7,0 \pm 0,1	12,4 \pm 0,1	5,3 \pm 0,1	47,8 \pm 0,4	27,5 \pm 0,4
	Italien (2002)	6,6 \pm 0,2	11,2 \pm 0,2	6,6 \pm 0,3	48,1 \pm 0,7	27,5 \pm 0,1
Perla	Italien (2000)	16,7 \pm 0,2	5,0 \pm 0,1	8,9 \pm 0,2	33,9 \pm 0,3	35,5 \pm 0,3
	Italien (2001)	14,3 \pm 0,2	4,2 \pm 0,3	8,2 \pm 0,3	37,8 \pm 0,4	35,5 \pm 0,5
	Italien (2002)	13,2 \pm 0,2	3,4 \pm 0,6	9,4 \pm 0,1	39,5 \pm 0,4	34,5 \pm 0,3

Balilla	Spanien (2000)	14,8 ± 0,2	4,5 ± 0,3	8,5 ± 0,2	35,1 ± 0,5	37,1 ± 0,5
	Italien (2000)	17,7 ± 0,3	5,9 ± 0,1	8,3 ± 0,2	32,4 ± 0,3	35,7 ± 0,5
	Italien (2002)	14,4 ± 0,6	4,1 ± 0,7	9,0 ± 0,2	36,2 ± 0,3	36,3 ± 0,2
	Italien (2002)	13,0 ± 0,6	4,6 ± 0,1	8,6 ± 0,4	36,8 ± 1,0	36,9 ± 0,3
Selenio	Frankreich (2000)	12,2 ± 0,2	7,0 ± 0,2	9,9 ± 0,2	39,6 ± 0,3	31,3 ± 0,4
	Italien (2000)	13,4 ± 0,8	6,0 ± 0,4	9,1 ± 0,1	37,7 ± 1,4	33,7 ± 0,7
	Italien (2001)	13,9 ± 0,3	4,9 ± 0,2	9,1 ± 0,4	37,1 ± 0,6	35,0 ± 0,3
	Italien (2002)	6,9 ± 0,8	10,5 ± 0,5	7,6 ± 0,2	44,6 ± 0,6	30,4 ± 0,6
	Italien (2002)	13,6 ± 0,7	4,2 ± 0,4	9,6 ± 0,4	39,8 ± 0,7	32,9 ± 0,8
	Italien (2002)	13,4 ± 0,5	3,9 ± 0,2	9,2 ± 0,2	39,5 ± 0,7	34,1 ± 0,2

¹ Mittelwert ± Konfidenzintervall ($p < 0,05$)

Ebenso wie der γ -Oryzanol-Gehalt wurde die Sterylferulat-Verteilung von Umwelteinflüssen beeinflusst. Besonders deutlich ist dies wiederum bei den Proben der Sorte Cripto (Tabelle 5): während eine Probe aus Frankreich aus dem Jahre 2000 mehr als dreimal soviel 24-Methylcholesterylferulat wie 24-Methylcholestanylferulat enthielt, enthielt eine Probe desselben Jahrgangs aus Italien etwa gleich große Mengen der beiden Sterylferulate. Proben des darauf folgenden Jahres enthielten dagegen etwa doppelt soviel 24-Methylcholestanylferulat wie 24-Methylcholesterylferulat. Ein Zusammenhang zwischen der Sterylferulat-Verteilung und dem γ -Oryzanol-Gehalt war nicht zu erkennen. Langkorn- und Rundkornreis unterschieden sich nicht in der Sterylferulat-Verteilung.

Die Variabilität in der Sterylferulat-Verteilung ist in Tabelle 6 wiedergegeben. In den untersuchten Braunreisproben variierten die Anteile einzelner Sterylferulate beträchtlich. In Weizen und Mais wurden weitaus geringere Schwankungen in der Sterylferulat-Verteilung beobachtet [20].

Tabelle 6: Variabilität der Sterylferulat-Verteilung in Europäischem Braunreis

	Anteil am Gesamt- γ -Oryzanol [%]
<i>4,4'-Dimethylsterylferulate:</i>	68 – 76
Cycloartenylferulat	32 – 52
24-Methylencycloartanylferulat	23 – 38
<i>4,4'-Desmethylsterylferulate:</i>	24 – 32
24-Methylcholesterylferulat	5 – 18
24-Methylcholestanylferulat	3 – 14
β -Sitosterylferulat	5 – 10

Interessanterweise waren die Anteile an 4,4'-Dimethylsterylferulaten bzw. an 4,4'-Desmethylsterylferulaten ungeachtet der enormen Variabilität in der Sterylferulat-Verteilung relativ konstant (Tabelle 6). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Anteil an Cycloartenylferulat negativ mit dem Anteil an 24-Methylencycloartanylferulat korreliert ($r^2 = -0,95$): je größer der Anteil an Cycloartenylferulat in einer Probe war, desto niedriger war der Anteil an 24-Methylencycloartanylferulat (Abb. 28a). Ebenso korrelierte der Anteil an 24-Methylcholesterylferulat negativ mit dem Anteil an 24-Methylcholestanylferulat ($r^2 = -0,92$): je größer der Anteil an 24-Methylcholesterylferulat in einer Probe war, desto geringer fiel der Anteil an 24-Methylcholestanylferulat aus (Abb. 28b). Daneben gab es auch einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Gruppe der 4,4'-Dimethylsterylferulate und der Gruppe der 4,4'-Desmethylsterylferulate: der Anteil an Cycloartenylferulat korrelierte negativ mit dem Anteil an 24-Methylcholesterylferulat ($r^2 = -0,93$; Abb. 28c).

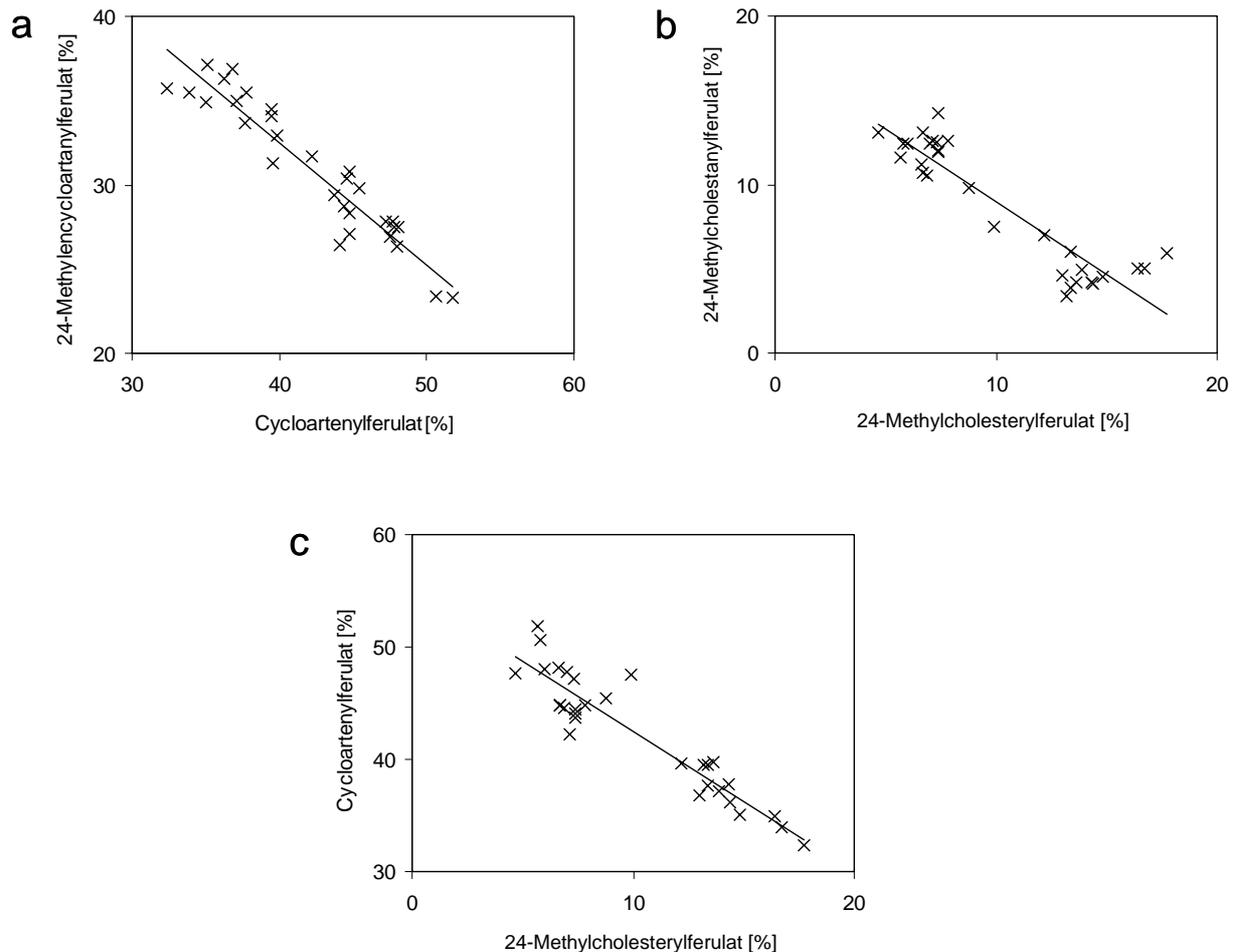


Abb. 28: Korrelationen zwischen den Anteilen einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol in Europäischen Braunreisproben ($N = 30$):

(a) Der Anteil an 24-Methylcycloartanylferrat korreliert negativ mit dem Anteil an Cycloartenylferulat ($r^2 = -0,95$), (b) der Anteil an 24-Methylcholestanylferrat korreliert negativ mit dem Anteil an 24-Methylcholesterylferulat ($r^2 = -0,92$) und (c) der Anteil an Cycloartenylferulat korreliert negativ mit dem Anteil an 24-Methylcholesterylferulat ($r^2 = -0,93$).

Die Zusammenhänge zwischen den Anteilen der einzelnen Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol können mit dem in Abbildung 29 wiedergegebenem Modell beschrieben werden: die negativen Korrelationen zwischen dem Anteil an Cycloartenylferulat und dem Anteil an 24-Methylcycloartanylferrat bzw. zwischen dem Anteil an 24-Methylcholesterylferulat und dem Anteil an 24-Methylcholestanylferrat sind durch zwei Wippen dargestellt. Beide Wippen sind über eine Stange miteinander verbunden, die den Zusammenhang zwischen der Gruppe der 4,4'-Dimethylsterylferulate und der Gruppe der 4,4'-Desmethylsterylferulate veranschaulicht. Die Sterylferulate sind dabei von links nach rechts entsprechend der Sterol-

Biosynthese angeordnet. Ist der Anteil an Cycloartenylferulat, dem Ferulasäureester des am Anfang der Sterol-Biosynthese stehenden Sterols, groß, dann ist der Anteil an 24-Methylcholestanylferulat, dem Ferulasäureester eines Endprodukts der Sterol-Biosynthese, ebenfalls relativ groß. Die Anteile der Ferulasäureester von 24-Methylencycloartanol und 24-Methylcholesterol, die biosynthetisch betrachtet Intermediate der 24-Methylcholestanol-Biosynthese darstellen, sind dann relativ gering. Sind dagegen die Anteile der Ferulasäureester der intermediären Sterole 24-Methylencycloartanol und 24-Methylcholsterol relativ groß, dann sind die Anteile der Ferulasäureester der am Anfang bzw. am Ende der Sterol-Biosynthese stehenden Sterole Cycloartenol und 24-Methylcholestanol relativ gering.

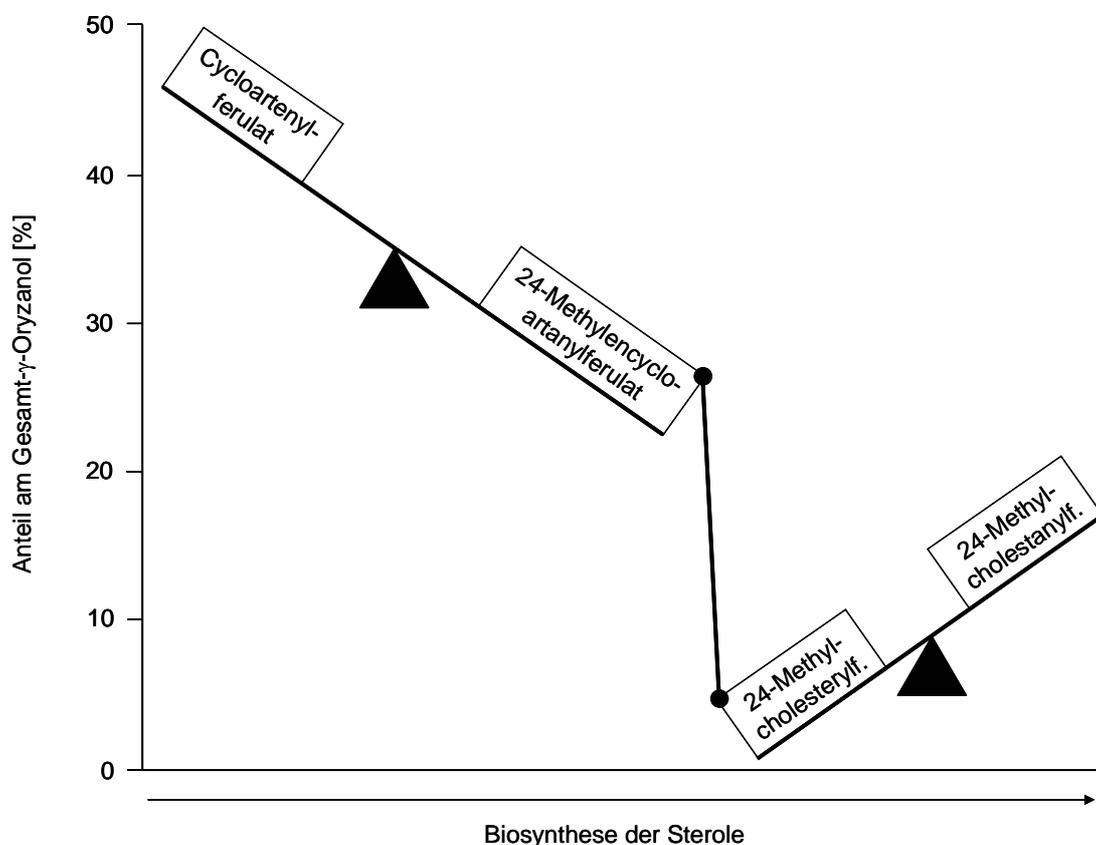


Abb. 29: Modell zur Beschreibung der Zusammenhänge zwischen den Anteilen einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol. Die Beschreibung des Modells erfolgt im Text.

Eine biochemische Erklärung der beobachteten Zusammenhänge ist noch nicht möglich, da über die Regulation der Biosynthese von Sterolen und Sterol-Lipiden noch zu wenig bekannt ist. Die beobachteten Korrelationen könnten auf Zusammenhänge zwischen den für die γ -Oryzanol-Synthese zur Verfügung stehenden freien Sterole zurückzuführen sein. Denkbar

wäre aber auch, dass die Sterylferulat-Verteilung vom Spektrum der freien Sterole unabhängig ist und auf der Ebene der Veresterung reguliert wird.

Korrelationen zwischen einzelnen Sterolen wurden bisher in Löwenzahnblättern und Olivenöl beobachtet: im Unverseifbaren von Virgin Olivenöl korrelierte der Anteil an β -Sitosterol negativ mit dem Anteil an Δ^5 -Avenasterol [190]. Untersuchungen der Sterol-Fettsäureester in Löwenzahnblättern ergaben, dass der Anteil an Cycloartenol-Fettsäureester negativ mit dem Anteil an 24-Methylencycloartanol-Fettsäureester korreliert. Unabhängig von den großen Schwankungen, die die Anteile der beiden Ester aufwiesen, lag der Anteil beider Sterol-Fettsäureester relativ konstant zwischen 65 – 75 %. Es wurde beobachtet, dass das Verhältnis von Cycloartenol-Fettsäureester zu 24-Methylencycloartanol-Fettsäureester von der Jahreszeit abhängt [191].

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die in dieser Arbeit beobachteten Zusammenhänge zwischen einzelnen Sterylferulaten zu erklären. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der Sterol-Biosynthese [82, 84, 94], der Verwendung isopenmarkierter Vorstufen und Intermediate der Sterol-Biosynthese [86] sowie durch gezielte biotechnologische Eingriffe in den Sterol-Metabolismus [91] könnten neue Erkenntnisse bezüglich der Regulation der γ -Oryzanol-Biosynthese und bezüglich der physiologischen Funktion der Sterylferulate gewonnen werden. In die Untersuchungen sollten freie Sterole, Sterol-Fettsäureester und Sterolglykoside mit eingeschlossen werden, um Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Sterol-Lipiden untersuchen zu können. Von besonderem Interesse sind sicher auch exogene Einflüsse wie z. B. Temperatur, Licht, Niederschläge oder Pathogenbefall.

4.2.4 Einfluss des Reifegrades

Grüne, unreife Reiskörner fallen bei der Reisproduktion als Nebenprodukt an. Da aus ihnen ein Reisöl gewonnen werden kann, das einen ebenso hohen γ -Oryzanol-Gehalt wie Reiskleieöl aufweist, wurden grüne Reiskörner als Rohstoff für die Produktion von Nutraceuticals vorgeschlagen [192]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die Sterylferulat-Verteilung in grünen Reiskörnern mit der Sterylferulat-Verteilung in reifen Reiskörnern vergleichbar ist.

