

Formulieren von Anthocyanen in Doppelemulsionen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
Dissertation

von
Dipl.-Ing. Kerstin Frank
aus Ketsch

Referent:	Prof. Dr.-Ing. Heike P. Schuchmann
Korreferent:	Prof. Dr.-Ing. Michael Türk
Tag des Kolloquiums:	30. Januar 2012

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-8439-0344-8

© Verlag Dr. Hut, München 2012
Sternstr. 18, 80538 München
Tel.: 089/66060798
www.dr.hut-verlag.de

Die Informationen in diesem Buch wurden mit großer Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Verlag, Autoren und ggf. Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für eventuell verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der Vervielfältigung und Verbreitung in besonderen Verfahren wie fotomechanischer Nachdruck, Fotokopie, Mikrokopie, elektronische Datenaufzeichnung einschließlich Speicherung und Übertragung auf weitere Datenträger sowie Übersetzung in andere Sprachen, behält sich der Autor vor.

1. Auflage 2012

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2007 bis November 2011 während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) im Bereich der Lebensmittelverfahrenstechnik. Mein herzlicher Dank gilt an dieser Stelle all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr.-Ing. Heike P. Schuchmann danke ich sehr herzlich für die Anregung und Betreuung dieser Dissertation, die wissenschaftlichen Diskussionen sowie für die große Freiheit bei der Gestaltung der Inhalte.

Besonders danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr.-Ing. Michael Türk für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Die durchgeführten Arbeiten wurden im Rahmen des AiF/DFG-Clusterprojektes „Mikrostrukturierte multidisperse Hüllkapseln“ durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungsbereich der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) finanziell unterstützt. Neben den Geldgebern möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Clusterprojekt für die gute Zusammenarbeit, den wertvollen wissenschaftlichen Austausch sowie die gute Atmosphäre bei den Projekttreffen bedanken. Hervorzuheben sind insbesondere Volker Gräf, Elke Walz, Dr. Sabine Leick, Michael Betz sowie Christopher Kropat, die durch ihre Versuche und Messergebnisse zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Durchführung der LC/MS-Messungen danke ich Dr. Susanne Skrebek. Herrn Dr. Jens Reinisch danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Cosmo-RS-Simulationen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen am Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik für die super Arbeitsatmosphäre bedanken. Die gute Zusammenarbeit, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen sowie die gemeinsamen Unternehmungen aller Art habe ich immer sehr zu schätzen gewusst. Besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang

allen technischen Mitarbeitern für die stets große Hilfsbereitschaft und Anleitung meiner Studenten im Labor und Technikum. Hervorzuheben sind Lydia Schütz und Annette Berndt, die mit großer Motivation und Sorgfalt einen erheblichen Teil der Versuche durchgeführt und damit einen entscheidenden Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben,

allen Studentinnen und Studenten, die im Rahmen von Studien- und Diplomarbeiten, als Hiwis oder während ihrer Tätigkeit als

Gastwissenschaftler zu dieser Arbeit beigetragen haben: Arthur Zago dos Santos Gomes, Carolin Richter, Cosima Engelke, Daniel Ladiges, Di Yao, Julia Johansmeier, Letícia Nasser Lauandos Pozza, Magdalena Pietuch, Mario Hirth, Michael Groß, Sabrina Pisot, Sonja Müller, Zafer Erbay,

Dr. Volker Gaukel, Renate Genzer, Silvia Rösner, Erika Sonnenburg, Tanja Baumgärtner und Klaudia Merkle, die mir viele organisatorische Angelegenheiten abgenommen und mich bei allerlei administrativen Angelegenheiten freundlich und hilfsbereit unterstützt haben,

der freundlichen IT von nebenan, d.h. Jewe Schröder, Marc Schlender, Dr.-Ing. Karsten Köhler und Paul Berres, die mir bei IT-Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen,

Dr.-Ing. Caroline Mages-Sauter, Mario Horvat, Richard Bernewitz und Katharina Kelemen für die gute und freundschaftliche Atmosphäre in unserem Büro.

Ebenso bedanke ich mich bei Anna Schuch, Mario Hirth, Marion Gedrat und Dr.-Ing. Robert Engel für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen Anregungen.

Meinem Freund Philip danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche Unterstützung, seine Liebe und Motivation. Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich stets unterstützt und in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	5
2.1	Struktur und physikalische Stabilität von einfachen und multiplen Emulsionen	5
2.2	Multiple Emulsionen als Trägersystem hydrophiler Substanzen.....	16
2.3	Herstellung von einfachen und multiplen Emulsionen.....	18
2.3.1	Prinzipielle Herstellungsverfahren	18
2.3.2	Tropfenaufbruch beim mechanischen Emulgieren.....	19
2.3.3	Tropfenstabilisierung	23
2.3.4	Mechanische Emulgierverfahren	26
2.3.5	Energiedichtekonzept.....	28
2.4	Hydrokolloide.....	29
2.5	Anthocyane.....	31
2.5.1	Natürliches Vorkommen der Anthocyane	31
2.5.2	Chemische Eigenschaften von Anthocyanen.....	33
2.5.3	Absorptionsspektren der Anthocyane.....	37
2.5.4	Einflussfaktoren auf die Stabilität der Anthocyane	38
2.5.5	Allgemeine Abbaumechanismen der Anthocyane.....	41
2.5.6	Natürliche Stabilisierung der Anthocyane in der Pflanzenzelle	43
2.5.7	Physiologische Eigenschaften und bisherige Erkenntnisse zur Bioverfügbarkeit der Anthocyane.....	44
2.6	Beurteilung von Löslichkeitsphänomenen mittels theoretisch-rechnerischer Modelle.....	45
2.6.1	Theoretisch-rechnerische Modelle.....	45
2.6.2	Der Verteilungskoeffizient P	47
2.7	Fettverdauung im Gastrointestinaltrakt.....	47
3	Material und Methoden	51
3.1	Materialien	51
3.1.1	Heidelbeerextrakt	51
3.1.2	Disperse und kontinuierliche Phasen	52
3.1.3	Weitere Hilfsstoffe.....	56
3.2	Methoden.....	57
3.2.1	Herstellung der anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktlösungen	57
3.2.2	Herstellung der Pektinlösungen	58
3.2.3	Herstellung pektinhaltiger Heidelbeerextraktlösungen	58

3.2.4	Bestimmung der relativen Anthocyankonzentration	58
3.2.5	Bestimmung der Randbedingungen zum verlustfreien Formulieren von Anthocyanen in multiplen Emulsionen.....	59
3.2.6	Methoden zur Untersuchung des Übergangs von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase	61
3.2.7	Herstellung der W_1/O -Emulsionen	64
3.2.8	Herstellung der anthocyanhaltigen Doppelemulsionen	65
3.2.9	Charakterisierung der dispersen bzw. kontinuierlichen Phasen	66
3.2.10	Charakterisierung der Emulsionssysteme.....	67
3.2.11	Methode zur Bestimmung der Freisetzung eingeschlossener Substanzen	70
3.2.12	Magen-Darm-Modell zur Bestimmung der Stabilität und der Freisetzung im Gastrointestinaltrakt.....	72
3.2.13	Bestimmung der Osmolariät der Freisetzungsm Medien.....	74
3.2.14	Untersuchungen zur chemopräventiven Wirkung des Heidelbeerextraktes.....	74
4	Anthocyanstabilität	77
4.1	Einfluss des pH-Wertes.....	77
4.2	Einfluss von Pektinen.....	78
4.3	Stabilität von Anthocyanen im Homogenisierprozess.....	79
5	Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase.....	83
5.1	Phänomene und Hypothesen.....	83
5.2	Ergebnisse zu Hypothese 1: Chemische Reaktion.....	86
5.3	Ergebnisse zu Hypothese 2: Intermolekulare Copigmentierung.....	86
5.4	Ergebnisse zu Hypothese 3: Transport in inversen Emulgatormizellen	87
5.5	Ergebnisse zu Hypothese 4: Löslichkeitseffekte	91
6	Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen	97
6.1	Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W_1/O -Emulsionen.....	97
6.1.1	Einfluss von Elektrolyten und Hydrokolloiden auf die Mikrostruktur von W_1/O -Emulsionen	97
6.1.2	Einfluss von Herstellungsverfahren und Prozessparametern auf die Mikrostruktur der inneren Emulsionen.....	103

6.1.3	Einfluss des Heidelbeerextraktanteils in der W_1 -Phase auf die Mikrostruktur pektinhaltiger W_1/O -Emulsionen	108
6.1.4	Einfluss des Dispersphasenanteils φ auf die Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen	111
6.2	Langzeitstabilisierung der inneren Tropfen	113
7	Einstellung der Mikrostruktur der äußeren Emulsionen	117
7.1	Einfluss von Emulgatortyp und Prozessparameter auf die Mikrostruktur von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen.....	118
7.2	Einfluss eines Gelbildners in W_2 auf die Mikrostruktur von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen	121
7.3	Einfluss des äußeren Dispersphasenanteils φ_{WO} auf die Mikrostruktur von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen.....	123
8	Stabilität von Doppelemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane	127
8.1	Lagerstabilität.....	127
8.2	Freisetzung von Anthocyanen in wässrigen Systemen während der Formulierung und Lagerung	128
8.3	Stabilität der Doppelemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt.....	135
8.3.1	Stabilität der Doppelemulsionen im Gastrointestinaltrakt....	135
8.3.2	Aufnahme der Anthocyane im Gastrointestinaltrakt	145
8.4	Chemopräventive Wirkung der heidelbeerextrakthaltigen Doppelemulsionen.....	147
8.4.1	Modulation der EGFR-Phosphorylierung.....	147
8.4.2	Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen	150
9	Zusammenfassung und Ausblick	153
10	Summary and outlook.....	161
	Literaturverzeichnis.....	169
	Formelzeichen und Abkürzungen	189
	Abbildungsverzeichnis.....	197
	Tabellenverzeichnis.....	205
11	Anhang.....	207
11.1	Realteil des Brechungsindex in Abhängigkeit des Heidelbeerextraktanteils in wässriger Lösung	207

11.2	Kalibriergerade zur Bestimmung der Anthocyankonzentration	207
11.3	Kritische Mizellbildungskonzentration von PGPR in MCT-Öl	208
11.4	Einfluss Öltyp und Heidelbeerextrakt auf die kritische Mizellbildungskonzentration von PGPR	210
11.5	Zusammensetzung des in den COSMO-RS- Berechnungen zugrunde gelegten MCT-Öls	211
11.6	Einfluss von Natriumchlorid auf die Grenzflächen spannung	211
11.7	Einfluss von Pektin auf die Grenzflächenspannung	212
11.8	Einfluss der Umfangsgeschwindigkeit und Passagenzahl auf die Verteilungssumme von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen	213
11.9	Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren in der ZKDM auf den Sauterdurchmesser der inneren Emulsionen	214
11.10	Einfluss des Homogenisierdruckes auf die Verteilungssumme von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen	215
11.11	Herstellung pektinfreier Emulsionen im Hochdruckhomogenisator	217
11.12	Gelertemperatur der verwendeten Pektine	218
11.13	Zusammensetzung der Pektin-Salz-Mischungen bei Verwendung des nicht standardisierten Pektins	219
11.14	Mikroskopische Aufnahmen der nicht sedimentierten Emulsionen mit > 0,5 % Heidelbeerextrakt	220
11.15	Einfluss des Heidelbeerextraktgehalts auf die Viskosität pektinhaltiger Wasserphasen	221
11.16	CMC-Messungen der verwendeten hydrophilen Emulgatoren	222
11.17	Dynamische Viskosität einer W_1/O -Emulsion mit 30 % Dispersphasenanteil	223
11.18	Dynamische Viskosität der W_2 -Phase	224
11.19	Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Tropfengrößenverteilung von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen	225
11.20	Lagerstabilität von gallensäure- und konjugat stabilisierten Doppelemulsionen mit Dispersphasenanteilen von 30 bis 80 %	227
11.21	Adsorptionsverhalten der hydrophilen Spritzenfilter	228

1 Einleitung und Problemstellung

Viele Früchte und Gemüsesorten enthalten einen hohen Anteil an bioaktiven Inhaltsstoffen, die sich positiv auf die menschliche Gesundheit auswirken. Ein Beispiel stellen Anthocyane dar, die zur größten Gruppe hydrophiler Pflanzenfarbstoffe zählen [Delgado-Vargas et al., 2003]. Sie sind für die Farbgebung vieler blau-, lila- und rotgefärbter Früchte, Gemüsesorten und Blüten verantwortlich [Takeoka et al., 2008; He et al., 2010]. Insbesondere die Europäische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) weist einen hohen Anthocyanengehalt auf [Kalt et al., 1999]. Da solche anthocyanhaltigen Lebensmittel in unterschiedlichen Studien (*in vitro*, Tier- und klinischen Studien) hohe antioxidative, antikanzerogene sowie immunstimulierende Wirkung [Middleton, 1998; Rechkemmer et al., 2004; Watzl et al., 2005; Wang et al., 2008] zeigten, gewinnen sie in der Lebensmittelindustrie, insbesondere in den Bereichen funktionelle Lebensmittel oder Nahrungsergänzungsmittel zunehmend an Bedeutung. Darüber hinaus stellen Anthocyane als natürliche Farbstoffe eine aussichtsreiche Alternative zu synthetischen Farbstoffen dar [He et al., 2010].

Die zuvor erwähnten Studien zeigten allerdings auch, dass Anthocyane aus natürlichen Quellen wie Früchten oder Gemüse häufig effektiver sind als aus Pflanzenzellen isolierte oder chemisch synthetisierte Moleküle. Als mögliche Gründe werden eine ungenügende Stabilität der Moleküle außerhalb der natürlichen Mikroumgebung, unterschiedliche Freisetzungen im Magen-Darm-Trakt und molekulare Wechselwirkungen mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen diskutiert [Brouillard, 1982; Shenoy, 1993; Hubbermann, 2005]. Ohne geeignete Schutzmaßnahmen gelingt es nicht, Anthocyane isoliert zu stabilisieren, so dass nach dem Genuss eines mit Anthocyanen angereicherten Lebensmittels in der Blutbahn nur äußerst geringe Mengen an Anthocyanen nachweisbar sind [Bub et al., 2001]. Weitgehend unbekannt sind deswegen mögliche positive oder negative biologische Aktivitäten dieser Molekülklasse. Um diese näher untersuchen zu können, muss daher eine Formulierung entwickelt werden, die es ermöglicht, Anthocyane stabil und möglichst unverändert in den menschlichen Darm, den Ort der Aufnahme in das Blutssystem, zu transportieren.

Doppelemulsionen könnten hierfür prinzipiell eine geeignete Formulierung darstellen. Für sie werden bereits zahlreiche potentielle Anwendungen in der Chemie-, Bitumen-, Kosmetik-, Pharma- und Lebensmittelindustrie diskutiert. So können sie zum Beispiel zur Wirkstoffstabilisierung, zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit bzw. kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen [Benoy et al., 1972; Florence et al., 1976; Matsumoto et al., 1989; Garti et al., 1996; Garti,

1 Einleitung und Problemstellung

1997a; Garti, 1997b; Benichou et al., 2004; Gouin, 2004; Appelqvist et al., 2007; Garti et al., 2011] oder zur parenteralen Ernährung [Marti-Mestres et al., 2002] eingesetzt werden. Darüber hinaus werden Doppelemulsionen zur Geschmacksmaskierung oder in Form von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen auch für die Herstellung fettreduzierter Produkte mit gleichbleibenden sensorischen Eigenschaften wie die der Vollfettprodukte in Erwägung gezogen [Ficheux et al., 1998; Lobato-Calleros et al., 2008].

Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit dem Einbringen eines anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes als beispielhaft ausgewählten hydrophilen Bioaktivstoff in $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen. Diese Systeme sollen es ermöglichen, die hydrophilen bioaktiven Inhaltsstoffe in den inneren W_1 -Tropfen zu verkapseln und dadurch gezielt gegenüber mikrobiologischen Veränderungen, degradierenden Umgebungsbedingungen und Wechselwirkungen mit umgebenden Medien zu schützen. Durch die mehrphasige Struktur der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen besteht die Möglichkeit, die eingeschlossenen, hydrophilen Substanzen wiederum in ein wässriges Produkt einzubringen. Innerhalb der W_1 -Tropfen können prinzipiell stabilisierende Umgebungsbedingungen realisiert werden. Die umgebenden Emulgatorschichten und eine nicht mischbare Triglyceridphase sollen zudem eine Art Schutzhülle bilden. Je nach Aufbau der Grenzflächen und umgebenden Triglyceridphase ist es denkbar, damit zusätzlich zum Stabilisierungseffekt eine Freisetzung an unterschiedlichen Orten im Verdauungstrakt auszulösen. Um den Einfluss der Emulsionsstruktur und -zusammensetzung auf die Stabilität und Freisetzung der eingeschlossenen Bioaktivstoffe untersuchen zu können, ist es aber zunächst notwendig, Verfahren zu entwickeln, die eine gezielte Herstellung von multiplen Emulsionen mit ganz spezifischen Eigenschaften (z.B. innere und äußere Tropfengrößenverteilung, Viskosität, Lagerstabilität...) ermöglichen.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Forschungsarbeiten wurden im Rahmen des AiF-Projektes „Mikrostrukturierte, multidisperse Hüllkapseln“ durchgeführt, das in das gleichzeitig von der DFG und der AiF geförderte Clustervorhaben „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multi-kapselsystemen“ eingebettet war. Hieran waren 9 Forschergruppen, 6 Wirtschaftsverbände und mehr als 30 Unternehmen beteiligt. Ziel des Clustervorhabens war es, innovative Technologien zur stabilen Mikroverkapselung von bioaktiven Inhaltsstoffen und zur gezielten Freisetzung im Magen-Darm-Trakt zu entwickeln und grundlegende Studien zu Freisetzungs- und Wirkungsmechanismen durchzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zunächst die für die Formulierung der Anthocyane in $W_1/O/W_2$ -Emulsionen relevanten Eigenschaften untersucht und dargestellt. Hierzu zählt zum einen das Aufzeigen der einzustellenden

1 Einleitung und Problemstellung

Umgebungsbedingungen in den W_1 -Tropfen für eine maximale Anthocyanstabilität. Da die bioaktiven Moleküle beim Einbringen in die inneren Wassertropfen von Doppelemulsionen zunächst mit der W_1 -Phase gemischt werden und anschließend einen Emulgierprozess überstehen müssen, bei dem hohe mechanische und thermische Energien eingetragen werden, wird zum anderen die Stabilität von Anthocyanmolekülen in wässriger Lösung unter definierten mechanischen und thermischen Beanspruchungen untersucht.

Während der Formulierung des anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes in der inneren W_1/O -Emulsion wurde ein Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase beobachtet. Da dies einerseits die Einschlusseigenschaften der Emulsionen stark beeinflussen könnte, andererseits aber auch neue Möglichkeiten zum Färben lipophiler Medien bietet, werden im zweiten Teil dieser Arbeit vier mögliche Erklärungsansätze dieses Phänomens untersucht.

Unter Berücksichtigung der für die Formulierung von Anthocyanen relevanten Eigenschaften werden die in der Literatur beschriebenen Herstellungsverfahren für einfache und multiple Emulsionen für die Beladung der Trägersysteme mit Anthocyanen angepasst und praktikable Prozesswege aufgezeigt. Besonderes Augenmerk gilt dabei der gezielten Variation der Mikrostruktur der inneren W_1/O - sowie der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen. Ziel ist es, aufzuzeigen, wie durch geeignete Einstellung der Mikrostruktur der inneren und äußeren Emulsionen lagerstabile Formulierungen hergestellt werden können, die es ermöglichen, die Anthocyanmoleküle an verschiedenen Stellen des menschlichen Gastrointestinaltraktes mit unterschiedlicher Kinetik freizusetzen.

Die Stabilität der Doppelemulsionen im Gastrointestinaltrakt wurde in einem *in vitro* Magen-Darm-Modell untersucht. Hierbei wurde sowohl die physikalische Stabilität der Doppelemulsionen während der gastrointestinalen Passage als auch die Freisetzung der eingeschlossenen Anthocyane analysiert.

Darüber hinaus wurde in Kooperation mit der Universität Wien im Rahmen des Clustervorhabens untersucht, inwieweit die krebopräventive Wirkung des in dieser Arbeit verwendeten Heidelbeerextraktes durch die Formulierung in Doppelemulsionen beeinflusst wird. Hierfür wurden Untersuchungen bzgl. der chemopräventiven Wirkung von reinen Heidelbeerextraktlösungen sowie von extrakthaltigen Doppelemulsionen an humanen Kolonkarzinomzellen durchgeführt.

1 Einleitung und Problemstellung

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Struktur und physikalische Stabilität von einfachen und multiplen Emulsionen

Emulsionen sind disperse Systeme bestehend aus mindestens zwei ineinander nicht löslichen oder nahezu unlöslichen Flüssigkeiten.

Im Falle eines zweiphasigen Systems, einer sogenannten einfachen Emulsion, liegt die eine Flüssigkeit fein verteilt als Tropfen in der anderen Flüssigkeit vor. Die tropfenbildende Phase wird hierbei als disperse Phase, die umgebende als kontinuierliche Phase bezeichnet. Im Allgemeinen bestehen die beiden Phasen aus einer hydrophilen und einer lipophilen Flüssigkeit, beispielsweise Wasser und Öl. Je nach Art der inneren Phase kann zwischen Wasser-in-Öl (W/O)-Emulsionen und Öl-in-Wasser (O/W)-Emulsionen unterschieden werden [Schubert, 2005].

Multiple Emulsionen weisen eine komplexere Struktur auf. Es handelt sich hierbei um „Emulsionen in Emulsionen“, bei denen die Tropfen der dispersen Phase selbst wiederum Tropfen enthalten. Solche Strukturen können aus beliebig vielen Phasen bestehen [Becher, 1965]. Den einfachsten Fall einer multiplen Emulsion stellen Doppelemulsionen dar. Hierbei wird zwischen Wasser-in-Öl-in-Wasser ($W_1/O/W_2$)- und Öl-in-Wasser-in-Öl ($O_1/W/O_2$)-Emulsionen unterschieden (siehe Abb. 2-1).

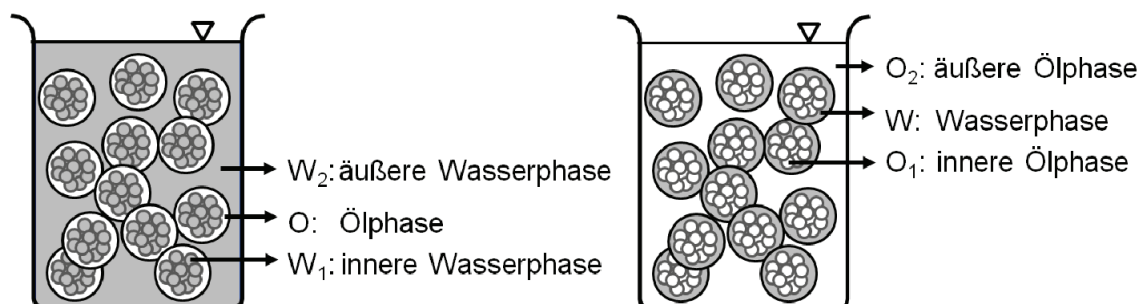


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Struktur von Doppelemulsionen: links: $W_1/O/W_2$ -Emulsion, rechts: $O_1/W/O_2$ -Emulsion.

Bei den in dieser Arbeit betrachteten Emulsionen handelt es sich ausschließlich um $W_1/O/W_2$ -Emulsion, bei denen jeder dispergierte W_1 -Tropfen durch eine Ölschicht von der umgebenden W_2 -Phase isoliert ist [Davis et al., 1985; Garti,

1997a]. Der Massenanteil der dispersen Phase wird Dispersphasenanteil genannt. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Massenanteil der inneren W_1 -Tropfen bezogen auf die innere W_1/O -Emulsion als Dispersphasenanteil φ , der Massenanteil der W_1/O -Tropfen bezogen auf die gesamte Doppelemulsion als Dispersphasenanteil φ_{WO} bezeichnet.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit von Doppelemulsionen in der Praxis ist allerdings eine ausreichend lange Haltbarkeit im Produkt. Das heißt, die Doppelemulsionen müssen mikrobiologisch, chemisch und physikalisch stabil sein. Unter mikrobiologischer Stabilität ist die Beständigkeit der Emulsionen gegen durch Mikroorganismen induzierte Veränderungen zu verstehen. Die chemische Stabilität beschreibt die Stabilität gegen chemische Veränderungen. Beispiele hierfür sind Veränderungen durch Oxidationsreaktionen, durch UV-Licht oder durch die Reaktion einzelner Komponenten miteinander. Die physikalische Stabilität beschreibt die Beständigkeit einer Emulsion gegen Veränderungen des dispersen Zustandes (siehe nächster Abschnitt). In dieser Arbeit wird untersucht, inwieweit $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen geeignete Strukturen zur Verkapselung darstellen. Dafür, und für deren Anwendbarkeit in der Praxis, ist vor allem die physikalische Stabilität entscheidend. Hierbei wird zwischen kurzzeitiger und langzeitiger Stabilität unterschieden. Unter Kurzzeitstabilität ist der Zeitraum der Herstellung zu verstehen, der im Bereich von wenigen Sekunden bis hin zu einigen Stunden liegen kann. Die Langzeitstabilität umfasst die Zeit bis hin zum Verbrauch des Produktes, welche im Bereich von Wochen bis Monaten liegen kann [Das et al., 1991; Schubert, 2005].

Physikalische Stabilität von Emulsionen im Allgemeinen

Unter physikalischer Stabilität ist die Beständigkeit einer Emulsion gegen Veränderungen des dispersen Zustandes zu verstehen, d.h. eine Emulsion gilt als physikalisch stabil, wenn ihre Tropfengrößenverteilung unabhängig vom Ort in der Probe und von der Zeit ist [Das et al., 1991]. Dies gilt sowohl für einfache als auch für multiple Emulsionen. Bei der Emulsionsherstellung kommt es zu einer Vergrößerung der Grenzfläche zwischen den Flüssigkeitsphasen, wodurch die Grenzflächenenergie zunimmt. Da das System jedoch bestrebt ist, einen möglichst energiearmen Zustand einzunehmen, kann es zum Zusammenfließen der dispersen Tropfen kommen, was als **Koaleszenz** bezeichnet wird. Die Stabilität von Tropfen gegen Koaleszenz wird vor allem von der Stabilität des Grenzflächenfilms zwischen zwei potentiell koaleszierenden Tropfen und der elektrostatischen Grenzschicht zwischen ihnen bestimmt [Opawale et al., 1998a; Opawale et al., 1998b; Jiao et al., 2002]. Da an der Tropfengrenzfläche anziehende van-der-Waals Kräfte, anziehende oder abstoßende elektrostatische

2.1 Struktur und physikalische Stabilität von einfachen und multiplen Emulsionen

Kräfte sowie sterische Wechselwirkungen auftreten, kann eine ausreichende Stabilität der Emulsionen gegen Koaleszenz nur dann sichergestellt werden, wenn sich als Summe dieser Kräfte eine abstoßende Kraft zwischen den Tropfen einstellt [Cheng et al., 2005]. Wenn alle im System vorhandenen Tropfen koaleszieren, kommt es zu einer vollständigen Phasentrennung, was als **Brechen** der Emulsion bezeichnet wird.

Daneben gibt es noch vier weitere Destabilisierungsmechanismen, die zu einer Veränderung der Emulsionsstruktur führen können. Hierzu zählen die Sedimentation/Aufräumung, die Flockung oder Aggregation, die Ostwaldreifung und die Phaseninversion.