Untersuchungen an Samen der Ringelblume (*Calendula officinalis*) und an Getreidekörnern (Mais, Weizen und Sorghumhirse) zeigten, dass der Reifegrad einen signifikanten Einfluss auf die Sterol-Lipide in Samen und Getreidekörnern haben kann. So nahm in den untersuchten Samen und Getreidekörnern während der Reife der Gesamtgehalt an Sterolen bezogen auf die Trockenmasse ab [193 – 197]. Der Anteil Sterol-Fettsäureester am Gesamtgehalt der Sterole erhöhte sich mit zunehmender Reife [193 – 195, 197, 198]. In Erbsensamen

(*Pisum sativum* L.) wurde beobachtet, dass die Sterol-Biosynthese während der Reife abnimmt. Dabei wird die Biosynthese von 24-Methylcycloartenol reduziert und vermehrt Cycloartenol gebildet [199].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich grüne, unreife Reiskörner von reifen Braunreiskörnern bezüglich γ -Oryzanol-Gehalt oder Sterylferulat-Verteilung unterscheiden. Dazu wurde bespelzter Reis manuell entspelzt und in grüne und reife Körner getrennt. Dieses Verfahren stellte sicher, dass grüne und reife Körner sich im Reifegrad unterschieden, aber den gleichen genetischen Hintergrund hatten und unter identischen Bedingungen angebaut worden waren. Grüne Körner und reife Körner wurden getrennt mittels on-line LC-GC untersucht. Eine Berücksichtigung des Wassergehalts erübrigte sich, da grüne und reife Körner durch die industrielle Trocknung des bespelzten Reises auf den gleichen Wassergehalt gebracht worden waren (ca. 13 %) [200]. Grüne und reife Körner wurden in drei Chargen der Sorte Cripto und in zwei Chargen der Sorte Selenio untersucht.

Ein Einfluss des Reifegrades auf den γ -Oryzanol-Gehalt konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 30): während in zwei Chargen Reis der γ -Oryzanol-Gehalt in den grünen Körnern statistisch signifikant niedriger ausfiel (16 bzw. 18 %), unterschieden sich bei den verbleibenden drei Chargen Reis grüne und reife Körner nicht im γ -Oryzanol-Gehalt ($p < 0,05$).

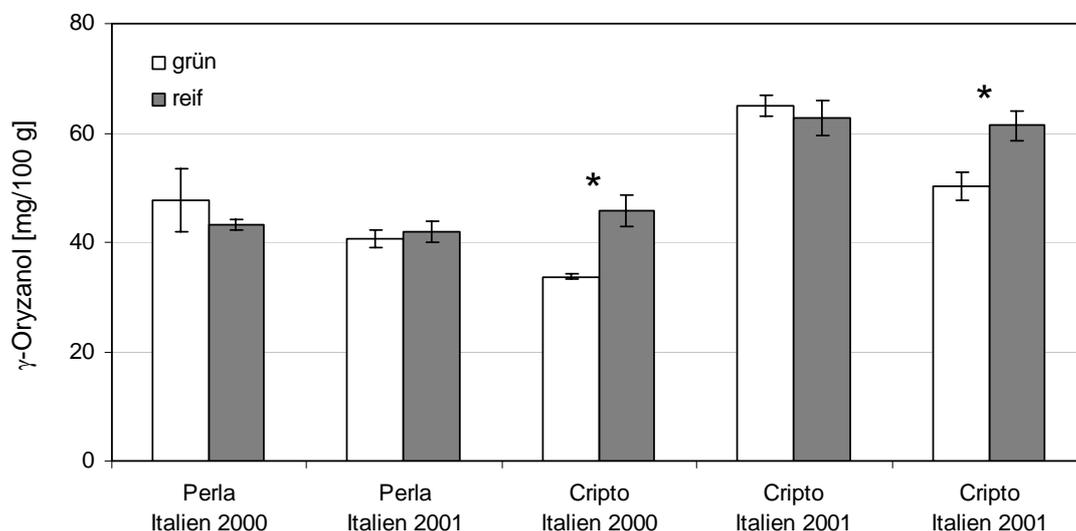


Abb. 30: γ -Oryzanol-Gehalt in grünen und reifen Reiskörnern in fünf Chargen Sorten Perla und Cripto. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen grünen und reifen Körnern einer Charge sind mit einem Stern markiert ($p < 0,05$). Fehlerbalken repräsentieren Konfidenzintervalle ($p < 0,05$; $n = 6$). Die beiden Proben mit der Bezeichnung „Cripto Italien 2001“ wurden von verschiedenen Erzeugern erhalten.

Abgesehen von kleineren statistisch signifikanten Unterschieden glich die Sterylferulat-Verteilung in den grünen Reiskörnern der Sterylferulat-Verteilung in den entsprechenden reifen Reiskörnern ($p < 0,05$; Abb. 31). Sowohl die reifen als auch die grünen Reiskörner der Sorte Perla enthielten mehr 24-Methylcholesterylferulat als 24-Methylcholestanylferulat aber vergleichbare Mengen Cycloartenylferulat und 24-Methylencycloartanylferulat. Demgegenüber enthielten sowohl die reifen als auch die grünen Reiskörner der Sorte Cripto mehr Cycloartenylferulat als 24-Methylencycloartanylferulat sowie mehr 24-Methylcholestanylferulat als 24-Methylcholesterylferulat.

Folglich unterscheiden sich grüne, unreife Körner nicht von reifen Reiskörnern bezüglich γ -Oryzanol-Gehalt oder Sterylferulat-Verteilung. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die in europäischen Braunreisproben beobachteten großen Unterschiede in der Sterylferulat-Verteilung (siehe 4.2.3) nicht auf unterschiedliche Reifegrade der Proben zurückzuführen sind.

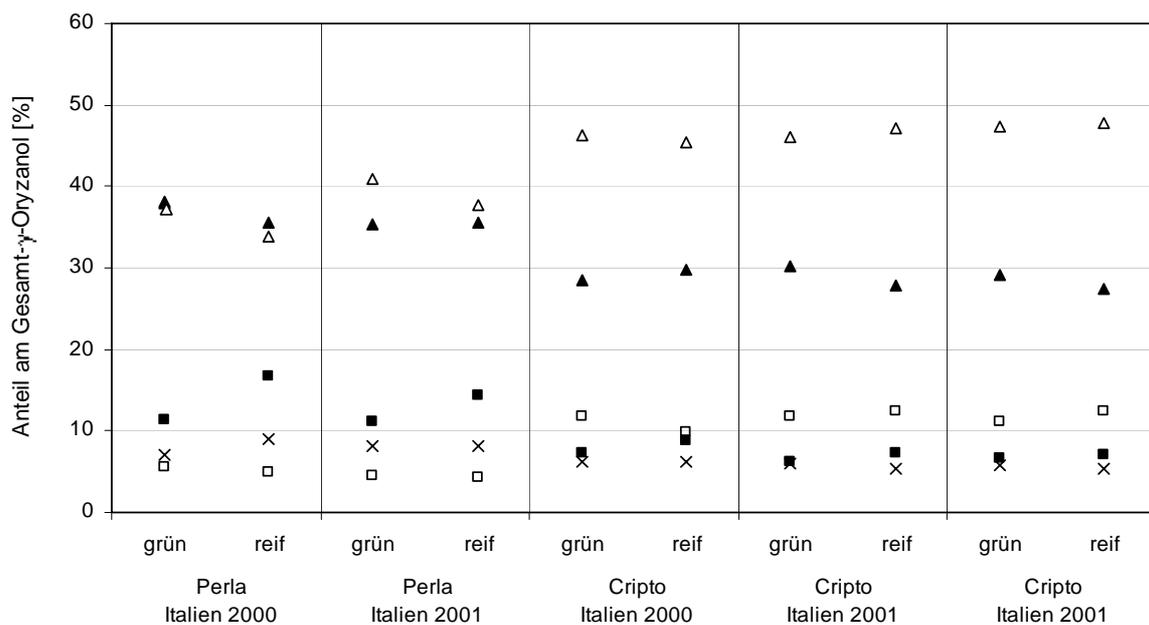


Abb. 31: Sterylferulat-Verteilung in grünen und reifen Reiskörnern in fünf Chargen Braunreis der Sorten Perla und Cripto: Anteile der Sterylferulate Cycloartenylferulat (Δ), 24-Methylencycloartanylferulat (\blacktriangle), 24-Methylcholesterylferulat (\blacksquare), 24-Methylcholestanylferulat (\square) und β -Sitosterylferulat (\times) am γ -Oryzanol-Gehalt. Die beiden Proben mit der Bezeichnung „Cripto Italien 2001“ wurden von verschiedenen Erzeugern erhalten.

4.2.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die natürlichen Schwankungsbreiten von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in Braunreis untersucht. Als Untersuchungsmaterial standen 30 Proben europäischer Sorten aus den Jahren 2000 – 2002 zur Verfügung.

Der γ -Oryzanol-Gehalt in den untersuchten Proben lag zwischen 26 und 63 mg/100 g. In allen Proben wurden Cycloartenylferulat und 24-Methylencycloartanylferulat als Hauptkomponenten, sowie 24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat und β -Sitosterylferulat als Minorkomponenten von γ -Oryzanol nachgewiesen. Die Anteile der einzelnen Sterylferulate wiesen große Schwankungen auf. So lag der Anteil an Cycloartenylferulat zwischen 32 und 52 %, der Anteil an 24-Methylencycloartanylferulat zwischen 23 und 38 %, der Anteil an 24-Methylcholesterylferulat zwischen 5 und 18 %, der Anteil an 24-Methylcholestanylferulat zwischen 3 und 14 % und der Anteil an β -Sitosterylferulat zwischen 5 und 10 %. Ungeachtet dieser großen Schwankungen erwies sich der Anteil an 4,4'-Dimethylsterylferulaten (Cycloartenylferulat und 24-Methylencycloartanylferulat) bzw. der Anteil an 4,4'-Desmethylsterylferulaten (24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat und β -Sitosterylferulat) als relativ konstant (68 – 76 % bzw. 24 – 32 %). Dies war darauf zurückzuführen, dass der Anteil an Cycloartenylferulat negativ mit dem Anteil an 24-Methylencycloartanylferulat bzw. der Anteil an 24-Methylcholesterylferulat negativ mit dem Anteil an 24-Methylcholestanylferulat korreliert ($r^2 = -0,95$ bzw. $r^2 = -0,92$). Der Anteil an Cycloartenylferulat korrelierte dabei negativ mit dem Anteil an 24-Methylcholesterylferulat ($r^2 = -0,93$).

Langkorn- und Rundkornreis unterschieden sich weder im γ -Oryzanol-Gehalt noch in der Sterylferulat-Verteilung.

Wie die Untersuchung unreifer (grüner) und reifer Reiskörner zeigte, sind die beobachteten Schwankungen in γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung nicht auf unterschiedliche Reifegrade zurückzuführen: unreife und reife Reiskörner derselben Charge wiesen den gleichen γ -Oryzanol-Gehalt und eine im Wesentlichen identische Sterylferulat-Verteilung auf. Die Untersuchung von Proben einer Reissorte, die in unterschiedlichen Ländern zu unterschiedlichen Zeiten angebaut worden war, zeigte, dass sowohl der γ -Oryzanol-Gehalt als auch die Sterylferulat-Verteilung von Umwelteinflüssen beeinflusst wird.

4.3 γ -ORYZANOL IN GENTECHNISCH VERÄNDERTEN REISLINIEN

4.3.1 Einleitung

In der modernen Züchtung von Nutzpflanzen werden in zunehmendem Maße Methoden der Gentechnologie eingesetzt. Diese Methoden zeichnen sich v. a. dadurch aus, dass Eigenschaften gezielt verändert und Merkmale über Artgrenzen hinweg übertragen werden können [201]. Ziele gentechnischer Veränderungen von Nutzpflanzen sind zum einen verbesserte agronomische Eigenschaften zum anderen die Verbesserung sensorischer oder ernährungsphysiologischer Eigenschaften [202]. Die weltweite Anbaufläche gentechnisch veränderter Nutzpflanzen stieg in den Jahren 1996 – 2003 von 1,7 Millionen ha auf 67,7 Millionen ha [203]. Große öffentliche Aufmerksamkeit erzielte die Entwicklung des so genannten „Golden Rice“: mit Hilfe der Gentechnik gelang es, den Biosynthese-Weg für Provitamin A (β -Carotin) ins Reis-Endosperm einzuführen. Die aufgrund des β -Carotins gold-gelb gefärbten Reiskörner sollen helfen, den in Südostasien weit verbreiteten Vitamin-A-Mangel zu bekämpfen [204].

Das Inverkehrbringen gentechnisch veränderter Lebensmittel bedarf einer Genehmigung. In der Europäischen Union wird seit dem 18. April 2004 die Zulassung gentechnisch veränderter Lebensmittel durch die Verordnung (EC) 1829/2003 geregelt [205]. Voraussetzung für eine Zulassung ist u. a. eine umfassende Sicherheitsbewertung des gentechnisch veränderten Lebensmittels. Ein wichtiges Konzept in der Sicherheitsbewertung stellt dabei das 1993 von der OECD eingeführte Konzept der „Substantiellen Äquivalenz“ dar [206, 207]: zunächst wird das zu bewertende gentechnisch veränderte Lebensmittel mit einem konventionellem, als sicher geltenden Lebensmittel verglichen. Die weitere Sicherheitsbewertung konzentriert sich anschließend auf die zwischen gentechnisch verändertem und konventionellem Lebensmittel festgestellten Unterschiede. Übertragen auf pflanzliche Lebensmittel bedeutet dies, dass die gentechnisch veränderte Linie mit ihrer Elternlinie verglichen wird. In den Vergleich werden molekularbiologische, agronomische und morphologische Parameter sowie Daten zur chemischen Zusammensetzung miteinbezogen. Um zu vermeiden, dass Unterschiede zwischen den Linien auf Umwelteinflüsse zurückzuführen sind, müssen gentechnisch veränderte Linie und Elternlinie parallel, unter identischen Bedingungen angebaut werden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen gentechnisch veränderter Linie und Elternlinie, die konsistent in verschiedenen Feldversuchen auftreten, weisen auf unerwartete Neben-

effekte der gentechnischen Veränderung hin. Diese Unterschiede werden dann vor dem Hintergrund der natürlichen Schwankungsbreite bezüglich ihrer ernährungsphysiologischen oder toxikologischen Relevanz bewertet [206].

Die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung im Rahmen einer Sicherheitsbewertung soll Inhaltsstoffe beinhalten, die wichtige endogene Stoffwechselwege repräsentieren. Insbesondere die ernährungsphysiologisch und toxikologisch wichtigen Inhaltsstoffe des betreffenden Lebensmittels müssen untersucht werden [206]. γ -Oryzanol stellt nicht nur eine ernährungsphysiologisch interessante Gruppe an Reis-Inhaltsstoffen dar, sondern erlaubt auch einen Einblick in zwei wichtige Stoffwechselwege: den Isoprenoid- und den Shikimat-Weg. Daher liefert die Untersuchung von γ -Oryzanol in gentechnisch veränderten Reislinien einen wertvollen Beitrag zu deren Beurteilung im Rahmen einer Sicherheitsbewertung.

Ein signifikanter Einfluss einer gentechnischen Veränderung auf den γ -Oryzanol-Gehalt wurde im Falle des „Golden Rice“ festgestellt: gentechnisch veränderte Linien wiesen signifikant höhere γ -Oryzanol-Gehalte im polierten Reis auf (Faktor 4 – 8). Dieser Nebeneffekt der gentechnischen Veränderung wurde als ernährungsphysiologisch positiv bewertet [208]. Nicht untersucht wurde, ob die gentechnische Veränderung neben dem γ -Oryzanol-Gehalt auch die Sterylferulat-Verteilung beeinflusst.

Die in dieser Arbeit vorgestellte on-line LC-GC Methode ermöglicht es, sowohl den γ -Oryzanol-Gehalt als auch die Sterylferulat-Verteilung in die chemisch-analytische Charakterisierung von gentechnisch veränderten Reislinien mit einzubeziehen. Die durch die Untersuchung konventioneller Sorten gewonnenen Daten zur natürlichen Schwankungsbreite (vgl. 4.2) können als Grundlage zur Bewertung der biologischen Relevanz statistisch signifikanter Unterschiede zwischen gentechnisch veränderter Linie und Elternlinie herangezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in drei gentechnisch veränderten Reislinien (PHA-E-, GNA- und *Bt*-Reis) untersucht werden. Die Reislinien dienten im EU-Projekt SAFOTEST (QLK1-CT-1999-00651) als Modellorganismen zur Entwicklung neuer Methoden für die Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Lebensmittel und sollten im Rahmen des Projekts umfassend chemisch-analytisch charakterisiert werden.

4.3.2 PHA-E-Reis

Gentechnisch veränderter PHA-E-Reis enthält das PHA-E-Lektin-Gen aus der Kidney-Bohne (*Phaseolus vulgaris*). PHA-E-Reis diente im EU-Projekt SAFOTEST als Positivkontrolle für die zu entwickelnden *in-vitro*- und *in-vivo*-Tests, da dieser Reis aufgrund des PHA-E-Lektins in rohem Zustand für Säugetiere toxisch sein sollte [154].