Bei der **Sedimentation** bzw. beim **Aufräumen** sammelt sich aufgrund von Dichteunterschieden die weniger dichte Phase an der Oberfläche der Emulsion. Die **Aggregation** bzw. **Flockung** bedingt, dass die anziehenden Kräfte zwischen Tropfen groß genug sind, um die thermischen Bewegungen der Tropfen zu überwinden. Als Folge lagern sich die Tropfen aneinander an, wobei die Grenzfläche zwischen ihnen erhalten bleibt. Da Aggregate schneller sedimentieren bzw. aufräumen als Einzeltropfen, kommt es durch Aggregation zu einer/m verstärkten Sedimentation/Aufräumen. Darüber hinaus stellt Aggregation oft eine Vorstufe von Koaleszenz dar. Sind die beiden phasenbildenden Flüssigkeiten nicht völlig unlöslich ineinander, kann außerdem **Ostwaldreifung** auftreten. Hierbei kommt es zu einer Diffusion von Molekülen aus kleinen Tropfen durch die kontinuierliche Phase hin zu größeren Tropfen. Die großen Tropfen wachsen als Folge an, während die kleinen immer kleiner werden bis hin zu deren völligem Verschwinden. Treibende Kraft hierfür sind verschiedene chemische Potentiale in Tropfen unterschiedlicher Tropfengröße. Bei der **Phaseninversion** werden kontinuierliche und disperse Phase „vertauscht“, d.h. die kontinuierliche Phase wird zur dispersen und umgekehrt [Tadros, 1983; Schubert, 2005]. Als Ursache werden in der Literatur unterschiedliche Mechanismen diskutiert, die auf Koaleszenzvorgängen basieren und stark vom Stoffsystem abhängen. Während des Emulgierens kann eine Phaseninversion durch Änderungen der Prozessparameter, z.B. des Energieeintrages, der Zugabegeschwindigkeit von Komponenten oder Temperaturveränderungen induziert werden. Außerdem spielt die Emulsionszusammensetzung eine wichtige Rolle [Tadros, 1983; Groeneweg et al., 1998; Salager, 2006; Rondon-Gonzalez et al., 2009].

Zur Stabilisierung von Emulsionen gegen Koaleszenz können **Emulgatoren** eingesetzt werden. Emulgatoren sind amphiphile Moleküle, d.h. sie besitzen sowohl einen hydrophilen als auch einen lipophilen Molekülteil. Dadurch lagern sie sich bevorzugt an der Phasengrenzfläche an, wodurch die Grenzflächenspannung sinkt. Mit zunehmender Konzentration an Emulgator-

molekülen steigt die Belegungsdichte der Grenzfläche bei gleichzeitiger Abnahme der Grenzflächenspannung. Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen den an der Grenzfläche adsorbierten Emulgatormolekülen und den in einer oder beiden Phasen gelösten. Ist die Grenzfläche maximal mit Emulgatormolekülen belegt, so ist das Minimum der Grenzflächenspannung für den eingesetzten Emulgator und die betrachtete Grenzfläche erreicht. Die entsprechende Emulgatorkonzentration wird als kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) bezeichnet. Bei einer weiteren Erhöhung der Emulgatorkonzentration kann es bei vielen Emulgatoren zur Mizellbildung in der Lösung kommen [Becher, 1983; Tadros, 2005; Schubert, 2005]. In der Praxis kann eine Vielzahl sowohl kurzkettiger als auch hochmolekularer Emulgatoren zur Verwendung kommen. Diese können außerdem in ionische und nichtionische Emulgatoren unterteilt werden. Je nach Molekülstruktur unterscheiden sie sich in ihrem Adsorptionsverhalten, der Anordnung an der Grenzfläche und dem Stabilisierungsmechanismus gegen Koaleszenz [Schuchmann et al., 2005; Tadros, 2005; Schubert, 2005]. So ist zum Beispiel die Adsorptionsgeschwindigkeit bei langkettigen, höhermolekularen Emulgatoren geringer als bei kurzkettigen [Mao et al., 2009]. Die Adsorption von kurzkettigen ionischen Emulgatoren führt zu einer gleichsinnigen Aufladung der Tropfengrenzflächen. Hierdurch entstehen Abstoßungspotentiale, die die Annäherung der dispergierten Tropfen verhindern können. In diesem Fall spricht man von elektrostatischer Stabilisierung. Durch die Adsorption von Proteinen oder anderen Biopolymeren können die Tropfen sterisch und im Falle ionischer Polymere auch elektrosterisch stabilisiert werden. Bei der sterischen Stabilisierung werden die zur Emulsion zugegebenen Makromoleküle an der Tropfenoberfläche adsorbiert. Nähern sich die Tropfen dann einander an, kann es zu einer gegenseitigen Behinderung der in die kontinuierliche Phase ragenden Polymerketten kommen. Dies verhindert eine weitere Annäherung der Tropfen und somit Koaleszenz. Im Falle der elektrosterischen Stabilisierung überlagern sich elektrostatische und sterische Effekte [Schubert, 2005]. Darüber hinaus kann es durch die Adsorption von langkettigen, höhermolekularen Emulgatoren auch zur Ausbildung eines viskoelastischen Grenzflächenfilms kommen, der die Tropfen neben sterischen und elektrostatischen Effekten gegen Flockung und Koaleszenz stabilisieren kann [Schuchmann et al., 2005; Muschiolik et al., 2007; Lakkis, 2007; Appelqvist et al., 2007]. Unter Verwendung von kurzkettigen, nichtionischen Emulgatoren kommt es in der Regel nicht zum Aufbau eines viskoelastischen und/oder geladenen Grenzflächenfilms. Die Stabilisierung erfolgt hier über hydrodynamische Effekte wie den Maragoni Effekt. Das heißt, wenn sich zwei Tropfen annähern, kommt es im Zwickelbereich der Tropfen zu einem osmotischen Druckunterschied zwischen dem Grenzflächenfilm und dem umgebenden Lösungsmittel. Das hat zur Folge, dass Flüssigkeit aus der

2.1 Struktur und physikalische Stabilität von einfachen und multiplen Emulsionen

kontinuierlichen Phase in den Zwickelbereich nachströmt, wodurch eine weitere Tropfenannäherung und damit Koaleszenz verhindert werden kann [Appelqvist et al., 2007].

Des Weiteren kann die Stabilität von Emulsionen insbesondere bei W_1/O -Emulsionen durch die Zugabe von **Elektrolyten** zur dispersen Wasserphase gesteigert werden. Bei Zugabe eines in der kontinuierlichen Phase unlöslichen Elektrolyten konnten zum Beispiel durch Ostwaldreifung ausgelöste Instabilitäten reduziert werden [Koroleva et al., 2003]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Emulsionsstabilität durch simultane Wechselwirkungen von Emulgatoren und Elektrolyten beeinflusst wird. So wurde zum Beispiel bei Verwendung von Polyglycerin-Polyricinoleat (PGPR) als lipophilem Emulgator eine deutliche Verbesserung der Stabilisierung von W_1/O -Emulsionen beobachtet, wenn Natriumchlorid (NaCl) in der W_1 -Phase gelöst war [Kanouni et al., 2002; Scherze et al., 2006]. Scherze et al. (2006) beobachteten bei Einsatz von Natriumchlorid außerdem eine stärkere Absenkung der Grenzflächenspannung, die Bildung kleinerer Tropfen sowie eine erhöhte Koaleszenzstabilität von PGPR-stabilisierten Emulsionen. Die Autoren erklärten das damit, dass die Stabilität von W_1/O -Emulsionen stark von der Robustheit des Grenzflächenfilms abhängt [Opawale et al., 1998a]. Elektrolyte können durch Interaktion mit dem Emulgator einen starren Grenzflächenfilm bewirken, da sie in der Lage sind, die Lipophilie des Emulgators zu erhöhen. Das wird damit begründet, dass Elektrolyte die folgenden Eigenschaften eines Emulgators verändern können [Kawashima et al., 1992; Knoth et al., 2007]:

- Den HLB-Wert (Hydrophilic-Lipophilic-Balance), der den hydrophilen und lipophilen Anteil von hauptsächlich nichtionischen Tensiden beschreibt
- Die Hydratationsbedingungen niedermolekularer Emulgatoren durch Verdrängung der Hydratationshülle

Darüber hinaus können sowohl die Kurz- als auch die Langzeitstabilität von Emulsionen durch die Zugabe von **Stabilisatoren** bzw. **Dickungsmitteln** erhöht werden. Typische in der Lebensmittelindustrie eingesetzte Stabilisatoren sind zum Beispiel Proteine oder Hydrokolloide. Bei Verwendung von Dickungsmitteln kommt es durch eine Erhöhung der Viskosität der kontinuierlichen Phase η_k zu einem langsameren Ausfließen der Zwickelflüssigkeit zwischen den Tropfen. Hierdurch verlängert sich die Dauer bis zum Kontakt zweier Grenzflächen, wodurch die Koaleszenzwahrscheinlichkeit und damit auch die Koaleszenzrate sinken (siehe Kapitel 2.3.3). Durch die Erhöhung von η_k wird außerdem die Sedimentationsgeschwindigkeit nach Stokes v_{St} (Gleichung 2.1) reduziert, was

2 Theoretische Grundlagen

sich positiv auf die Langzeitstabilität der Emulsionen auswirkt. Ist es möglich eine ausreichend hohe Fließgrenze der kontinuierlichen Phase aufzubauen, können Tropfenbewegungen sogar vollständig unterbunden werden.

$$v_{St} = \frac{(\rho_k - \rho_d) \cdot g \cdot x^2}{18 \cdot \eta_k} \quad 2.1$$

Mit:	ρ_k	Dichte der kontinuierlichen Phase
	ρ_d	Dichte der dispersen Phase
	g	Erdbeschleunigung
	x	Durchmesser

Beim Einsatz von Stabilisatoren ist allerdings zu beachten, dass die Verwendung von Makromolekülen wie Polysacchariden oder Proteinen in geringer Konzentration auch zu einer Destabilisierung des Systems führen kann. Nähern sich zwei Tropfen einander an, kann es im Zwickelraum zwischen den Tropfen zu einer Verarmung an Stabilisatormolekülen kommen. Hierdurch entstehen lokale osmotische Druckdifferenzen, die zur Flockung führen können (= „depletion flocculation“). Darüber hinaus kann es zur Bildung von Polymerbrücken zwischen benachbarten Tropfen kommen. Diese Art der Flockung wird als „bridging flocculation“ bezeichnet [Vrij, 1976; Cao et al., 1990; Dickinson, 1992; Dickinson et al., 1997a; Dickinson et al., 1997b; Appelqvist et al., 2007].

Nach Stokes (Gleichung 2.1) kann der Sedimentationsprozess außerdem durch die Reduktion der Tropfengröße x oder durch Angleichen der Dichten der beiden Phasen verlangsamt werden [Schubert, 2005]. Es ist zu berücksichtigen, dass die Stokes-Gleichung quantitativ betrachtet nur für Emulsionen mit geringen Dispersphasenanteilen gilt. Bei Systemen mit hohen Dispersphasenanteilen kommt es zusätzlich zu hydrodynamischen Wechselbeziehungen und falls ionische Emulgatoren vorhanden sind auch zu elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen den Tropfen. Hierdurch sinkt die Sedimentationsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Zunahme der scheinbaren Viskosität der Emulsionen. Chanamai et al. (2000) beobachteten zum Beispiel ab einem Dispersphasenanteil von 40 % kein Aufrahmen der von ihnen untersuchten O/W-Emulsionen mehr. Außerdem wiesen diese Emulsionen elastische Eigenschaften auf.

2.1 Struktur und physikalische Stabilität von einfachen und multiplen Emulsionen

Für hochkonzentrierte Systeme lässt sich die effektive Sedimentationsgeschwindigkeit $v_{St,eff}$ mit folgender Gleichung berechnen [Buscall et al., 1982]:

$$v_{St,eff} = v_{St} \cdot \left(1 - \frac{\varphi_V}{\varphi_{V,krit}}\right)^{r \cdot \varphi_{V,krit}} \quad 2.2$$

Mit: r Konstante
 φ_V Volumenanteil an disperser Phase
 $\varphi_{V,krit}$ Volumenanteil an disperser Phase bei dichtester Packung

Die grundlegenden Einflussfaktoren auf die Sedimentationsgeschwindigkeit, die in der Stokes-Gleichung definiert wurden, bleiben daher bestehen und können zur Verbesserung der Sedimentationsstabilität herangezogen werden [Chanamai et al., 2000; Appelqvist et al., 2007].

Physikalische Stabilität von Doppelemulsionen

Bei Doppelemulsionen sind neben den soeben beschriebenen allgemeinen physikalischen Destabilisierungsmechanismen noch einige Sonderfälle zu berücksichtigen. Da in einer Doppelemulsion zwei verschiedene Emulsionstypen gleichzeitig vorliegen, im Falle einer $W_1/O/W_2$ -Emulsion eine innere W_1/O -Emulsion und eine äußere O/W_2 -Emulsion, sind zur kinetischen Stabilisierung des Systems mindestens zwei verschiedene Emulgatoren notwendig: ein W/O -Emulgator bzw. lipophiler Emulgator, der die innere W_1/O -Emulsion stabilisiert und ein O/W -Emulgator bzw. hydrophiler Emulgator zur Stabilisierung der äußeren O/W_2 -Emulsion. Da laut Bancroft die Phase zur kontinuierlichen Phase wird, in der sich der Emulgator gegenüber der anderen Phase besser löst [Bancroft, 1913; Bancroft, 1915], muss der W/O -Emulgator eine bessere Löslichkeit in Öl, der O/W -Emulgator eine bessere Löslichkeit in Wasser aufweisen. Aufgrund dieser komplexen Struktur von Doppelemulsionen folgen zusätzliche Wechselwirkungen sowohl zwischen den inneren W_1 -Tropfen und der W_2 -Phase, zwischen den Öltropfen, aber auch zwischen den beiden Emulgatoren untereinander [Jiao et al., 2002]. Für Doppelemulsionen ergeben sich daher die folgenden, in Abb. 2-2 schematisch dargestellten, möglichen Destabilisierungsmechanismen, die oftmals auch parallel zueinander auftreten [Florence et al., 1981; Benichou et al., 2004; Appelqvist et al., 2007]:

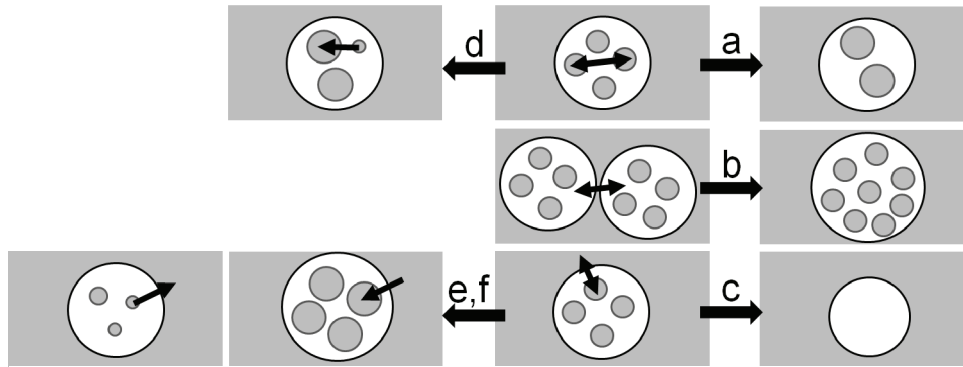


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der möglichen Destabilisierungsmechanismen in multiplen Emulsionen vom Typ $W_1/O/W_2$.

- a) Koaleszenz der inneren W_1 -Tropfen (analog zu W/O-Emulsionen)
- b) Koaleszenz der Öltröpfchen (analog zu O/W-Emulsionen)
- c) Koaleszenz zwischen den inneren W_1 -Tropfen und der umgebenden W_2 -Phase
- d) Ostwald-Reifung zwischen den inneren W_1 -Tropfen (analog zu W/O-Emulsionen)
- e) Ostwald-Reifung zwischen den inneren W_1 -Tropfen und den umgebenden W_2 -Tropfen
- f) Migration von Wasser, einschließlich möglicher gelöster hydrophiler Substanzen, zwischen der inneren und äußeren Wasserphase, durch die Ölschicht hindurch. Dies kann sowohl über Diffusion als auch über einen Transport in inversen Emulgatormizellen erfolgen [Garti, 1997b; Grossiord et al., 2001; Pays et al., 2002].

Die **Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase** (Fall c) ist vor allem wegen des Größenunterschiedes der inneren W_1 -Tropfen und der W_1/O -Tropfen kritisch. Die W_1/O -Tropfen sind in der Regel mindestens 10 Mal größer als die W_1 -Tropfen. Daher sind die anziehenden London-van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den O/W_2 -Grenzflächen, die auf die W_1 -Tropfen fast eben wirken, und den kleinen W_1 -Tropfen nahezu doppelt so groß wie zwischen den W_1 -Tropfen. Dies führt zu einer Annäherung der inneren Wassertropfen an die äußere Grenzfläche und damit zu einer Zunahme der Koaleszenzwahrscheinlichkeit mit der umgebenden W_2 -Phase. [Israelachvili, 1992; Ficheux et al., 1998]. Die beschriebenen Phänomene laufen unter erhöhter thermischer und mechanischer Belastung beschleunigt ab. Demnach ist bei der Herstellung und Lagerung von Doppulemulsionen auf besonders schonende Bedingungen zu achten [Dickinson, 1992; Ficheux et al., 1998; Grossiord et al., 2001; Pays et al., 2002]. Darüber hinaus spielen die ausgewählten Emulgatoren eine entscheidende Rolle. In Abhängigkeit des Emulgatorsystems kann die Verwendung von hohen Konzentrationen eines kurzkettigen hydrophilen

2.1 Struktur und physikalische Stabilität von einfachen und multiplen Emulsionen

Emulgators in der W_2 -Phase die Emulsionsstabilität bzw. Einschlusseffizienz reduzieren. Als Ursache werden Wechselwirkungen der lipophilen und hydrophilen Emulgatoren an der O/W_2 -Grenzfläche diskutiert, die zu einer Abnahme der Koaleszenzstabilität führen können [Rosano et al., 1998; Ficheux et al., 1998; Kanouni et al., 2002]. Demzufolge sollte die Konzentration des lipophilen Emulgators die des kurzkettigen, hydrophilen Emulgators um mindestens den Faktor 2 übersteigen [Matsumoto et al., 1989; Garti, 1997a; Garti et al., 1998]. Allerdings kann unter Verwendung von langkettigen hydrophilen Emulgatoren wie zum Beispiel Proteinen auch bei Reduktion des Anteils an lipophilem Emulgator eine zufriedenstellende Koaleszenzstabilität erreicht werden. Dies wird auf Seite 13 f noch detaillierter beschrieben. Darüber hinaus kann die Koaleszenzstabilität von Doppelemulsionen durch Zugabe von Makromolekülen wie z.B. Gelatine oder anderen Hydrokolloiden (siehe Kapitel 2.4) zur inneren Wasserphase erhöht werden. Dies führt zur Ausbildung von viskoelastischen, gelartigen Strukturen an der W_1/O -Grenzfläche oder zum kompletten Ausgelieren der inneren Wasserphase, was die Koaleszenz unter den W_1 -Tropfen, aber auch mit der umgebenden W_2 -Phase reduzieren kann [Surh et al., 2007; Dickinson, 2011].

Zur **Ostwald-Reifung** (Fall e) zwischen den inneren W_1 -Tropfen und der umgebenden W_2 -Phase kann es zum Beispiel im Falle von hyperosmotischen Bedingungen kommen. Hyperosmotische Bedingungen liegen vor, wenn die Osmolarität (Anzahl an osmotisch aktiven Molekülen pro kg Lösungsmittel) der W_1 -Phase durch osmotisch aktive Substanzen wie z.B. Salz erhöht ist. Das Wasser wird dem Konzentrationsgradienten folgen und von der äußeren in die innere Wasserphase diffundieren. Hierdurch kommt es zu einer Zunahme der inneren W_1 -Tropfengröße, was wiederum zu einem Anschwellen der Öltropfen bis zu einer kritischen Größe führt. Diese ist abhängig vom Stoffsystem. Der Einfluss von Parametern wie z.B. der Viskosität der Ölphase oder dem Emulgatorsystem wird im Folgenden noch diskutiert. Nach Überschreiten der kritischen Größe kann es zum Bruch der Ölmembran und damit zur Freisetzung eingeschlossener Substanzen kommen. Ob es zum Bruch kommt und wie stark bzw. wie schnell die Freisetzung eingeschlossener Materie ist, hängt von der Art und Konzentration des eingesetzten lipophilen Emulgators ab. Untersuchungen zeigten, dass höhere Konzentrationen an lipophilem Emulgator die Schwellkapazität der Öltropfen erhöhen und damit die Freisetzung eingeschlossener Substanzen reduziert werden kann. Dies wird damit erklärt, dass der lipophile Emulgator, wenn er in ausreichender Konzentration vorhanden ist, nicht nur die innere W_1/O -Grenzfläche stabilisiert, sondern auch zur äußeren O/W_2 -Grenzfläche wandert und dort an Stellen adsorbieren kann, an denen aufgrund des Anschwellens der Öltropfen nicht ausreichend Emulgatormoleküle vorhanden sind [Matsumoto et al., 1980; Dickinson, 1992;

2 Theoretische Grundlagen

Jager-Lezer et al., 1997; Rosano et al., 1998; Ficheux et al., 1998; Grossiord et al., 2001; Pays et al., 2002]. Bei umgekehrtem Konzentrationsgradienten kommt es durch den osmotischen Druck zu einer Diffusion von Wasser aus den inneren Wassertropfen in die umgebende W_2 -Phase (Fall e). Dieser Fall der Ostwald-Reifung führt auch dazu, dass aktive Stoffe, die in der W_1 -Phase gelöst sind, durch **direkten Transport über die Ölschicht** in die äußere Wasserphase transportiert werden (Fall f). Im Extremfall kann es auch zu einem vollständigen Verlust der inneren Wassertropfen in die umgebende Wasserphase kommen, was zu einer einfachen O/W-Emulsion führt [Matsumoto et al., 1989; McClements et al., 1996; Mezzenga et al., 2004].

Dem zur Ostwald-Reifung führenden Flüssigkeitsstrom J über die Ölmembran liegt die folgende Kinetik zugrunde:

$$J = L_P \cdot (\Delta \Pi - \Delta p_k) \quad 2.3$$

Mit:

J	Flüssigkeitsstrom
L_P	Permeabilitätskoeffizient der Ölphase für Wasser
$\Delta \Pi$	Osmotische Druckdifferenz zwischen W_1 und W_2
Δp_k	Kapillardruck- bzw. Laplace-Druckdifferenz zwischen W_1 und W_2

Nach dieser Gleichung ist J direkt proportional zum osmotischen Gradienten zwischen der inneren und äußeren Wasserphase. Gleichzeitig wirkt dem osmotischen Druckgradienten der hydrostatische Laplace-Druckgradient entgegen [Jager-Lezer et al., 1997]. Der Laplace-Druck, der auch als Kapillardruck p_k bezeichnet wird, kann über die Laplace-Gleichung berechnet werden, die in Gleichung 2.4 für kugelförmige Tropfen des Durchmessers x dargestellt ist [Walstra et al., 1998].

$$p_k = \gamma \cdot \frac{4}{x} \quad 2.4$$

Mit:

γ	Grenzflächenspannung zwischen disperser und kontinuierlicher Phase
----------	--

Um eine ausreichende Langzeitstabilisierung der Emulsion zu gewährleisten, müssen die Summe aus dem Laplace- und osmotischen Druck in W_1 und der osmotische Druck in W_2 ausgeglichen sein [Rosano et al., 1998; Kanouni et al., 2002]. Hierbei ist der Laplace-Druck direkt proportional zur reziproken Tropfengröße (siehe Gleichung 2.4). Aufgrund des erhöhten Dampfdruckes an der Oberfläche von kleinen Tropfen, ist die Menge einer gelösten Substanz in der direkten Umgebung des kleinen Tropfens umso größer, je kleiner seine

2.1 Struktur und physikalische Stabilität von einfachen und multiplen Emulsionen

Tropfengröße ist. Die hier gelösten Moleküle der Substanz werden entsprechend des Konzentrationsgradienten in Richtung niedrigerer Substanzkonzentrationen diffundieren, z.B. zur Grenzfläche größerer Tropfen bzw. im Falle der Doppelemulsionen zur äußeren O/W₂-Grenzfläche. Dieser Effekt spielt bei Doppelemulsionen aufgrund des Größenunterschiedes der W₁- und der W₁/O-Tropfen eine entscheidende Rolle. Daher muss der osmotische Druck der W₂-Phase z.B. durch Zugabe von osmotisch aktiven Substanzen so eingestellt werden, dass er im Gleichgewicht mit dem Laplace- und osmotischen Druck in den W₁-Tropfen ist [Rosano et al., 1998].

Magdassi und Garti (1986) konnten außerdem zeigen, dass es bei Doppelemulsionen, deren osmotischer Gradient durch Zugabe von Elektrolyten eingestellt war, auch ohne Zerstörung der W₁/O- sowie der O/W₂-Grenzflächenfilme zur Migration von Wasser, einschließlich möglicher gelöster hydrophiler Substanzen, zwischen der inneren und äußeren Wasserphase, durch die Ölschicht hindurch (Fall f) kommen kann. Als Ursache für diesen Transport aktiver Substanzen über die Ölschicht wird neben der direkten *Diffusion* ein Transport in *inversen Emulgatormizellen* diskutiert [Magdassi et al., 1986; Garti, 1997b; Grossiord et al., 2001; Pays et al., 2002].

Die Stabilität der Emulsionen bzw. die Freisetzung eingeschlossener Substanzen kann auch durch Anpassung der *Ölphase* erfolgen. Ein hoher Anteil an mittelkettigen Fettsäuren, d.h. Fettsäuren mit niedrigem Schmelzpunkt, korreliert mit einer Erhöhung der Freisetzung. Analog nimmt die Barrierewirkung mit dem Gehalt an langkettigen, gesättigten und damit höher schmelzenden Fettsäuren zu [Weiß, 2006; Kramer et al., 2007]. Gleichzeitig zeigten Grossiord et al. (2001) einen direkten Zusammenhang zwischen der Ölviskosität und der zuvor beschriebenen Schwellkapazität der Ölphase. Je niedriger die Ölviskosität ist, umso höher ist die Schwellkapazität. Als Ursache wird diskutiert, dass bei niedriger Ölviskosität eine schnellere Migration des lipophilen Emulgators an die äußere O/W₂-Grenzfläche möglich ist.

Unter Verwendung von *langkettigen hydrophilen Emulgatoren* in der äußeren Wasserphase, wie zum Beispiel Proteinen, verbessern sich die Stabilität und die Einschlusseigenschaften von multiplen Emulsionen bedeutend. Darüber hinaus kann die Verwendung von Polymeren auch bei Reduktion des Anteils an lipophilem Emulgator zu einer zufriedenstellenden Stabilität gegen Koaleszenz führen. Als Ursache werden sterische Abstoßungskräfte sowie eine erhöhte Elastizität des Grenzflächenfilms diskutiert, da die elastischeren Grenzflächenfilme stabiler sind gegenüber dem Anschwellen der dispersen Phase [Garti, 1997b; Garti, 1998; Pays et al., 2002; Benichou et al., 2004; Dickinson, 2011]. Inwieweit langkettige Emulgatoren Mizellen bilden oder zwischen den Grenzflächen wandern, ist noch nicht allgemein geklärt. Michaut

et al. (2004) beobachteten aber bei Versuchen mit Poly-Natriumacrylat keine Migration des langkettigen Emulgators an die innere W_1/O -Grenzfläche [Michaut et al., 2004].

Als weitere Möglichkeit zur Stabilisierung von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen werden **Protein-Polysaccharid-Konjugate** diskutiert, die unter kontrollierten Trocknungs- und Temperaturbedingungen hergestellt werden. Über einen der Maillard-Reaktion ähnelnden Reaktionsverlauf kommt es zur kovalenten Bindung zwischen Protein und Polysaccharid. Da jedes Polysaccharidmolekül nur eine reduzierende Gruppe besitzt, die unter den gegebenen Bedingungen mit den Amin (Lysin-) Gruppen der Proteine reagieren kann, ist davon auszugehen, dass die Konjugate aus nur einem Protein, aber mehreren Polysaccharidanteilen zusammengesetzt sind. Vorteile der Konjugate gegenüber einfachen Proteinen sind deren erhöhte Hydrophilie und bessere Emulgiereigenschaften, die auf einer besseren sterischen Tropfenstabilisierung und der Ausbildung einer zusätzlichen viskoelastischen Polysaccharidschicht um die Öltropfen beruhen [Dickinson, 1992; Dickinson, 2011]. Als weitere Vorteile für den Einsatz von Protein-Polysaccharid-Konjugaten in der Lebensmittelindustrie wird in der Literatur außerdem von einer erhöhten Einschlusseffizienz verkapselter Substanzen, einer verbesserten Säurestabilität sowie antioxidativen und antimikrobiellen Effekten berichtet [Nakamura et al., 1991; Nakamura et al., 1992a; Nakamura et al., 1992b; Shu et al., 1996; Knoth et al., 2007].

2.2 Multiple Emulsionen als Trägersystem hydrophiler Substanzen

Viele wertgebende Inhaltsstoffe wie zum Beispiel pharmazeutische Wirkstoffe, Vitamine, bioaktive Peptide, Antioxidantien oder auch Mineralstoffe werden oft bereits während der Lagerung des Produktes, beim Verzehr oder auf dem Weg zum Wirkort im menschlichen Körper abgebaut oder es kommt zu Änderungen ihrer molekularen Konformation. Wenn sie nicht in geeigneten Formulierungen vorliegen, wird eine Vielzahl der Substanzen überhaupt nur zu einem sehr geringen Anteil vom Körper aufgenommen. In diesem Fall wäre für die angestrebte Wirkung eine Überdosierung bis an die Grenzen des physikalisch möglichen notwendig. Und selbst dann ist die notwendige Konzentration am Wirkort nicht für jeden Stoff zu gewährleisten. Durch die Formulierung bzw. Verkapselung in geeigneten Trägersystemen wäre es denkbar, diese Substanzen zum einen gegen Abbau zu schützen, zum anderen eine kontrollierte Freisetzung am gewünschten Wirkort zu ermöglichen. Es ist davon auszugehen, dass hierdurch die Bioverfügbarkeit und biologische Wirkung der Substanz erhöht werden. Da sich unterschiedliche wertgebende Inhaltsstoffe maßgeblich in ihren

2.2 Multiple Emulsionen als Trägersystem hydrophiler Substanzen

Eigenschaften unterscheiden, müssen für verschiedene Substanzen unterschiedliche Trägersysteme gewählt werden. Als Beispiele sind Suspensionen, Solubilisate, Liposomen oder auch Emulsionen zu nennen, deren Eigenschaften in Tab. 2-1 zusammengefasst sind [Gouin, 2004; McClements et al., 2009].

Tab. 2-1: Beispiele für Trägersysteme zur Formulierung von bioaktiven Substanzen und deren Eigenschaften.

Struktur	Eigenschaft	Effekt	Literatur
Suspension	Kristalline Feststoffpartikel	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Lösungsgeschwindigkeit • Farbinstensivierung 	[Müller et al., 1999]
Solubilisat	Einschluss der Substanz in Mizellen	<ul style="list-style-type: none"> • Gezielter Transport an den Wirkort • Durch Solubilisierung können Substanzen in optisch klare Lösungen eingebracht werden. 	[Gouin, 2004; Tadros, 2005; Engel, 2007b]
Liposom	<ul style="list-style-type: none"> • Einschluss in Lipid-Doppelschicht oder im Inneren des Liposoms • Ähnlichkeit zu Zellmembranen 	<ul style="list-style-type: none"> • Gezielter Transport an den Wirkort • Stabilisierung der Substanzen 	[Gouin, 2004; Tadros, 2005; Engel, 2007b; McClements et al., 2009]
Emulsion	• Substanz gelöst in der dispersen Phase	<ul style="list-style-type: none"> • Übersättigung in submikronen Tropfen möglich • Stabilisierung der Substanzen • Gezielter Transport an den Wirkort • Magenstabilität (O/W) 	[Ax, 2003; Engel, 2007a]

Auch im Lebensmittelbereich ist es oft wünschenswert, Nahrungsmittel mit wertgebenden, gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen wie zum Beispiel sekundären Pflanzenstoffen, Vitaminen oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren

anzureichern. Mit Bezug auf eine gesunde Ernährung sind hier insbesondere wasserbasierte Lebensmittel wie Fruchtsäfte oder Joghurts von großem Interesse. Als wasserdispergierbare Formulierung zum Einschluss von Omega-3-Fettsäuren [McClements et al., 2000] oder lipophiler sekundärer Pflanzenstoffe wie z.B. Carotinoiden oder Phytosterolen [Ax, 2003; Engel, 2007a] haben sich O/W-Emulsionen bewährt. Hydrophile Substanzen hingegen können in der inneren W_1 -Phase von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen verkapselt werden [Gouin, 2004; Appelqvist et al., 2007]. Durch die mehrphasige Struktur besteht die Möglichkeit, die eingeschlossenen, hydrophilen Substanzen wiederum in ein wässriges Produkt einzubringen.

Die Freisetzung der formulierten Substanzen erfolgt basierend auf den zuvor beschriebenen Destabilisierungsmechanismen (siehe Kapitel 2.1). Sie kann durch Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes, durch Anwendung von Druck oder Scherung, durch den Zusatz von Emulgatoren, Enzymen sowie durch osmotische Kräfte oder einfach nur durch die Zeit induziert werden [Pothakamury et al., 1995; Gouin, 2004; Weiß, 2006].

2.3 Herstellung von einfachen und multiplen Emulsionen

2.3.1 Prinzipielle Herstellungsverfahren

Sowohl einfache als auch multiple Emulsionen können prinzipiell über mechanische oder physikalisch-chemische Verfahren hergestellt werden. Zu den physikalisch-chemischen Verfahren zählen zum Beispiel die Phaseninversions-Temperatur-Methode (PIT-Methode), bei der feindisperse Emulsionen durch Erhöhung der Temperatur über den Phaseninversionsbereich erzeugt werden [Shinoda et al., 1964; Allouche et al., 2003; Salager et al., 2003], oder die Kondensationsmethode, bei der Tropfen durch eine mittels Keimen induzierte Kondensation gebildet werden [Mollet et al., 2000]. Hierbei werden Emulsionen ohne mechanischen Energieeintrag erzeugt. Diese Verfahren sind nur für spezifische Stoffsysteme unter sehr definierten Bedingungen anwendbar. Außerdem sind die so erzeugten Emulsionen auch nur unter speziellen Bedingungen stabil. Die Herstellung von Emulsionen über den Eintrag mechanischer Energie hingegen ist vielseitiger anwendbar.

Beim mechanischen Emulgieren werden zunächst die kontinuierliche Phase, die disperse Phase sowie weitere Hilfsstoffe wie Emulgatoren oder Stabilisatoren miteinander vermischt. Hierdurch entsteht eine grobdisperse Rohemulsion. Anschließend wird die Grenzfläche zwischen den Phasen unter Eintrag weiterer mechanischer Energie deformiert und schließlich aufgebrochen, wodurch eine feindisperse Emulsion entsteht. Dabei ist die Stabilisierung der neu gebildeten

2.3 Herstellung von einfachen und multiplen Emulsionen

Grenzflächen entscheidend dafür, ob die entstandenen Tropfen erhalten bleiben oder wieder koaleszieren [Walstra, 1983; Walstra et al., 1998]. Typische mechanische Emulgiervverfahren werden in Kapitel 2.3.4 vorgestellt.

Die mechanische Herstellung von Doppelemulsionen erfolgt über ein zweistufiges Emulgiervverfahren. Hierbei wird die innere W_1/O -Emulsion unter Anwendung von energie- und scherintensiven Emulgiervverfahren hergestellt, um möglichst kleine Tropfen zu erzeugen. Dies ist wichtig, um einen hohen Füllgrad an inneren Tropfen realisieren zu können.

Bei der Herstellung der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsion im zweiten Emulgierschritt ist darauf zu achten, Verfahren mit möglichst geringer Scherbelastung zu wählen, um den Verlust an inneren W_1 -Tropfen durch Koaleszenz der Tropfen untereinander und mit der umgebenden W_2 -Phase zu vermeiden [Garti et al., 1998]. In diesem zweiten Emulgierschritt kann es durch die Dehnung und Scherung der W_1/O -Tropfen zu einer Vergrößerung der O/W_2 -Grenzfläche bei konstantem Tropfenvolumen und zur Entstehung interner Strömungen kommen. Daher ist es möglich, dass ein größerer Anteil an W_1 -Tropfen an die äußere Grenzfläche gelangt und mit der umgebenden W_2 -Phase koalesziert [Klahn et al., 2002]. Folglich muss im zweiten Emulgierschritt stets abgewägt werden, wie hoch die eingetragene Dehnung und Scherung sein dürfen, um den Verlust an inneren Tropfen zu minimieren und wie hoch sie sein müssen, um Doppelemulsionen mit einer gewünschten W_1/O -Tropfengröße herzustellen.

2.3.2 Tropfenaufbruch beim mechanischen Emulgieren

Damit es während des Emulgierens zum Tropfenaufbruch kommt, müssen die Tropfen ausreichend lange über ein kritisches Maß verformt werden. Deformierende Spannungen, die sich je nach vorherrschenden Strömungsbedingungen unterscheiden, werden über die kontinuierliche Phase übertragen. Die Emulgiermaschine dient hierbei der Erzeugung zerkleinerungswirksamer Strömungen. Den deformierenden Spannungen wirken an der Tropfengrenzfläche formerhaltende Spannungen entgegen. Hierzu zählen die Grenzflächenspannung γ zwischen disperser und kontinuierlicher Phase, die in Abhängigkeit des Kapillardrucks p_k beschrieben werden kann, sowie die rheologischen Eigenschaften des Grenzflächenfilms. Bei niedermolekularen Emulgatoren, die keine viskoelastischen Filme an der Grenzfläche ausbilden, kann der Einfluss der Grenzflächenrheologie vernachlässigt werden [Erni et al., 2005]. In diesem Fall sind die formerhaltenden Spannungen direkt proportional zur Grenzflächenspannung γ bzw. dem Kapillardruck p_k , der über die in Kapitel 2.1 d) beschriebene Laplace-Gleichung (Gleichung 2.4) berechnet werden kann [Walstra, 1983; Walstra et al., 1998].

2 Theoretische Grundlagen

Gleichzeitig wirken im Tropfeninneren und in der kontinuierlichen Phase viskose Kräfte einer Tropfendeformation entgegen. Zu diesen Kräften zählt zum einen die Fließgrenze der dispersen Phase, die anfangs einer Tropfendeformation entgegensteht. Zum anderen wirkt die dynamische Viskosität der dispersen Phase η_d nach Überwindung der Fließgrenze einer weiteren Deformation entgegen. Die hieraus resultierenden viskosen Spannungen σ_η innerhalb des dispersen Tropfens können folgendermaßen abgeschätzt werden [Walstra, 1983]:

$$\sigma_\eta = \frac{2 \cdot \eta_d \cdot \left(\frac{\sigma}{\rho_d}\right)^{1/2}}{x} \quad 2.5$$

Mit: σ deformierende Spannung
 ρ_d Dichte der dispersen Phase
 x Tropfendurchmesser

Um zu beurteilen, ob es während des Emulgierens zum Tropfenaufbruch kommt, werden die konkurrierenden Kräfte an der Grenzfläche zwischen kontinuierlicher und disperser Phase ins Verhältnis zueinander gesetzt. Eine hierfür oft verwendete charakteristische dimensionslose Größe ist die Weber-Zahl We . Die Weber-Zahl, die den Einfluss der viskosen Spannungen nicht berücksichtigt, ist definiert als der Quotient von deformierenden Spannungen σ und formerhaltenden Spannungen, die in diesem Fall durch die kapillaren Spannungen und damit den Kapillardruck p_k beschrieben werden:

$$We = \frac{\text{deformierende Spannungen}}{\text{formerhaltende Spannungen}} = \frac{\sigma}{p_k} = \frac{\sigma \cdot x}{4 \cdot \gamma} \quad 2.6$$

Demzufolge kann ein Tropfen aufgebrochen werden, wenn die Weber-Zahl einen bestimmten kritischen Wert We_{krit} überschreitet [Walstra, 1983].

Eine weitere dimensionslose Kennzahl zur Beschreibung der Tropfendeformation ist die Kapillar-Zahl Ca , die aus dem Quotient der Weber-Zahl We zur Reynolds-Zahl Re gebildet wird. Über die Re -Zahl, die das Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften beschreibt, wird hier der Einfluss der viskosen Spannungen berücksichtigt [Grace, 1982].

$$Ca = \frac{We}{Re} = \frac{\eta_k \cdot v}{\gamma} \quad 2.7$$

2.3 Herstellung von einfachen und multiplen Emulsionen

Hierbei ist v die charakteristische Geschwindigkeit der kontinuierlichen Phase gegenüber dem Tropfen und η_k die dynamische Viskosität der kontinuierlichen Phase.

Die dargestellten dimensionslosen Kennzahlen beschreiben die Tropfendeformation sowie den Tropfenaufbruch. Damit ein Tropfen aber tatsächlich aufbricht, müssen die angreifenden Spannungen ausreichend lange wirken. Diese kritische Deformationszeit hängt u.a. von der Viskosität der dispersen Phase η_d und den anliegenden Spannungen σ ab. Sie kann mit der folgenden Gleichung abgeschätzt werden [Walstra, 1993]:

$$t_{def,krit} = \frac{\eta_d}{\sigma - p_k} \quad 2.8$$

Die zum Tropfenaufbruch notwendigen Spannungen werden je nach Emulgiersystem über laminare oder turbulente Strömungen eingebracht. Im Falle einer **laminaren Strömung** sind die Tropfen Schub- oder Dehnspannungen ausgesetzt. Hierbei kann die Deformation der Tropfen durch Scherung oder Dehnung verursacht werden. Der Zusammenhang zwischen der laminaren kritischen Kapillar-Zahl $Ca_{lam,krit}$ und dem Viskositätsverhältnis λ , gebildet aus dem Quotient der Viskosität der dispersen Phase zur Viskosität der kontinuierlichen Phase, ist in Abb. 2-3 für Scher- und Dehnströmungen dargestellt [Grace, 1982].

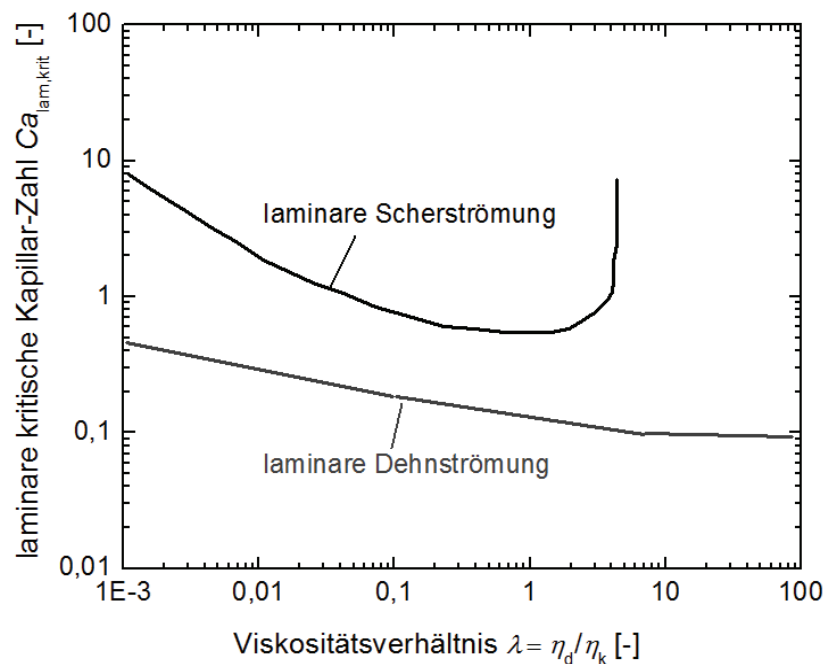


Abb. 2-3: Abhängigkeit der laminaren kritischen Kapillar-Zahl $Ca_{lam,krit}$ vom Viskositätsverhältnis λ , nach [Grace, 1982].

2 Theoretische Grundlagen

Die für einen Tropfenaufbruch in laminarer Scherströmung notwendigen kritischen Kapillarzahlen sind für Viskositätsverhältnisse im Bereich $0,1 \leq \lambda \leq 1$ am niedrigsten. Für $\lambda > 4$ ist ein Tropfenaufbruch theoretisch unmöglich, weil hier $Ca_{lam,krit} \rightarrow \infty$ strebt. In diesem Fall kann die tatsächliche Tropfendeformation der durch die Scherströmung theoretisch induzierten Deformation nicht folgen. Das führt dazu, dass eine Erhöhung der Scherrate nur zu einer Rotation der Tropfen, aber nicht zu deren Aufbruch führt [Stone, 1994]. Für Viskositätsverhältnisse $\lambda < 0,1$ nimmt die laminare kritische Kapillarzahl ebenfalls zu, weil die Tropfen stärker deformiert werden können, bevor es zum Tropfenaufbruch kommt. In Dehnströmungen hingegen ist der Einfluss des Viskositätsverhältnisses deutlich geringer. Die Tropfen werden hier zu langgezogenen Filamenten deformiert, so dass bei ausreichend langen Deformationszeiten auch für $\lambda \gg 4$ ein effektiver Tropfenaufbruch möglich ist.

Die zuvor beschriebenen Modelle zum Tropfenaufbruch gehen alle von einem Einzeltropfen in einer Newtonschen Flüssigkeit aus. In praktischen Anwendungen bestehen die Emulsionen aber aus einem höheren Anteil an disperser Phase, so dass der Aufbruch mehrerer Tropfen betrachtet werden muss. Wechselwirkungen zwischen den Tropfen können hier das Aufbruchverhalten entscheidend beeinflussen. Zum einen wird sich die Viskosität der Emulsion und damit des, den aufzubrechenden Tropfen umgebenden, Mediums ändern. Zum anderen kann der Aufbruch gedehnter Tropfen durch Kollisionen mit kleineren Tropfen verhindert werden. Dies ist bereits ab einem Dispersphasenanteil von 1 % möglich [Janssen et al., 1995]. Für Emulsionen mit Dispersphasenanteilen bis zu 70 % ist es aber denkbar, die beschriebenen Modelle anzupassen, indem die Viskosität der kontinuierlichen Phase η_k durch die Viskosität der Emulsion η_e ersetzt wird [Armbruster, 1990; Jansen et al., 2001]. Jansen et al. (2001) zeigten hiermit für Systeme, bestehend aus den gleichen dispersen und kontinuierlichen Phasen, eine gute Übereinstimmung zwischen $Ca_{lam,krit}$ von Einzeltropfen und $Ca_{lam,krit}$ von Emulsionen [Jansen et al., 2001].

Die Tropfenaufbruchsmechanismen in **turbulenten Strömungen** sind je nach Tropfengröße und Größe der vorliegenden Wirbel unterschiedlich. Ist ein Tropfen wesentlich kleiner als der Wirbel, dem er ausgesetzt ist, so wird er diesem folgen. In diesem Fall können nur auftretende Scherkräfte zum Tropfenaufbruch führen. Sind die Wirbel und Tropfen ähnlich groß, entstehen durch Trägheitskräfte an der Grenzfläche Druckdifferenzen, die zu bauchigen Tropfendeformationen und schließlich zum Tropfenaufbruch führen können [Walstra, 1983; Walstra et al., 1998; Schubert, 2005].

2.3 Herstellung von einfachen und multiplen Emulsionen

Die beschriebenen Deformationen bewirken im Tropfen interne Strömungen, die viskose Spannungen und dynamische Drücke hervorrufen können. Neben den viskosen Spannungen σ_η wirkt auch hier die Grenzflächenspannung γ als formerhaltende Spannung. Zwei von Hinze (1955) definierte, gängige Kennzahlen zur Beschreibung des Tropfenaufbruchs in turbulenter Strömung sind die bereits zuvor erläuterte Weber-Zahl sowie die im Folgenden dargestellte Ohnsorge-Zahl Oh [Hinze, 1955; Schubert, 2005].

$$Oh = \frac{\eta_d}{(\gamma \cdot \rho_d \cdot x)^{0,5}} \quad 2.9$$

Diese beschreibt den dämpfenden Viskositätseffekt der Flüssigkeit im Tropfen.

Ausgehend von diesen beiden Kennzahlen ist es möglich, den Tropfenaufbruch in turbulenter Strömung durch die folgende Funktion darzustellen:

$$We_{krit} = K \cdot [1 + \phi(Oh)] \quad 2.10$$

Hierbei steht We_{krit} für die kritische Weber-Zahl, K für eine Konstante und $\phi(Oh)$ für eine Funktion der Ohnsorge-Zahl.

Wie die Funktion $\phi(Oh)$ genau verläuft, ist nicht bekannt. Unterschiedliche Forschergruppen [Hinze, 1955; Arai et al., 1977] zeigten jedoch, dass der Funktionswert für kleine Ohnsorge-Zahlen gegen Null geht. In diesem Fall hängen Tropfenaufbruch und -deformation nur von der Weber-Zahl ab [Schubert, 2005].

2.3.3 Tropfenstabilisierung

Wesentliche Voraussetzung für eine stabile Emulsion ist, dass die beim Tropfenaufbruch neu entstandenen Oberflächen schnell stabilisiert werden, da die Tropfen aufgrund von Wärme, Sedimentationseffekten und während des Homogenisierprozesses insbesondere durch die erzeugten Strömungen ständig in Bewegung sind und daher kollidieren können. Hierbei nähern sich die Tropfen einander an, wobei die kontinuierliche Phase zwischen den Tropfen verdrängt wird. Ausschlaggebend dafür, ob es anschließend auch zur Koaleszenz kommt, ist die Zwickelflüssigkeit zwischen den Tropfen, über die

2 Theoretische Grundlagen

die folgenden Wechselwirkungskräfte interagieren können [Chesters, 1991; Israelachvili, 1992; Schubert, 2005]:

- Hydrodynamische Kräfte aufgrund viskoser Reibung der umgebenden kontinuierlichen Phase
- Intermolekulare Kräfte zwischen den Tropfen. Hierzu zählen van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte, sterische sowie strukturelle Kräfte.

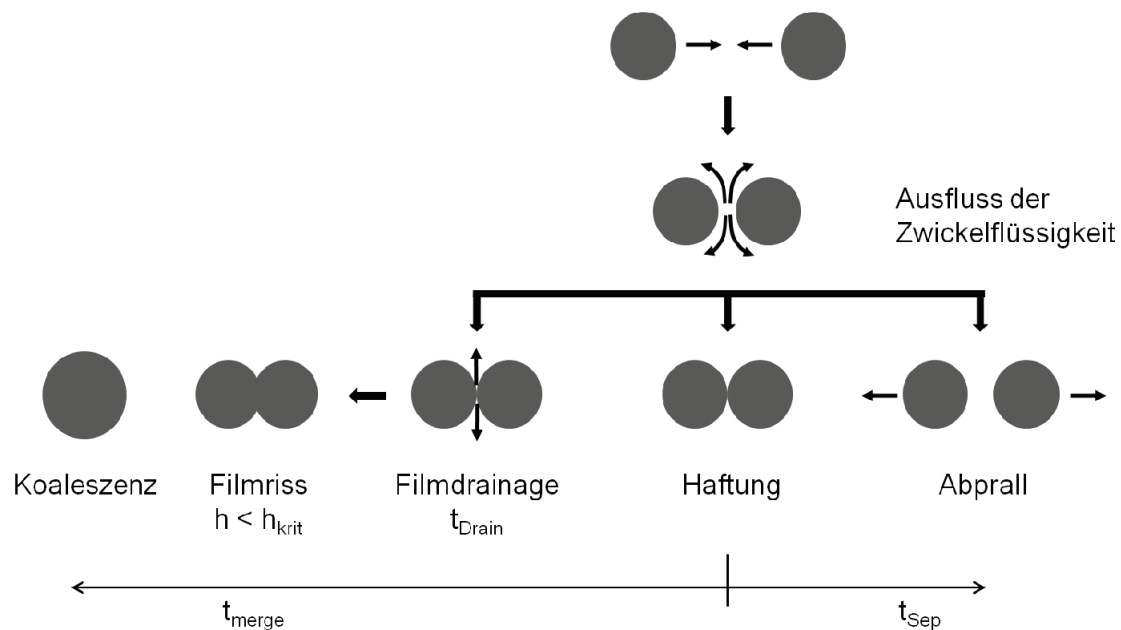


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der zur Tropfenkoaleszenz in Emulsionen führenden Vorgänge [Danner, 2001].

Sind anziehende und abstoßende Kräfte im Gleichgewicht, können die Tropfen als Aggregate bzw. Flocken verharren. Sind die abstoßenden Kräfte größer als die anziehenden, entfernen sich die Tropfen wieder voneinander. Die Emulsion ist in diesem Fall stabil [Ivanov et al., 1997; Fletcher, 1998]. Die Zeit zwischen Haftung und Abprall wird als Separationszeit t_{Sep} bezeichnet. Sind die anziehenden Kräfte allerdings größer als die abstoßenden, wird der Grenzflächenfilm instabil. In diesem Fall kommt es zur Filmdrainage, d.h. Flüssigkeit strömt aus dem Film aus. Nach dem Unterschreiten einer kritischen Filmdicke h_{krit} kann es durch zufällige Fluktuation an der Grenzfläche zum Reißen des Films kommen (siehe Abb. 2-4). Die Stärke dieser Fluktuationen wird von der Grenzflächenrheologie sowie von kolloidalen Kräften zwischen der Grenzfläche bestimmt. Die Zeit zwischen Haftung und Koaleszenz wird als t_{merge} bezeichnet, die hauptsächlich durch die Filmdrainagenzeit t_{Drain} bestimmt ist [Tadros, 1983; Ivanov et al., 1997; Schubert, 2005].

2.3 Herstellung von einfachen und multiplen Emulsionen

Die **Koaleszenzwahrscheinlichkeit** p_{Koal} in Gleichung 2.11 beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der zwei Tropfen nach der Kollision koaleszieren. Sie ist definiert als das Verhältnis der Zeit, die für die Filmdrainage benötigt wird (t_{Drain}) und der Kollisionszeit zweier Tropfen t_{Koll} [Ross et al., 1978]:

$$p_{Koal} = \exp\left(-\frac{t_{Drain}}{t_{Koll}}\right) \quad 2.11$$

Für $t_{Drain} \ll t_{Koll}$ nimmt die Koaleszenzwahrscheinlichkeit einen Wert von 1 an, d.h. in diesem Fall führt jede Kollision zur Koaleszenz, da der Film ausreichend Zeit zum Ausfließen hat. Ist die Drainagezeit hingegen länger als die Kollisionszeit geht die Koaleszenzwahrscheinlichkeit gegen 0. Die Kollisionszeit selbst hängt von den Strömungsbedingungen und der eingetragenen Energiedichte sowie den zuvor beschriebenen Wechselwirkungskräften zwischen den Tropfen ab [Schubert, 2005].

Ein Maß zur Beschreibung der Kurzzeitstabilität ist die Koaleszenzrate Ω , die die Anzahl an Koaleszenzvorgängen pro Zeit und Volumen beschreibt. Je niedriger die Koaleszenzrate ist, umso stärker wird das Emulgierergebnis durch die Tropfenzerkleinerung bestimmt und umso weniger durch Tropfenkoaleszenz.

Die **Koaleszenzrate** Ω kann mit der folgenden Gleichung in Abhängigkeit der Kollisionsfrequenz C und der Koaleszenzwahrscheinlichkeit p_{Koal} beschrieben werden [Chesters, 1991]:

$$\Omega = p_{Koal} \cdot C \quad 2.12$$

Hierbei stellt die **Kollisionsfrequenz** C die Anzahl an Tropfenkollisionen pro Emulsionsvolumen und Zeit dar. Die Kollisionsfrequenz ist proportional zur Tropfenanzahl n pro Volumen [Chesters, 1991].