Mit Hilfe der vorgestellten on-line LC-GC-Methode wurden γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in Braunreis der gentechnisch veränderten Linie (PHA-E) bzw. der Elternlinie (EYI105) bestimmt. Das Untersuchungsmaterial stammte aus einem Freilandversuch in China, in dem beide Linien parallel unter identischen Bedingungen angebaut worden waren.

Wie Abbildung 32 zeigt, wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im γ -Oryzanol-Gehalt zwischen gentechnisch veränderter Linie und Elternlinie festgestellt ($p < 0,05$). Die Werte beider Linien lagen innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite konventioneller Sorten, die durch die Untersuchung von 30 europäischen Braunreisproben abgeschätzt worden war (vgl. 4.2.2).

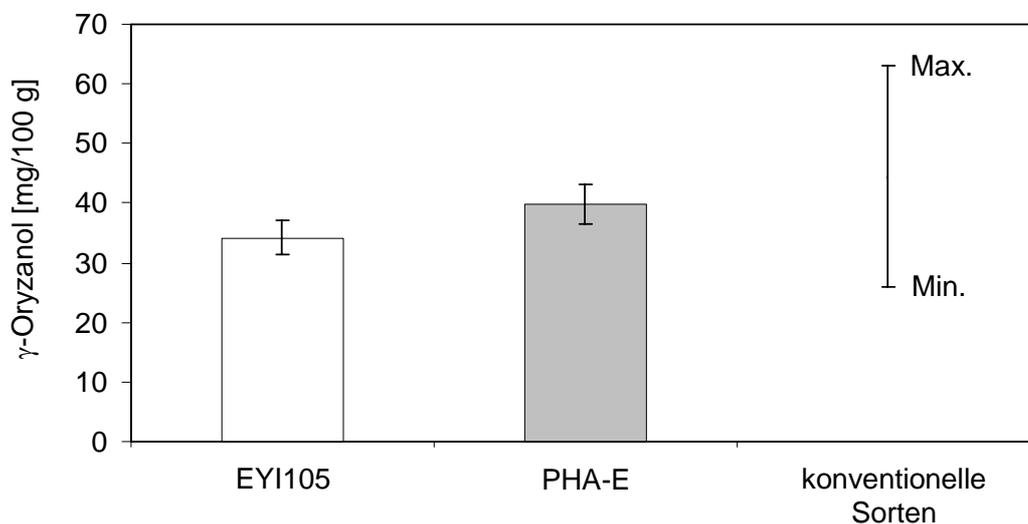


Abb. 32: γ -Oryzanol-Gehalt in Braunreis der gentechnisch veränderten Linie PHA-E bzw. der Elternlinie EYI105 sowie die Schwankungsbreite des γ -Oryzanol-Gehalts, die in Braunreis konventioneller (europäischer) Sorten beobachtet wurde (N = 30; vgl. 4.2.2).

Fehlerbalken repräsentieren Konfidenzintervalle ($n = 3$, $p < 0,05$).

Die Sterylferulat-Verteilung in der gentechnisch veränderten Linie glich der Sterylferulat-Verteilung in der Elternlinie (Tabelle 7). Zwar wies PHA-E-Reis im Vergleich zur Elternlinie einen statistisch signifikant niedrigeren Anteil an 24-Methylcholestanylferulat auf ($p < 0,05$), der Unterschied war jedoch – verglichen mit der in konventionellen Sorten beobachteten Schwankungsbreite – äußerst gering. Die Anteile einzelner Sterylferulate lagen für beide Linien im Bereich der natürlichen Schwankungsbreite konventioneller Sorten. Wie bereits in Proben konventioneller Sorten beobachtet, ging ein vergleichsweise hoher Anteil an 24-Methylcholesterylferulat bzw. 24-Methylencycloartanylferulat mit einem vergleichsweise niedrigen Anteil an 24-Methylcholestanylferulat bzw. Cycloartanylferulat einher.

Somit war kein Einfluss der gentechnischen Veränderung auf γ -Oryzanol-Gehalt oder Sterylferulat-Verteilung im PHA-E-Reis nachweisbar.

Tabelle 7: Sterylferulat-Verteilung in Braunreis der gentechnisch veränderten Linie PHA-E und der Elternlinie EYI105 sowie die Schwankungsbreite der Sterylferulat-Verteilung, die in Braunreis konventioneller (europäischer) Sorten beobachtet wurde (N = 30; vgl. 4.2.3).

	Anteile einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol [%] ¹				
	24-Methyl-cholesteryl- f.	24-Methyl-cholestanyl- f.	β -Sitosteryl- f.	Cycloartenyl- f.	24-Methylen- cycloartanyl- f.
EYI105	16,1 \pm 0,2	5,1 \pm 0,4	7,6 \pm 0,2	33,3 \pm 0,4	37,9 \pm 0,5
PHA-E	16,4 \pm 0,5	4,1 \pm 0,3²	7,6 \pm 0,4	33,7 \pm 0,5	38,9 \pm 0,8
konv. Sorten	5 - 18	3 - 14	5 - 10	32 - 52	23 - 37

¹ Mittelwert \pm Konfidenzintervall (n = 3, p < 0,05)

² Statistisch signifikanter Unterschied zwischen PHA-E und EYI105 (p < 0,05)

4.3.3 GNA-Reis

Im Falle des gentechnisch veränderten GNA-Reis wurde ein Lektin-Gen aus dem Schneeglöckchen (*Galanthus nivalis*) auf Reis übertragen. Das für Säugetiere nicht toxische Lektin verleiht der Reispflanze eine Resistenz gegenüber dem weit verbreiteten Reisschädling *Nilaparvata lugens* [155].

Für die Untersuchung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung standen Braunreisproben aus einem Feldversuch in China zur Verfügung. Gentechnisch veränderte Linie (GNA) und Elternlinie (ASD16) waren parallel unter identischen Bedingungen angebaut worden.

Wie Abbildung 33 zeigt, wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im γ -Oryzanol-Gehalt zwischen gentechnisch veränderter Linie und Elternlinie festgestellt ($p < 0,05$). Die γ -Oryzanol-Gehalte beider Linien lagen innerhalb der Schwankungsbreite, die in konventionellen europäischen Sorten beobachtet wurde.

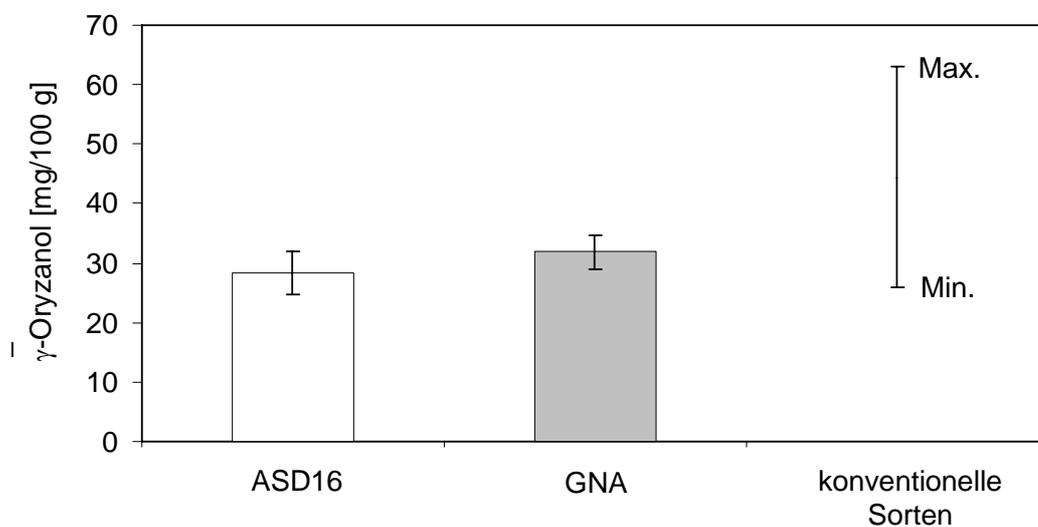


Abb. 33: γ -Oryzanol-Gehalt in Braunreis der gentechnisch veränderten Linie GNA bzw. der Elternlinie ASD16 sowie die Schwankungsbreite des γ -Oryzanol-Gehalts, die in Braunreis konventioneller (europäischer) Sorten beobachtet wurde (N = 30; vgl. 4.2.2).

Fehlerbalken repräsentieren Konfidenzintervalle ($n = 3$, $p < 0,05$).

Die Anteile an 24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat, β -Sitosterylferulat und Cycloartenylferulat am Gesamt- γ -Oryzanol waren in der gentechnisch veränderten Linie statistisch signifikant niedriger als in der Elternlinie (Tabelle 8; $p < 0,05$). Der Anteil an 24-Methylcycloartenylferulat war dagegen in der gentechnisch veränderten Linie statistisch signifikant höher. Verglichen mit der großen Schwankungsbreite der Sterylferulat-Verteilung, die in konventionellen europäischen Sorten beobachtet wurde, sind die Unterschiede im Sterylferulat-Muster jedoch gering. Die Frage, ob die detektierten Unterschiede auf die gentechnische Veränderung zurückzuführen sind, kann auf der Grundlage eines einzigen Feld-

versuches nicht beantwortet werden. Nur wenn die Unterschiede konsistent in verschiedenen Feldversuchen auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass sich beide Linien in der Sterylferulat-Verteilung unterscheiden.

Tabelle 8: Sterylferulat-Verteilung in Braunreis der gentechnisch veränderten Linie GNA und der Elternlinie ASD16 sowie die Schwankungsbreite der Sterylferulat-Verteilung, die in Braunreis konventioneller europäischer Sorten beobachtet wurde (N = 30; vgl. 4.2.3).

	Anteile einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol [%] ¹				
	24-Methyl-cholesteryl- f.	24-Methyl-cholestanyl- f.	β -Sitosteryl- f.	Cycloartenyl- f.	24-Methylen- cycloartenyl- f.
ASD16	15,3 \pm 0,4	7,2 \pm 0,3	8,8 \pm 0,3	25,0 \pm 0,4	43,7 \pm 0,6
GNA	13,5 \pm 0,2²	5,9 \pm 0,2²	7,3 \pm 0,2²	20,6 \pm 0,4²	52,8 \pm 0,9²
konv. Sorten	5 - 18	3 - 14	5 - 10	32 - 52	23 - 37

¹ Mittelwert \pm Konfidenzintervall (n = 3, p < 0,05)

² Statistisch signifikanter Unterschied zwischen ASD16 und GNA (p < 0,05)

Wie bereits in Proben konventioneller europäischer Sorten beobachtet (vgl. 4.2.3), ging ein vergleichsweise hoher Anteil an 24-Methylcholesterylferulat bzw. 24-Methylencycloartenylferulat mit einem vergleichsweise niedrigen Anteil an 24-Methylcholestanylferulat bzw. Cycloartenylferulat einher (Tabelle 8). Der Anteil an 4,4'-Desmethylsterylferulaten bzw. der Anteil an 4,4'-Dimethylsterylferulaten lag für beide Linien innerhalb der Schwankungsbreite der untersuchten europäischen Sorten. Es fällt jedoch auf, dass in beiden Linien die Anteile an Cycloartenylferulat und 24-Methylencycloartenylferulat außerhalb der Schwankungsbreite der europäischen Proben liegen. Ursache hierfür könnten genetische Unterschiede zwischen europäischen Sorten und der asiatischen Sorte ASD16 oder Unterschiede in den Anbaubedingungen auf den unterschiedlichen Kontinenten sein. Dies verdeutlicht, wie wichtig es für die Abschätzung der natürlichen Schwankungsbreite eines Pflanzeninhaltsstoffes ist, über möglichst umfangreiche Daten zu verfügen (unterschiedliche Anbauggebiete, Sorten, Anbaubedingungen, etc.). Mit Hilfe der vorgestellten on-line LC-GC-Methode können in Zukunft ohne aufwendige Probenvorbereitung weitere Daten zur natürlichen Schwankungsbreite von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung gesammelt werden.

4.3.4 *Bt*-Reis (KMD1)

Durch Übertragung des *cryIAb*-Gens aus *Bacillus thuringiensis* können Reispflanzen generiert werden (*Bt*-Reis), die gegen eine Reihe von Insekten resistent sind [156, 209 – 211]. Aus der chinesischen Reislinie Xiushui 11 wurde auf diese Weise die gentechnisch veränderte Linie KMD1 gewonnen [156]. Für die Untersuchung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung stand Probenmaterial aus zwei Feldversuchen (China) zur Verfügung. In jedem Feldversuch waren gentechnisch veränderte Linie (KMD1) und Elternlinie (Xiushui 11) parallel unter identischen Bedingungen angebaut worden.

In keinem der beiden Feldversuche konnte zwischen gentechnisch veränderter Linie und Elternlinie ein statistisch signifikanter Unterschied im γ -Oryzanol-Gehalt nachgewiesen werden (Abb. 34, $p < 0,05$). Alle Werte lagen im Bereich der in europäischen Proben beobachteten natürlichen Schwankungsbreite.

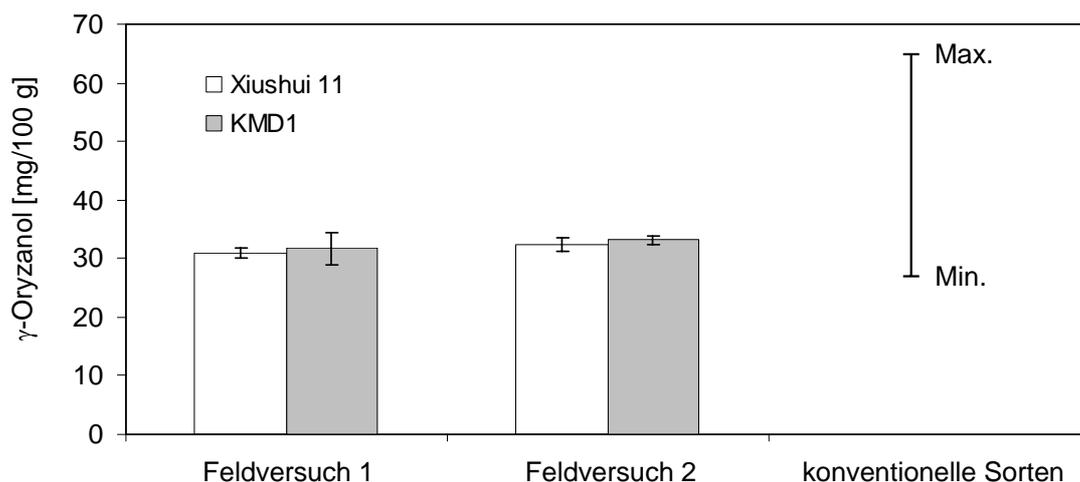


Abb. 34: γ -Oryzanol-Gehalt in Braunreis der gentechnisch veränderten Linie KMD1 bzw. der Elternlinie Xiushui 11 sowie die Schwankungsbreite des γ -Oryzanol-Gehalts, die in Braunreis konventioneller (europäischer) Sorten beobachtet wurde (N = 30; vgl. 4.2.2).

Fehlerbalken repräsentieren Konfidenzintervalle ($n = 6$, $p < 0,05$).

In beiden Feldversuchen wiesen Elternlinie und gentechnisch veränderte Linie ein im Vergleich zu den bisher untersuchten Reisproben einmaliges Sterylferulat-Muster auf (Tabelle 9): zwar war – wie bei allen anderen Proben auch – ein hoher Anteil an 24-Methylcholesterylferulat mit einem niedrigen Anteil an 24-Methylcholestanylferulat und ein hoher Anteil an 24-Methylcycloartanylferulat mit einem niedrigen Anteil an Cycloartanylferulat verbunden, im

Gegensatz zu den bisher untersuchten Proben wiesen Xiushui 11 und KMD1 aber einen hohen Anteil 24-Methylcholesterylferulat in Verbindung mit einem hohen Anteil an Cycloartenylferulat auf. In den bisher untersuchten Proben korrelierte ein hoher Anteil an 24-Methylcholesterylferulat aber mit einem niedrigen Anteil an Cycloartenylferulat bzw. mit einem hohen Anteil an 24-Methylencycloartenylferulat (vgl. 4.2.3). Da diese Besonderheit in beiden Linien zu beobachten war, kann darauf geschlossen werden, dass sie nicht auf die gentechnische Veränderung zurückzuführen ist.

Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen gentechnisch veränderter Linie und Elternlinie, die konsistent in beiden Feldversuchen detektiert wurden ($p < 0,05$), waren verglichen mit der in konventionellen Reissorten beobachteten großen Schwankungsbreite gering (vgl. 4.2.3). Die Anteile an 24-Methylcholesterylferulat und Cycloartenylferulat waren in KMD1 statistisch signifikant höher, die Anteile an 24-Methylcholestanylferulat und 24-Methylencycloartenylferulat dagegen statistisch signifikant niedriger als in der Elternlinie. Zur Klärung, ob sich KMD1 tatsächlich geringfügig in seiner Sterylferulat-Verteilung von Xiushui 11 unterscheidet, sind weitere Feldversuche nötig.

Tabelle 9: Sterylferulat-Verteilung in Braunreis der gentechnisch veränderten Linie KMD1 und der Elternlinie Xiushui 11 sowie die Schwankungsbreite der Sterylferulat-Verteilung, die in Braunreis konventioneller europäischer Sorten beobachtet wurde (N = 30; vgl. 4.2.3).

	Anteile einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol [%] ¹				
	24-Methylcholesterylferul.	24-Methylcholestanylferul.	β -Sitosterylferul.	Cycloartenylferul.	24-Methylen-cycloartenylferul.
Feldversuch 1					
Xiushui 11	19,3 \pm 0,3	6,8 \pm 0,2	9,5 \pm 0,3	37,7 \pm 0,6	26,6 \pm 0,6
KMD1	21,1 \pm 1,4²	6,0 \pm 0,2²	10,5 \pm 0,2²	44,2 \pm 0,6²	18,3 \pm 0,4²
Feldversuch 2					
Xiushui 11	14,7 \pm 0,2	9,2 \pm 0,4	10,1 \pm 0,3	40,5 \pm 0,3	25,4 \pm 0,4
KMD1	15,2 \pm 0,1²	7,9 \pm 0,1²	9,9 \pm 0,2	44,5 \pm 0,4²	22,4 \pm 0,4²
konv. Sorten	5 - 18	3 - 14	5 - 10	32 - 52	23 - 37

¹ Mittelwert \pm Konfidenzintervall (n = 6, $p < 0,05$)

² Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Xiushui 11 und KMD1 ($p < 0,05$)

4.3.5 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgestellte on-line LC-GC-Methode wurde zur Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in gentechnisch veränderten Reislinien eingesetzt. Untersucht wurden Reislinien, die (i) ein Lektin-Gen aus der Kidney-Bohne (PHA-E-Reis), (ii) das Lektin-Gen aus dem Schneeglöckchen (GNA-Reis), oder (iii) das *cryIAb*-Gen aus *Bacillus thuringiensis* (*Bt*-Reis) enthielten. Das Untersuchungsmaterial stammte aus Feldversuchen in China, in denen gentechnisch veränderte Linie und die jeweilige Elternlinie parallel unter identischen Bedingungen angebaut worden waren. Braunreisproben der gentechnisch veränderten Linie und der entsprechenden Elternlinie wurden bezüglich γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung miteinander verglichen und Unterschiede vor dem Hintergrund der Schwankungsbreiten, die in konventionellen (europäischen) Proben beobachtet worden waren, bewertet.

Keine der gentechnisch veränderten Linien unterschied sich im γ -Oryzanol-Gehalt von ihrer Elternlinie ($p < 0,05$). Der γ -Oryzanol-Gehalt aller Linien lag im Bereich der Schwankungsbreite, die in konventionellen europäischen Sorten beobachtet worden war. Die Sterylferulat-Muster der gentechnisch veränderten Linien glichen im Wesentlichen den Mustern der entsprechenden Elternlinien. Zwar wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen gentechnisch veränderten Linien und ihren Elternlinien detektiert, verglichen mit der in konventionellen Sorten beobachteten großen Schwankungsbreite waren diese Unterschiede jedoch gering.

Im Falle des GNA- und des *Bt*-Reis lagen die Anteile einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol sowohl für die gentechnisch veränderte Linie als auch für die Elternlinie außerhalb der in europäischen Proben beobachteten Schwankungsbreite. *Bt*-Reis und seine Elternlinie wiesen außerdem ein Sterylferulat-Muster auf, das in keiner der europäischen Proben beobachtet worden war: beide Linien enthielten einen vergleichsweise hohen Anteil 24-Methylcholesterylferulat (15 – 21 %) in Verbindung mit einem vergleichsweise niedrigen Anteil an 24-Methylencycloartanylferulat (18 – 27 %). Dies zeigt, wie wichtig es für die Abschätzung natürlicher Schwankungsbreiten ist, möglichst umfangreiche Daten zur Verfügung zu haben. Mit Hilfe der entwickelten on-line LC-GC-Methode können in Zukunft ohne aufwendige Probenvorbereitung weitere Daten zur natürlichen Schwankungsbreite von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung gesammelt werden. Dabei sollten verschiedene Sorten ebenso wie unterschiedliche Anbauggebiete oder Anbaubedingungen berücksichtigt werden.

4.4 γ -ORYZANOL IN VOLLKORNREISFLOCKEN

4.4.1 Einleitung

Bisherige Untersuchungen zum Einfluss technologischer Prozesse auf den γ -Oryzanol-Gehalt in Reis und Reisprodukten konzentrierten sich auf Prozesse zur Verarbeitung von Reiskleie. Da Reiskleie reich an endogenen Lipasen und Lipoxygenasen ist, entwickelt Reiskleie innerhalb kurzer Zeit ein ranziges Aroma. Dies kann durch Inaktivierung der Enzyme mittels thermischer Behandlung oder Bestrahlung verhindert werden [43, 45]. Je nach angewandtem Verfahren treten dabei unterschiedliche Verluste an γ -Oryzanol auf. So sinkt der γ -Oryzanol-Gehalt bei Stabilisierung mittels Extruder je nach gewählter Temperatur (110 – 140 °C) und Haltezeit (0 – 6 min) um 4 – 11 % [46, 47]. Bei der Stabilisierung mittels Bestrahlung treten deutlich höhere Verluste auf. Je nach Strahlendosis beträgt der Verlust an γ -Oryzanol 11 – 22 % [45]. Die höchsten Verluste bei der Stabilisierung von Reiskleie (26 %) wurden bei der Stabilisierung mittels Wasserdampf beobachtet [48]. Wird Reiskleie mittels Extruder stabilisiert, mit salzsaurer Lösung Phytinsäure entfernt und die Kleie anschließend im Trommel-Trockner getrocknet (125 °C), gehen während des gesamten Prozesses ca. 50 % des in der rohen Reiskleie enthaltenen γ -Oryzanol verloren [178]. Welche Einflüsse die Verarbeitung von Reiskleie auf die Sterylferulat-Verteilung hat, wurde in keiner der Arbeiten untersucht.

Vollkornreisflocken stellen wie Reiskleie eine attraktive Lebensmittelzutat dar. Die Verarbeitung von Braunreis zu Vollkornreisflocken beinhaltet sowohl mechanische als auch thermische Belastungen des Materials. Zunächst wird Braunreis unter Wasserdampfzugabe im Säulendämpfer gedämpft. Die Korntemperatur wird dabei eine Stunde lang bei 100 °C gehalten. Anschließend wird der so stabilisierte Braunreis mit Hilfe eines Walzenstuhls flockiert. Die Trocknung der feuchten Flocken erfolgt mittels Fließbettrockner bei einer Lufttemperatur von 80 °C [157]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der vorgestellten on-line LC-GC-Methode untersucht, welchen Einfluss die Verarbeitung von Braunreis zu Vollkornreisflocken auf γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung hat.

4.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Herstellung der Vollkornreisflocken erfolgte in einem kontinuierlichen Verfahren in betrieblichem Maßstab. Die Verarbeitung von Braunreis zu Vollkornreisflocken nahm 75 min in Anspruch. Um den Einfluss des gesamten Herstellungsprozesses auf γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung zu untersuchen, wurden aus der laufenden Produktion Braunreisproben und 75 min später Proben der Vollkornreisflocken entnommen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass Flocken und Braunreis aus derselben Charge stammten. Insgesamt wurden vier Probennahmen durchgeführt. Da es sich bei Braunreis und Vollkornreisflocken um unterschiedliche Produkte handelt, wurden die Trockenmassen der Proben ermittelt, und der γ -Oryzanol-Gehalt auf die Trockenmasse (TM) bezogen.

Der γ -Oryzanol-Gehalt der Braunreisproben lag zwischen 37 – 41 mg/100 g TM, der der Vollkornreisflocken zwischen 33 – 35 mg/100 g TM (Abb. 35). Die Gehalte der Vollkornreisflocken waren damit im Mittel niedriger als die der Braunreisproben (12 %). Statistisch signifikant war dieser Unterschied jedoch nur bei einer der vier Probennahmen. Verglichen mit der in europäischem Braunreis beobachteten natürlichen Schwankung des γ -Oryzanol-Gehalts waren die Unterschiede im γ -Oryzanol-Gehalt zwischen Braunreis und daraus hergestellten Vollkornreisflocken gering (vgl. 4.2.3). Bei der Verarbeitung von Braunreis zu Vollkornreisflocken ist daher allenfalls mit geringen Verlusten an γ -Oryzanol zu rechnen.

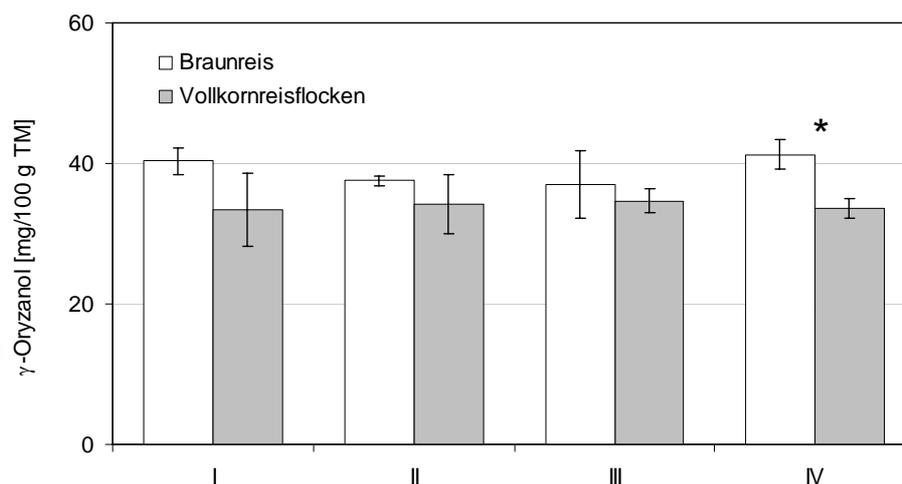


Abb. 35: γ -Oryzanol-Gehalt in Braunreis und daraus hergestellten Vollkornreisflocken (I – IV: vier Probennahmen). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Braunreis und Flocken sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet ($p < 0,05$). Fehlerbalken repräsentieren Konfidenzintervalle ($n = 3$, $p < 0,05$). TM = Trockenmasse

Wie Tabelle 10 zeigt, wurde zwischen Braunreis und daraus hergestellten Vollkornreisflocken kein Unterschied in der Sterylferulat-Verteilung festgestellt.

Tabelle 10: Sterylferulat-Verteilung in Braunreis und daraus hergestellten Vollkornreisflocken (vier Probennahmen).

	Anteile einzelner Sterylferulate am Gesamt- γ -Oryzanol [%] ¹				
	24-Methyl-cholesteryl.	24-Methyl-cholestanyl.	β -Sitosteryl.	Cycloartenyl.	24-Methylen-cycloartenyl.
Probe I					
Braunreis	13,9 \pm 1,3	3,3 \pm 0,1	9,0 \pm 0,8	39,3 \pm 2,0	34,6 \pm 0,2
Reisflocken	14,2 \pm 0,2 ²	3,4 \pm 0,3	9,3 \pm 0,2	38,7 \pm 0,2	34,4 \pm 0,6
Probe II					
Braunreis	14,1 \pm 0,2	3,5 \pm 0,2	9,2 \pm 0,2	38,6 \pm 0,2	34,6 \pm 0,2
Reisflocken	14,3 \pm 0,1	3,7 \pm 0,2	9,2 \pm 0,4	38,9 \pm 0,5	33,9 \pm 0,2²
Probe III					
Braunreis	14,0 \pm 0,4	3,5 \pm 0,4	9,0 \pm 0,2	39,2 \pm 0,4	34,4 \pm 0,5
Reisflocken	14,4 \pm 0,3	3,6 \pm 0,1	9,2 \pm 0,3	38,7 \pm 0,3	34,1 \pm 0,2
Probe IV					
Braunreis	14,3 \pm 0,2	3,4 \pm 0,3	9,1 \pm 0,2	38,7 \pm 0,2	34,6 \pm 0,2
Reisflocken	14,3 \pm 0,6	3,8 \pm 0,3	9,2 \pm 0,5	38,5 \pm 0,8	34,3 \pm 0,3

¹ Mittelwert \pm Konfidenzintervall (n = 3, p < 0,05)

² Statistisch signifikanter Unterschied zwischen Braunreis und Vollkornreisflocken (p < 0,05).

4.5 ENZYMATISCHE HYDROLYSE VON γ -ORYZANOL

4.5.1 Einleitung

Studien an Hunden, Kaninchen und Ratten deuten darauf hin, dass die Hydrolyse von Sterylferulaten einen entscheidenden Schritt im Metabolismus von oral aufgenommenem γ -Oryzanol darstellt [33 – 37]. Enzyme, die an einer Hydrolyse beteiligt sind, wurden jedoch noch nicht identifiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten kommerzielle Enzympräparate auf eine Sterylferulat-hydrolysierende Aktivität untersucht werden. Enzyme, die *in-vitro* in der Lage sind, γ -Oryzanol zu hydrolysieren, sind möglicherweise auch an einer Hydrolyse *in-vivo* beteiligt. Sollten Enzyme gefunden werden, die spezifisch bestimmte Sterylferulate hydrolysieren, könnten diese zur gezielten Veränderung der Zusammensetzung von γ -Oryzanol-Präparaten eingesetzt werden, um technologisch oder physiologisch erwünschte Sterylferulate anzureichern.

Als Substrat wurde in den durchgeführten Hydrolyseexperimenten kommerziell erhältliches γ -Oryzanol eingesetzt. Abgesehen davon, dass das eingesetzte γ -Oryzanol kein 24-Methylcholestanylferulat enthielt, entsprach die Sterylferulat-Verteilung (43,5 % 24-Methylcycloartanylferulat, 34,9 % Cycloartenylferulat, 14,3 % 24-Methylcholesterylferulat und 7,4 % β -Sitosterylferulat) der Sterylferulat-Verteilung, wie sie in Reis beobachtet wurde (siehe 4.2.3).

Die Hydrolyse einzelner Sterylferulate kann anhand der Abnahme der betreffenden Ester oder der Freisetzung der entsprechenden Sterole detektiert werden. Die Untersuchung auf freigesetzte Sterole hat den Vorteil, dass der Nachweis eines freigesetzten Sterols die Hydrolyse des betreffenden Esters voraussetzt, während die Abnahme eines Esters auch durch Verluste während der Analytik verursacht werden kann. Aus diesem Grund wurde die Sterolbildung als Indikator für eine Hydrolyse des betreffenden Sterylferulats gewählt. Die Hydrolyseansätze wurden mit MTBE extrahiert und der Extrakt nach Silylierung mittels GC-FID/MS auf TMS-Derivate der Sterole untersucht. Zusätzlich wurde in ausgewählten Proben die Sterylferulat-Verteilung mit Hilfe der on-line LC-GC untersucht.

4.5.2 Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) sind Hydrolasen, die für ihr breites Substratspektrum bekannt sind. Sie katalysieren nicht nur die Hydrolyse von Triglyceriden, sondern akzeptieren eine Reihe von Estern als Substrate [212]. Daher wurden zunächst Lipasepräparate unterschiedlicher Herkunft (Bakterium, Pilz, Pflanze, Tier) auf eine Sterylferulat-hydrolysierende Aktivität untersucht. Es wurden Reaktionsmedien verwendet, die für Lipase-katalysierte Hydrolysen empfohlen werden [213]:

- Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0
- Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 mit 10 % Aceton
Ein Acetonzusatz verbessert die Löslichkeit hydrophober Substrate.
- TRIS-Puffer pH 8,5 mit 10 % Aceton
Lipase-katalysierte Hydrolysen werden durch Anhebung des pH-Werts i. d. R. beschleunigt.
- Zweiphasensystem bestehend aus Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 und Toluol
Zweiphasensysteme werden eingesetzt, da Lipasen an Grenzflächen besonders aktiv sind.
- Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 mit Taurocholat
Taurocholat erhöht als Emulgator die Löslichkeit hydrophober Substrate.

p-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) wurde als Positivkontrolle für eine Lipase-Aktivität eingesetzt [214]. Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* (L-PC), *Aspergillus niger* (L-AN) und Weizenkeimen (L-WK) hydrolysierten *p*NPP in allen Reaktionsmedien (Tabelle 11). Keine der drei Lipasen katalysierte eine Hydrolyse von γ -Oryzanol. Ein Lipase-Präparat aus Schweinepankreas (L-SP) setzte dagegen in Anwesenheit von Taurocholat 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol aus γ -Oryzanol frei. 24-Methylencycloartanol und Cycloartenol wurden nicht detektiert. Die Quantifizierung der freigesetzten Sterole ergab eine auf γ -Oryzanol bezogene Hydrolyserate von 2 % (37 °C, 24 h). Eine nicht enzymatisch katalysierte Hydrolyse von 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat konnte nach Inkubation ohne L-SP ausgeschlossen werden. Interessanterweise wurde in Reaktionsmedien, die kein Taurocholat enthielten, keine Hydrolyse von γ -Oryzanol durch L-SP beobachtet.