Möglichkeiten zur Reduzierung der Koaleszenzrate Ω bestehen also darin, die Koaleszenzwahrscheinlichkeit p_{Koal} sowie die Kollisionsfrequenz C durch entsprechende Maßnahmen zu verringern.

Eine Maßnahme stellt hier die Wahl eines geeigneten Emulgators dar. Umso schneller die Adsorptionskinetik eines Emulgators ist, desto eher kann er die Tropfen durch entsprechende Wechselwirkungskräfte gegen Koaleszenz schützen. Darüber hinaus führt eine schnellere Belegung der Grenzfläche mit Emulgatormolekülen auch zu einer rascheren Absenkung der Grenzflächen­spannung und damit zu einem energetisch günstigeren Zustand, was ebenfalls

Koaleszenz entgegenwirkt. Dementsprechend sind in Verfahren mit einer kurzen Verweilzeit in der Emulgieranlage Emulgatoren mit einer sehr schnellen Adsorptionskinetik erforderlich. Ein Beispiel hierfür ist das Emulgieren im Hochdruckhomogenisator. Bei Prozessen mit längerer Verweilzeit, wie z.B. Rotor-Stator-Systemen, können auch mit langsameren Emulgatoren durchaus kleine Tropfen erzielt werden [Karbstein, 1994]. Darüber hinaus können bestimmte Emulgatoren durch Ausbildung von monomolekularen Grenzflächenfilmen mit mehr oder weniger viskoelastischen Eigenschaften bzw. durch Ausbildung sterischer oder elektrosterischer Barrieren das Zusammenfließen der emulgierten Tropfen verhindern. Zusatzstoffe wie Elektrolyte können die Beschaffenheit des Grenzflächenfilms und damit die Tropfenstabilisierung zusätzlich beeinflussen (siehe Kapitel 2.1). Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung der Koaleszenzrate stellt die Erhöhung der Viskosität der kontinuierlichen Phase durch Stabilisatoren oder Gelbildner dar. Dies bewirkt ein langsames Ausfließen der Zwickelflüssigkeit zwischen den Tropfen, wodurch sich die Dauer bis zum Kontakt zweier Grenzflächen sowie die folgende Drainagezeit verlängern ($\rightarrow p_{\text{Koal}} \downarrow$). Darüber hinaus kann die Erhöhung der Viskosität der kontinuierlichen Phase, je nach Strömungsform, zu einer Reduzierung der Kollisionsfrequenz führen. Auch durch eine geeignete Wahl der Strömungsform im Prozess, zum Beispiel durch das Schaffen hydrodynamischer Stabilisierungszonen sowie durch eine Reduktion des Dispersphasenanteils kann die Koaleszenzrate verringert werden [Dickinson, 1988; Ivanov et al., 1999; Danner, 2001; Schubert, 2005].

2.3.4 Mechanische Emulgiervverfahren

Typische Anlagen, die beim Emulgieren zur Ausbildung zerkleinerungswirksamer Strömungen eingesetzt werden, sind Rotor-Stator-Systeme, Hochdruckhomogenisatoren, Ultraschallhomogenisatoren und Membransysteme [Karbstein, 1994; Walstra et al., 1998; Schuchmann, 2005; Lambrich et al., 2005].

Rotor-Stator-Maschinen (RSM) bestehen immer aus einem rotierenden und einem statischen Bauteil. Die Tropfen werden hier entweder aufgrund laminarer Scherströmungen, turbulenter Strömungen oder einer Kombination aus beiden aufgebrochen. Rotor-Stator-Maschinen können diskontinuierlich oder kontinuierlich betrieben werden. Die einfachste Bauform ist der Rührbehälter. Der Nachteil eines Rührbehälters besteht in einem relativ niedrigen und inhomogenen Leistungseintrag. Die Feinemulsionen weisen daher oft Tropfengrößen $x > 2 \mu\text{m}$ und breite Tropfengrößenverteilungen auf. Weiterentwickelte Rotor-Stator-Systeme sind Zahnkranzdispergiermaschinen (ZKDM) und Kolloidmühlen (KM). Aufgrund der Geometrie der

2.3 Herstellung von einfachen und multiplen Emulsionen

Zerkleinerungseinheit ist eine definierte Beanspruchung des Produktes möglich als bei einfachen Rührbehältern. Bedingt durch niedrige Investitionskosten, eine einfache Handhabung und sehr variable Einsatzmöglichkeiten sind Rotor-Stator-Maschinen weit verbreitet. Ein weiterer Vorteil von Rotor-Stator-Maschinen besteht darin, dass die Verweilzeit der Emulsionen in der Zerkleinerungseinheit einer Rotor-Stator-Maschine verhältnismäßig lang ist und gesteuert werden kann, weshalb Rotor-Stator-Maschinen bei Verwendung von langsam adsorbierenden Emulgatoren oftmals das System der Wahl darstellen. Allerdings lassen sich häufig nur niedrige spezifische Energieeinträge realisieren [Karbstein, 1994; Schultz et al., 2002; Schubert, 2005].

Hochdruckhomogenisatoren (HDH) sind in der pharmazeutischen sowie in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet. Sie ermöglichen den Eintrag von sehr hohen spezifischen Energien. Hochdrucksysteme bestehen aus einer Hochdruckpumpe und einer Homogenisierblende bzw. einem Homogenisierventil. In der Pumpe wird das Medium auf Drücke von 2 bis zu mehreren tausend bar verdichtet. Die Energie, die schließlich zum Zerkleinern der Emulsionstropfen genutzt wird, wird in der Blende bzw. dem Ventil dissipiert, wobei in Abhängigkeit von der Strömungsführung zwischen radialen, axialen und Gegenstrahlgeometrien unterschieden wird. Zum Tropfenaufbruch tragen hier neben Scher- und Trägheitskräften in turbulenter Strömung auch Kavitation und Scherkräfte in laminarer Dehnströmung bei [Schultz et al., 2002; Schuchmann, 2005].

Die Emulsionsherstellung mittels diskontinuierlicher **Ultraschallsysteme** wird zumeist im Laborbereich angewandt, um kleine Mengen feindisperser Emulsionen herzustellen. Als zerkleinerungswirksame Mechanismen treten hier Kavitation und Mikroturbulenzen auf. Auch durch kontinuierliches Ultraschallmulgieren können feindisperse Emulsionen hergestellt werden. Allerdings ist ein Scale-up in den Produktionsmaßstab aufgrund der geringen Leistung der marktüblichen Ultraschallsonotroden bis heute nur schwer möglich [Behrend et al., 2002; Schultz et al., 2002; Schuchmann, 2005].

Das Emulgieren mit **Membranen** stellt ein relativ neues kontinuierliches Emulgierverfahren dar. Beim sogenannten konventionellen Membranemulgieren wird die disperse Phase durch die Poren einer mikroporösen Membran in der kontinuierlichen Phase dispergiert. Durch das Ablösen der Tropfen von der Membranoberfläche entstehen Tropfen mit enger Tropfengrößenverteilung [Nakashima et al., 1991; Fuchigami et al., 2000; Wang et al., 2005]. Die exakten Tropfenbildungsmechanismen sind in [Vladislavljevic et al., 2012] zusammenfassend dargestellt. Da die mechanische Belastung beim Membranemulgieren sehr gering ist, sind diese Verfahren vor allem für

Emulsionen mit empfindlichen Bestandteilen geeignet [Peng et al., 1998; Lambrich et al., 2004]. Alternativ können Membranen eingesetzt werden, um Rohemulsionen weiter zu zerkleinern. In diesem Fall spricht man von **Premix-Membranemulgieren**. Der Vorteil dieses Verfahrens sind die größeren Volumenströme, die sich im Vergleich zum konventionellen Membranemulgieren realisieren lassen [Suzuki et al., 1996; Badolato et al., 2007].

Eine weitere Entwicklung in diesem Bereich stellt das direkte Emulgieren mit **Mikrokanalsystemen** dar. Die besondere Form dieser Systeme bewirkt eine Tropfenbildung ausgehend von Laplace-Instabilitäten, wodurch eine sehr monodisperse Emulsion entsteht. Bisher konnten aber nur Emulsionen im Tropfengrößenbereich einiger Mikrometer bei sehr geringen Durchsätzen realisiert werden, weshalb sich dieses Verfahren industriell noch nicht durchgesetzt hat [Kawakatsu et al., 1997; Sugiura et al., 2001; Kawakatsu et al., 2001; Lambrich et al., 2004; Schuchmann, 2005; Utada et al., 2005; Utada et al., 2007]. Neuere Arbeiten beschäftigen sich mit der Anordnung von mehreren 100 Mikrokanälen auf einem Chip. Hierdurch soll das Verfahren an den industriellen Einsatz adaptiert werden [Kobayashi et al., 2010].

Bei der Herstellung von Doppelemulsionen können im ersten Emulgierschritt alle Verfahren eingesetzt werden, die es ermöglichen, die gewünschte Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen bei gleichzeitigem Erhalt der zu formulierenden Substanzen einzustellen. Beim Einbringen der inneren W_1/O -Emulsionen in die äußere W_2 -Phase ist allerdings zu berücksichtigen, dass hohe Scherkräfte, Dehnung sowie Turbulenz zu einer verstärkten Freisetzung eingeschlossener W_1 -Tropfen führen können (siehe Kapitel 2.3). Verfahren, die ein schonendes Einbringen der inneren Emulsion ermöglichen, sind das Emulgieren mit Membranen oder mit Kolloidmühlen bei geringen Drehzahlen [Muschiolik et al., 2007; Schuch et al., 2012].

2.3.5 Energiedichtekonzept

Im vorangegangenen Kapitel wurden verschiedene Verfahren zur Erzeugung von Emulsionen vorgestellt. Um die Effektivität der Zerkleinerung eines Verfahrens unabhängig vom Verfahren selbst beurteilen zu können, wurde für das mechanische Emulgieren das so genannte Energiedichtekonzept entwickelt [Karbstein, 1994]. Dieses basiert darauf, dass sowohl die Verweilzeit t_V als auch der volumenspezifische Leistungseintrag P_V Einfluss auf das Emulgierergebnis haben. Das Produkt aus mittlerer Verweilzeit \bar{t}_V und mittlerem volumenspezifischem Leistungseintrag \bar{P}_V ergibt den volumenspezifischen Energieeintrag bzw. die Energiedichte E_V . Experimentell lässt sich die Energiedichte aus dem Quotient aus Leistungseintrag P und Volumenstrom \dot{V} ,

2.4 Hydrokolloide

oder speziell beim Hochdruckhomogenisieren aus dem Homogenisierdruck Δp ermitteln.

$$E_V = \bar{P}_V \cdot \bar{t}_V = \frac{E}{V} = \frac{P}{\dot{V}} = \Delta p \quad 2.13$$

Hierbei beschreibt E den Energieeintrag und V das Emulsionsvolumen.

Für den Fall, dass sowohl die deformierenden Spannungen σ im Prozess größer sind als die zum Tropfenaufbruch erforderlichen Spannungen σ_{krit} , als auch die für den Tropfenaufbruch erforderliche Deformationszeit $t_{def,krit}$ überschritten wird (siehe Kapitel 2.3.2), lässt sich das Zerkleinerungsergebnis als Funktion der Energiedichte beschreiben. Der Zusammenhang zwischen der erreichbaren mittleren Tropfengröße \bar{x} und der eingebrachten Energie kann dann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\bar{x} \propto E_V^{-b} \quad 2.14$$

Der Exponent b ist eine strömungsspezifische Konstante. Für einen zerkleinerungsdominierten Prozess, in dem Koaleszenz ausgeschlossen werden kann, ist $b > 0$. In diesem Fall lässt der Wert des Exponenten Rückschlüsse auf den Tropfenzerkleinerungsmechanismus zu. Zum Beispiel nimmt b für eine Zerkleinerung in rein laminarer Strömung den Wert 1 an, für eine Zerkleinerung in turbulenter Strömung einen Wert zwischen 0,25 und 0,4 [Koglin et al., 1981; Karbstein, 1994; Schuchmann, 2005].

2.4 Hydrokolloide

Hydrokolloide sind makromolekulare, hydrophile Substanzen. Aufgrund ihres hohen Wasserbindevermögens und ihrer Fähigkeit Gelnetzwerke aufzubauen, können sie die Viskosität wässriger Systeme erhöhen. Daher werden sie in der Lebensmittelindustrie vielfach als Dickungsmittel zur Einstellung der Mikrostruktur, Textur oder auch zur Verlängerung der Haltbarkeit eingesetzt. Der Begriff „Hydrokolloid“ umfasst alle Polysaccharide, die aus Pflanzen, Seegrass und mikrobiologischen Quellen extrahiert werden, sowie Gummiharze aus Pflanzenexsudaten und modifizierte Biopolymere, die über eine chemische oder enzymatische Behandlung von Stärke oder Cellulose hergestellt wurden. Darüber hinaus wird das Protein Gelatine aufgrund seiner starken Hydrophilie ebenfalls zur Gruppe der Hydrokolloide gezählt, im Gegensatz zu anderen Proteinen wie Casein oder Gluten [Dickinson, 2003; Dickinson, 2009].

2 Theoretische Grundlagen

Pektine, die ebenfalls zur Gruppe der Hydrokolloide zählen, sind Heteropolysaccharide, die in den Zellwänden und Mittellamellen aller höheren Landpflanzen vorkommen. Sie werden durch Extraktion hauptsächlich aus Apfeltrester und den Schalen von Citrusfrüchten gewonnen. Die Hauptketten von Pektinen bestehen überwiegend aus α -(1-4)-verknüpften D-Galakturonsäureeinheiten (siehe Abb. 2-5).

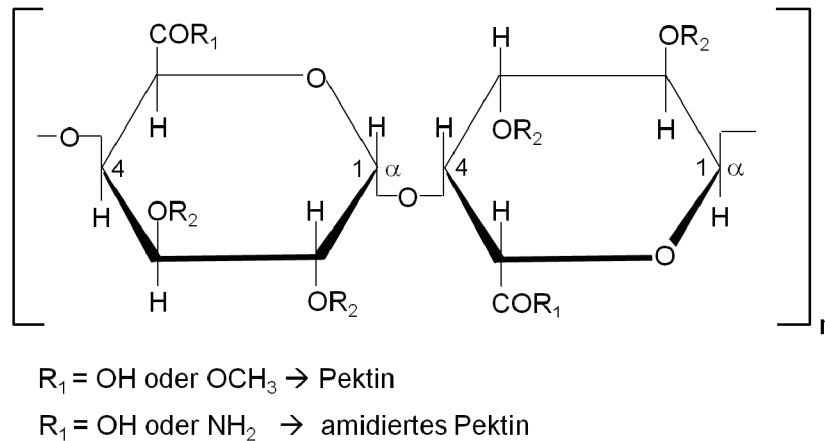


Abb. 2-5: Struktur der Pektinhauptketten.

Diese lineare Kette wird in regelmäßigen Abständen durch 1,2-glykosidisch verknüpfte α -L-Rhamnosin unterbrochen. Zusätzlich können die Rhamnosemoleküle noch oligomere neutrale Seitenketten aus Arabinose, Galactose oder Arabinogalactose tragen. Die Carboxylgruppen der D-Galakturonsäureeinheiten können dabei in unterschiedlichem Maße mit Methanol verestert sein. Hierbei wird zwischen hochveresterten Pektinen mit einem Veresterungsgrad von mehr als 50 % und niederveresterten Pektinen mit einem Veresterungsgrad von weniger als 50 % unterschieden. Darüber hinaus können Carboxylgruppen durch Säureamidgruppen ersetzt sein. In diesem Fall spricht man von amidierten Pektinen, für die der Amidierungsgrad als Kenngröße angegeben werden kann [Belitz et al., 2008; Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken, 2008a]. Hochveresterte Pektine bilden in saurer Lösung in Anwesenheit von hohen Zuckerkonzentrationen Gele aus [Narayanan et al., 2002]. Niederveresterte Pektine gelieren hauptsächlich durch Interaktion mit mehrwertigen Kationen wie z.B. Calcium- oder Magnesiumionen. Die Gelierung beruht hierbei auf Komplexierung zwischen den Kationen und den negativ geladenen Carboxylgruppen unterschiedlicher Pektinketten. [Powell et al., 1982; Thibault et al., 1986]. Die Gelierungskinetik und die sich ausbildende Gelstärke werden bestimmt von Faktoren wie dem Veresterungsgrad, dem mittleren Molekulargewicht, der Ionenstärke, der Pektinkonzentration, dem

2.5 Anthocyane

löslichen Trockenmassegehalt, dem pH-Wert sowie der Temperatur. Niederveresterte, amidierte Pektine bieten durch die Amidgruppen zusätzliche Bindungsmöglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen und benötigen daher weniger Kationen zur Komplexierung und der damit verbundenen Gelbildung. Die Geliertemperatur der amidierten Pektine wird zudem von der Kationendosierung weniger stark beeinflusst [Narayanan et al., 2002; Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken, 2008a].

2.5 Anthocyane

Anthocyane gehören zur größten Gruppe hydrophiler Pflanzenfarbstoffe. Ihr Name leitet sich von den griechischen Worten *anthos* (für Blüte) und *kyanos* (für blau) ab [Delgado-Vargas et al., 2003]. Bis heute wurden mehr als 635 Anthocyanverbindungen in der Natur identifiziert, die für die Farbgebung vieler blau-, lila- und rotgefärbter Früchte, Gemüsesorten und Blüten verantwortlich sind [Takeoka et al., 2008; He et al., 2010]. Da solche anthocyanhaltigen Lebensmittel in unterschiedlichen Studien (*in vitro*, Tier- und klinischen Studien) hohe antioxidative, antikanzerogene sowie immunmodulierende Wirkung zeigten [Middleton, 1998; Rechkemmer et al., 2004; Watzl et al., 2005; Wang et al., 2008], gewinnen sie in der Lebensmittelindustrie, insbesondere in den Bereichen funktionelle Lebensmittel oder Nahrungsergänzungsmittel, zunehmend an Bedeutung. Darüber hinaus stellen Anthocyane als natürliche Farbstoffe eine vielversprechende Alternative zu synthetischen Farbstoffen dar [Bridle et al., 1997; He et al., 2010].

2.5.1 Natürliches Vorkommen der Anthocyane

In vielen blau-, lila- und rotgefärbten Beeren, Früchten und daraus hergestellten Säften bzw. Rotweinen sowie bestimmten Gemüsearten sind hohe Anthocyananteile enthalten (siehe Tab. 2-2) [Watzl et al., 2002; Wu et al., 2006; He et al., 2010]. Die höchsten Anthocyankonzentrationen finden sich in den Randschichten der Pflanzen wie den Epidermis- und Subepidermiszellen [Watzl et al., 2002]. Für viele Pflanzen sind Anthocyane deshalb so wichtig, weil sie durch ihre Farbe Tiere anlocken, die für die Samenverteilung und Blütenbestäubung sorgen. Durch ihre Fähigkeit, Licht in großem Maße zu absorbieren, können Anthocyane außerdem Pflanzen vor UV-induzierten Schäden schützen. Darüber hinaus können sie als Antioxidanzien, Pflanzenabwehrstoffe gegen Mikroorganismen oder antibakterielle Substanzen wirken [Kong et al., 2003; He et al., 2010].

2 Theoretische Grundlagen

Tab. 2-2: Zusammenstellung des Anthocyangehalts einiger ausgewählter Lebensmittel [Clifford, 2000; Wu et al., 2006].

Lebensmittel	mg / 100 g Frischgewicht
Brombeeren	115 – 245
Himbeeren	10 – 92
Heidelbeeren	83 – 420
Schwarze Johannisbeeren	130 – 476
Süßkirschen	2 – 450
Weintrauben	30 – 750
Aronia	200 – 1480
Blutorangen (Saft)	200
Rote Zwiebeln	0 – 49
Rotkohl	25 – 322
Auberginen	86 – 750
Rhabarber	0 – 200
Radieschen	70 – 130
Rotwein	24 – 35
Portwein, rot	14 – 110

Die in Tab. 2-2 gezeigten Daten zu den Anthocyangehalten in unterschiedlichen Lebensmitteln wurden von verschiedenen Forschergruppen zusammengetragen und weisen eine hohe Schwankungsbreite auf. Das ist zum einen auf die äußerst komplexe Analyse der Anthocyane zurückzuführen [Clifford, 2000]. Zum anderen hängt der Anthocyangehalt der Pflanzen auch von den Umgebungsbedingungen ab, unter denen sie kultiviert werden. Einen großen Einfluss haben zum Beispiel Lichteinstrahlung, Temperatur und Höhenlage [He et al., 2010].

Die hier dargestellten, relativ hohen Anthocyangehalte konnten allerdings nur in frischen Lebensmitteln gemessen werden. In verarbeiteten Produkten wie zum Beispiel Konserven, Brot, Müsli oder auch Babynahrung, denen anthocyanhaltige Rohstoffe zugefügt wurden, konnten kaum bzw. keine Anthocyane mehr nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich auf ihre geringe chemische Stabilität und einen daraus folgenden Abbau während der Verarbeitung zurückzuführen [Wu et al., 2006].

2.5.2 Chemische Eigenschaften von Anthocyanen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Anthocyananalysen sowie die Untersuchungen zur Stabilität der Anthocyane im Homogenisierprozess sind insbesondere die chemischen Eigenschaften der Anthocyane wichtig. Daher werden diese im Folgenden detailliert beschrieben.

Chemische Struktur der Anthocyane

Anthocyane bilden eine Untergruppe der Flavonoide, die alle eine C₆-C₃-C₆-Grundstruktur besitzen und in fast jeder höher entwickelten Pflanze vorkommen [Kuehnau, 1976]. Die Aglykone der Anthocyane, d.h. die nicht-Zucker Komponenten der Anthocyane, bei denen die Glykosylgruppe eines Anthocyanglykosides durch ein Wasserstoffatom ersetzt wurde [IUPAC, 1995], werden als Anthocyanidine bezeichnet. Die Grundstruktur der Anthocyanidine bildet das Flavyliumkation (siehe Abb. 2-6). Die Anthocyane variieren im phenolischen Kernaglykon und im Glykosilierungsmuster der konjugierten Zucker. In der Natur wurden bisher etwa 17 Anthocyanidine entdeckt, wobei nur sechs allgegenwärtig sind. Abb. 2-6 zeigt neben der Grundstruktur der Anthocyane auch diese sechs in der Natur am häufigsten vorkommenden Aglykone. Sie unterscheiden sich im Hydroxy- und Methoxy-Substitutionsmuster des B-Ringes. Art und Anzahl an Substituenten haben Einfluss auf die Farbwirkung der Anthocyane. Während ein größerer Anteil an Hydroxylgruppen die Farbwirkung in den blauen Bereich des Farbspektrums verschiebt, führt ein größerer Anteil an Methoxygruppen zu einer Verschiebung des Farbspektrums in den roten Bereich [Mazza et al., 1987b; Francis, 1989; Kong et al., 2003; Delgado-Vargas et al., 2003; Fleschhut, 2004; Prior et al., 2006].

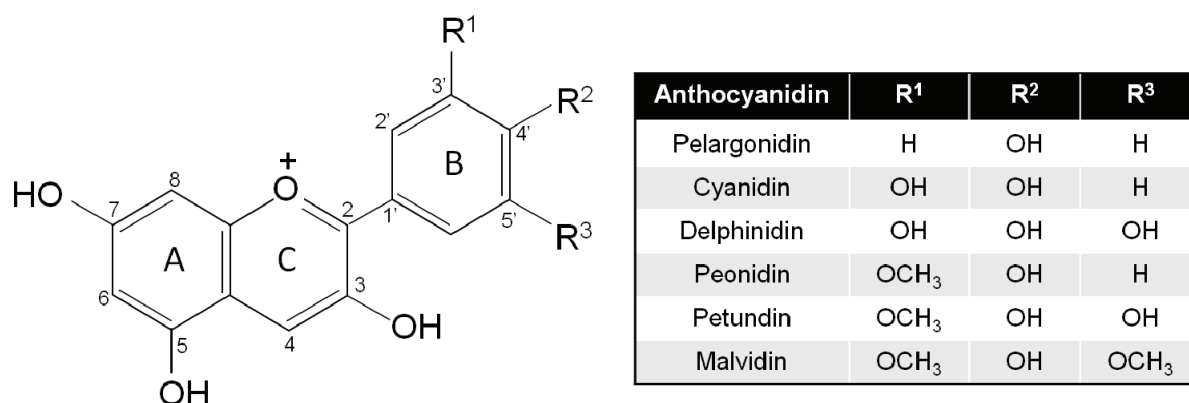


Abb. 2-6: Kernaglykon der Anthocyane und die wichtigsten in der Natur vorkommenden Anthocyanidine (nach [Mazza et al., 1987b; Prior et al., 2006]).

2 Theoretische Grundlagen

In der Natur liegen die Anthocyane in leicht saurer bis neutraler wässriger Lösung (z.B. pH 2,5 – 7,5) in den Zellvakuolen des Pflanzengewebes vor [Jackman et al., 1995], wobei die Anthocyanidine fast immer glykosidisch gebunden sind. Das heißt, Zuckerkomponenten sind über eine Sauerstoffbrücke meist am C3- oder am C3- und C5-Atom des C-Rings mit dem Aglykon verbunden. In seltenen Fällen wurden auch Glykosilierungen an den Positionen 3', 4' und 5' des B-Ringes beobachtet. Als häufigste Zuckerkomponenten finden sich Glukose, Rhamnose, Xylose, Galaktose und Arabinose, die als Mono-, Di- oder auch Trisaccharide gebunden vorliegen können [Mazza et al., 1987b; Prior et al., 2006]. Solch eine Glykosilierung erhöht zum einen die Wasserlöslichkeit der Anthocyane, zum anderen wird die chemische Stabilität durch Ausbildung eines intramolekularen Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen den Anthocyanmolekülen erhöht. Hierdurch werden die Anthocyanmoleküle vor Hydratisierung geschützt [He et al., 2010]. Außerdem hat die Glykosilierung einen Einfluss auf die Pigmentfarbe. Bei gleichem pH-Wert sind Anthocyane mit Glykosilierung am C3-Atom (3-Glykoside) stärker gefärbt als Anthocyane mit Glykosilierung am C3- und C5-Atom (3,5-Glykoside) oder Anthocyane mit Glykosilierung am C5-Atom (5-Glykoside). Vergleichende Untersuchungen zur optischen Dichte der unterschiedlichen Lösungen zeigten, dass die Absorption von 3,5- und 5-Glykosiden bei der maximalen Absorptionswellenlänge nur halb so hoch ist wie die von 3-Glykosiden oder freien Anthocyanidinen [Mazza et al., 1987b]. Angesichts dessen sind Art und Anzahl der Zucker am C3-Atom weniger bedeutend für die Farbgebung, wohingegen eine zusätzliche Glykosilierung am C5-Atom eine leichte Farbverschiebung zu rot-violet bewirkt [Hubbermann, 2005].

Darüber hinaus sind die Zuckerreste der Anthocyane häufig mit organischen Säuren acyliert. Übliche Säuren hierfür sind aliphatische, phenolische und Hydroxymethylsäuren wie z.B. Essig-, Oxal-, Malon-, Gallus-, Cumar-, Kaffee-, Ferula- oder Sinapinsäure [Clifford, 2000; Watzl et al., 2002; Kong et al., 2003; Fleschhut, 2004; He et al., 2010]. Auch die Acylierung übt einen stabilisierenden Effekt auf Anthocyane aus, der auf intramolekulare Copigmentierung zurückzuführen ist (siehe Kapitel 2.5.6) [Bridle et al., 1997]. Hierbei kommt es zu einer sandwichartigen Stapelung der Acylgruppen mit dem Pyriliumring der Anthocyanmoleküle, wodurch die Anthocyanmoleküle, auch bei höherer Temperatur, vor Hydratisierung geschützt werden. Anders als die Glykosilierung führt die Acylierung aber zu einer Reduktion der Anthocyanwasserlöslichkeit [Jackman et al., 1995; He et al., 2010].