Tabelle 11: Screening von Lipasepräparaten unterschiedlicher Herkunft auf γ -Oryzanol-hydrolysierende Aktivität

	Hydrolyserate [%] ¹								
	L-PC		L-AN		L-WK		L-SP		
	γ -Oryzanol	<i>p</i> NPP ²	γ -Oryzanol	<i>p</i> NPP	γ -Oryzanol	<i>p</i> NPP	γ -Oryzanol	<i>p</i> NPP	
Puffer pH 7,0	- ³	83	-	13	-	-	3	-	9
Puffer pH 7,0 + 10 % Aceton	-	89	-	12	-	-	+ ⁴	-	62
Puffer pH 8,5 + 10 % Aceton	-	91	-	18	-	-	+	-	33
Zweiphasensystem	-	75	-	72	-	-	15	-	9
Puffer pH 7,0 + Taurocholat	-	89	-	28	-	-	31	2	43

¹ Versuchsbedingungen und Analysemethoden: siehe Material und Methoden

² *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) wurde als Positivkontrolle eingesetzt

³ keine Sterole detektierbar

⁴ unterhalb der Bestimmungsgrenze

Das eingesetzte Lipase-Präparat L-SP enthielt Pankreas-Cholesterolesterase (EC 3.1.1.13) [215]. Die Aktivität dieses Enzyms hängt von der Anwesenheit von Gallensalzen wie z. B. Taurocholat ab [216]. Es ist bekannt, dass Pankreas-Cholesterolesterase Cholesteryl-*o*-coumarat hydrolysiert, einen den Sterylferulaten strukturell sehr ähnlichen Ester (Abb. 36) [217]. Daher erschien es möglich, dass die Hydrolyse von 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat nicht durch Pankreas-Lipase, sondern durch die im Lipase-Präparat enthaltene Cholesterolesterase katalysiert wurde. Aus diesem Grund konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Klasse der Cholesterolesterasen.

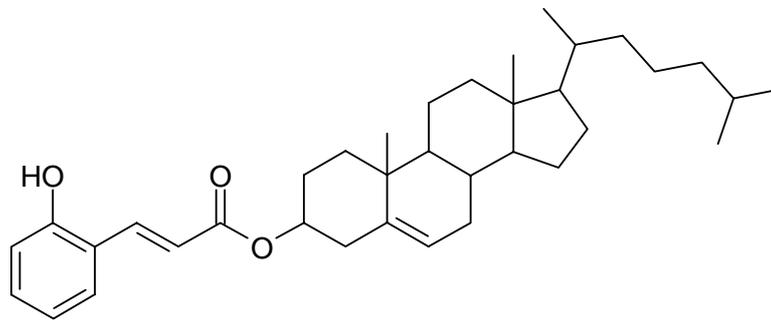


Abb. 36: Strukturformel von Cholesteryl-*o*-coumarat

4.5.3 Cholesterolesterasen

Kommerziell erhältliche Cholesterolesterasen aus *Pseudomonas sp.* (CE-PS), *Candida cylindracea* (CE-CC), Schweinepankreas (CE-SP) und Rinderpankreas (CE-RP) wurden auf eine Sterylferulat-hydrolysierende Aktivität untersucht (Tabelle 12). Alle vier Cholesterolesterasen setzten – unabhängig von ihrer Herkunft – 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol aus γ -Oryzanol frei. 24-Methylcycloartanylferulat und Cycloartenylferulat wurden nicht hydrolysiert. Die getesteten Cholesterolesterasen wiesen damit die gleiche Sterolspezifität auf, wie sie für das Lipasepräparat aus Schweinepankreas (L-SP) beobachtet wurde. Ein quantitativer Vergleich der Hydrolyseraten einzelner Cholesterolesterasen ist nicht möglich, da die für die Cholesterolesterasen angegebenen Enzymaktivitäten von den Herstellern mit unterschiedlichen Methoden bestimmt worden waren.

Tabelle 12: Freisetzung von Sterolen aus γ -Oryzanol durch Cholesterolesterasen unterschiedlicher Herkunft¹

γ -Oryzanol-Bestandteil	CE-PS			CE-CC			CE-SP			CE-RP		
	Sterol ² [nmol/mg]	Umsatz ³ [%]	Sterol [nmol/mg]	Umsatz [%]								
β -Sitosterylferulat	35 \pm 1 ⁴	2.8 \pm 0.1	24 \pm 1	8,0 \pm 0,3	69 \pm 6	37 \pm 3	23 \pm 5	67 \pm 14				
24-Methylcholesterylferulat	83 \pm 3	3.3 \pm 0.1	45 \pm 5	7,5 \pm 0,9	128 \pm 4	34 \pm 1	43 \pm 8	63 \pm 12				
Cycloartenylferulat	- ⁵	-	-	-	-	-	-	-				
24-Methylen- cycloartenylferulat	-	-	-	-	-	-	-	-				

¹ bestimmt nach 24 h bei 37 °C (Versuchsbedingungen und Analysemethoden: siehe Material und Methoden)² nmol Sterol/mg Enzym-Präparat³ Hydrolyserate bezogen auf die Anfangsmenge des betreffenden Esters⁴ Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3⁵ keine Sterole detektierbar

Die sterolspezifische Hydrolyse von γ -Oryzanol konnte auch auf Ebene der Ferulasäureester nachgewiesen werden. γ -Oryzanol wurde nach der Inkubation extrahiert und mittels on-line LC-GC wurde die Sterylferulat-Verteilung bestimmt. Inkubation von γ -Oryzanol in Puffer hatte keinen Einfluss auf die Sterylferulat-Verteilung (Abb. 37). Nach Inkubation mit Cholesterolesterase sank dagegen der Anteil an 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat.

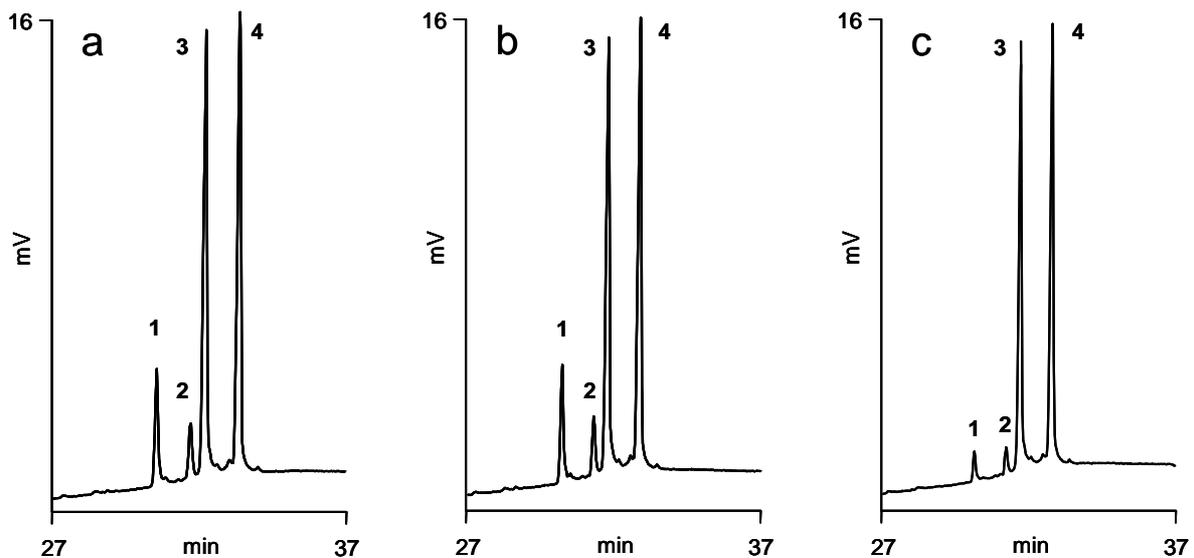


Abb. 37: Sterolspezifische Hydrolyse von γ -Oryzanol mit Schweinepankreas-Cholesterolesterase. Bestimmung der Sterylferulat-Verteilung mittels on-line LC-GC vor (a) und nach Inkubation in Puffer (b) sowie nach Inkubation mit Cholesterolesterase (c). (1) 24-Methylcholesterylferulat, (2) β -Sitosterylferulat, (3) Cycloartenylferulat und (4) 24-Methylencycloartenylferulat.

Es ist bekannt, dass Pankreas-Cholesterolesterase Fettsäureester von Cholesterol und Phyto-sterolen hydrolysiert [218, 219]. Die Hydrolysegeschwindigkeit der Fettsäureester hängt dabei vom veresterten Sterol ab: Buttersäure- und Ölsäureester von Ergosterol, welches sich von Cholesterol in der Anzahl der Doppelbindungen in der Ringstruktur unterscheidet, wurden durch Pankreas-Cholesterolesterase langsamer hydrolysiert als die entsprechenden Ester von Cholesterol, β -Sitosterol und Stigmasterol, die identische Ringstrukturen aufweisen [218]. Die Ursache für die bei der Hydrolyse von γ -Oryzanol beobachteten Substratspezifität dürfte ebenfalls in der unterschiedlichen Struktur der veresterten Sterole zu suchen sein. Die Ringstrukturen der 4,4'-Desmethylsterole 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol sind identisch mit der Ringstruktur von Cholesterol. Die Ringstrukturen der 4,4'-Dimethylsterole

Cycloartenol und 24-Methylcycloartenol unterscheiden sich dagegen von der Ringstruktur des Cholesterols durch Methylgruppen an C-4 und C-14 sowie durch die Cyclopropanstruktur an C-9/C-10. Die Konformationen von Cycloartenol und 24-Methylcycloartenol wurden mittels Kristallstrukturanalysen, Kraftfeldrechnungen und NMR-Studien untersucht und mit der anderer Sterole verglichen [86, 220 – 223]. Es zeigte sich, dass Cycloartenol und 24-Methylcycloartenol in Lösung eine planare Konformation einnehmen, die der planaren Konformation von Cholesterol ähnlich ist (Abb. 38) [86, 221, 223]. Die Methylgruppen an C-4 und C-14, die im Cholesterol fehlen, ragen jedoch axial aus der Molekülebene und stören so die ansonsten planare Moleküloberfläche. Außerdem wurde beobachtet, dass im Vergleich zu 4,4'-Desmethylsterolen in 4,4'-Dimethylsterolen Ring A aufgrund der beiden Methylgruppen an C-4 abgeflacht ist. Daneben beeinflussen die beiden Methylgruppen an C-4 die Bindungseigenschaften der Hydroxygruppe an C-3 [223].

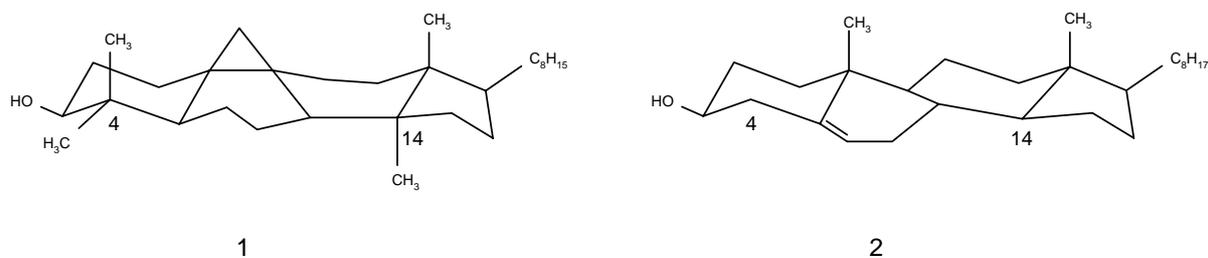


Abb. 38: Konformation von Cycloartenol (1) und Cholesterol (2) [86, 223].

4.5.4 Künstliche Verdauungssäfte

γ -Oryzanol wurde *in-vitro* standardisierten künstlichen Verdauungssäften ausgesetzt. Pepsin in salzsaurer Lösung (pH 1,2) wurde als künstlicher Magensaft und Pankreatin in Taurocholat-haltigem Puffer (pH 7,5) als künstlicher Darmsaft verwendet [224, 225]. Bei Pankreatin handelt es sich um ein Rohpräparat aus Schweinepankreas, das neben Cholesterolesterase zahlreiche weitere Verdauungsenzyme aus der Bauchspeicheldrüse enthält (u. a. Amylase, Trypsin, Lipase, Ribonuklease) [226, 227].

In künstlichem Magensaft wurde im untersuchten Zeitraum von 48 h keine Hydrolyse von γ -Oryzanol beobachtet. Künstlicher Darmsaft setzte dagegen spezifisch 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol frei. Cycloartenol und 24-Methylcycloartenol wurden nicht gebildet. Eine nicht enzymatisch katalysierte Hydrolyse von 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat konnte nach Inkubation ohne Pankreatin ausgeschlossen werden. Die Hydrolyseraten

der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat im künstlichen Darmsaft waren verhältnismäßig gering (2,4 % je Ester nach 24 h bei 37 °C). Da bekannt ist, dass die Aktivität von Cholesterolesterase von der Gallensalz-Konzentration abhängt [216], wurde der Einfluss einer erhöhten Taurocholat-Konzentration auf die Hydrolyse von γ -Oryzanol in künstlichem Darmsaft untersucht. Durch Steigerung der Taurocholat-Konzentration von 0,9 mM auf 6,0 mM erhöhte sich die Hydrolyserate von 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat deutlich (14,2 % bzw. 16,5 % nach 24 h bei 37 °C). Angesichts der durchschnittlichen Verweildauer der Nahrung im Dünndarm (2 – 5 h), erscheinen die beobachteten Hydrolyseraten dennoch gering (Abb. 39). Da im angewandten einfachen *in-vitro* Modell jedoch die Bildung komplexer Mizellen oder die Regulation der Enzym- und Gallensalzsekretion nicht berücksichtigt wurden, können die Hydrolyseraten *in-vivo* durchaus höher sein.

Die Hydrolyse von γ -Oryzanol im künstlichen Darmsaft verlief mit der gleichen Sterolspezifität wie die durch isolierte Cholesterolesterase katalysierte Hydrolyse. Die Sterolspezifität der Hydrolyse wurde offensichtlich durch die Anwesenheit der anderen Verdauungsenzyme nicht beeinflusst. Von Cholesteryl-*o*-coumarat, einem den Sterylferulaten strukturell sehr ähnlichen Ester, ist bekannt, dass es nur durch Pankreas-Cholesterolesterase, nicht aber durch Pankreas-Lipase, Trypsin oder Chymotrypsin hydrolysiert wird [217]. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die im künstlichen Darmsaft beobachtete Sterylferulat-hydrolysierende Aktivität auf die im Pankreatin enthaltene Cholesterolesterase zurückzuführen ist.

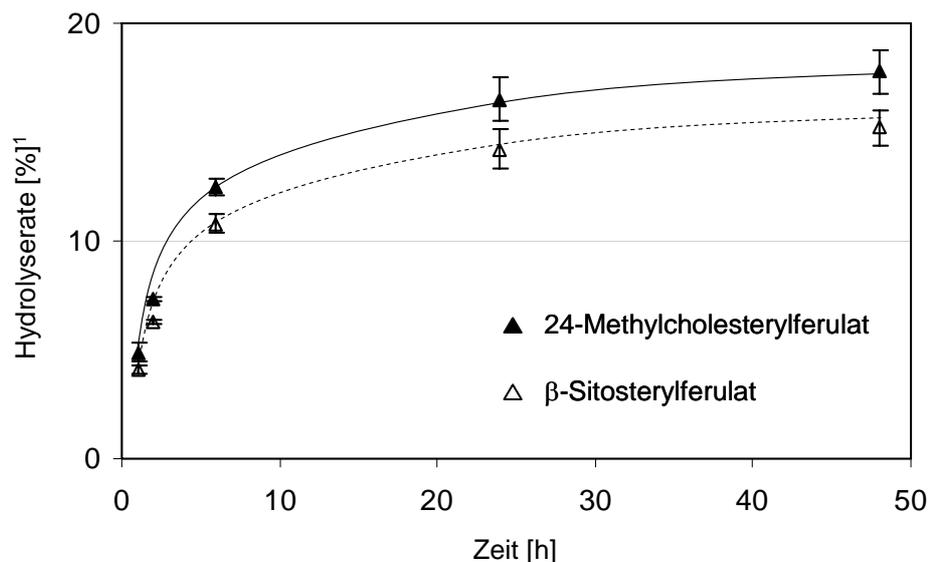


Abb. 39: Hydrolyse von γ -Oryzanol in künstlichem Darmsaft in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen $n = 3$).

¹ bezogen auf den Anfangsgehalt der jeweiligen Ester.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass die von der Bauchspeicheldrüse in den Darm abgegebene Cholesterolesterase eine Rolle im Metabolismus von oral aufgenommenem γ -Oryzanol spielen könnte. Es ist vorstellbar, dass γ -Oryzanol nicht nur im Darmgewebe [35] sondern z. T. bereits im Dünndarm in Ferulasäure und die entsprechenden Sterole gespalten wird. Während Sterole eine geringe Bioverfügbarkeit aufweisen [228], ist Ferulasäure dafür bekannt, effektiv absorbiert zu werden [229 – 231]. Angesichts der Tatsache, dass γ -Oryzanol zu etwa 70 % aus Cycloartenylferulat und 24-Methylcycloartenylferulat besteht (vgl. 4.2.3), ist der im Dünndarm durch Cholesterolesterase hydrolysierbare Anteil an γ -Oryzanol durch deren Sterolspezifität beschränkt.

Die Tatsache, dass sich Sterylferulate in ihrem Metabolismus möglicherweise unterscheiden, ist vor allem vor dem Hintergrund der Diskussion, neben Reis auch andere Cerealien als Quellen für Sterylferulate zu nutzen [25, 122], interessant. Die Sterylferulat-Verteilungen dieser Cerealien unterscheiden sich jedoch drastisch von der Sterylferulat-Verteilung in Reis. Die durch Cholesterolesterase nicht hydrolysierbaren 4,4'-Dimethylsterylferulate Cycloartenylferulat und 24-Methylcycloartenylferulat sind in anderen Cerealien nicht enthalten (vgl. 2.2.1). Weitere Untersuchungen sind nötig, um den Einfluss der molekularen Struktur von Sterylferulaten auf ihren Metabolismus und ihre physiologische Wirkung zu klären.