Durch diese Vielzahl an strukturellen Variationsmöglichkeiten entsteht eine große Zahl an unterschiedlichen Verbindungen, die teilweise auch hochmolekulare Strukturen aufweisen. Typische Molekulargewichte für

2.5 Anthocyane

Anthocyane reichen von 400 bis 1200 g/mol [Fleschhut, 2004; Prior et al., 2006]. Beispiele für solche komplexen Strukturen sind in Abb. 2-7 dargestellt.

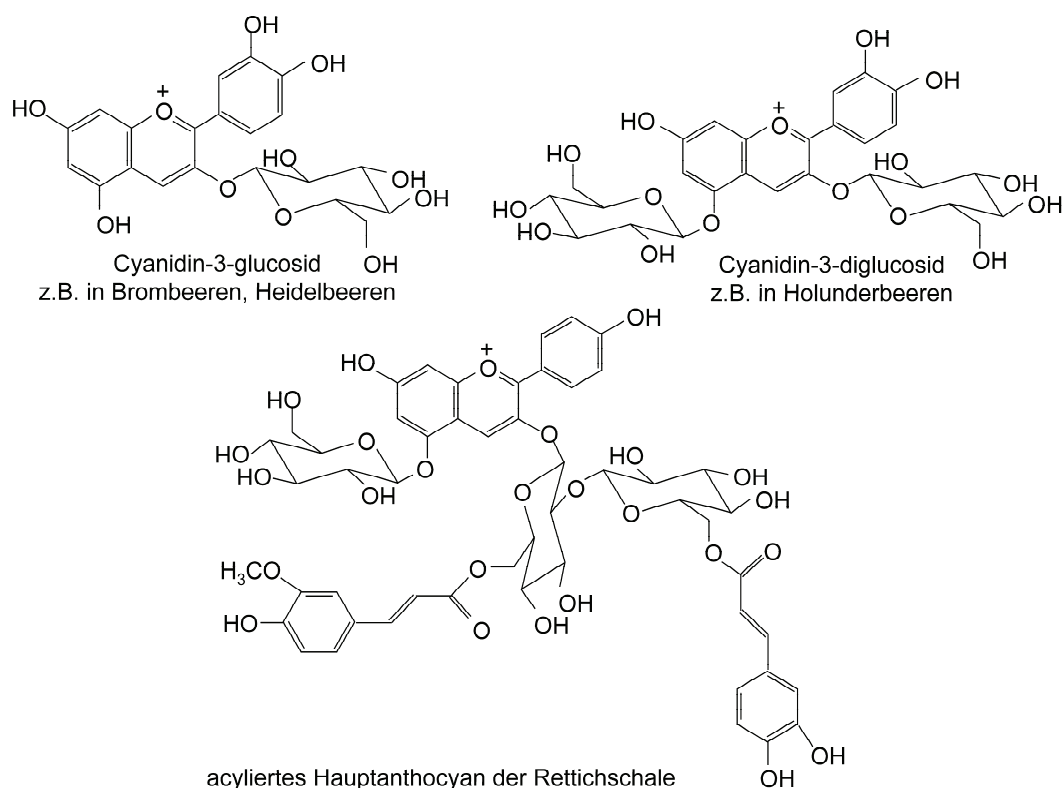


Abb. 2-7: Struktur einiger ausgewählter, natürlich vorkommender Anthocyane, nach [Fleschhut, 2004].

Einfluss des pH-Wertes auf die chemische Struktur der Anthocyane

Anthocyane liegen in wässriger Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes in verschiedenen Formen nebeneinander vor, wobei das Gleichgewicht je nach pH-Wert zu verschiedenen Einzelstrukturen verschoben ist. Damit verhalten sie sich wie pH-Indikatoren, die bei niedrigem pH-Wert rot, bei mittlerem pH-Wert blau und bei hohem pH-Wert farblos sind. Mit der Aufklärung dieser strukturellen Änderungen in säurehaltigen Lösungen beschäftigte sich intensiv die Arbeitsgruppe um Brouillard [Brouillard et al., 1977a; Brouillard et al., 1977b; Brouillard et al., 1978; Brouillard, 1982]. Demnach existieren in wässriger Lösung vier verschiedene Chromophore der Anthocyane: das rote Flavyliumkation, die blaue chinoide Base, die farblose Carbinol-Pseudobase und das schwach gelblich bis farblose Chalkon (siehe Abb. 2-8) [Brouillard et al., 1977a; Brouillard, 1982; Hubbermann, 2005].

2 Theoretische Grundlagen

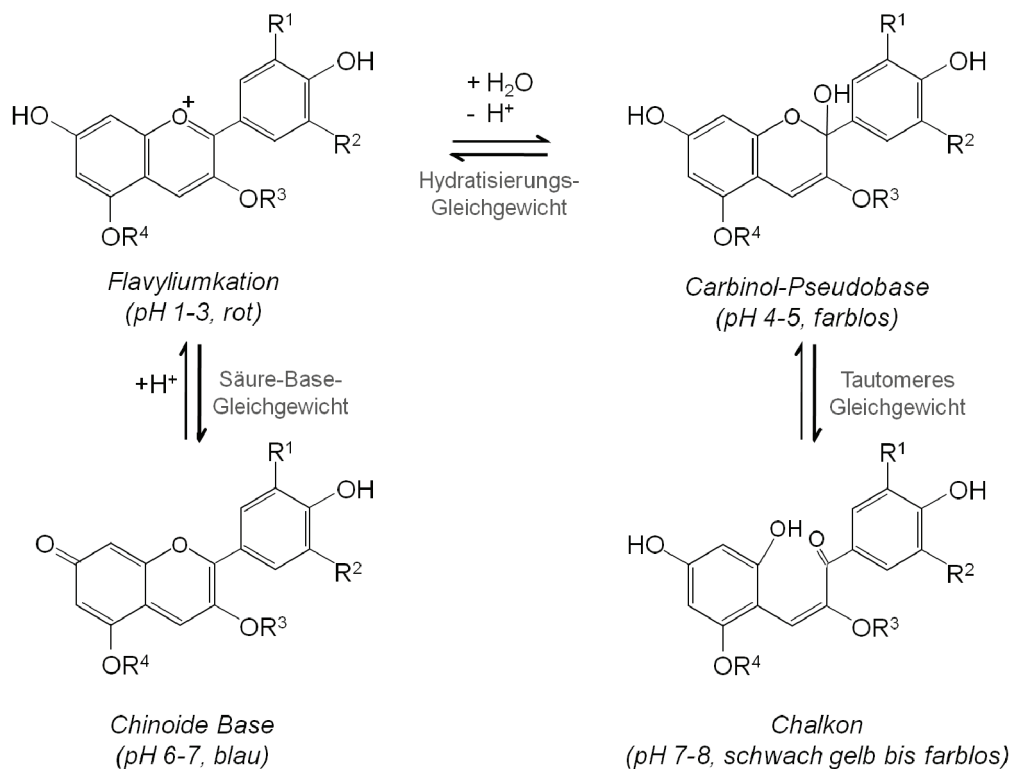


Abb. 2-8: Strukturelle Veränderung der Anthocyane in Abhängigkeit des pH-Wertes. R¹, R²: H, OH oder OCH₃. R³: Glykosyl, R⁴: H oder Glykosyl, nach [Brouillard et al., 1977a; Mazza et al., 1987b].

Bei pH-Werten zwischen 1 und 3 liegt sowohl das Säure-Base-Gleichgewicht als auch das Hydratisierungs-Gleichgewicht auf der Seite des mesomeriestabilisierten Flavylumkations, was zu einer intensiven Rotfärbung der Lösungen führt. Mit zunehmendem pH-Wert kommt es einerseits zu einer sofortigen Deprotonierung. Diese exotherme, sehr schnell ablaufende Reaktion führt zur Bildung der blau gefärbten chinoiden Base (siehe Abb. 2-8, Säure-Base-Gleichgewicht) [Brouillard et al., 1977a; Mazza et al., 1987b]. Gleichzeitig führt eine pH-Erhöhung zur Anlagerung von Wasser am Flavylumkation (siehe Abb. 2-8, Hydratisierungs-Gleichgewicht). Diese ablaufende Hydratisierung tritt in der Natur überwiegend am C2-Atom auf. Als Produkt entsteht die farblose Carbinol-Pseudobase, die bei pH-Werten oberhalb von 7 durch Öffnung des C-Rings weiter in das leicht gelblich bis farblose Chalkon überführt wird. Sowohl die Hydratisierung als auch die Öffnung des Pyriliumrings sind endotherme Reaktionen, weshalb das Chromophorengleichgewicht für hohe Temperaturen auf Seiten des Chalkons liegt [Brouillard et al., 1977a; Hubbermann, 2005].

2.5.3 Absorptionsspektren der Anthocyane

Anthocyane besitzen zwei Absorptionsmaxima. Eines liegt im UV-Bereich bei 265 - 275 nm, das andere im sichtbaren Bereich bei 465 - 560 nm [Merken et al., 2000]. Die Absorptionsmaxima sind abhängig von pH-Wert und Struktur.

Wie bereits in den vorigen Kapiteln dargestellt, kommt es durch unterschiedliche Grundstrukturen des Aglykons, sowie durch die Art und das Ausmaß von Glykosilierung und Acylierung zu einer Verschiebung der Farbspektren. Darüber hinaus kann es durch Copigmentierung und Metallkomplexbildung zu einer Veränderung der Absorptionsspektren kommen (siehe Kapitel 2.5.6).

Abb. 2-9 zeigt am Beispiel von Cyanidin-3,5-Diglucosid, wie sich die charakteristischen Absorptionsmaxima in Abhängigkeit der molekularen Struktur verändern [Mazza et al., 1987a].

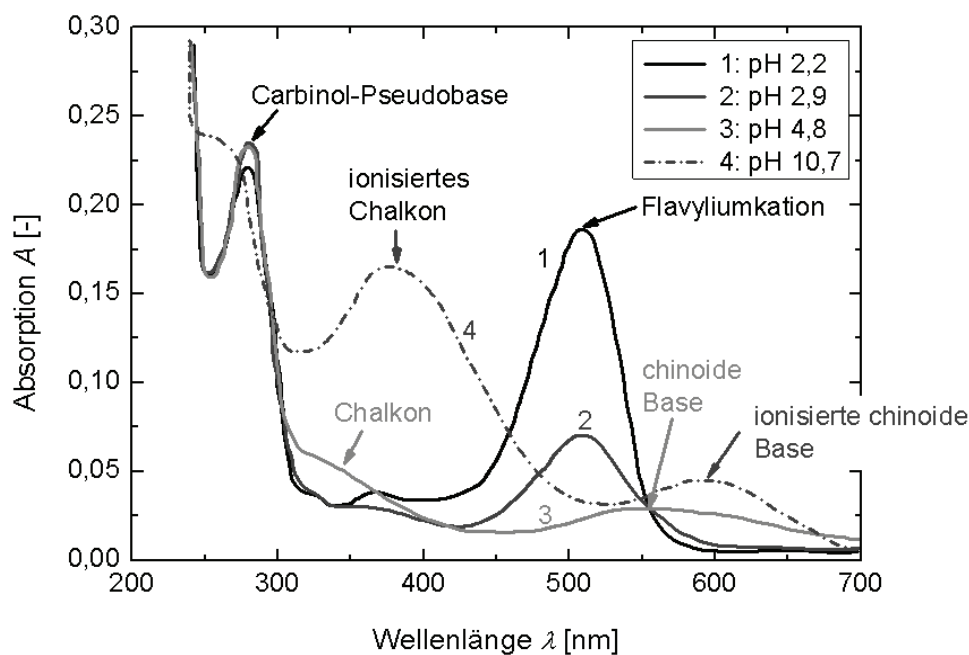


Abb. 2-9: Spektrum von Cyanidin-3,5-Diglucosid bei verschiedenen pH-Werten, nach [Mazza et al., 1987a; Hubbermann, 2005].

Demzufolge kann die Absorption der Anthocyane im sichtbaren Bereich sowie die jeweilige Feinstruktur der Spektren zur Quantifizierung der Anthocyane genutzt werden.

2.5.4 Einflussfaktoren auf die Stabilität der Anthocyane

Aufgrund eines fehlenden Elektrons ist der kationische Flavylumkern der Anthocyane sehr reaktiv. Daher kann es während der Verarbeitung und der Lagerung von anthocyanhaltigen Produkten zu Änderungen in der molekularen Struktur der Anthocyane und zu einem Farbverlust kommen [Jurd, 1972]. Im Folgenden sind die wichtigsten Einflussfaktoren auf den Erhalt der Anthocyanstruktur und der Farbe dargestellt.

Einfluss von pH-Wert auf den Anthocyanzerfall

Der pH-Wert hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Anthocyane [Mazza et al., 1987b]. Insbesondere bei höheren pH-Werten, bei denen die Anthocyane in Form des Chalkons oder der Carbinol-Pseudobase vorliegen, kommt es zum Abbau [Markakis et al., 1974]. Dies ist damit zu begründen, dass das Chalkon und die Carbinol-Pseudobase bereits die ersten Produkte des Anthocyanzerfalls darstellen und somit ein weiterer Abbau von dieser Zerfallsstufe aus beschleunigt verläuft (siehe Abb. 2-11, Seite 42).

Einfluss der Temperatur auf den Anthocyanzerfall

Die Verarbeitungs- und Lagertemperatur haben einen entscheidenden Einfluss auf die Anthocyanstabilität [Nebesky et al., 1949; Meschter, 1953; Decareau et al., 1956; Markakis et al., 1956; Hrazdina et al., 1970; Adams et al., 1973a; Markakis et al., 1974; Jäger et al., 2011]. Dies liegt daran, dass die in Kapitel 2.5.5 beschriebenen allgemeinen Abbaumechanismen endotherm sind und somit bei erhöhter Temperatur beschleunigt ablaufen. Meschter (1953) zeigte einen logarithmischen Zusammenhang zwischen dem Farberhalt in Erdbeerkonserven und der Lager- bzw. Prozesstemperatur. Es wurde von einer Halbwertszeit von 8000 Stunden bei 0 °C, 1300 Stunden bei 20 °C aber nur noch 1 Stunde bei 100 °C berichtet. Ähnliche Ergebnisse wurden von Markakis et al. (1956) veröffentlicht. Darüber hinaus wurde von verschiedenen Forschergruppen beobachtet, dass der Anthocyanabbau bei der Verarbeitung von Frucht- und Gemüseprodukten nach einer Erwärmung auf z.B. 100 °C für 2 Minuten und anschließender sofortiger Abkühlung auf 0 bis 10 °C vernachlässigbar ist. Je langsamer die Abkühlung allerdings erfolgte und je höher die Lagertemperatur war, umso höher war der beobachtete Anthocyanabbau [Markakis et al., 1956; Adams, 1973a].

Keith und Powers (1965) zeigten außerdem, dass der Abbau der Anthocyane Pelargonidin-3-Glucosid, Malvidin-3-Glucosid und Petunidin-3-Glucosid einer Kinetik erster Ordnung folgt [Keith et al., 1965]. Auch andere Forschergruppen

2.5 Anthocyane

konnten dies bestätigen [Meschter, 1953; Markakis et al., 1956; Segal et al., 1969; Tantshev et al., 1975; Kirca et al., 2007]. Folglich kann die Zeitabhängigkeit des Anthocyanabbaus mit der in Gleichung 2.15 dargestellten Kinetik erster Ordnung beschrieben werden. Die Temperaturabhängigkeit der Reaktion kann durch den in Gleichung 2.16 dargestellten Arrhenius-Ansatz ausgedrückt werden [Kirca et al., 2007]:

$$c(t) = c(t_0) \cdot e^{-k(T) \cdot t_{Heiz}} \quad 2.15$$

$$k(T) = k_0 \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}} \quad 2.16$$

Mit:	$k(T)$	Temperaturabhängiger Geschwindigkeitskoeffizient
	k_0	Frequenzfaktor
	E_A	Aktivierungsenergie
	R	Universelle Gaskonstante

Verschiedene Forschergruppen berichten von Aktivierungsenergien für den Anthocyanabbau von 67 bis 130 kJ/mol. Die Werte variieren je nach Struktur der untersuchten Anthocyane und je nach Versuchsbedingungen [Tantshev et al., 1975; Markakis, 1982; Jackman et al., 1987].

Lichtinduzierter Anthocyanabbau

Neben pH-Werten > 4 und hohen Temperaturen kommt es auch unter Lichteinwirkung zu einem beschleunigten Anthocyanabbau [Attoe et al., 1981; Carlsen et al., 1997]. Hierbei muss zwischen zwei unterschiedlichen Effekten differenziert werden, die parallel zueinander auftreten können. Zum einen werden die rein thermischen Abbaureaktionen durch Licht verstärkt. Zum anderen kommt es während der photochemischen Degradation zur Bildung von Abbauprodukten direkt über das angeregte Flavylumkation. Ein möglicher Abbaumechanismus ist hierbei eine Hydrolyse am C4-Atom des angeregten Flavylumkations, die zur Bildung der in Abb. 2-10 dargestellten Struktur führt. Eine anschließende Hydrolyse dieser Molekülstruktur in Position 2 mit darauffolgender Ringöffnung führt zu den gleichen Abbauprodukten wie ein rein thermischer Abbau [Furtado et al., 1993].

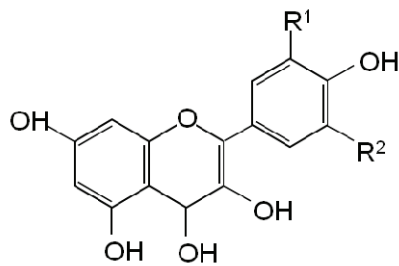


Abb. 2-10: Produkt aus der Hydrolyse des angeregten Flavylumkations bei photochemischer Degradation nach [Furtado et al., 1993]. R^1 , R^2 : H, OH oder CH_3 .

Sauerstoffinduzierter Anthocyanabbau

Unter Anwesenheit von Sauerstoff kommt es zum Abbau und damit zur Entfärbung anthocyanhaltiger Lösungen. Die zugrunde liegende Reaktion ist vermutlich eine direkte Oxidation mit Sauerstoff und/oder indirekte Oxidation, bei der oxidierte Komponenten im umgebenden Medium mit den Anthocyanen reagieren können. Hierbei entstehen farblose oder bräunlich gefärbte Produkte [Jackman et al., 1987].

Reaktionen mit Zuckern und Zuckerabbauprodukten

Der Einfluss von Zuckern und Zuckerabbauprodukten auf die Anthocyanstabilität wurde von vielen Forschergruppen untersucht. Insbesondere bei erhöhter Lager- oder Prozesstemperatur und durch die Anwesenheit von Sauerstoff kann es unter Anwesenheit von Zuckern zu einem beschleunigten Abbau kommen [Markakis et al., 1974; Jackman et al., 1987]. Nach Meschter (1953) hängt die Abbaurate der Anthocyane stark davon ab, wie schnell die vorhandenen Zucker zu Zuckerabbauprodukten wie z.B. Furfural oder 5-Hydroxy-Methylfurfural (HMF) abgebaut werden, da diese deutlich schädlicher wirken als die eigentlichen Zucker. Sie können mit Anthocyanen kondensieren, wodurch komplexe, braun gefärbte Komponenten entstehen [Debicki-Pospisil et al., 1983].

Der zuckerinduzierte Anthocyanabbau läuft überwiegend bei höheren Temperaturen ab, da die oben genannten Zuckerabbauprodukte unter diesen Bedingungen in einer Maillardreaktion gebildet werden. Dagegen wurde bei niedrigen Temperaturen in hochkonzentrierten Zuckerlösungen eine bessere Anthocyanstabilität beobachtet als in wässrigen Lösungen. Das ist vermutlich auf die geringere Wasseraktivität in Lösungen mit hohem Zuckergehalt zurückzuführen. Je niedriger die Wasseraktivität ist, umso langsamer ist die Mobilität von potentiellen Reaktanten und umso niedriger ist die Löslichkeit von

Sauerstoff [Meschter, 1953; Tinsley et al., 1960; Wrolstad et al., 1990; Tsai et al., 2004].

Reaktionen mit Hydrokolloiden

Anthocyane können mit Polysacchariden auf molekularer Ebene wechselwirken. So treten zum Beispiel in Blütenblättern Wechselwirkungen zwischen Anthocyanen und kolloidalen Substanzen auf [Robinson, 1939; Bayer et al., 1966; Asen et al., 1970]. Hierbei kommt es nicht zur Ausbildung von chemischen Bindungen, sondern zu einer Adsorption der Anthocyanmoleküle an den Polysaccharidmolekülen [Asen et al., 1970]. Es wird vermutet, dass zwischen Hydrokolloiden und Anthocyanen ähnliche Wechselwirkungen auftreten, da die Farbe von Anthocyanlösungen nach Zugabe der Hydrokolloide Amylose, Amylopektin und α - und β -Cyclodextrin stark verblasst [Lewis et al., 1995; Hubbermann, 2005].

Dennoch wurde nach der Zugabe des Hydrokolloids Pektin eine leichte Farbintensivierung von Anthocyanlösungen beobachtet. Hier kommt es vermutlich zur Komplexbildung aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Flavylumkation der Anthocyane und der dissoziierten Carboxylgruppe des Pektins, ähnlich wie bei der Gelbildung von Pektinen mit Calciumionen. Pektine können daher ähnlich wie Copigmente (siehe Kapitel 2.5.6) wirken und die Anthocyane vor Hydratisierung schützen [Belitz et al., 1999; Hubbermann, 2005; Hubbermann et al., 2006].

2.5.5 Allgemeine Abbaumechanismen der Anthocyane

Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Faktoren, die den Anthocyanzerfall beeinflussen, ist es nahezu unmöglich, eine allgemeingültige Theorie zum Abbaumechanismus zu formulieren. Selbst für Modellsysteme, bei denen aufgereinigte Anthocyane in Pufferlösungen untersucht wurden, wodurch eine Vielzahl der oben dargestellten Einflüsse ausgeschlossen werden konnten, sind zumindest zwei mögliche Abbaumechanismen denkbar [Markakis et al., 1974; Jackman et al., 1987]. Laut Markakis (1956) wird die glykosidische Bindung erst nach Bildung des Chalkons durch Öffnung des C-Ringes der Carbinol-Pseudobase hydrolysiert (siehe Abb. 2-11, oben). Diese Reaktion verläuft bei Raumtemperatur langsam, wird allerdings durch Wärme beschleunigt [Markakis et al., 1974]. Unter Anwesenheit von Sauerstoff wurde neben den Abbauprodukten von Malvidin, Cyanidin und Peonidin 3,5-Diglykosid auch ein Kumarin-Diglykosid identifiziert [Hrazdina et al., 1970].

2 Theoretische Grundlagen

Ein alternativer Mechanismus wurde von Adams vorgeschlagen [Adams, 1973a; Adams, 1973b]. Bei pH-Werten zwischen 2 und 4 entstehen unter Wärmeeinwirkung nach Hydratisierung und Ringöffnung über die Zwischenstufe eines Diketons ein Aldehyd und eine phenolische Carbonsäure (siehe Abb. 2-11, unten). Das Aldehyd wird hier aus dem A-Ring des Anthocyanidins gebildet und ist daher für alle Aglykone gleich. Die Carbonsäure hingegen geht aus dem B-Ring hervor und ist somit für jedes Anthocyanidin charakteristisch. Für die Aglykone Cyanidin, Malvidin, Peonidin und Pelargonidin entstehen entsprechend die Carbonsäuren Protocatechusäure, Syringasäure, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure [Fleschhut, 2004].

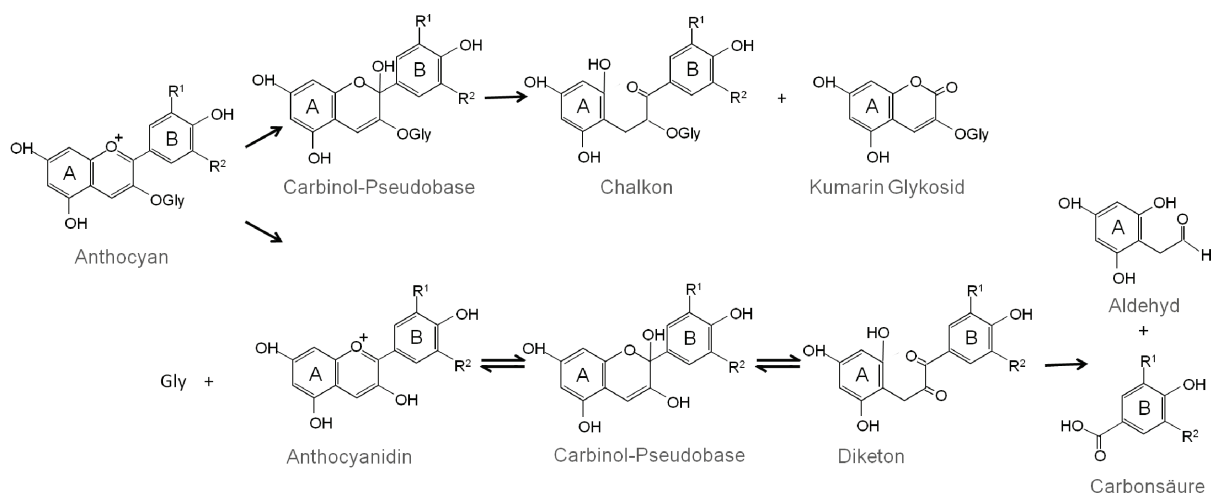


Abb. 2-11: Theorie zum Anthocyanzerfall, nach [Markakis 1957] (oben), und [Adams et al., 1973b] (unten). Zeichnung nach [Jackman et al., 1987]. Gly = Glykosid.

Dadurch dass die Bildung der Carbinol-Pseudobasen- und der Chalkon-Zwischenprodukte beim Zerfall der Anthocyanidine endotherm verläuft, lässt sich ein verstärkter Anthocyanabbau bei erhöhter Temperatur erklären. Dies ist insbesondere bei der Verarbeitung und Lagerung von anthocyanhaltigen Produkten entscheidend. Durch Kühlen bzw. Ansäuern der Lösung werden die chinoide Base und die Carbinol-Pseudobase schnell wieder in die Kationenform überführt. Die Umstrukturierung der Chalkon-Form ist allerdings relativ langsam. Für die Chalkon-Form eines 3,5-Diglykosides dauerte es bei 25 °C etwa 12 Stunden, für die eines 3-Glykosides 6 -7 Stunden bis sich ein Gleichgewicht mit dem Flavylumkation einstellt [Brouillard, 1982; Mazza et al., 1987b; Francis, 1989].

2.5.6 Natürliche Stabilisierung der Anthocyane in der Pflanzenzelle

Anthocyane liegen in der Natur in leicht saurer bis neutraler wässriger Lösung (z.B. pH 2,5 – 7,5) in den Zellvakuolen des Pflanzengewebes vor [Jackman et al., 1995]. Bei diesen pH-Werten kommt es aber durch Hydrolyse schnell zur Bildung der Carbinol-Pseudobase und damit zur Entfärbung der Anthocyanlösungen (siehe Kapitel 2.5.2). Damit die Anthocyane in der Natur dennoch ihre intensive Farbwirkung entfalten können, bedarf es anderer Methoden, das Flavyliumkation vor hydrolytischen Angriffen zu schützen. Mechanismen zur Stabilisierung der Anthocyane *in vivo* sind zum Beispiel die intramolekulare und intermolekulare Copigmentierung sowie die Metallkomplexbildung [Mazza et al., 1987b; Harborne, 1988].

Im Falle der **intermolekularen Copigmentierung** kann es zur Komplexbildung von Anthocyanen mit Komponenten wie z.B. Flavonoiden, organischen Säuren, Alkaloiden, Aminosäuren, Nukleotiden oder auch mit anderen Anthocyanen kommen [Robinson et al., 1931; Mazza et al., 1990]. Letzteres wird auch als Selbstassoziierung bezeichnet. Bei der intermolekularen Copigmentierung kommt es, überwiegend durch schwache hydrophobe Kräfte und π - π Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Kernen, zur Assoziation der Moleküle durch vertikale Stapelung. Dies schützt die Anthocyanmoleküle vor Hydratisierung [Mazza et al., 1987b; Brouillard et al., 1991; Cooper-Driver, 2001].

Bei Anthocyanen, deren Glykoside mit aromatischen oder aliphatischen Säuren acyliert sind, kann es zudem zur **intramolekularen Copigmentierung** kommen. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den Anthocyanen und den Copigmenten [Brouillard, 1982]. Die entsprechenden Säurereste können dabei durch sandwichartige Anlagerung an beiden Seiten des Pyriliumrings ebenfalls die Hydratisierung des Moleküls verhindern [Brouillard, 1981; Harborne, 1988].

Sowohl durch inter- als auch durch intramolekulare Copigmentierung kommt es zu einer Verstärkung der Farbintensität. Dies wird auch als hyperchromer Effekt bezeichnet. Zudem wird das Absorptionsmaximum zu größeren Wellenlängen verschoben, was auch als bathochromer Effekt bezeichnet wird [Asen et al., 1972a; Asen et al., 1972b].

Darüber hinaus können Anthocyane **Komplexe** mit dreiwertigen **Metallionen**, insbesondere mit Fe^{3+} und Al^{3+} , eingehen, was zu einer Blauverschiebung des Absorptionsspektrums führt. Bei diesem auch in der Natur beobachteten Phänomen kommt es zur Komplexbildung von zwei Anthocyanmolekülen mit einem Metallion. Auf diese Weise lässt sich die stabile blaue Farbe vieler

Blüten, z.B. der Gemeinen Tagblume (*Commelina communis*) und der Hortensie (*hydrangea macrophylla*) erklären [Goto et al., 1986; Harborne, 1988].

2.5.7 Physiologische Eigenschaften und bisherige Erkenntnisse zur Bioverfügbarkeit der Anthocyane

Anthocyanaufnahme

Die in der Literatur veröffentlichten Werte zur täglichen Aufnahme an Anthocyanen sind sehr verschieden. Laut einer amerikanischen Studie aus den 70er Jahren wurde die tägliche Aufnahme an Anthocyanen auf 180 mg pro Person im Winter und 215 mg pro Person im Sommer geschätzt [Kuehnau, 1976; Wu et al., 2006]. Das United States Department of Agriculture (USDA) veröffentlichte als Ergebnis neuerer Untersuchungen eine tägliche Aufnahmemenge von nur 12,5 mg pro Person [Wu et al., 2006]. Und laut einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2002 wird die tägliche Aufnahme in Deutschland auf durchschnittlich 2,6 mg pro Person geschätzt (Schwankungsbreite 0 - 76 mg) [Watzl et al., 2002].

Die großen Unterschiede in der geschätzten Aufnahmemenge der beiden US-Studien sind möglicherweise auf unterschiedliche zugrunde gelegte Mengen an verzehrten Lebensmitteln zurückzuführen [Wu et al., 2006]. Darüber hinaus ist hervorzuheben, dass die aufgenommene Menge an Anthocyanen bei Bevölkerungsgruppen in Abhängigkeit der Region, der Jahreszeiten und unterschiedlicher Konsumeigenschaften schwanken kann. Zum Beispiel werden mit einem Glas Rotwein (100 ml) bereits 24 - 35 mg Anthocyane aufgenommen, so dass der tägliche Konsum von Rotwein die Anthocyanaufnahme stark erhöht. Darüber hinaus kann die Anthocyanmenge bei Personen mit hohem Obstverzehr saisonal deutlich gesteigert sein [Watzl et al., 2002; Wu et al., 2006].

Trotz der zahlreichen Studien zu Anthocyanen gibt es bis heute aber keine empfohlene Mindestaufnahmemenge von der deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE).

Bioverfügbarkeit der Anthocyane

Anthocyanhaltige Lebensmittel zeigten in unterschiedlichen Studien (*in vitro*, Tier- und klinischen Studien) hohe antikanzerogene sowie immunstimulierende Wirkung. Darüber hinaus wirken sie vorbeugend gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Fettleibigkeit und Diabetes. Das gesundheitsfördernde Potential der Anthocyane ist zum größten Teil auf die antioxidative Wirkung dieser Substanzen zurückzuführen [Middleton, 1998; Rechkemmer et al., 2004; Watzl

2.6 Beurteilung von Löslichkeitsphänomenen mittels theoretisch-rechnerischer Modelle

et al., 2005; Wang et al., 2008; He et al., 2010]. Die in diesen Studien durchgeführten Untersuchungen zeigten allerdings auch, dass Anthocyane aus natürlichen Quellen wie Früchten oder Gemüse effektiver sind als aus Pflanzenzellen isolierte oder chemisch synthetisierte Moleküle. Dies ist auf die zuvor dargestellten degradierenden Effekte während der Lebensmittelverarbeitung, -lagerung und des Verzehrs bzw. des Transports durch das humane Verdauungssystem zum Wirkort zurückzuführen. Ohne geeignete Schutzmaßnahmen gelingt es daher nicht, Anthocyane isoliert zu stabilisieren, so dass nach dem Genuss eines mit Anthocyanen angereicherten Lebensmittels in der Blutbahn nur äußerst geringe Mengen an Anthocyanen nachweisbar sind [Bub et al., 2001; He et al., 2010; Koli et al., 2010].

Das heißt, das gesundheitsfördernde Potential der Anthocyane hängt stark von deren Bioverfügbarkeit *in vivo* ab, bzw. davon, wo, wie und in welchem Umfang sie absorbiert und metabolisiert werden. Die Erkenntnisse hierzu sind noch immer begrenzt, wobei es in den letzten 15 Jahren entscheidende Fortschritte gab. Hierzu zählen, dass der größte Teil der Anthocyane im Dünndarm aufgenommen wird. Es kann aber auch im Magen und im Dickdarm zu einer Aufnahme von Anthocyanen bzw. Anthocyanmetaboliten kommen. Dennoch gibt es viele Unklarheiten über die ablaufenden Molekültransformationen *in vivo*, d.h. während der oralen Aufnahme, des Durchlaufens des Gastrointestinaltrakts sowie der Absorption und dem Metabolismus [Kroon et al., 2004; Nurmi et al., 2009; He et al., 2010; Koli et al., 2010].

2.6 Beurteilung von Löslichkeitsphänomenen mittels theoretisch-rechnerischer Modelle

2.6.1 Theoretisch-rechnerische Modelle

Zur Beurteilung von Löslichkeitsphänomenen ist es in vielen verfahrenstechnischen Bereichen wichtig, thermophysikalische Daten von Lösungen oder Flüssigkeitsgemischen zu kennen. Beispiele stellen Trennungsprozesse wie die Destillation oder die Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie die Löslichkeit von Feststoffen, Kristallisationsprozesse von Lösungen, Membranprozesse oder auch Absorptions- und Adsorptionsvorgänge dar. Darüber hinaus lassen sie Aussagen über das Gleichgewichtsverhalten chemischer Substanzen unter bestimmten Umgebungsbedingungen zu. Eine Möglichkeit zur kostengünstigen und schnellen Bestimmung solcher Daten stellen theoretisch-rechnerische Modelle dar. Hierbei kann prinzipiell zwischen zwei Ansätzen unterschieden werden [Eckert et al., 2002]:

1. Methoden, die auf der Anpassung experimenteller Daten an eine gegebene funktionelle Form beruhen. Die thermodynamischen Informationen werden aus der funktionellen Form inter- oder extrapoliert. Beispiele hierfür sind Aktivitätskoeffizientenmodelle wie das NRTL (Non Random Two Liquid) Modell oder UNIQUAC (Universal Quasichemical) sowie Zustandsgleichungsmodelle wie die Soave-Redlich-Kwong oder die Peng-Robinson Zustandsgleichungen [Prausnitz et al., 1999; Reid et al., 2001; Eckert et al., 2002; Sandler, 2006].
2. Methoden, die unabhängig sind von experimentellen Daten. Beispiele hierfür sind die sogenannten GCM-Methoden (Group Contribution Method) [Gmehling, 1998]. Diese Methoden basieren auf Wechselwirkungsmerkmalen, die zuvor durch Ermittlung der Phasengleichgewichte von Systemen mit gleichen funktionellen Gruppen bestimmt wurden. Sie gehen davon aus, dass die Wechselwirkungsenergie jedes Systems durch die Summe der Wechselwirkungsenergien der im System vorhandenen funktionellen Gruppen angenähert werden kann. Das heißt, eine Flüssigkeit wird nicht als Mischung wechselwirkender Moleküle betrachtet, sondern als eine Mischung aus interagierenden funktionellen Gruppen. Eine der präzisesten GCM-Methoden bildet das UNIFAC (Universal Quasichemical Functional Group Activity Coefficients) Modell [Gmehling, 1998; Lin et al., 1999; Eckert et al., 2002; Sandler, 2006].

Darüber hinaus ist es möglich, thermophysikalische Eigenschaften von Reinstoffen und beliebigen Mischungen mit COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents) zu berechnen. Berechenbare Größen sind z.B. Eigenschaften zum Gas-Flüssig-Gleichgewicht (VLE) wie der Aktivitätskoeffizient, Exzessgrößen oder Phasendiagramme. Außerdem ist die Bestimmung von Eigenschaften des Flüssig-Flüssig-Gleichgewichts (LLE) und des Fest-Flüssig-Gleichgewichts (SLE) möglich. Beispiele hierfür sind der Verteilungskoeffizient oder die Löslichkeit von Flüssigkeiten und Feststoffen. COSMO-RS legt den Berechnungen, anders als die zuvor beschriebenen GCM-Modelle, das gesamte Molekül zu Grunde bzw. die gesamten Moleküloberflächen. Diese werden vorab mittels quantenchemischer Methoden berechnet. COSMO-RS verbindet eine elektrostatische Theorie lokal wechselwirkender Oberflächenladungen, die aus den quantenchemischen Berechnungen entnommen werden können, mit einer exakten statistischen thermodynamischen Methodik. Die zugrundeliegende quantenchemische Basis für COSMO-RS bildet COSMO (Conductor-like Screening Model). COSMO gehört zur Klasse der quantenchemischen Modelle, die Solvatationseffekte durch ein Kontinuummodell abbilden. Die exakten, zugrundeliegenden Theorien

2.7 Fettverdauung im Gastrointestinaltrakt

sind in der angegebenen Literatur ausführlich beschrieben [Klamt, 1995; Eckert et al., 2002].

2.6.2 Der Verteilungskoeffizient P

Der Verteilungskoeffizient beschreibt die Löslichkeit einer Substanz in einer flüssigen Phase, z.B. Öl oder Octanol, bezogen auf die Löslichkeit der entsprechenden Substanz in einer anderen flüssigen Phase, z.B. Wasser.

Der mittels COSMO-RS berechnete Verteilungskoeffizient P ist wie folgt definiert:

$$P = \frac{c_{L2}}{c_{L1}} \quad 2.17$$

Mit: c_{L1} Löslichkeit einer Substanz in der 1. flüssigen Phase
 c_{L2} Löslichkeit einer Substanz in der 2. flüssigen Phase

Der Verteilungskoeffizient hängt u.a. von der molekularen Struktur des gelösten Stoffes sowie des Lösungsmittels, von der Ionisierung oder Dimerisierung der gelösten Moleküle, der Hydratbildung, der Konzentration des gelösten Stoffes (nur bei hohen Konzentrationen) und von der Temperatur [Leo et al., 1971] ab.

Ausgehend von der obigen Definition gilt folgender Zusammenhang:

- $P < 1$ bzw. $\log P < 0$ → Die Löslichkeit in Phase 1 ist größer
- $P > 1$ bzw. $\log P > 0$ → Die Löslichkeit in Phase 2 ist größer

2.7 Fettverdauung im Gastrointestinaltrakt

Nahrungsfette werden in unterschiedlichen Formen konsumiert, z.B. als Bulkfette in Form von Margarine oder Butter, als strukturierte Fette z.B. in Form von Brot, Keksen oder Nüssen oder auch als emulgierte Fette z.B. in Form von Milch, Sahne, Dressings, Suppen, Soßen und Süßspeisen [McClements, 2005; Mun et al., 2007]. 95 % der enthaltenen Fette sind langkettige Triglyceride bzw. Triacylglycerole, die in ihrer ursprünglichen Form nicht vom menschlichen Körper (über die Enterozyten) aufgenommen werden können. Hierfür ist ein Abbau zu freien Fettsäuren oder Monoacylglycerolen notwendig [Di Maio et al., 2011].

Dieser gastrointestinale Fettabbau besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Dabei laufen sowohl physikochemische als auch enzymatische Vorgänge ab. Da Fette unlöslich in Wasser sind, müssen sie in den im Gastrointestinaltrakt vorhandenen wässrigen Medien emulgiert werden.

Aufgrund der auf sie wirkenden mechanischen Kräfte sowie durch die Einwirkung unterschiedlicher grenzflächenaktiver und stabilisierender Komponenten entstehen dabei in Wasser dispergierte Öltröpfen [Bauer et al., 2005; Mun et al., 2007]. Die ersten Veränderungen der Struktur, des Aggregatzustandes und der Grenzflächeneigenschaften der Lipide in der Ölphase können bereits direkt nach der oralen Aufnahme im Mund auftreten. Dort wird das Lebensmittel bereits mit Speichel vermischt ($\text{pH} \approx 7$), welcher u.a. das Verdauungsenzym Amylase enthält, Temperaturveränderungen ausgesetzt ($T \approx 37 \text{ °C}$) und mechanisch beansprucht [Van Aken, 2007; Bonnaire et al., 2008]. Die eigentliche Fettverdauung findet dann sowohl im Magen als auch im Dünndarm statt [Bauer et al., 2005]. Im Magen, wo je nach aufgenommener Nahrung ein pH-Wert zwischen 1 und 2,5 vorliegt, werden die Lipide des Speisebreis mit einer stark sauren wässrigen Lösung vermischt, die Mineralien, Biopolymere, grenzflächenaktive Lipide und Enzyme enthält (Magensekretion) [McClements et al., 2007; Bonnaire et al., 2008; McConnell et al., 2008]. Weitere im Magen vorliegende grenzflächenaktive Substanzen kommen vom Lebensmittel selbst (z.B. Proteine, Polysaccharide, Phospholipide, Tenside) oder von Abbauprodukten des Lebensmittels (z.B. hydrolysierte Proteine, Acylglycerine, Fettsäuren) [Pafumi et al., 2002; Kalantzi et al., 2006; Mun et al., 2007]. Aufgrund von Tropfenaufbruchs- und Koaleszenzvorgängen sowie Veränderungen in der Natur und Zusammensetzung der grenzflächenaktiven Stoffe, die an der Öl-Wasser-Grenzfläche adsorbiert sind, kann die Ölphase daher im Magen weitere strukturelle Veränderungen erfahren. Im Detail bedeutet das, dass die Magenlipase an der Öl-Wasser-Grenzfläche adsorbiert und somit den Fettverdauungsprozess initiiert. Dadurch wird ein Teil der vorhandenen Triacylglycerole in Diacylglycerole, Monoacylglycerole und freie Fettsäuren umgewandelt, die selbst wieder grenzflächenaktiv sind [Bauer et al., 2005; Bonnaire et al., 2008]. Im Dünndarm werden die emulgierten Fette des Speisebreis dann mit dem Verdauungssaft vermischt, der Pankreaslipase, Colipase, Gallensalze und Phospholipide enthält. Der pH-Wert im Dünndarm liegt zwischen 6,1 und 8,1 und nimmt mit zurückgelegter Wegstrecke zu [McConnell et al., 2008]. Die Gallensalze und Phospholipide konkurrieren hier mit ursprünglich an der Öl-Wasser-Grenzfläche adsorbierten grenzflächenaktiven Substanzen bzw. verdrängen diese von der Grenzfläche, so dass der Lipase/Colipase-Komplex an der Öltröpfenoberfläche angreifen kann. Auch in diesem Schritt werden Triacylglycerole in Diacylglycerole, Monoacylglycerole und freie Fettsäuren abgebaut. Die Produkte der Lipolyse verlassen die Oberfläche der Lipidtröpfen und werden in Mischmizellstrukturen aus Phospholipiden und Gallensalzen eingebaut, die sie dann zu den Enterozyten transportieren, über die sie aufgenommen werden [Bauer et al., 2005; Bonnaire et al., 2008].

2.7 Fettverdauung im Gastrointestinaltrakt

Typischerweise erfolgen 10 bis 30 % des hier beschriebenen Fettaufschlusses im Magen, der Rest im Dünndarm [Mun et al., 2007]. Die Verweilzeiten im Gastrointestinaltrakt hängen u.a. stark von der Menge und Art der aufgenommenen Nahrung, der Flüssigkeitszufuhr, dem Gesundheitszustand sowie der Intensität der Peristaltik ab. Daher liegen typische Verweilzeiten bei wenigen Minuten bis zu 8 Stunden im Magen und weitere 1,5 bis 5,4 Stunden im Dünndarm [Davis et al., 1986; McConnell et al., 2008]. Sowohl im Magen als auch im Dünndarm müssen die Lipasen an der Tropfengrenzfläche adsorbieren, damit sie in direkten Kontakt mit den in den Tropfen enthaltenen Lipiden kommen. Daher liegt es nahe, dass die Art des Grenzflächenfilms um die Öltropfen und die Zusammensetzung des umgebenden Verdauungsmediums eine entscheidende Rolle bezüglich der Geschwindigkeit und des Ausmaßes der Fetthydrolyse und damit auch bezüglich der Freisetzung eingeschlossener Substanzen spielen [Fillerytravis et al., 1995; Mun et al., 2007].

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel sind die in dieser Arbeit angewandte Methodik zur Herstellung und Charakterisierung anthocyanhaltiger Lösungen sowie einfacher und multipler Emulsionen und die dabei eingesetzten Stoffe zusammengestellt. Darüber hinaus werden die Methoden zur Untersuchung des in Kapitel 5 beschriebenen Ölübergangs dargestellt.

Wenn nicht gesondert gekennzeichnet, sind alle in dieser Arbeit angegebenen Konzentrationswerte Gewichtsprozent. Bei Emulsionen beziehen sie sich, wenn keine weiteren Angaben gemacht werden, stets auf die Phase, in der die Substanz gelöst ist.

3.1 Materialien

3.1.1 Heidelbeerextrakt

Für die Untersuchung der Eigenschaften und zur Formulierung von Anthocyanen in einfachen und multiplen Emulsionen wurde das kommerziell erhältliche, anthocyanhaltige Heidelbeerextrakt (HE) „600761 Bilberry Extract 25 %“ verwendet. Das Heidelbeerextrakt wurde von der Firma Kaden Biochemical GmbH, Deutschland zur Verfügung gestellt und ist für Lebensmittel zugelassen¹.

Der Rohstoff zur Extraktgewinnung ist laut Hersteller der aus der Saftherstellung verbleibende Trester der Europäischen Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus*). Der Anteil an Anthocyanen (Aglykone und Anthocyanidine) ist auf 25 % eingestellt, wobei die mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) bestimmten Leitverbindungen Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin sind. Eine nähere Spezifizierung der Hauptbestandteile kann Tab. 3-1 entnommen werden.

¹ Laut Hersteller wird dieser durch methanolische Extraktion hergestellte Extrakt nicht mehr vertrieben. Mittlerweile ist ein neuer Heidelbeerextrakt auf dem Markt, der nach anderen Verfahren hergestellt wird.

3 Material und Methoden

Tab. 3-1: Hauptbestandteile des verwendeten HE [Kaden Biochemical GmbH, 2008].

Anthocyanglykosid	Anteil [g/100 g Anthocyanglykosid]
Cyanidin-3-glykosid	10,4
Cyanidin-3-galaktosid	5,4
Cyanidin-3-arabinosid	3,1
Delphinidin-3-glykosid	5,8
Delphinidin-3-galaktosid	4,4
Delphinidin-3-arabinosid	4,1
Malvidin-3-glykosid	4,2
Malvidin-3-galaktosid	5,5
Petunidin-3-glykosie	3,1
Petunidin-3-galaktosid	2,1
Petunidin-3-arabinosid	2,6
Peonidin-3-glykosid	3,1
Summe	53,8

Neben Anthocyanen, weiteren Polyphenolen, Tanninen und Gerbstoffen sind im Extrakt außerdem Glucose und Fructose mit jeweils weniger als 1 % Anteil enthalten. Darüber hinaus enthält das Heidelbeerextrakt bis zu 28,8 % nicht näher spezifizierte Ballaststoffe. Der Gesamtpolyphenolgehalt liegt bei 46 % [Kaden Biochemical GmbH, 2008].

3.1.2 Disperse und kontinuierliche Phasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich W_1/O - sowie $W_1/O/W_2$ -Emulsionen hergestellt. Mit dem Ziel, anhand der in dieser Arbeit entwickelten anthocyanhaltigen Emulsionen, zukünftig gezielte Bioverfügbarkeits- und Bioaktivitätsstudien von Anthocyanen, u.a. mit anthocyanangereicherten Lebensmitteln, durchführen zu können, sollten alle Komponenten der Emulsionen zumindest in gewissem Umfang oder unter bestimmten Bedingungen für die Anwendung in Lebensmitteln zugelassen sein.

Disperse W_1 -Phase bzw. anthocyanhaltige wässrige Phase

Als Grundlage der inneren Wasserphase diente bidestilliertes Wasser. Zur Einstellung des pH-Wertes in den Emulsionen wurde Zitronensäure (Reinheit $\geq 99,5\%$, wasserfrei, Artikel-Nr. 6490, CAS-Nr. 77-92-9, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) verwendet. In einem Großteil der Emulsionen war außerdem noch das zuvor beschriebene Heidelbeerextrakt in der dispersen Phase gelöst.

Darüber hinaus wurde die W_1 -Phase der Emulsionen teilweise mit **Salz** sowie mit **Salz-Pektin-Mischungen** angereichert, um deren Einfluss auf die Mikrostruktur der Emulsionen nach der Emulsionsherstellung und die Langzeitstabilität zu untersuchen (siehe Kapitel 6.1.1). Im Falle von Pektin sollte zudem die Stabilität der Anthocyane erhöht werden. Als Salz wurde Calciumchlorid (CaCl_2) (Calciumchlorid-Dihydrat $\geq 99\%$, CELLPURE[®], Artikel-Nr. HN04.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) verwendet. Bei der Auswahl des Pektins sowie bei der Festlegung der verwendeten Pektin- und Salzmengen war zu berücksichtigen, dass das Pektin während des Herstellungsprozesses noch flüssig sein musste, und erst anschließend während der Lagerung bei $T = 4\text{ °C}$ ausgelieren sollte. Laut Hersteller eignen sich hierfür insbesondere amidierete Pektine. Ein weiterer Vorteil niederveresterter, amidierter Pektine ist, dass sie durch mehrwertige Kationen schonend vernetzt werden können. Daher wurden zum einen Versuche mit dem nicht standardisierten amidierten Pektin CU-L 077/10 (Herbstreith und Fox KG; Deutschland) durchgeführt. Das Pektin CU-L 077/10 weist einen Veresterungsgrad von 24 % und einen Amidierungsgrad von 24 % auf. Zur Ausbildung des Gelnetzwerkes wurden Calciumionen in Form des zuvor beschriebenen Calciumchlorids in Kombination mit Dinatriumdiphosphat (Artikel-Nr. 7150, CAS.-Nr. 7758-16-9, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und Dextrose (D-(+)-Glucose p.a., ACS, wasserfrei, Artikel-Nr. X997.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) zugegeben. Dextrose diente zur Einstellung des Trockenmassegehalts der Salz-Pektin-Mischungen und Dinatriumdiphosphat als Puffersalz. Zum anderen wurden Versuche mit dem standardisierten Pektin CB 025 E der Firma Herbstreith und Fox durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein amidiertes Citruspektin mit einem Veresterungsgrad von 23 bis 27 % und einem Amidierungsgrad von 23 bis 25 %. Es besteht aus teilweise veresterten und amidierten Poly-Galakturonsäuren und ihren Natrium-, Kalium- sowie Ammonium-Salzen. Pektin Amid CB 025-E ist bereits mit Diphosphat, Calciumchlorid und Dextrose standardisiert, um definierte rheologische Bedingungen einzustellen [Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken, 2010].

Ölphase

Die Ölphase der Emulsionen bestand aus Pflanzenöl (Rapsöl) der Firma St. Wendeler Ölsaaten GmbH & Co. KG, Deutschland, und einem lipophilen Emulgator. Dieser wird im Abschnitt „Emulgatoren“ noch näher erläutert.

Um bei den Versuchen zum Ölübergang nichtspezifisierbare Effekte von Fettbegleitstoffen auszuschließen, wurde ein gehärtetes, fraktioniertes Palmöl verwendet (Miglyol 812, Sasol Germany GmbH, Deutschland). Miglyol 812 wird durch Synthese aus gehärteten Fettsäurefraktionen pflanzlicher Öle mit Glycerin hergestellt. Daher enthält es, verglichen mit natürlichen Pflanzenölen, praktisch keine Fettbegleitstoffe. Da Miglyol 812 hauptsächlich aus Triglyceriden mittelkettiger, gesättigter Fettsäuren besteht, wird es auch als MCT-Öl (Medium Chain Triglyceride) bezeichnet.

Kontinuierliche Wasserphase (W₂)

Als Grundlage der äußeren Wasserphase diente ebenfalls bidestilliertes Wasser. Zur Emulsionsstabilisierung wurde stets ein hydrophiler Emulgator sowie in einem Teil der Versuche auch das zuvor beschriebene standardisierte Pektin CB 025-E hinzugefügt. Die verwendeten hydrophilen Emulgatoren werden im folgenden Kapitel näher spezifiziert.

Emulgatoren

Zur Stabilisierung der W₁-Tropfen sowie zur Stabilisierung der W₁/O-Tropfen wurden ausgewählte lipophile bzw. hydrophile Emulgatoren verwendet.

Lipophiler Emulgator

Als lipophiler Emulgator wurde Polyglycerin-Polyricinoleat (PGPR 4150, Paalsgard[®], Dänemark) eingesetzt, da es einer der wirksamsten Emulgatoren zur Stabilisierung von W₁/O-Emulsionen ist [Benichou et al., 2001]. PGPR setzt sich aus Polyglycerin-Molekülen zusammen, die mit polymerisierten Ricinusfettsäuren verestert sind. Die durchschnittliche Molmasse beträgt etwa 1600 g/mol [Paalsgard - Dänemark, 2010].

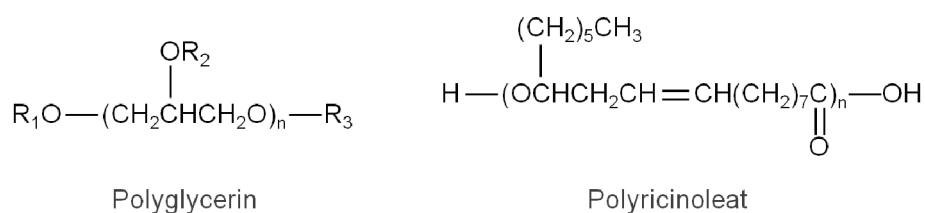


Abb. 3-1: Struktur von PGPR. Die Reste R₁, R₂ sowie R₃ am Polyglycerinmolekül können Wasserstoff oder Polyricinoleat sein. Nach [Wilson et al., 1998].

3.1 Materialien

Obwohl PGPR nach dem heutigen Stand der Forschung den menschlichen Fettstoffwechsel oder die Aufnahme fettlöslicher Vitamine nicht beeinflusst und kein karzinogenes Potential aufweist [Wilson et al., 1998; Smith et al., 1998], ist es in der EU laut Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV) [Bundesministerium der Justiz, 1998] nur in fettarmen und fettreduzierten Aufstrichen und Soßen mit 4 g/kg sowie in Süßwaren auf Kakaobasis und Schokolade mit 5 g/kg zugelassen.