4.5.5 Pankreas-Acetonpulver

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eignen sich Cholesterolesterasen prinzipiell zur Modifizierung der Sterylferulat-Verteilung von γ -Oryzanol durch selektive Hydrolyse von 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat. Analog der Veresterung von Cholesterol mit Fettsäuren [232] gelingt unter geeigneten Reaktionsbedingungen möglicherweise auch die gezielte Veresterung von 4,4'-Desmethylsterolen mit Ferulasäure. Um derartige Reaktionen wirtschaftlich durchführen zu können, sind ökonomisch günstige Quellen für Cholesterolesterasen nötig. In der Präparativen Chemie wird so genanntes Rinderpankreas-Acetonpulver als kostengünstige Alternative zu teuren, aufgereinigten Cholesterolesterasen verwendet [233]. Daher wurde untersucht, ob mit Pankreas-Acetonpulvern aus Rind und Schwein ebenfalls eine sterolspezifische Hydrolyse von γ -Oryzanol möglich ist.

Wie Tabelle 13 zeigt, katalysieren Pankreas-Acetonpulver aus Rind und Schwein die sterolspezifische Hydrolyse von γ -Oryzanol: 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat wurden hydrolysiert, während Cycloartenylferulat und 24-Methylcycloartenylferulat nicht umgesetzt wurden. Mit 5 mg Rinderpankreas-Acetonpulver wurden ähnlich hohe Hydrolyse-

raten erzielt, wie mit 1,8 mg aufgereinigter Rinderpankreas-Cholesterolesterase (Tabelle 12). Angesichts der sehr viel niedrigeren Preise, sind Pankreas-Acetonpulver geeignet, als Biokatalysatoren für die Veränderung der Sterylferulat-Verteilung von γ -Oryzanol in technologischem Maßstab eingesetzt zu werden.

Tabelle 13: Hydrolyse von γ -Oryzanol mit Pankreas-Acetonpulver¹

	Schweinepankreas-Acetonpulver		Rinderpankreas-Acetonpulver	
	Sterol ² [nmol/mg]	Umsatz ³ [%]	Sterol [nmol/mg]	Umsatz [%]
γ -Oryzanol-Bestandteil				
β -Sitosterylferulat	$8,3 \pm 0.5^4$	69 ± 4	$8,4 \pm 0.8$	70 ± 7
24-Methylcholesterylferulat	$15,7 \pm 0.7$	65 ± 3	$16,4 \pm 1.4$	68 ± 6
Cycloartenylferulat	- ⁵	-	-	-
24-Methylen-cycloartanylferulat	-	-	-	-

¹ bestimmt nach 24 h bei 37 °C (Versuchsbedingungen und Analysenmethode: siehe Material und Methoden)

² nmol Sterol/mg Acetonpulver

³ Hydrolyserate bezogen auf die Anfangsmenge des betreffenden Esters

⁴ Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3

⁵ keine Sterole detektierbar

4.5.6 Zusammenfassung

Unterschiedliche Enzympräparate wurden auf eine Sterylferulat-hydrolysierende Aktivität getestet. Als Substrat wurde kommerziell erhältliches γ -Oryzanol (43,5 % 24-Methylen-cycloartanylferulat, 34,9 % Cycloartenylferulat, 14,3 % 24-Methylcholesterylferulat und 7,4 % β -Sitosterylferulat) eingesetzt. Lipase-Präparate aus *Pseudomonas cepacia*, *Aspergillus niger* und Weizenkeime akzeptierten γ -Oryzanol nicht als Substrat. Ein Lipase-Präparat aus Schweinepankreas setzte geringe Mengen 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol frei – allerdings nur in Gegenwart des Gallensalzes Taurocholat. Da bekannt war, dass das Lipase-Präparat aus Schweinepankreas Cholesterolesterase enthält [215], deren Aktivität von der Anwesenheit von Gallensalzen abhängt [216], wurde vermutet, dass die Sterylferulat-

hydrolysierende Aktivität auf Cholesterolesterase zurückzuführen ist. Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich daher auf Cholesterolesterasen. Alle untersuchten Cholesterolesterasen (aus *Pseudomonas sp.*, *Candida cylindracea*, Rinder- und Schweinepankreas) katalysierten die Hydrolyse von 24-Methylcholesterylferulat und β -Sitosterylferulat. Cycloartenol und 24-Methylen-cycloartenol wurden nicht freigesetzt. Die Sterolspezifität der Cholesterolesterase-katalysierten Hydrolyse von γ -Oryzanol kann durch die unterschiedlichen Ringstrukturen der veresterten Sterole erklärt werden: die 4,4'-Desmethylsterole 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol weisen verglichen mit Cholesterol identische Ringstrukturen auf, während sich die 4,4'-Dimethylsterole Cycloartenol und 24-Methylen-cycloartenol in ihren Ringstrukturen von Cholesterol unterscheiden. Die gleiche Sterolspezifität wurde bei Pankreas-Acetonpulvern aus Schwein und Rind sowie in künstlichem Darmsaft beobachtet. In künstlichem Magensaft erfolgte keine Hydrolyse von γ -Oryzanol.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pankreas-Cholesterolesterase *in-vivo* eine entscheidende Rolle im Metabolismus von γ -Oryzanol spielen könnte. Die beobachtete Sterolspezifität der Cholesterolesterase zeigt jedoch, dass sich der Metabolismus einzelner Sterylferulate möglicherweise unterscheidet. Da der Mechanismus der cholesterinsenkenden Wirkung von γ -Oryzanol nicht geklärt ist, kann noch nicht beurteilt werden, ob die Hydrolyse von Sterylferulaten einen positiven oder negativen Einfluss auf ihre Wirkung hat. Die durchgeführten Untersuchungen bieten jedoch die Basis für die enzymkatalysierte Modifikation der Sterylferulat-Verteilung in γ -Oryzanol-Präparaten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Reis enthält Ferulasäureester von Phytosterolen, die unter dem Begriff γ -Oryzanol zusammengefasst werden. γ -Oryzanol eignet sich als natürliches Antioxidationsmittel und besitzt cholesterinsenkende Wirkung. *In-vivo* und *in-vitro* Studien deuten darauf hin, dass sowohl die antioxidative Aktivität als auch die cholesterinsenkende Wirkung von der Sterylferulat-Verteilung beeinflusst wird. Bisher beschriebene Methoden zur Analyse der Sterylferulate setzten eine aufwendige Probenvorbereitung voraus, um γ -Oryzanol vor der Analyse von störenden Matrixbestandteilen abzutrennen. Für die Untersuchung einer größeren Anzahl Proben sind diese Methoden daher nicht geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf der on-line gekoppelten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Gaschromatography (on-line LC-GC) eine Analysenmethode entwickelt, mit der γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung ohne vorherige Aufreinigung in Probenextrakten aus Reis und Reisprodukten bestimmt werden können. Die on-line LC-GC-Methode zeichnete sich durch eine hohe Wiederfindung (96 %) und gute Reproduzierbarkeit aus.

Mit Hilfe der neu entwickelten Analysenmethode wurden die natürlichen Schwankungsbreiten von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung in europäischen Braunreisproben untersucht. Der γ -Oryzanol-Gehalt der untersuchten Proben lag zwischen 26 und 63 mg/100 g. Hauptkomponenten von γ -Oryzanol waren Cycloartenylferulat (32 – 52 %) und 24-Methylcycloartanylferulat (23 – 38 %). Als Minorkomponenten wurden 24-Methylcholesterylferulat (5 – 18 %), 24-Methylcholestanylferulat (3 – 14 %) und β -Sitosterylferulat (5 – 10 %) identifiziert. Je größer der Anteil an Cycloartenylferulat war, desto niedriger war der Anteil an 24-Methylcycloartanylferulat ($r^2 = -0,95$) und je größer der Anteil an 24-Methylcholesterylferulat war, desto niedriger war der Anteil an 24-Methylcholestanylferulat ($r^2 = -0,92$). Dies hatte zur Folge, dass die Anteile an 4,4'-Dimethylsterylferulaten (Cycloartenylferulat und 24-Methylcycloartanylferulat) bzw. an 4,4'-Desmethylsterylferulaten (24-Methylcholesterylferulat, 24-Methylcholestanylferulat und β -Sitosterylferulat) ungeachtet der großen Variabilität in der Sterylferulat-Verteilung relativ konstant waren (68 – 76 % bzw. 24 – 32 %). Der Anteil an Cycloartenylferulat korrelierte dabei negativ mit dem Anteil an 24-Methylcholesterylferulat ($r^2 = -0,93$).

Wie die Untersuchung unreifer (grüner) Reiskörner zeigte, sind die beobachteten Schwankungen in γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung nicht auf unterschiedliche Reifegrade zurückzuführen. Die Untersuchung von Proben einer Reissorte, die in unter-

schiedlichen Ländern zu unterschiedlichen Zeiten angebaut worden war, zeigte, dass sowohl γ -Oryzanol-Gehalt als auch die Sterylferulat-Verteilung von Umwelteinflüssen beeinflusst werden.

Die entwickelte on-line LC-GC-Methode wurde im Rahmen der chemisch-analytischen Charakterisierung gentechnisch veränderter Linien zu Bestimmung von γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung eingesetzt. Keine der untersuchten gentechnisch veränderten Linien unterschied sich bezüglich des γ -Oryzanol-Gehalts statistisch signifikant von ihrer Elternlinie ($p < 0,05$). Die Sterylferulat-Verteilung der gentechnisch veränderten Linien glich im Wesentlichen der Sterylferulat-Verteilung der entsprechenden Elternlinien. Statistisch signifikante Unterschiede in der Sterylferulat-Verteilung waren, verglichen mit der in den europäischen Braunreisproben beobachteten Schwankungsbreite, gering.

Desweiteren wurde mit Hilfe der entwickelten on-line LC-GC-Methode der Einfluss eines technologischen Prozesses auf γ -Oryzanol-Gehalt und Sterylferulat-Verteilung untersucht. Als Beispiel für einen Prozeß, der sowohl thermische als auch mechanische Belastungen beinhaltet, wurde die Herstellung von Vollkornreisflocken aus Braunreis in betrieblichem Maßstab gewählt. Wie die Untersuchung von Braunreis und daraus hergestellten Vollkornreisflocken zeigte, hatte der angewandte Prozeß keinen Einfluss auf γ -Oryzanol-Gehalt oder Sterylferulat-Verteilung.

Über den Metabolismus von Sterylferulaten ist wenig bekannt. Tierstudien zeigen, dass die Hydrolyse der Esterbindung einen entscheidenden Schritt im Metabolismus darstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene kommerzielle Enzympräparate auf eine γ -Oryzanol-hydrolysierende Aktivität untersucht. Lipasepräparate unterschiedlicher Herkunft akzeptierten γ -Oryzanol nicht als Substrat. Cholesterolesterasen katalysierten dagegen eine sterolspezifische Hydrolyse von γ -Oryzanol: gaschromatographisch konnte die Freisetzung von 24-Methylcholesterol und β -Sitosterol nachgewiesen werden. Cycloartenol und 24-Methylencycloartanol wurden nicht freigesetzt. Die Sterolspezifität der Hydrolyse konnte durch Anwendung der on-line LC-GC-Methode auch auf der Ebene der Ester nachgewiesen werden. Die gleiche Sterolspezifität wurde in künstlichem Darmsaft und in Pankreas-Acetonpulvern beobachtet. In künstlichem Magensaft wurde keine Hydrolyse beobachtet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pankreas-Cholesterolesterase *in-vivo* am Metabolismus von γ -Oryzanol beteiligt sein könnte. Daneben eröffnen die durchgeführten Experimente die Möglichkeit, die Zusammensetzung von γ -Oryzanol-Präparaten enzymatisch zu modifizieren.

6 LITERATUR

- [1] Xu Z., Godber J. S. Purification and identification of components of γ -oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47(7), 2724 – 2728.
- [2] Gertz Ch., Klostermann S., Kochhar S. P. Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, 102, 543 – 551.
- [3] Gertz Ch., Kochhar S. P. A new method to determine oxidative stability of vegetable fats and oils at simulated frying temperature. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* **2001**, 8(1), 82 – 88.
- [4] Kim J.-S., Suh M.-H., Yang C.-B., Lee H. G. Effect of γ -oryzanol on the flavor and oxidative stability of refrigerated cooked beef. *J. Food Sci.* **2003**, 68(8), 2423 – 2429.
- [5] Riedel J.-H., Koller A., Argembeaux H. Stylingmittel auf Alkoholbasis enthaltend Gamma-Oryzanol und Calciumsalzen. Europäische Patentanmeldung EP 0937450A1, **1999**.
- [6] Shinomiya M., Morisaki N., Matsuoka N., Izumi S., Saito Y., Kumagai A., Mitani K., Morita S. Effects of γ -oryzanol on lipid metabolism in rats fed high-cholesterol diet. *Tohoku J. Exp. Med.* **1983**, 141, 191 – 197.
- [7] Seetharamaiah G. S., Chandrasekhara N. Hypocholesterolemic activity of oryzanol in rats. *Nutr. Rep. Intern.* **1988**, 38(5), 927 – 935.
- [8] Seetharamaiah G. S., Chandrasekhara N. Effect of oryzanol on fructose induced hypertriglyceridaemia in rats. *Indian J. Med. Res.* **1988**, 88, 278 – 281.
- [9] Seetharamaiah G. S., Chandrasekhara N. Comparative hypocholesterolemic activities of oryzanol, curcumin and ferulic acid in rats. *J. Food Sci. Technol.* **1993**, 30(4), 249 – 252.
- [10] Rong N., Ausman L. M., Nicolosi R. J. Oryzanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty streaks in hamsters. *Lipids* **1997**, 32(3), 303 – 309.
- [11] Ishihara M. Effect of γ -oryzanol on serum lipid peroxide level and clinical symptoms of patients with climacteric disturbances. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.* **1984**, 10(3), 317 – 323.

- [12] Yoshino G., Kazumi T., Amano M., Tateiwa M., Yamasaki T., Takashima S., Iwai M., Hatanaka H., Baba S. Effects of gamma-oryzanol on hyperlipidemic subjects. *Curr. Ther. Res.* **1989**, *45(4)*, 543 – 552.
- [13] Rukmini C., Raghuram T. C. Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. *J. Am. Coll. Nutr.* **1991**, *10(6)*, 593 – 601.
- [14] Sugano M., Tsuji E. Rice bran oil and cholesterol metabolism. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 521S – 524S.
- [15] Cicero A. F. G., Gaddi A. Rice bran oil and γ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 277 – 289.
- [16] Nakayama S., Manabe A., Suzuki J., Sakamoto K., Inagaki T. Comparative effects of two forms of γ -oryzanol in different sterol compositions on hyperlipidemia induced by cholesterol diet in rats. *Japan. J. Pharmacol.* **1987**, *44*, 135 – 143.
- [17] Yagi K., Ohishi N. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1979**, *25*, 127 – 130.
- [18] Xu Z., Hua N., Godber J. S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49(4)*, 2077 – 2081.
- [19] Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50(7)*, 2161 – 2168.
- [20] Seitz L. M. Stanol and sterol esters of ferulic and *p*-coumaric acids in wheat, corn, rye, and triticale. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37(3)*, 662 – 667.
- [21] Rogers E. J., Rice S. M., Nicolosi R. J., Carpenter D. R., McClelland C. A., Romanczyk L. J. Identification and quantitation of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70(3)*, 301 – 307.
- [22] Hakala P., Lampi A.-M., Ollilainen V., Werner U., Murkovic M., Wähälä K., Karkola S., Piironen V. Steryl phenolic acid esters in cereals and their milling fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50(19)*, 5300 – 5307.

- [23] Fang N., Yu S., Badger Th. M. Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51(11)*, 3260 – 3267.
- [24] Evershed R. P., Spooner N., Prescott M. C., Goad L. J. Isolation and characterisation of intact steryl ferulates from seeds. *J. Chromatogr.* **1988**, *440*, 23 – 35.
- [25] Norton R. A. Quantitation of steryl ferulate and *p*-coumarate esters from corn and rice. *Lipids* **1995**, *30(3)*, 269 – 274.
- [26] Norton R. A. Isolation and identification of steryl cinnamic acid derivatives from corn bran. *Cereal Chem.* **1994**, *71(2)*, 111 – 117.
- [27] Grob K. On-line coupled LC-GC. Hüthig-Verlag, Heidelberg, **1991**.
- [28] Micali G., Lanuzza F., Curró P. Analysis of tocopherols in margarine by on-line HPLC-HRGC coupling. *J. High Res. Chromatogr.* **1993**, *16*, 536 – 538.
- [29] Villén J., Blanch G. P., del Castillo M. L. R., Herraiz M. Rapid and simultaneous analysis of free sterols, tocopherols, and squalene in edible oils by coupled reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1419 – 1422.
- [30] Kamm W., Dionisi F., Fay L.-B., Hirschenhuber C., Schmarr H.-G., Engel K.-H. Analysis of steryl esters in cocoa butter by on-line liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, *918*, 341 – 349.
- [31] Kamm W., Dionisi F., Hirschenhuber C., Schmarr H.-G., Engel K.-H. Rapid detection of vegetable oils in milk fat by on-line LC-GC analysis of β -sitosterol as marker. *Eur. J. Lipid Sci Technol.* **2002**, *104*, 756 – 761.
- [32] Kamm W., Dionisi F., Fay L.-B., Hirschenhuber C., Schmarr H.-G., Engel K.-H. Rapid and simultaneous analysis of 16-*O*-methylcafestol and sterols as markers for authenticity assessment of green coffee beans by on-line LC-GC. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **2002**, *79*, 1109 – 1113.
- [33] Fujiwara S., Sakurai S., Noumi K., Sugimoto I., Awata N. Metabolism of γ -oryzanol in rabbit. *Yakugaku* **1980**, *100(10)*, 1011 – 1018.