Hydrophile Emulgatoren

Zur Stabilisierung der W_1/O -Tropfen wurden folgende hydrophile Emulgatoren verwendet:

- Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat: Tween 20, CAS 9005-64-5, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland
- Gallensäure (GS) aus einem Gallensäureextrakt vom Schwein, das aus Glycin- und Taurinkonjugaten der Hyodesoxycholsäure und weiteren Gallensalzen besteht (CAS 8008-63-7, Artikelnummer B8631, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland).
- Molkenproteinisolat (MPI): BiPRO[®], Proteingehalt von 96 %, Davisco Foods International Inc., Schweiz
- Ein isoliertes β -Lactoglobulin, isoliert aus Molkenproteinisolat durch Filtrationsprozesse [Maubois et al., 2001] an der TU München, ZIEL-Abteilung Technologie, Deutschland

β -Lactoglobulin und die grenzflächenaktiven Proteine des Molkenproteinisolats sind Naturprodukte, die aus der Milch gewonnen werden. Sie weisen eine globuläre Struktur und lange Molekülketten auf, weshalb zum Beispiel β -Lactoglobulin je nach Polydispersität eine molare Masse von $M_{W,\beta\text{-Lactoglobulin}} = 18277$ bis 35554 g/mol [Töpel, 2004] hat. Tween 20, ein künstlich hergestellter Emulgator, für den keine toxischen Wirkungen bekannt sind, da er im menschlichen Organismus wie Fettsäuren metabolisiert wird, ist in der EU in Lebensmitteln in Mengen von bis zu 10 g/kg und in Nahrungsergänzungsmitteln sogar unbeschränkt zugelassen [Bundesministerium der Justiz, 1998]. Tween 20 zeichnet sich durch seine geringe molare Masse aus ($M_{W,\text{Tween20}} = 1228$ g/mol). Das verwendete Gallensäureextrakt ist nicht für die Verwendung in Lebensmitteln zugelassen. Da Gallensäuren aber bei der Fettverdauung im menschlichen Darm beteiligt sind, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welchen Effekt die Verwendung von gallensäureartigen Emulgatoren auf die Mikrostruktur und die Stabilität der Emulsionen im Gastrointestinaltrakt hat. Gallensäuren besitzen, ebenso wie Tween 20, eine sehr niedrige molare Masse (z.B. $M_{W,\text{Hyodesoxycholsäure}} = 393$ g/mol).

3 Material und Methoden

Darüber hinaus wurden einzelne Versuche mit einem selbst synthetisierten Protein-Polysaccharid-Konjugat durchgeführt. Dieses wird im Folgenden auch als Konjugat bezeichnet. Solche Konjugate sollen verbesserte Emulgier-eigenschaften und eine erhöhte Einschlusseffizienz verkapselter Substanzen bewirken (siehe Kapitel 2.1). Zur Herstellung wurden die Rohstoffe Lacprodan 87 (Arla Foods amba, Dänemark) und Dextran 500 ($M_{W,Dextran\ 500} = 500000\text{ g/mol}$, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) im Verhältnis 1 zu 2 gemischt und in demineralisiertem Wasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die eigentliche Konjugatbildung erfolgte dann während einer 8-stündigen Inkubation bei 60 °C über einer gesättigten Kaliumchloridlösung (Kaliumchlorid, CAS 7447-40-7, Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland), die zur Einstellung einer definierten Luftfeuchtigkeit von 84 % diente [Flügel, 2003; Knoth et al., 2007].

3.1.3 Weitere Hilfsstoffe

Alle weiteren verwendeten Chemikalien sowie zugehörige Spezifikationen finden sich in Tab. 3-2. Die dort aufgeführten Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tab. 3-2: Für bestimmte Anwendungen eingesetzte Chemikalien und deren Spezifikationen.

Chemikalien	Hersteller	Spezifikation
Weitere hydrophile Farbstoffmoleküle		
Vitamin B12	Carl Roth	$M_{W,Vitamin\ B12} = 1579,6\text{ g/mol}$, CAS 68-19-9
Coomassie-Brillantblau G 250	Carl Roth	$M_{W,Brillantblau} = 877\text{ g/mol}$, CAS 6104-58-1
Polyvinylamin Sulfonat (Poly R 478)	Früher: Sigma Aldrich, USA (von Prof. Dr. G. Muschiolik, Food Innovation Consultant, zur Verfügung gestellt)	$M_{W,PolyR-478} = 40000\text{ g/mol}$ – 100000 g mol^{-1} , [Tsukihara et al., 2008], CAS 68550-77-6
Hilfsstoffe bei der Bestimmung der Anthocyankonzentration		
Salzsäure	Carl Roth	37 %, pur, CAS 7647-01-0
Cyanidin-3-O-Glucosid Chlorid	Carl Roth	Kuromaninchlorid Rotichrom [®] HPLC, CAS 7084-24-4

3.2 Methoden

Hilfsstoffe für die LC-MS-Analysen		
Methanol	VWR	CAS 20864.320
Heptan	Carl Roth	CAS X878.1
Ameisensäure	VWR	CAS 1.00264.1000
Trifluoressigsäure	VWR	CAS 1.00807.1000
Delphinidin-3-O-Glucosid Chlorid	Extrasynthese	CAS 0938
Medien für <i>in vitro</i> Verdauungsversuche		
Natriumchlorid	Carl Roth	CAS 7647-14-5
Kaliumchlorid	Merck / VWR	CAS 7447-40-7
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth	CAS 7778-77-0
Calciumchlorid	Carl Roth	CAS 10035-04-8
Pankreatin	Sigma Aldrich	CAS 8049-47-6
Pepsin	Sigma Aldrich	CAS 9001-75-6
Gallensalz	Fluka	Artikel-Nr. 48305
Salzsäure	Carl Roth	CAS 7647-01-0
Natronlauge	Merck / VWR	CAS 1310-73-2
Puffersysteme		
pH 2	Carl Roth	Artikel-Nr. P715.1
pH 3	Carl Roth	Artikel-Nr. T181.1
pH 4	Carl Roth	Artikel-Nr. P712.1
pH 5	Carl Roth	Artikel-Nr. T183.1
pH 6	Carl Roth	Artikel-Nr. T184.1
pH 7	Carl Roth	Artikel-Nr. A518.1
pH 8	Carl Roth	Artikel-Nr. T186.1

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktlösungen

Zur Herstellung der wässrigen Anthocyanlösungen wurde das anthocyanhaltige Heidelbeerextrakt unter 30-minütigem Rühren mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur in bidestilliertem Wasser gelöst. Bei Bedarf wurde der pH-Wert des Wassers vor der Zugabe des Heidelbeerextrakts mit Zitronensäure auf 3,5 eingestellt. Unlösliche Extraktpartikel wurden durch Abnutschen (Rundfilter FT 3-101-090, Grad 388, Sartorius Stedim biotech, Deutschland) unter Verwendung einer Vakuumpumpe entfernt.

3.2.2 Herstellung der Pektinlösungen

Zur Herstellung der Pektinlösungen wurde zunächst die gewünschte Menge an standardisiertem Pektin oder an nicht standardisiertem Pektin in Kombination mit den zur Gelierung notwendigen Zusatzstoffen in kochendem Wasser (pH 3,5) gelöst. Dies erfolgte unter kontinuierlichem Rühren mit einem T25 digital Ultra-Turrax[®] mit einer S 25 N - 10 G Dispergiereinheit (Durchmesser 7,5 mm, IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) für 2 Minuten bei 8000 1/min und für weitere 2 Minuten bei 10000 1/min.

Die genaue Zusammensetzung der Salz-Pektin-Mischungen, die unter Verwendung des nicht standardisierten Pektins zugegeben wurden, können Tab. 11-1 und Tab. 11-2 im Anhang (Kapitel 11.13) entnommen werden.

3.2.3 Herstellung pektinhaltiger Heidelbeerextraktlösungen

Bei der Herstellung pektinhaltiger Heidelbeerextraktlösungen ist zu beachten, dass die verwendeten Pektine bei Temperaturen von 100 °C in der wässrigen Phase gelöst werden müssen. Da Anthocyane allerdings temperatursensitive Moleküle sind, war es nicht möglich, das Pektin direkt in einer wässrigen Heidelbeerextraktlösung zu lösen. Daher wurde zunächst die 3 1/3-fache Menge der in der endgültigen Heidelbeerextraktlösung gewünschten Pektinkonzentration unter Rühren mit einer Zahnkranzdispergiermaschine (T25 digital Ultra Turrax[®], IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) in kochendem Wasser gelöst. Parallel wurde eine Heidelbeerextraktlösung, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, mit der 1 3/7-fachen Menge der in der endgültigen Lösung gewünschten Extraktkonzentration hergestellt. Anschließend wurden die Pektin- und Heidelbeerextraktlösungen in einem Verhältnis von 3:7 vermischt. Um hierbei zu vermeiden, dass es durch die starke Temperaturdifferenz der beiden Lösungen zu einem vorschnellen Ausgelieren des Pektins und damit möglicherweise zur „Klumpchenbildung“ kommt, wurde die reine Heidelbeerextraktlösung vor dem Mischen auf 40 °C vorgewärmt. Eine kurzzeitige Erwärmung der Anthocyane auf die hierbei auftretenden Temperaturen hat keinen signifikanten Anthocyanabbau zur Folge (siehe Kapitel 4.3).

3.2.4 Bestimmung der relativen Anthocyankonzentration

Wie in Kapitel 2.5.3 erläutert, kann die Absorption der Anthocyane im sichtbaren Bereich sowie die jeweilige Feinstruktur der Spektren zur Identifizierung bzw. Quantifizierung der Anthocyane genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anthocyankonzentration der Heidelbeerextraktlösungen mit einem Einstrahlabsorptionsspektrometer (Cary 50 Conc,

Varian) nach einer von Bonerz et al. beschriebenen Methode bestimmt [Bonerz et al., 2006]. Hierfür wurde 5 %-ige (v/v) Salzsäure entweder für Kalibrierungszwecke zu Cyanidin-3-O-Glykosid-Chlorid-Lösungen definierter Konzentration oder zu den entsprechenden Heidelbeerextraktlösungen zugegeben. Die Heidelbeerextraktlösungen wurden stets mit bidestilliertem Wasser verdünnt, so dass das Absorptionsmaximum bei $\lambda = 520$ nm unterhalb von 1,6 lag (siehe Anhang, Kapitel 11.2). Cyanidin-3-O-Glykosid-Chlorid wurde zur Kalibrierung verwendet, da Cyanidin-3-Glykosid eine der Hauptkomponenten des hier verwendeten Heidelbeerextrakts ist. Durch die Zugabe der Salzsäure werden die Anthocyane in ihre stabilste molekulare Form, das Flavyliumkation, umgewandelt, dessen charakteristische Absorptionswellenlänge, je nach Glykosilierung des Anthocyanidins zwischen 500 und 520 nm liegt. Auf diese Weise ist es möglich, alle in der Lösung vorliegenden Anthocyane und Anthocyanidine zu erfassen. Daher wurde die Absorption der Heidelbeerextraktlösungen vor und nach entsprechender Probenbehandlung bei $\lambda = 520$ nm gemessen. Unter Probenbehandlung sind hier sowohl thermische oder mechanische Beanspruchungen als auch die Lagerung zu verstehen. Die Anthocyankonzentration c_A der Probe wurde basierend auf Cyanidin-3-Glykosid-Äquivalenten unter Verwendung der zuvor bestimmten Kalibriergeraden (siehe Anhang, Kapitel 11.2) ermittelt. Da es sich bei dem verwendeten Heidelbeerextrakt um ein Naturprodukt handelt und daher nicht davon auszugehen ist, dass bei Verwendung der gleichen Menge an Extrakt immer die gleiche Menge an Anthocyanen in die Lösung überführt wird, wurde für eine Vergleichbarkeit der Proben die relative Anthocyankonzentration a , bezogen auf die Ausgangskonzentration, eingeführt. Diese kann nach Gleichung 3.1 berechnet werden.

$$a = \frac{c_A(t)}{c_A(t_0)} \quad 3.1$$

Hierbei bezeichnet $c_A(t_0)$ die Konzentration vor, $c_A(t)$ die Konzentration nach der entsprechenden Probenbehandlung.

3.2.5 Bestimmung der Randbedingungen zum verlustfreien Formulieren von Anthocyanen in multiplen Emulsionen

Bestimmung der Stabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes

Zur Bestimmung der Anthocyanstabilität bei unterschiedlichen pH-Werten wurde das Heidelbeerextrakt nicht in bidestilliertem Wasser, sondern in

Puffersystemen mit unterschiedlichem pH-Wert gelöst (Vorgehen analog Kapitel 3.2.1). Die verwendeten Puffersysteme sind in Tab. 3-2 zusammengefasst. Über einen Zeitraum von 2 Wochen wurde in regelmäßigen Abständen die relative Anthocyankonzentration a bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte unter Lichtausschluss bei $T = 4\text{ °C}$.

Bestimmung der Anthocyanstabilität unter Anwesenheit von Pektin als Copigment

Um den Einfluss von Pektin auf die Anthocyanstabilität zu untersuchen, wurde die relative Anthocyankonzentration wässriger Heidelbeerextraktlösungen sowohl ohne Pektin als auch mit 1,5 % standardisiertem Pektin über einen Zeitraum von 30 Tagen bestimmt. Die Extraktkonzentration der Lösungen betrug 0,5 %. Die Lagerung der Proben erfolgte unter Lichtausschluss bei $T = 4\text{ °C}$.

Methode zur Untersuchung der Anthocyanstabilität im Homogenisierprozess

Um zu untersuchen, inwieweit Anthocyane durch die mechanischen und thermischen Beanspruchungen im Homogenisierprozess degradiert werden, wurden wässrige Heidelbeerextraktlösungen definierten mechanischen oder thermischen Beanspruchungen, wie sie auch im Emulgierprozess auftreten, ausgesetzt.

Zur Untersuchung der thermischen Anthocyanstabilität wurden wässrige Heidelbeerextraktlösungen mit Extraktkonzentrationen von $c_{HE} = 250\text{ }\mu\text{g/ml}$ auf Temperaturen von 60 °C , 70 °C und 90 °C erwärmt, was Temperaturen entspricht, die typischerweise im Emulgierprozess auftreten können. Die kurzen Verweilzeiten t_V in Emulgieranlagen, die je nach Emulgiermaschine zwischen 30 ms und 5 s liegen können, wurden durch Erwärmen der Proben in einem Mikrowärmetauscher (hergestellt vom Institut für Mikroprozessertechnik, KIT, $t_V < 1\text{ s}$, Heizrate $\Delta T/\Delta t \sim 850\text{ °C/s}$) realisiert. Um die Stabilität der Proben bei Heizzeiten bis zu 120 Minuten zu untersuchen, wurden die Proben nach dem Aufheizen im Mikrowärmetauscher in Wärmeschränken bei entsprechender Temperatur gelagert. Hierbei wurde alle 30 Minuten die Anthocyankonzentration c_A bestimmt und die entsprechende relative Anthocyankonzentration a berechnet.

Um den Einfluss von kombinierten thermisch-mechanischen Beanspruchungen auf die Anthocyanstabilität zu untersuchen, wurden Heidelbeerextraktlösungen mit $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ und $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ Heidelbeerextrakt in einem Hochdruck-

homogenisator (MF-110EH-30, Blendenkombination: F12Y – 75 μm / H 30 Z – 200 μm , Microfluidics[®], USA) bei Homogenisierdrücken zwischen 300 und 1500 bar beansprucht. Bei diesen Prozessbedingungen wirken sowohl hohe Scherraten als auch Kavitation [Baldyga et al., 2009] auf die Tropfen und damit auch auf die bioaktiven Moleküle. Nach der Homogenisierung wurden die wässrigen Heidelbeerextraktlösungen sofort in Eiswasser auf 25 °C abgekühlt. Anschließend wurde die Anthocyankonzentration c_A bestimmt und die entsprechende relative Anthocyankonzentration a berechnet [Frank et al., 2012].

3.2.6 Methoden zur Untersuchung des Übergangs von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

Zur Untersuchung des im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Übergangs hydrophiler Farbstoffmoleküle in die Ölphase, wurden vier verschiedenen Hypothesen untersucht. Im Folgenden werden die Methoden erläutert, die zur Untersuchung dieser Hypothesen angewendet wurden. Alle Untersuchungen wurden am Beispiel des anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes durchgeführt [Frank et al., 2011a].

Die für diese Versuche hergestellten W_1/O -Emulsionen wurden in einem Hochdruckhomogenisator (MF 110 EH-30, Blendenkombination: F12Y – 75 μm / H 30 Z – 200 μm , Microfluidics[®], USA) bei Homogenisierdrücken von $\Delta p = 1000$ bar emulgiert. Zur beschleunigten Separation der kontinuierlichen Ölphase, wurden die Proben für 24 Stunden bei 11500 1/min bzw. 14780 RZB (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert (Rotana 460 R, Hettich Zentrifugen, Deutschland). Anschließend erfolgte eine spektralphotometrische Charakterisierung (Cary 50 Conc, Varian) der gefärbten Ölphasen bei 520 nm, der charakteristischen Absorptionswellenlänge des Flavyliumkations [Merken et al., 2000].

Untersuchungen zu Hypothese 1: Chemische Reaktion

Um aufzuklären in welcher chemischen Struktur die Anthocyanmoleküle in der Ölphase vorliegen und ob eine chemische Reaktion als Ursache für den beobachteten Übergang von Farbstoffmolekülen in die Ölphase in Frage kommt, wurden die gefärbten Ölphasen mittels kombinierter Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) / Diodenarraydetektor (DAD) / Massenspektroskopie (MS) von Dr. Susanne Skrebek am Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung des Max Rubner-Instituts in Karlsruhe untersucht. Hierfür wurden die Anthocyane methanolisch aus der Ölphase extrahiert, mittels Stickstoffverdampfung getrocknet, in angesäuertem Wasser gelöst und schließlich in die HPLC / DAD / MS injiziert. Vorab wurden Fettrückstände durch Extraktion mit

Heptan entfernt. Die Analysen wurden in einer HPLC-Apparatur der HP 1200 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt, das mit einem DAD ausgestattet war. Darüber hinaus war das HPLC-System mit einem Massenspektrometer mit Tripelquadrupol als Ionenfalle ausgestattet (3200 QTrap; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die Analyten wurden im positiven Ionenmodus detektiert und die Datenerfassung erfolgte online durch Aufnahme des für jede Komponente spezifischen Übergangs von Ausgangs- und Produktionen.

Untersuchungen zu Hypothese 2: Intermolekulare Copigmentierung

Um zu untersuchen, ob der Übergang von Farbstoffmolekülen in die Ölphase auf intermolekularer Copigmentierung beruht, wurden die ursprünglichen anthocyanhaltigen Wasserphasen sowie die abzentrifugierten, rot gefärbten Ölphasen spektralphotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 900 nm untersucht. Da eine intermolekulare Copigmentierung mit einer Farbintensivierung, d.h. dem sogenannten hyperchromatischen Effekt, sowie einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen, dem bathochromen Effekt, einher geht, ist es auf diese Weise möglich, copigmentierte Anthocyane nachzuweisen [Asen et al., 1972a; Asen et al., 1972b].

Untersuchungen zu Hypothese 3: Inverse Emulgatormizellen

Um zu untersuchen, ob ein Transport von Farbstoffmolekülen in inversen Emulgatormizellen für den beobachteten Übergang von Anthocyanen in die Ölphase verantwortlich ist, wurde zunächst die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von PGPR an der Pflanzenöl-Wasser-Grenzfläche mittels Spinning-Drop-Tensiometrie bestimmt. Diese Messungen wurden im Rahmen des in Kapitel 1 beschriebenen Clustervorhabens von Dr. Sabine Leick am Lehrstuhl für physikalische Chemie II, TU Dortmund, an einem kommerziell erhältlichen Spinning Drop Video Tensiometer SVT 20 der DataPhysics Instruments GmbH durchgeführt. Nähere Informationen zur Spinning-Drop-Tensiometrie sind in [Leick et al., 2010] zusammengefasst.

Anschließend wurden W_1/O -Emulsionen mit PGPR-Anteilen größer und kleiner der CMC hergestellt. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurde visuell und spektralphotometrisch untersucht, ob es auch für Emulgatorkonzentrationen unter der CMC zu einem Übergang von Anthocyanmolekülen in die Ölphase kam. Wenn der Ölübergang auf einen Transport in inversen Emulgatormizellen

beruht, sollte sich für $c_{PGPR} < CMC$ keine signifikante Färbung der Ölphase beobachten lassen.

Untersuchungen zu Hypothese 4: Löslichkeitseffekte

Um aufzuklären, ob der Übergang von Anthocyanmolekülen in die Ölphase von Löslichkeitseffekten bzw. dem Verteilungskoeffizienten $\log P$ abhängt, wurden W_1/O -Emulsionen mit 0,05 bis 0,5 % Heidelbeerextrakt in der W_1 -Phase sowohl mit als auch ohne PGPR in der Ölphase hergestellt, zentrifugiert und bezüglich der Färbung der Ölphase analysiert.

Darüber hinaus wurden 0,05 bis 0,5 % Heidelbeerextrakt direkt zum Pflanzenöl zugegeben und mittels Hochdruckhomogenisator bei einem Homogenisierdruck Δp von 1000 bar homogenisiert. Anschließend wurden unlösliche Extraktbestandteile durch Zentrifugieren entfernt. Die klaren Lösungen wurden dann sowohl visuell als auch spektralphotometrisch bezüglich der Färbung der Ölphase untersucht.

Neben den praktisch durchgeführten Untersuchungen zum Übergang von Anthocyan-molekülen in die Ölphase, wurde der Einfluss der molekularen Form der Anthocyane auf den Verteilungskoeffizienten $\log P$ mittels Cosmo-RS-Simulationen analysiert. Dies erfolgte mit dem Programm *COSMOtherm* (F. Eckert und A. Klamt, *COSMOtherm*, Version C2.1, Release 01.10; *COSMOlogic GmbH & Co. KG*, Leverkusen, Deutschland, 2009). Hierfür wurden zunächst die quantenchemischen Modelle der untersuchten Anthocyanmoleküle, des Wassers als disperse Phase sowie der in der kontinuierlichen Ölphase enthaltenen Fettsäuren im BP-TZVP-Level mittels Turbomole V6.2 (*COSMOlogic GmbH & Co. KG*, Leverkusen, Deutschland) ermittelt. Für die anschließend durchgeführten COSMO-RS-Simulationen wurde die Fettsäurezusammensetzung des in den Versuchen verwendeten MCT-Öls zugrundegelegt (siehe Anhang, Kapitel 11.5). Es wurden zum einen Berechnungen gemacht, bei denen davon ausgegangen wurde, dass das Öl wasserfrei ist (Wassergehalt in Phase 2: 0%). Zum anderen wurden Berechnungen durchgeführt, bei denen die im Öl gelöste Wassermenge mit berücksichtigt wurde. Mit dem Feuchtebestimmer KERN MLS 65-3A der Firma Kern und Sohn GmbH, Deutschland, wurde im reinen MCT-Öl ein Wassergehalt von 0,15 % ermittelt. Unter Berücksichtigung dieser Werte wird den COSMO-RS-Simulationen die in Tab. 3-3 dargestellte Zusammensetzung der Phasen 1 und 2 zugrundegelegt.

3 Material und Methoden

Tab. 3-3: Bei den Cosmo-RS-Berechnungen zugrundeliegende Zusammensetzung der beiden Phasen.

Phase		Anteile, wenn kein Wasser im Öl löslich ist [-]	Anteil, wenn die Löslichkeit von Wasser im Öl bei 0,15 % liegt [-]
Phase 1: Wasser	Reines Wasser	1	1
Phase 2: Öl	Caprinsäure	0,38	0,37943
	Capronsäure	0,02	0,01997
	Caprylsäure	0,58	0,57913
	Laurinsäure	0,02	0,01997
	Wasser	0	0,0015

Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten P der einzelnen Anthocyane bzw. Anthocyanglykoside zwischen Wasser und Öl wurde bei 25 °C sowie bei 45 °C durchgeführt.

3.2.7 Herstellung der W_1/O -Emulsionen

Zur Herstellung der W_1/O -Emulsionen wurde zunächst der lipophile Emulgator PGPR in der Ölphase gelöst. Um eine bessere Löslichkeit des PGPRs im Öl zu erreichen, erfolgte dies unter einstündigem Rühren bei 40 °C mit einem Propellerrührer (3-flügelig, Durchmesser 55 mm, IKA[®], Deutschland) bei 200 1/min. Die Konzentration an PGPR betrug, außer bei den Untersuchungen zum Ölübergang in inversen Mizellen, stets 2,5 % bezogen auf die Ölphase. Als disperse W_1 -Phase wurde entweder bidestilliertes Wasser, eine Pektinlösung oder eine anthocyanhaltige Pektinlösung eingesetzt. Die Pektinlösungen sowie die anthocyanhaltigen Pektinlösungen wurden entsprechend der in Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.2.3 beschriebenen Vorgehensweise hergestellt.

Anschließend wurde die W_1 -Phase mit einer Geschwindigkeit von 0,7 g/s zur Ölphase zugegeben und mit einem Ultra-Turrax T25 (Dispergiereinheit S 25 N - 10 G, Durchmesser 7,5 mm, IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland) für 3 Minuten bei 8000 1/min in einem 500 ml-Becherglas vordispersiert. Um den Einfluss von Prozessparametern auf die Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen zu untersuchen, wurden die feindispersen W_1/O -Emulsionen dann mit einem Hochdruckhomogenisator (MF 110 EH-30, Blendenkombination: F12Y – 75 µm / H 30 Z – 200 µm, Microfluidics[®], USA) oder mit einer Zahnkranzdispergiermaschine (Magic Lab[®], Modul DR, IKA[®],

3.2 Methoden

Deutschland) hergestellt. Das Emulgieren mittels Hochdruckhomogenisator erfolgte bei Homogenisierdrücken Δp zwischen 300 und 1000 bar, das Emulgieren in der Zahnkranzdispergiermaschine bei Drehzahlen zwischen 5000 und 15000 1/min. Das entspricht Umfangsgeschwindigkeiten von 7,7 bis 23 m/s. Die Anzahl der Durchläufe wurde zwischen 1 und 3 variiert.

Die W_1/O -Emulsionen wurden direkt nach der Herstellung im Kühlschrank bei 4 °C abgekühlt, um zum einen einem thermisch induzierten Abbau von eingeschlossenen Anthocyanen entgegenzuwirken. Zum anderen sollte hierdurch die Ausgelierung der pektinhaltigen W_1 -Phasen induziert bzw. beschleunigt werden.

3.2.8 Herstellung der anthocyanhaltigen Doppelemulsionen

Die Herstellung der $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen erfolgte in einem zweistufigen Emulgiervorgang (siehe Abb. 3-2). Im ersten Schritt wurde die innere wässrige Phase in der umgebenden Triglyceridphase emulgiert. Während des zweiten Emulgierschrittes wurde dann die zuvor hergestellte W_1/O -Emulsion in der W_2 -Phase emulgiert.