- [34] Fujiwara S., Noumi K., Sugimoto I., Awata N. Mass fragmentographic determination of ferulic acid in plasma after oral administration of γ -oryzanol. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, 30(3), 973 – 979.
- [35] Fujiwara S., Sakurai S., Sugimoto I., Awata N. Absorption and metabolism of γ -oryzanol in rats. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 31(2), 645 – 652.
- [36] Fujiwara S., Honda S. Determination of cinnamic acid and its analogues by electrophoresis in a fused silica capillary tube. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1811 – 1814.
- [37] Hiramatsu K., Tani T., Kimura Y., Izumi S., Nakane P. K. Effect of gamma-oryzanol on atheroma formation in hypercholesterolemic rabbits. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1990**, 15(4), 299 – 305.
- [38] Food and Agricultural Organization (FAO) Database, Rom, Stand: 30. April 2003.
- [39] Consensus document on the biology of *Oryza sativa* (rice). Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, **1999**.
- [40] Krebs A. Reis und Reisprodukte für die Lebensmittelindustrie. *LVT Lebensmittel Industrie* **2000**, 45, 179 – 181.
- [41] Hettiarachchy N. S., Ju Z. Y., Siebenmorgen T., Sharp R. N. Rice: Production, processing and utilization. In: Kulp K., Ponte J. G. (Hrsg.) Handbook of Cereal Science and Technology. Marcel Dekker, New York, **2000**.
- [42] Franke W. Nutzpflanzenkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [43] Saunders R. M. Rice bran: composition and potential food uses. *Food Rev. Inter.* **1985 - 86**, 1(3), 465 – 495.
- [44] Juliano B. O. Rice bran. In: Juliano B. O. (Hrsg.) Rice chemistry and technology. AACC, St. Paul, Minnesota, **1985**.
- [45] Shin T.-S., Godber J. S. Changes of endogenous antioxidants and fatty acid composition in irradiated rice bran during storage. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44(2), 567 – 573.
- [46] Shin, T.-S., Godber J. S., Martin D. E., Wells J. H. Hydrolytic stability and changes in E vitamers and oryzanol of extruded rice bran during storage. *J. Food Sci.* **1997**, 62(4), 704 – 708.

- [47] Shin, T.-S. Kinetics of antioxidant degradation in rice bran on extruder stabilization processing. *Food Sci. Biotechnol.* **1999**, *8(1)*, 47 – 53.
- [48] Lloyd B. J., Siebenmorgen T. J., Beers K. W. Effects of commercial processing on antioxidants in rice bran. *Cereal Chem.* **2000**, *77(5)*, 551 – 555.
- [49] The need for inclusion of rice bran oil in the standards for named vegetable oils. Eighteenth session of the Codex Committee on Fats and Oils, Codex Alimentarius Commission, London, **2003**.
- [50] Rukmini C. Chemical, nutritional and toxicological studies of rice bran oil. *Food Chem.* **1988**, *30*, 257 – 268.
- [51] Kahlon T. S., Saunders R. M., Chow F. I., Chiu M. M., Betschart A. A. Influence of rice bran, oat bran, and wheat bran on cholesterol and triglycerides in hamsters. *Cereal Chem.* **1990**, *67(5)*, 439 – 443.
- [52] Kahlon T. S., Saunders R. M., Sayre R. N., Chow F. I., Chiu M. M., Betschart A. A. Cholesterol-lowering effect of rice bran and rice bran oil fractions in hypercholesterolemic hamsters. *Cereal Chem.* **1992**, *69(5)*, 485 – 489.
- [53] Kahlon T. S., Chow F. I. Lipidemic response of hamsters to rice bran, uncooked or processed white and brown rice, and processed corn starch. *Cereal Chem.* **2000**, *77(5)*, 673 – 678.
- [54] Koba K., Liu J.-W., Bobik E., Sugano M., Huang Y.-S. Cholesterol supplementation attenuates the hypocholesterolemic effect of rice bran oil in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2000**, *46*, 58 – 64.
- [55] Nagao K., Sato M., Takenaka M., Ando M., Iwamoto M., Imaizumi K. Feeding unsaponifiable compounds from rice bran oil does not alter hepatic mRNA abundance for cholesterol metabolism-related proteins in hypercholesterolemic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65(2)*, 371 – 377.
- [56] Kaneko R., Tsuchiya T. New compound in rice bran and germ oils. *Kogyo Kagaku Zasshi* **1954**, *57*, 526.
- [57] Yasukawa K., Akihisa T., Kimura Y., Tamura T., Takido M. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21(10)*, 1072 – 1076.

- [58] Akihisa T., Yasukawa K., Yamaura M., Ukiya M., Kimura Y., Shimizu N., Arai K. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*(6), 2313 – 2319.
- [59] Kahnt G. *Trans-cis*-equilibrium of hydroxycinnamic acids during irradiation of aqueous solutions at different pH. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 755 – 758.
- [60] Hartley R. D., Jones E. C. Effect of ultraviolet light on substituted cinnamic acids and the estimation of their *cis* and *trans* isomers by gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1975**, *107*, 213 – 218.
- [61] Van Boven M., Daenens P., Tytgat J. Determination of simmondsins and simmondsin ferulates in jojoba meal and feed by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*(8), 2239 – 2243.
- [62] Kondo Y., Nakajima K., Nozoe S., Suzuki S. Isolation of ovulatory-active substances from crops of Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *Ma-yuen* Stapf.). *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*(8), 3147 – 3152.
- [63] Moreau R. A., Powell M. J., Hicks K. B., Norton R. A. A comparison of the levels of ferulate-phytosterol esters in corn and other seeds. In: Sánchez J., Cerdá-Olmedo E., Martínez-Force E. (Hrsg.) *Advances in Plant Lipid Research*, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spanien, **1998**, 472 – 474.
- [64] Werner U., Lampi A.-M., Ollilainen V., Piironen V., Murkovic M. Analyse von Sterylferulaten in Roggen als Substanzen mit cholesterinsenkender Wirkung. *Ernährung* **2002**, *26*(6), 245 – 248.
- [65] Iwatsuki K., Akihisa T., Tokuda H., Ukiya M., Higashihara H., Mukainaka T., Iizuka M., Hayashi Y., Kimura Y., Nishino H. Sterol ferulates, sterols, and 5-alk(en)ylresorcinols from wheat, rye, and corn bran oils and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*(23), 6683 – 6688.
- [66] Singh V., Moreau R. A., Hicks K. B. Yield and phytosterol composition of oil extracted from grain sorghum and its wet-milled fractions. *Cereal Chem.* **2003**, *80*(2), 126 – 129.
- [67] Kamm W., Dionisi F., Hirschenhuber C., Engel K.-H. Authenticity assessment of fats and oils. *Food Rev. Intern.* **2001**, *17*(3), 249 – 290.

- [68] Kondo Y., Suzuki S., Kuboyama M. Fertility drugs containing *Coix lacryma-jobi* extracts or ferulyl stanol derivatives and/or a phytosterol fatty acid ester. Europäische Patentanmeldung EP 0203277, **1986**.
- [69] Majumder P. L., Pal A. 24-Methylene cycloartanyl *p*-hydroxycinnamate from the orchid *Cirrhopetalum elatum*. *Phytochemistry* **1985**, *24*(9), 2120 – 2122.
- [70] Seitz L. M. Sitostanyl ferulate as an indicator of mechanical damage to corn kernels. *Cereal Chem.* **1990**, *67*(3), 305 – 307.
- [71] Moreau R. A., Singh V., Nuñez A., Hicks K. B. Phytosterols in the aleurone layer of corn kernels. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*(6), 803 – 806.
- [72] Gassner G., Hohmann B., Deutschmann F. Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1989**.
- [73] Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1995**, *46*, 521 – 547.
- [74] Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* **2001**, *6*(2), 78 – 84.
- [75] McCaskill D., Croteau R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 349 – 355.
- [76] Rendell N., Misso N. L. A., Goad L. J. Biosynthesis of 24-methylcholest-5-en-3 β -ol and 24-Ethylcholest-5-en-3 β -ol in *Zea mais*. *Lipids* **1986**, *21*(1), 63 – 68.
- [77] Nes W. D., Venkatramesh M. Enzymology of phytosterol transformations. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *34*(2), 81 – 93.
- [78] Arigoni D., Sagner S., Latzel Ch., Eisenreich W., Bacher A., Zenk M. H. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10600 – 10605.
- [79] Heldt H. W. Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1997**.
- [80] Goodwin T. W. Biosynthesis of sterols. In: Stumpf P. K., Conn E. E. (Hrsg.) *The biochemistry of plants, Vol. 4, Lipids: Structure and function*, Academic Press, New York, USA, **1980**, 485 – 507.

- [81] Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. A., Toivo J., Lampi A.-M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 939 – 966.
- [82] Benveniste P. Sterol biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1986**, *37*, 275 – 308.
- [83] Akihisa T., Matsumoto T. Structure and function of sterols in seeds. *Animal & Plant Sci.* **1988**, *1(1)*, 100 – 104.
- [84] Goad L. J. Inhibition of phytosterol biosynthesis and the consequences for plant growth. In: Harborne J. B., Tomas-Barberan F. A. (Hrsg.) *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*, Clarendon Press, Oxford, UK, **1991**, 209 – 229.
- [85] Pascal S., Taton M., Rahier A. Plant sterol biosynthesis: Identification and characterization of two distinct microsomal oxidative enzymatic systems involved in sterol C4-demethylation. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268(16)*, 11639 – 11654.
- [86] Guo D., Venkatramesh M., Nes W. D. Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. *Lipids* **1995**, *30(3)*, 203 – 219.
- [87] Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Sakurai A., Yoshida S., Li J., Chory J. Arabidopsis *det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5 α -cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.* **1999**, *120(3)*, 833 – 839.
- [88] Bouvier-Navé P., Husselstein T., Benveniste P. Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 88 – 96.
- [89] Gondet L., Weber Th., Maillot-Vernier P., Benveniste P., Bach Th. J. Regulatory role of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in a tobacco mutant that overproduces sterols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *186(2)*, 888 – 893.
- [90] Gondet L., Bronner R., Benveniste P. Regulation of sterol content in membranes by subcellular compartmentation of steryl-esters accumulating in a sterol-overproducing tobacco mutant. *Plant Physiol.* **1994**, *105*, 509 – 518.
- [91] Schaller H., Grausem B., Benveniste P., Chye M.-L., Tan C.-T., Song Y.-H., Chua N.-H. Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Müll. Arg. 3-hydroxy-3-

- methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 761 – 770.
- [92] Janssen G. G., Nes W. D. Structural requirements for transformation of substrates by the S-adenosyl-L-methionine: $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase: Inhibition by analogs of the transition state coordinate. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267(36)*, 25856 – 25863.
- [93] Mudd J. B. Sterol interconversions. In: Sumpf P. K., Conn E. E. (Hrsg.) *The biochemistry of plants, Vol. 4, Lipids: Structure and function*, Academic Press, New York, **1980**, 509 – 534.
- [94] Rahier A., Taton M., Bouvier-Navé P., Schmitt P., Benveniste P., Schuber F., Narula A. S., Cattel L., Anding C., Place P. Design of high energy intermediate analogues to study sterol biosynthesis in higher plants. *Lipids* **1986**, *21(1)*, 52 – 62.
- [95] Kuroda N., Ohnishi M., Fujino Y. Sterol lipids in rice bran. *Cereal Chem.* **1977**, *54(5)*, 997 – 1006.
- [96] Neish A. C. Formation of *m*- and *p*-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry* **1961**, *1(1)*, 1 – 24.
- [97] Strack D. Phenolic metabolism. In: Dey P. M., Harborne J. B. (Hrsg.) *Plant Biochemistry*, Academic Press, San Diego, USA, **1997**, 387 – 416.
- [98] Herrmann K. M. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* **1995**, *7(7)*, 907 – 919.
- [99] Herrmann K. M., Weaver L. M. The shikimate pathway. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 473 – 503.
- [100] Norton R. A., Dowd P. F. Effect of steryl cinnamic acid derivatives from corn bran on *Aspergillus flavus*, corn earworm larvae, and driedfruit beetle larvae and adults. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2412 – 2416.
- [101] Chipley J. R., Uraih N. Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, *40(2)*, 352 – 357.
- [102] Maeshima K., Hayashi N., Murakami T., Takahashi F., Komae H. Identification of chemical oviposition stimulants from rice grain for *Sitophilus zeamais* motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* **1985**, *11(1)*, 1 – 9.

- [103] Hartmann M.-A. Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci.* **1998**, 3(5), 170 – 175.
- [104] Eggensperger H., Wilker M. Zur multiaktiven Wirkung von Ferulasäure und ihren Estern in Kosmetika – Teil I. *SÖFW-Journal* **1996**, 122(3), 146 – 156.
- [105] Ueda H., Hayakawa R., Hoshino S., Kobayashi M. The effect of topically applied γ -oryzanol on sebaceous glands. *J. Dermatol.* **1976**, 3(1), 19 – 24.
- [106] Eggensperger H., Wilker M. Zur multiaktiven Wirkung von Ferulasäure und ihren Estern in Kosmetika – Teil III. *SÖFW-Journal* **1996**, 122(8), 554 – 556.
- [107] Coppini O., Paganuzzi D., Santi P., Ghirardini A. Capacità protettiva nei confronti delle radiazioni solari di derivati di origine vegetale. *Cosmetic News* **2001**, 136, 15 – 20.
- [108] Kaiser B. Ein Sonnenschutzmittel für Haut und Haar mit verbesserter Schutzeigenschaft. Deutsche Patentanmeldung DE 4421038 A1, **1995**.
- [109] Kaiser B. Sonnenschutzmittel für die topische Anwendung am menschlichen Körper. Deutsche Patentanmeldung DE 4421038 C2, **1997**.
- [110] WALA Heilmittel GmbH, 73087 Eckwäldern/Bad Boll.
- [111] Beiersdorf AG, 20245 Hamburg.
- [112] Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake of humans. *Free Rad. Res.* **1996**, 25(1), 57 – 74.
- [113] Tajima K., Sakamoto M., Okada K., Mukai K., Ishizu K., Sakurai H., Mori H. Reaction of biological phenolic antioxidants with superoxide generated by cytochrome P-450 model system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 115(3), 1002 – 1008.
- [114] Kim S. J., Han D., Moon K. D., Rhee J. S. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, 59(5), 822 – 826.
- [115] Xu Z., Godber J. S. Antioxidative activities of major components of γ -oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78(6), 645 – 649.

- [116] Akiyama Y., Hori K., Hata K., Kawane M., Kawamura Y., Yoshiki Y., Okubo K. Screening of chemiluminescence constituents of cereals and DPPH radical scavenging activity of γ -oryzanol. *Luminescence* **2001**, *16*, 237 – 241.
- [117] Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1815 – 1821.
- [118] Graf E. Antioxidative potential of ferulic acid. *Free Rad. Biol. Med.* **1992**, *13*, 435 – 448.
- [119] Yoshida Y., Niki E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2003**, *49(4)*, 277 – 280.
- [120] Kochhar S. P. Stabilisation of frying oils with natural antioxidative components. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 552 – 559.
- [121] Nanua J. N., McGregor J. U., Godber J. S. Influence of high-oryzanol rice bran oil on the oxidative stability of whole milk powder. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 2426 – 2431.
- [122] Hakani S., Mehta S., Canale P. McCarthy S. Evaluation of oxidative stability of flexible polyolefins by oxidative induction testing with γ -oryzanol and α -tocopherol antioxidants for food and medical applications. *J. Appl. Med. Polym.* **2000**, *4(2)*, 61 – 65.
- [123] Kuriakose A. P., Rajendran G. Rice bran oil as a novel compounding ingredient in sulphur vulcanization of natural rubber. *Eur. Polym. J.* **1995**, *31(6)*, 595 – 602.
- [124] Kannel W. B., Castelli W. P., Gordon T., McNamara, P. M. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Ann. Intern. Med.* **1971**, *74(1)*, 1 – 12.
- [125] Anonymus. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *J. Am. Med. Assn.* **1984**, *251(3)*, 351 – 364.
- [126] Anonymus. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *J. Am. Med. Assn.* **1984**, *251(3)*, 365 – 374.

- [127] Assmann G., Cullen P., Jossa F., Lewis B., Mancini M. Coronary heart disease: Reducing the risk. The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*(8), 1819 – 1824.
- [128] Wester I. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*(1), 37 – 44.
- [129] Ostlund R. E. Phytosterols in human nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 533 – 549.
- [130] Seetharamaiah G. S., Krishnakantha T. P., Chandrasekhara N. Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1990**, *36*, 291 – 297.
- [131] Seetharamaiah G. S., Chandrasekhara N. Effect of oryzanol on cholesterol absorption & biliary & fecal bile acids in rats. *Indian J. Med. Res.* **1990**, *92*, 471 – 475.
- [132] Sakamoto K., Tabata T., Shirasaki K., Inagaki T., Nakayama S. Effects of γ -oryzanol and cycloartenol ferulic acid ester on cholesterol diet induced hyperlipidemia in rats. *Japan. J. Pharmacol.* **1987**, *45*, 559 – 565.
- [133] Fujiwara S., Asakuma S., Sugimoto I. Improvement of the gastrointestinal absorption of γ -oryzanol by non-ionic surfactants and lipids. *Yakuzaigaku* **1984**, *44*(4), 222 – 230.
- [134] Seetharamaiah G. S., Prabhakar J. V. Oryzanol content of Indian rice bran oil and its extraction from soap stock. *J. Food Sci. Technol.* **1986**, *23*, 270 – 273.
- [135] Bucci R., Magri A. D., Magri A. L., Marini F. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 1254 – 1259.
- [136] Tanaka A., Tanabe K., Kato A., Muramatsu J. Quantitative analysis of ferulates in rice bran oil by high performance liquid chromatography. *Yukagaku* **1977**, *26*, 119 – 122.
- [137] Diack M., Saska M. Separation of vitamin E and γ -oryzanols from rice bran by normal-phase chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71*(11), 1211 – 1217.
- [138] Moreau R. A., Powell M. J., Hicks K. B. Extraction and quantitative analysis of oil from commercial corn fiber. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2149 – 2154.

- [139] Nasirullah K. M. N., Nagaraja K. V. Methods for detection of rice-bran, mustard, karanja oils and rice-bran deoiled cake. *Fat Sci. Technol.* **1992**, 94(12), 457 – 458.
- [140] Terajima K., Kishimoto K., Kamata K., Nishijima M., Ohnishi K. Determination of γ -oryzanol in commercial preparations with HPLC. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.* **1997**, 48, 81 – 85.
- [141] Gong Y., Yao H. Analysis of γ -oryzanol by LC/MS. *Huaxue Shijie* **2001**, 42(3), 123 – 125.
- [142] Dugo P., Dugo G., Mondello L. On-line coupled LC-GC: Theory and applications., *LCGC Europe – Recent Applications in Multidimensional Chromatography* **2003**, 12, 2 – 10.
- [143] Hyötyläinen T., Riekkola M.-L. On-line coupled liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 357 – 384.
- [144] Grob K., Fröhlich D., Schilling B., Neukom H. P., Nägeli P. Coupling of high-performance liquid chromatography with capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1984**, 295, 55 – 61.
- [145] Grob K. Solvent effects in capillary chromatography. *J. Chromatogr.* **1983**, 279, 225 – 232.
- [146] Grob K. Peak broadening or splitting caused by solvent flooding after splitless or cold on-column injection in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1981**, 213(1), 3 – 14.
- [147] Grob K. „Band broadening in space“ and the „retention gap“ in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1982**, 237(1), 15 – 23.
- [148] Jennings W. Selecting the injection mode. In: Sandra P. (Hrsg.) Sample introduction in capillary GC. Hüthig-Verlag, Heidelberg, **1985**.
- [149] Grob K., Schilling B. Observation of a peak under the action of „phase soaking“, a gas chromatographic solvent effect, during passage through a capillary column. *J. Chromatogr.* **1983**, 259(1), 37 – 48.
- [150] Grob K., Schmarr H.-G., Mosandl A. Early solvent vapor exit in GC for coupled LC-GC involving concurrent eluent evaporation. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1989**, 12, 375 – 382.

- [151] Schmarr H.-G., Mosandl A., Grob K. Coupled LC-GC: Evaporation rates for partially concurrent eluent evaporation using an early solvent vapor exit. *J. High Res. Chromatogr.* **1989**, *12(11)*, 721 – 726.
- [152] Grob K. Efficiency through combining high-performance liquid chromatography and high resolution gas chromatography: progress 1995 – 1999. *J. Chromatogr. A* **2000**, *892*, 407 – 420.
- [153] Munari F., Grob K. Automated on-line HPLC-HRGC: Instrumental aspects and application for the determination of heroin metabolites in urine. *J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.* **1988**, *11*, 172 – 176.
- [154] EU-Project No. QLK1-1999-00651: New methods for the safety testing of transgenic food (SAFOTEST) – 2nd Annual Report, **2002**.
- [155] Rao K. V., Rathore K. S., Hodges Th. K., Fu X., Stoger E., Sudhakar D., Williams S., Christou P., Bharathi M., Bown D. P., Powell K. S., Spence J., Gatehouse A. M. R., Gatehouse J. A. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* **1998**, *15(4)*, 469 – 477.
- [156] Shu Q., Ye G., Cui H., Cheng X., Xiang Y., Wu D., Gao M., Xia Y., Hu C., Sardana R., Altosaar I. Transgenic rice plants with a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol. Breed.* **2000**, *6(4)*, 433 – 439.
- [157] Kobler R., Mühldorfer Naturkorn-Mühle GmbH, Mühldorf, Persönliche Mitteilung, **2003**.
- [158] Anonymus. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, *Untersuchung von Lebensmitteln* **1987**, L16.01-1
- [159] Grob K., Lanfranchi M., Mariani C. Determination of free and esterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1989**, *471*, 397 – 405.
- [160] Grob K., Lanfranchi M., Mariani C. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67(10)*, 626 – 634.

- [161] Artho A., Grob K., Mariani C. On-line LC-GC for the analysis of the minor components in edible oils and fats – the direct method involving silylation. *Fat Sci. Technol.* **1993**, 95(5), 176 – 180.
- [162] Biedermann M., Grob K., Mariani C. Transesterification and on-line LC-GC for determination the sum of free and esterified sterols in edible oils and fats. *Fat Sci. Technol.* **1993**, 95(4), 127 – 133.
- [163] Biedermann M.; Grob K.; Mariani C. On-line LC-UV-GC-FID for the determination of Δ^7 - and $\Delta^{8(14)}$ -sterols and its application for the detection of adulterated olive oils. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **1995**, 72, 339 – 344.
- [164] Meyer V. R. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Otto Salle Verlag, Frankfurt, **1990**.
- [165] Schwarzenbach R. Absorption chromatographic separations on buffered silica gel. *J. Chromatogr.* **1985**, 334, 35 – 48.
- [166] Müller M., Engelhardt H. Spherical and irregular silica. Does shape influence the selectivity? In: Molnar, I. (Hrsg.) *Practical aspects of modern HPLC*, de Gruyter, Berlin, **1983**, 25 – 39.
- [167] Dr. Ing. H. Knauer GmbH. Persönliche Mitteilung, **2001**.
- [168] Grob K., Stoll J.-M. Loop-type interface for concurrent solvent evaporation in coupled HPLC-GC. Analysis of raspberry ketone in a raspberry sauce as an example. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1986**, 9, 518 – 523.
- [169] Tanaka A., Kato A. Mass spectra of several ferulates. *Yukagaku* **1975**, 24, 570 – 574.
- [170] Budzikiewicz H., Djerassi C., Williams D. H. Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. Volume II: Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes. Holden-Day, San-Francisco, **1964**.
- [171] Knights B. A. Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry. *J. Gas Chromatogr.* **1967**, 5, 273 – 282.
- [172] Partridge L. G., Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. 250. Characteristic fragmentations of cholesteryl acetate. *J. Org. Chem.* **1977**, 42(17), 2799 – 2805.

- [173] NIST 1995. Mass spectra library of The National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD.
- [174] Halket J. M. Derivatives for gas chromatography-mass spectrometry. In: Blau K., Halket J. (Hrsg.) *Handbook of derivatives for chromatography*, 2. Aufl., Wiley, Chichester, UK, **1993**, 297 – 325.
- [175] Xu Z., Godber J. S. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **2000**, 77(5), 547 – 551.
- [176] Todorova D., Mechkarova P., Pejcheva A., Milkova Ts. Sterols and sterylferulates in Bulgarian rice bran and husk. *Dokladi na Balgarskata Akademija na Naukite* **1998**, 51(7 – 8), 33 – 36.
- [177] Bergman C. J., Xu Z. Genotype and environment effects on tocopherol, tocotrienol, and γ -oryzanol contents of southern U.S. rice. *Cereal Chem.* **2003**, 80(4), 446 – 449.
- [178] Fuh W.-S., Chiang B.-H. Dephytinisation of rice bran and manufacturing a new food ingredient. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 81(15), 1419 – 1425.
- [179] Rohrer C. A., Siebenmorgen T. J. Nutraceutical concentrations within the bran of various rice kernel thickness fractions. *Biosystems Engineering*, in press.
- [180] Yoon S. H., Kim S. K. Oxidative stability of high-fatty acid rice bran oil at different stages of refining. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1994**, 71(2), 227 – 229.
- [181] Hu W., Wells J. H., Shin T.-S., Godber J. S. Comparison of isopropanol and hexane for extraction of vitamin E and oryzanols from stabilized rice bran. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1996**, 73(12), 1653 – 1656.
- [182] Dunford N. T., King J. W. Phytosterol enrichment of rice bran oil by a supercritical carbon dioxide fractionation technique. *J. Food Sci.* **2000**, 65(8), 1395 – 1399.
- [183] Dunford N. T., Teel J. A., King J. W. A continuous countercurrent supercritical fluid deacidification process for phytosterol ester fortification in rice bran oil. *Food Rev. Inter.* **2003**, 36(2), 175 – 181.
- [184] Krishna A. G. G., Khatoon S., Shiela P. M., Sarmandal C. V., Indira T. N., Mishra A. Effect of refining of crude rice bran oil on the retention of oryzanol in the refined oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **2001**, 78(2), 127 – 131.

- [185] Kim S. K., Kim C. J., Cheigh H. S., Yoon S. H. Effect of caustic refining, solvent refining and steam refining on the deacidification and color of rice bran oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1985**, *62(10)*, 1492 – 1495.
- [186] De B. K., Bhattacharyya D. K. Physical refining of rice bran oil in relation to degumming and dewaxing. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75(11)*, 1683 – 1686.
- [187] Shen Z., Palmer M. V., Ting S. S. T., Fairclough R. J. Pilot scale extraction of rice bran oil with dense carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44(10)*, 3033 – 3039.
- [188] Shen Z., Palmer M. V., Ting S. S. T., Fairclough R. J. Pilot scale extraction and fractionation of rice bran oil using supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45(12)*, 4540 – 4544.
- [189] Zhao W., Shishikura A., Fujimoto K., Arai K., Saito S. Fractional extraction of rice bran oil with supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51(7)*, 1773 – 1777.
- [190] de Blas O. J., de Valle González A. Determination of sterols by capillary column gas chromatography. Differentiation among different types of olive oil: virgin, refined, and solvent-extracted. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73(12)*, 1685 – 1689.
- [191] Westerman L., Roddick J. G. Annual variation in sterol levels in leaves of *Taraxacum officinale* Weber. *Plant Physiol.* **1981**, *68(4)*, 872 – 875.
- [192] Perretti G., Miniati E., Montanari L., Fantozzi P. Improving the value of rice by-products by SFE. *J. Supercrit. Fluid* **2003**, *26(1)*, 63 – 71.
- [193] Kasprzyk Z., Pyrek J., Turowska G. The variations of free and bound sterols in *Calendula officinalis* during vegetation. *Acta Biochim. Pol.* **1968**, *15(2)*, 149 – 159.
- [194] Davis D. L., Poneleit C. G. Sterol accumulation and composition in developing *Zea mays* L. kernels. *Plant Physiol.* **1974**, *54*, 794 – 796.
- [195] Davis D. L., Poneleit C. G. Sterols in developing seed from low and high oil *Zea mays* strains. *Phytochem.* **1975**, *14*, 1201 – 1203.
- [196] Torres J. V., Garcia-Olmedo F. Genetic control of sterol esterification in developing wheat endosperm. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *409*, 367 – 375.

- [197] Palmer M. A., Bowden B. N. Variations in sterol and triterpene contents of developing *Sorghum bicolor* grains. *Phytochem.* **1977**, *16*, 459 – 463.
- [198] Skarsaune S. K., Youngs V. L., Gilles K. A. Changes in wheat lipids during seed maturation. II. Changes in lipid composition. *Cereal Chem.* **1970**, *47(5)*, 533 – 544.
- [199] Baisted D. J. Sterol and triterpene synthesis in the developing and germinating pea seed. *Biochem. J.* **1971**, *124*, 375 – 383.
- [200] Kobler R., Mühldorfer Naturkorn-Mühle GmbH, Mühldorf, Persönliche Mitteilung, **2004**.
- [201] Heß D. Biotechnologie der Pflanzen – Eine Einführung. Eugen Ulmer, Stuttgart, S. 180 – 200, **1992**.
- [202] Engel K.-H., Frenzel Th., Miller A. Current and future benefits from the use of GM technology in food production. *Toxicology Letters* **2002**, *127*, 329 – 336.
- [203] James C. Preview – Global status of commercialized transgenic crops: 2003. ISAAA Briefs No. 30, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, New York, **2003**.
- [204] Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm. *Science* **2000**, *287*, 303 – 305.
- [205] Regulation (EC) 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Communities*, **2003**, *L268*, 1 – 23.
- [206] Draft guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. Scientific Panel on Genetically Modified Organisms of the European Food Safety Authority, April **2004**.
- [207] Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology: concepts and principles. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, **1993**.
- [208] Hoa T. T. C., Al-Babili S., Schaub P., Potrykus I., Beyer P. Golden Indica and Japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiol.* **2003**, *133*, 161 – 169.

- [209] Cheng X. Y., Sardana R., Kaplan H., Altosaar I. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2767 – 2772.
- [210] Wu G., Cui H., Ye G., Xia Y., Sardana R., Cheng X., Li Y., Altosaar I., Shu Q. Inheritance and expression of the *cryIAb* gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. *Theor. Appl. Genet.* **2002**, *104*, 727 – 734.
- [211] Ye G. Y., Yao H. W., Shu Q. Y., Cheng X., Hu C., Xia Y. W., Gao M. W., Altosaar I. High levels of stable resistance in transgenic rice with *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) under field conditions. *Crop Prot.* **2003**, *22*, 171 – 178.
- [212] Faber K. Biotransformations in organic chemistry. Springer, Berlin Heidelberg New York, **1997**.
- [213] Roche Molecular Biochemicals. CHIRAZYME – Lipases & Esterases Screening Set 2. Produktinformation von Roche Molecular Biochemicals, Version 3, November **1999**.
- [214] Fretzdorff B. Methodenvergleich zur Bestimmung lipolytischer Enzymaktivitäten in Hafer. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 450 – 455.
- [215] Sostmann K., Schreier P. Esterification in non-aqueous solvents: cholesterol esterase as a selective biocatalysator from porcine pancreas. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *200*, 428 – 431.
- [216] Vahouny G. V., Treadwell C. R. Pancreatic sterol ester hydrolase. In: *Methods in enzymology* **1969**, *15*, 537 – 543.
- [217] Pozdnev V. F., Planutis K. S., Tochilkin A. I. A fluorimetric method for estimating cholesterol esterase activity. *Bioorganicheskaya Khimiya* **1991**, *17(10)*, 1347 – 1351.
- [218] Swell L., Field H. jr., Treadwell C. R. Sterol specificity of pancreatic cholesterol esterase. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **1954**, *87*, 216 – 218.
- [219] Vahouny G. V., Weersing S., Treadwell C. R. Micellar-solubilized substrates and cholesterol esterase activity in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *107*, 7 – 15.
- [220] Nes W. D., Benson M., Lundin R. E., Le P. H. Conformational analysis of 9 β ,19-cyclopropyl sterols: Detection of the pseudoplanar conformer by nuclear Overhauser

- effects and its functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5759 – 5763.
- [221] Yoshida K., Hirose Y., Imai Y., Kondo T. Conformational analysis of cycloartenol, 24-methylenecycloartanol and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, 53(7), 1901 – 1912.
- [222] Milon A., Nakatani Y., Kintzinger J.-P., Ourisson G. The conformation of cycloartenol investigated by NMR and molecular mechanics. *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 1 – 13.
- [223] Nes W. D., Koike K., Jia Z., Sakamoto Y., Satou T., Nikaido T., Griffin J. F. 9 β ,19-Cyclosterol analysis by ^1H and ^{13}C NMR, cristallographic observations, and molecular mechanics calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120(24), 5970 – 5980.
- [224] Pharmacopoea Helvetica, 6. Ausgabe. Eidgenössische Druck- und Materialzentrale, Bern, 1971.
- [225] Longland R. C., Shilling W. H., Gangolli S. D. The hydrolysis of flavouring esters by artificial gastrointestinal juices and rat tissue preparations. *Toxicology* **1977**, 8, 197 – 204.
- [226] Fuchs C. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Technischer Service/Verkauf, Taufkirchen, Persönliche Mitteilung, **2003**.
- [227] Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen. Biochemikalien und Reagenzien für die Life Science Forschung, Laborkatalog 2002 – 2003.
- [228] Watzl B., Rechkemmer G. Phytosterine – Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkungen. *Ernährungs-Umschau* **2001**, 48(4), 161 – 164.
- [229] Zhao Z., Egashira Y., Sanada H. Digestion and absorption of ferulic acid sugar esters in rat gastrointestinal tract. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51(18), 5534 – 5539.
- [230] Zhao Z., Egashira Y., Sanada H. Ferulic esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. *J. Nutr.* **2003**, 133, 1355 – 1361.
- [231] Konishi Y., Shimizu M. Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67(4), 856 – 862.

-
- [232] Mori S., Nakata Y., Endo H. Biosynthesis of cholesterol linoleate by polyethylene glycol-modified cholesterol esterase in organic solvents. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1992**, *15*, 278 – 282.
- [233] Kazlauskas R. J. Resolution of binaphthols and spirobiindanols using cholesterol esterase. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4953 – 4959.