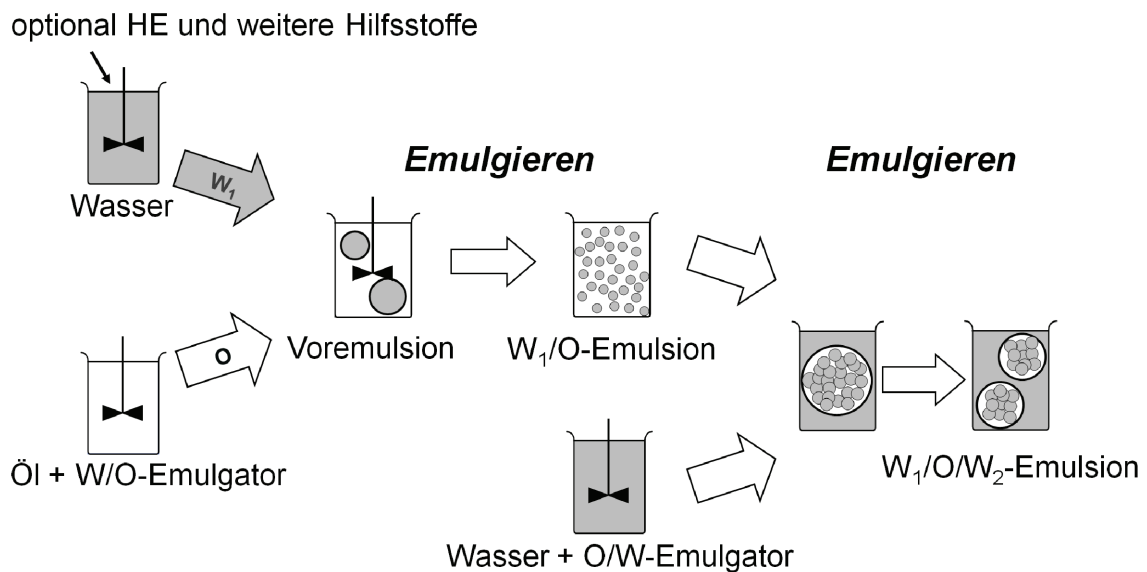


Abb. 3-2: Zweistufiges Emulgiervorgang zur Herstellung von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen. Im ersten Schritt wird eine W_1/O -Emulsion hergestellt. Im zweiten Schritt wird diese W_1/O -Emulsion in der W_2 -Phase emulgiert.

Herstellung der inneren wässrigen Phase

Um einen hohen Erhalt der inneren W_1 -Tropfen während des zweiten Emulgierschrittes und der darauffolgenden Lagerung sicherzustellen, wurden der inneren Wasserphase stets 1,5 % des zuvor beschriebenen standardisierten Pektins zugegeben. Die Proben wurden vor dem zweiten Emulgierschritt durch Abkühlen der W_1/O -Emulsion auf 4 °C ausgelieert. Die Herstellung der Pektinlösungen bzw. der anthocyanhaltigen Pektinlösungen erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 bzw. Kapitel 3.2.7 beschrieben.

Herstellung der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen

Während des zweiten Emulgierschrittes wurde die W_1/O -Emulsion zunächst mit einer Geschwindigkeit von 0,3 g/s unter Rühren mit einem Propellerrührer (3-flügelig, Durchmesser 55 mm, IKA[®], Deutschland) bei 200 1/min zur W_2 -Phase zugegeben. Die Herstellung der Feinemulsion erfolgte dann mit einer Kolloidmühle (Magic Lab[®], Module MK, IKA[®], Deutschland) bei einer konstanten Drehzahl von 3000 1/min. Das entspricht einer maximalen Umfangsgeschwindigkeit von etwa 3,5 m/s. Die Spaltweite wurde zur Variation des Energieeintrages zwischen 0,16 und 0,24 mm verändert. Die W_2 -Phase setzte sich aus bidestilliertem Wasser und 2 % hydrophilem Emulgator zusammen. Darüber hinaus wurden der W_2 -Phase bei einem Großteil der hergestellten Emulsionen 1,5 % standardisiertes Pektin zugegeben, um die Viskosität der W_2 -Phase zu erhöhen.

3.2.9 Charakterisierung der dispersen bzw. kontinuierlichen Phasen

Grenzflächenspannungsmessungen

Zur Bestimmung der Grenzflächenaktivität der eingesetzten Salze bzw. Pektine wurde die statische Grenzflächenspannung unterschiedlicher Salz- bzw. Salz-Pektin-Lösungen gegen Pflanzenöl bzw. PGPR-haltige Pflanzenöllösungen ($C_{PGPR} = 2,5 \%$) ermittelt. Die Messungen wurden bei 50 °C (minimale Prozesstemperatur bei der Emulsionsherstellung) mit der Wilhelmy-Platten-Methode durchgeführt (DCAT 11, DataPhysics Instruments GmbH, Deutschland).

Zur Charakterisierung der Grenzflächenaktivität der eingesetzten hydrophilen Emulgatoren wurde die CMC der Emulgatoren an der Pflanzenöl-Wasser-Grenzfläche mittels Pendant-Drop-Tensiometrie bestimmt. Außerdem wurde die dynamische Grenzflächenspannung 2 %-iger wässriger Emulgatorlösungen an

der Pflanzenöl-Wasser-Grenzfläche in Abhängigkeit des Grenzflächenalters gemessen. Darüber hinaus wurde das Grenzflächenverhalten von wässrigen Heidelbeerextraktlösungen mit Extraktkonzentrationen von 0 bis 0,5 % gegen reines Pflanzenöl untersucht. Die Messungen wurden im Rahmen des in Kapitel 1 beschriebenen Clustervorhabens von Dr. Sabine Leick am Lehrstuhl für physikalische Chemie II, TU Dortmund, an einem kommerziell erhältlichen Pendant Drop Tensiometer PAT 1 von Sinterface Technologies, Deutschland bei 20 °C durchgeführt. Nähere Informationen zur Pendant-Drop-Tensiometrie sind in [Leick et al., 2009] zusammengefasst.

Bestimmung der Geliertemperatur von Pektinen

Die Messungen zur Bestimmung der Geliertemperatur der eingesetzten Pektine wurden mit dem Rheometer Physica MCR 301 von Anton Paar GmbH, Deutschland mit einer Zylindergeometrie (CC27-Serial No. 19217; Durchmesser 28,92 mm) durchgeführt.

Zunächst wurde der viskoelastische Bereich der Pektinlösungen bestimmt. Hierfür wurde ein Amplitudensweep bei einer konstanten Temperatur von 20 °C und einer konstanten Frequenz von 1 Hz in einem Deformationsbereich von 0,01 bis 100 % durchgeführt.

Da ein System vollständig ausgeliert ist, wenn der Speichermodul G' und der Verlustmodul G'' identisch sind, erfolgte die Bestimmung der Geliertemperatur der verwendeten Pektine über einen Temperaturesweep. Hierbei wurden oszillatorische Messungen unter Vorgabe einer konstanten, im viskoelastischen Bereich liegenden Deformation, und einer konstanten Frequenz von 1 Hz durchgeführt. Die Temperatur war durch eine definierte Abkühlrate vorgegeben. Für $G' = G''$ konnte die Geliertemperatur abgelesen werden [Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken, 2008b].

3.2.10 Charakterisierung der Emulsionssysteme

Rheologische Untersuchungen

Zur Bestimmung des Viskositätsverhältnisses λ der inneren W_1/O -Emulsionen wurden die Fließkurven der dispersen W_1 -Phase sowie der zugehörigen W_1/O -Emulsionen in einem Scherratenbereich von 0,1 bis 1000 1/s aufgenommen (Rheometer: Physica MCR 301, Anton Paar GmbH, Deutschland). Die Messungen erfolgten mit einer Zylindergeometrie (CC27-Serial No. 19217; Durchmesser 28,92 mm) bei 50 °C (minimale Prozesstemperatur bei der Emulsionsherstellung). Die Scherrate wurde beginnend bei 0,1 1/s in 25

Schritten auf 1000 1/s gesteigert. Hierbei wurde für jeden Schritt nach Erreichen eines Gleichgewichts ein Messwert aufgenommen. Aus den gemessenen Schubspannungen konnte die Viskosität der Proben berechnet werden. Zur Bestimmung von λ wurde stets die Viskosität bei der maximal untersuchten Scherrate von 1000 1/s herangezogen.

Partikelgrößenanalyse der dispersen Trägersysteme

Zur Charakterisierung der Mikrostruktur der hergestellten Emulsionssysteme wurde in dieser Arbeit hauptsächlich die Partikelmesstechnik eingesetzt. Da es mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich ist, die Größe der inneren W_1 -Tropfen von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen quantitativ zu bestimmen, wurden die Dopplemulsionen nur bezüglich der W_1/O -Tropfengröße charakterisiert. Um dennoch einen groben Anhaltspunkt zu den Tropfengrößen der inneren W_1 -Tropfen zu bekommen, wurden die Tropfengrößenverteilungen der W_1 -Tropfen der inneren W_1/O -Emulsionen vor dem zweiten Emulgierschritt bestimmt. Unter optimalen Bedingungen, d.h. wenn es zu keinen Instabilitäten aufgrund des zweiten Emulgierschrittes kommt, ist davon auszugehen, dass die W_1 -Tropfengrößen in den Dopplemulsionen den Tropfengrößen in den W_1/O -Emulsionen vor dem zweiten Emulgierschritt entsprechen.

Die Tropfengrößenverteilung der W_1 -Tropfen von W_1/O -Emulsionen wurden in einem Beckman Coulter LS 230, die Tropfengrößenverteilung der W_1/O -Tropfen von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen in einem Beckman Coulter LS 13 320 (beide Coulter Electronics GmbH, Deutschland) bestimmt. Beide Messgeräte arbeiten nach dem Prinzip der Laserbeugung, kombiniert mit der Polarized Intensity Differential Scattering (PIDS)-Technologie, so dass die Geräte für eine identische Probe die gleichen Messergebnisse liefern. Laserbeugung ist ein statisches Streulichtverfahren. Es ermöglicht, dispergierte Partikel oder Tropfen im Größenbereich von 1,0 μm bis etwa 2000 μm zu bestimmen. Unter Einbeziehung der PIDS-Technologie können auch Tropfen im Bereich von 0,04 μm bis 1,0 μm erfasst werden. Der Messbereich ist allerdings geräteabhängig. Die Angaben beziehen sich auf die hier verwendeten Geräte der Firma Beckman Coulter.

Die den Messungen zugrunde liegenden optischen Modelle können Tab. 3-4 entnommen werden. Der Imaginärteil des Brechungsindex berücksichtigt hier die Lichtabsorption in der Probe. Da Wasser farblos und transparent ist, konnte für die reinen Wasserphasen ein Imaginärteil von 0 vorgegeben werden. Wie aus früheren Arbeiten hervorgeht, ist auch bei Verwendung farbiger Inhaltsstoffe in den Emulsionen eine Bestimmung der Partikelgrößen auf Basis von realen Brechungsindizes möglich, ohne dass es zu nennenswerten Änderungen der

3.2 Methoden

Messergebnisse kommt [Ax, 2003]. Zudem hatte die Zugabe von Heidelbeerextrakt zur W_1 -Phase keinen signifikanten Einfluss auf den Realteil des Brechungsindex der heidelbeerextrakthaltigen Phasen (siehe Anhang, Kapitel 11.1). Durch die Zugabe von Pektin verändert sich der Realteil des Brechungsindex der wässrigen Phasen auf 1,363, was jedoch die Tropfengrößenverteilungen nicht signifikant beeinflusste. Daher wurde für alle Systeme das in Tab. 3-4 dargestellte optische Modell verwendet.

Bei der Bestimmung der W_1/O -Tropfengröße ist davon auszugehen, dass es durch die inneren Wassertropfen zu Lichtabsorption kommt. Da der komplexe Brechungsindex keine Messgröße ist und somit nicht direkt bestimmt werden kann, ist nicht vorherzusagen, was für die hier durchgeführten Messungen der richtige Imaginärteil ist. Daher wurde der Imaginärteil wie bei den einfachen Emulsionen auf 0 gesetzt. Da sowohl die Zusammensetzung der inneren W_1 -Tropfen als auch der innere Dispersphasenanteil der in dieser Arbeit untersuchten Doppelemulsionen immer gleich war, ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch dann gegeben, wenn der tatsächliche Imaginärteil von 0 abweichen würde.

Tab. 3-4: Verwendete optische Modelle zur Bestimmung der W_1 - bzw. der W_1/O -Tropfengröße.

Stoffsystem	Kontinuierliche	Disperse Phase	
	Realteil	Realteil	Imaginärteil
W_1/O-	1,47	1,33	0
$W_1/O/W_2$-	1,33	1,47	0

Als Kenngröße zur Charakterisierung der vorliegenden Partikel- und Tropfengrößenverteilungen wurden in der Regel der $x_{90,3}$ -Wert oder der Sauterdurchmesser $x_{1,2}$ gewählt. Der $x_{90,3}$ -Wert stellt ein Maß für die größten Tropfen der Verteilung dar. Er ist definiert als die Partikelgröße, bei der 90 % des Dispersphasenvolumens der Tropfen kleiner sind [DIN ISO 9276-2, 2009]. Er ist deshalb von besonderem Interesse, da oftmals bereits kleine Anteile an großen Tropfen die Emulsionsqualität negativ beeinflussen können, z.B. durch verstärkte Aufrahmung bzw. Sedimentation. Der Sauterdurchmesser $x_{1,2}$, der insbesondere in der englischsprachigen Literatur auch oft als $d_{3,2}$ bezeichnet wird, stellt die, der spezifischen Oberfläche des gesamten Partikelkollektivs entsprechende, mittlere Kugelgröße dar [DIN ISO 9276-2, 2009; Stieß, 2009]. Damit ist er ein Maß für die spezifische Grenzfläche im System und ist dann von Interesse, wenn die Phasengrenzfläche eine Rolle spielt, beispielsweise bei der Belegung der Tropfenoberfläche mit Emulgatormolekülen oder der Freisetzung

von verkapselten Substanzen über die Tropfengrenzfläche. Eine weitere zur Charakterisierung der Tropfen herangezogene Kenngröße ist der $x_{50,3}$ -Durchmesser, der sogenannte Medianwert einer Volumenverteilungssumme. Er ist definiert als die Partikelgröße, bei der 50 % des Dispersphasenvolumens der Tropfen kleiner sind [DIN ISO 9276-2, 2009].

Zur Minimierung von Fehlern bei der Probencharakterisierung, die z.B. auf Unregelmäßigkeiten bei der Probennahme oder eine schlechte Durchmischung im Gerät basieren, wurde die Tropfengrößenverteilung jeder hergestellten Emulsion mindestens 3-fach gemessen und der Mittelwert der Messwerte gebildet. Zur Erfassung von Fehlern, die während der Probenvorbereitung bis hin zur Probennahme für die Tropfengrößenanalyse entstehen, wurden Versuche, bei denen die Standardabweichungen als Fehlerbalken aufgetragen sind, dreimal vollständig wiederholt. Das heißt, die Versuche wurden stets individuell vorbereitet und durchgeführt.

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Emulsionen

Zur optischen Charakterisierung der Mikrostruktur wurden ausgewählte W_1/O -Emulsionen mit einem Zeiss Axioskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) bei 100 bis 1000-facher Vergrößerung von Michael Betz am Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Abteilung Technologie der TU München analysiert. Die Messungen wurden im Rahmen des in Kapitel 1 beschriebenen Clustervorhabens durchgeführt.

3.2.11 Methode zur Bestimmung der Freisetzung eingeschlossener Substanzen

Um den Einfluss unterschiedlicher Emulsionsstrukturen auf die Freisetzung eingeschlossener Anthocyane aus $W_1/O/W_2$ -Doppелеmulsionen zu untersuchen, wurden Versuche mit demineralisiertem Wasser als Freisetzungsmedium durchgeführt. Bei klassischen Freisetzungsversuchen mit festen Kapselsystemen kann nach dem Einrühren der Kapseln in das Freisetzungsmedium regelmäßig eine Probe des Freisetzungsmediums entnommen und bezüglich der freigesetzten Wirkstoffmenge untersucht werden. Die Probennahme erfolgt hier oftmals mit einfachen Spritzen. Hat man es allerdings nicht mit festen Kapselsystemen, sondern mit Doppелеmulsionen zu tun, werden sich die W_2 -Phase und das Freisetzungsmedium beim Einrühren der $W_1/O/W_2$ -Emulsion vermischen. Das hat zur Folge, dass bei der einfachen Probennahme mit einer Spritze stets auch ein Teil der beladenen Öltropfen mit entnommen würde. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit immer ein hydrophiler Spritzenvorsatzfilter (Spritzenvorsatzfilter 2 mm, 0,45 μ m, Polyvinylidenfluorid

3.2 Methoden

(PVDF), unsteril, Buddeberg GmbH) hinzugezogen (siehe Abb. 3-3). Auf diese Weise war es möglich, Proben der umgebenden Phase, bestehend aus W_2 und Freisetzungsmedium, ohne beladene Öltröpfchen, abzutrennen.



Abb. 3-3: Schematischer Aufbau der durchgeführten Freisetzungsversuche.

Die entnommenen Proben wurden anschließend mittels der in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Methode nach Bonerz et al. (2006) charakterisiert. Anhand der somit bestimmten Anthocyankonzentration c_A ist allerdings nur dann ein direkter Vergleich des Freisetzungsverhaltens von verschiedenen Dopplemulsionen möglich, wenn deren W_1 -, O- und W_2 -Anteile sowie die Menge an anfangs in der Emulsion gelösten Anthocyanen identisch sind. Um eine Vergleichbarkeit auch für Emulsionssysteme mit unterschiedlicher Zusammensetzung sicherzustellen, wurde in dieser Arbeit der Freisetzungsfaktor F eingeführt, der wie folgt definiert ist:

$$F(t) = \frac{c_A(t)}{c_{A,GGW}} \quad 3.2$$

Hierbei bezeichnet c_A die gemessene Anthocyankonzentration und $c_{A,GGW}$ die Gleichgewichtskonzentration, die sich für $t \rightarrow \infty$ zwischen innerer und äußerer Wasserphase einstellen wird. Diese kann folgendermaßen berechnet werden:

$$c_{A,GGW} = \frac{\text{Gesamtmasse an Anthocyanen}}{\text{Gesamtvolumen an Wasser}} = \frac{m_A}{V_1 + V_2 + V_F} \quad 3.3$$

Mit:

m_A	Gesamtmasse an Anthocyanen
V_1	Volumen des Wassers in W_1
V_2	Volumen des Wassers in W_2
V_F	Volumen des Freisetzungsmediums

Zur Durchführung der Versuche wurden stets 15 g Emulsion in 150 g Freisetzungsmedium eingerührt. Der Freisetzungsfaktor wurde nach

30 Minuten, nach 1 Stunde, nach 3 sowie nach 5 Stunden ermittelt. Die Proben wurden mit einem Magnetrührer (Durchmesser 4 cm) bei 100 1/min in einem 250 ml Becherglas gerührt.

3.2.12 Magen-Darm-Modell zur Bestimmung der Stabilität und der Freisetzung im Gastrointestinaltrakt

Das Magen-Darm-Modell

Zur Untersuchung der Magen-Darm-Stabilität unterschiedlicher $W_1/O/W_2$ -Emulsionen wurden die Proben *in vitro* Verdauungsversuchen ohne „Mundpassage“ unterzogen. Die Versuchsbedingungen sind angelehnt an [DIN 19738, 2004]. Hierfür wurden die Emulsionen im Rahmen des in Kapitel 1 beschriebenen Clusterprojektes am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik des Max Rubner-Instituts (MRI) in Karlsruhe für 1 Stunde in simuliertem Magensaft und anschließend für weitere 5 Stunden in simuliertem Darmsaft bei $T = 37\text{ °C}$ inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem FairMenTec-Laborbioraktor (Bioengineering AG, Schweiz) mit einem Gesamtvolumen von 2,3 l. Da es auch im menschlichen Magen-Darm-Trakt zum regelmäßigen Durchmischen des Speisebreis durch die Peristaltik kommt, wurden die Proben während der gesamten Inkubation mit einem Paddelrührer (6 Rührblätter, Durchmesser 50 mm) bei einer konstanten Drehzahl von 280 1/min vermischt. Die Zusammensetzung der simulierten Verdauungsmedien kann Tab. 3-5 entnommen werden.

Tab. 3-5: Zusammensetzung der in den *in vitro* Verdauungsversuchen eingesetzten Verdauungsmedien.

Simulierter Magensaft: pH 2 (HCl)
Magenelektrolyt: 2,9 g/(l bidest. Wasser) NaCl 0,7 g/(l bidest. Wasser) KCl 0,27 g/(l bidest. Wasser) KH_2PO_4
Pepsin
Simulierter Darmsaft: pH 8 (NaOH)
Darmelektrolyt: 5 g/(l bidest. Wasser) NaCl 0,6 g/(l bidest. Wasser) KCl 0,4 g/(l bidest. Wasser) $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Gallensäure
Pankreatin

Um explizit den Effekt der Verdauungsenzyme während der Inkubation unter gastrointestinalen Bedingungen zu untersuchen, wurden die Versuche sowohl mit als auch ohne die Verdauungsenzyme Pepsin und Pankreation durchgeführt.

Charakterisierung der verdauten Emulsionssysteme

Um durch die Verdauung auftretende Veränderungen in der Emulsionsstruktur aufzuzeigen, wurden die Proben sowohl vor den Inkubationen also auch nach 1 Stunde im simulierten Magensaft sowie nach 1, 3 und 5 Stunden im simulierten Darmsaft mittels Laserbeugung (Mastersizer 2000, Malvern Instruments GmbH, Deutschland) und Flow Particle Image Analyzer (Sysmex FPIA 3000, Malvern Instruments GmbH, Deutschland) charakterisiert.

Mit dem Mastersizer 2000 wurde überprüft, ob es während der *in vitro* Verdauung zu Änderungen in der Tropfengrößenverteilung der Emulsionen kommt. Hierbei wurden die gleichen optischen Modelle herangezogen wie bei den Messungen mit dem Coulter LS 13 320. Der Messbereich des Mastersizer 2000 beträgt laut Hersteller 0,02 bis 2000 μm .

Der Sysmex FPIA-3000 ermöglicht außerdem die Bestimmung von Tropfengröße und Tropfenform unter Verwendung automatisierter Bildanalyseverfahren. Der vom Hersteller angegebene Messbereich beläuft sich auf 0,8 bis 300 μm . Diese Untersuchungen sollten Aufschluss über die Füllung der Öltropfen mit W_1 -Tropfen geben.

Methode zur Untersuchung der Aufnahme von Anthocyanen im Gastrointestinaltrakt

Neben diesen Versuchen wurde die Anthocyanfreisetzung aus $W_1/O/W_2$ -Emulsionen während der gastrointestinalen Inkubation bzw. die Anthocyanaufnahme im Dünndarm untersucht. Hierfür wurden die Emulsionen während der *in vitro* Verdauungsversuche durch einen Dialyseschlauch (Porengröße 1000 Dalton, Artikel Nr. 887.1, Carl Roth) gepumpt. Auf der gegenüberliegenden Membranseite befand sich als Freisetzungsmedium physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Der Dialyseschlauch entspricht in diesen Versuchen der menschlichen Darmwand. In regelmäßigen Abständen wurde eine Probe des Freisetzungsmediums mittels hydrophiler Spritzenfilter (Spartan[®], Durchmesser 30 mm, Porengröße 0,2 μm , Whatman) abgezogen und nach der Methode von Bonerz et al. (2006) photometrisch analysiert.

3.2.13 Bestimmung der Osmolalität der Freisetzungsmethoden

Die Osmolarität der Freisetzungsmethoden wurde mit dem Advanced 3MO Plus Osmometer (Advanced Instruments Inc., USA) indirekt über die Gefrierpunktsniedrigung der Lösungen bestimmt. Dies ist möglich, da die Osmolarität den Gefrier- und Siedepunkt einer Lösung beeinflusst. Die Kalibrierung des Messgerätes erfolgte mit den Kalibrierstandards 50 mOsm/kg H₂O (Artikel-Nr. 3MA005, Advanced Instruments Inc., USA) sowie 850 mOsm/kg H₂O (Artikel-Nr. 3MA085, Advanced Instruments Inc., USA).

3.2.14 Untersuchungen zur chemopräventiven Wirkung des Heidelbeerextraktes

Um zu untersuchen, inwieweit die krebspräventive Wirkung des in dieser Arbeit verwendeten Heidelbeerextraktes durch die Formulierung in Doppemulsionen beeinflusst wird, wurden die im Folgenden dargestellten Untersuchungen bzgl. der chemopräventiven Wirkung von reinen Heidelbeerextraktlösungen sowie von extrakthaltigen Doppemulsionen an humanen Kolonkarzinomzellen durchgeführt.

Diese Arbeiten wurden im Rahmen des in Kapitel 1 beschriebenen Clustervorhabens von Christopher Kropat als Teil seiner Dissertation am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien, durchgeführt und ausgewertet.

Modulation der EGFR-Phosphorylierung

Um zu untersuchen, ob eine potente Hemmung der Rezeptoraktivität im intakten Zellsystem in Form einer Hemmung der Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) zum Tragen kommt, wurde der Western Blot Assay angewandt. Am Modell von humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) wurde hierbei untersucht, wie stark die Aktivität des EGFR als Biomarker durch das unverkapselte Heidelbeerextrakt und durch das in Doppemulsionen eingeschlossene Heidelbeerextrakt gehemmt wird. Eine Hemmung des EGFR kann dabei Aufschlüsse über eine mögliche wachstumshemmende Wirkung und damit möglicherweise krebsvorbeugende Wirkung entsprechend des Extraktes in humanen Tumorzellen ergeben. Detaillierte Informationen zum Western Blot Assay sind in [Teller et al., 2009] dargestellt.

Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen

Die durch das Extrakt induzierte Wachstumshemmung wurde mittels Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) untersucht. Der Assay beruht auf der Anfärbung des Lebendproteins (= gesamtes Protein in den Zellen) mit dem Farbstoff SRB. Der Farbstoff bindet unter mild-sauren Bedingungen an basische Aminosäuren der Zellproteine und kann unter basischen Bedingungen (pH 10) wieder aus den Zellproteinen herausgelöst werden. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode ist in [Kern et al., 2007] dargestellt.

4 Anthocyanstabilität

Anthocyane sind sehr empfindliche Moleküle, die vor allem durch thermische Belastung, pH-Werte > 4 und durch die Anwesenheit von Sauerstoff abgebaut werden. Dies führt oftmals zu einer beschleunigten Degradation von Anthocyanen in Lebensmitteln während der Verarbeitung, Lagerung und im menschlichen Körper [Kirca et al., 2007; Hager et al., 2008].

Doppelemulsionen könnten ein ideales System zur Formulierung von Anthocyanen darstellen. Hierfür muss aber sichergestellt sein, dass ein nahezu verlustfreies Einbringen in das Emulsionssystem möglich ist. Zudem muss es möglich sein, das Milieu in den als „Nano-Container“ dienenden inneren Wassertropfen optimal einzustellen, um maximale Anthocyanstabilität zu gewähren. Um bioaktive Moleküle in den inneren, submikronen Tropfen einer Emulsion zu formulieren, müssen sie allerdings, nach vorherigem Lösen in der dispersen Wasserphase, einen Emulgierschritt mit hohen mechanischen und thermischen Beanspruchungen durchlaufen [Ribeiro et al., 2009].

Das folgende Kapitel soll daher zeigen, dass es möglich ist, das Milieu der inneren Wasserphase und die Herstellungsbedingungen beim Emulgieren so einzustellen, dass Anthocyane ohne signifikante Verluste in Doppelemulsionen formuliert werden können. Da es nicht möglich ist, die hergestellten W_1/O - bzw. $W_1/O/W_2$ -Emulsionen so aufzutrennen, dass die Anthocyankonzentration in den inneren Tropfen nach dem Emulgieren bestimmt werden kann und weil auch keine Methode bekannt ist, die eine direkte Analyse der Anthocyankonzentration in den W_1 -Tropfen erlaubt, wurden die Stabilitätsuntersuchungen am Beispiel von wässrigen Heidelbeerextrakt-(HE)-Lösungen durchgeführt.

Alle dargestellten Standardabweichungen sind aus einer Dreifachwiederholung der Versuche ermittelt.

4.1 Einfluss des pH-Wertes

Da der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Anthocyanstabilität hat, sollte die Stabilität der Moleküle durch Anpassung des pH-Wertes der W_1 -Phase erhöht werden können. Um zu untersuchen, welche pH-Werte notwendig sind, um eine ausreichende Stabilität der hier verwendeten Anthocyanmoleküle zu gewährleisten, wurden Untersuchungen zur Lagerstabilität der Moleküle in Abhängigkeit des pH-Wertes durchgeführt.

4 Anthocyanstabilität

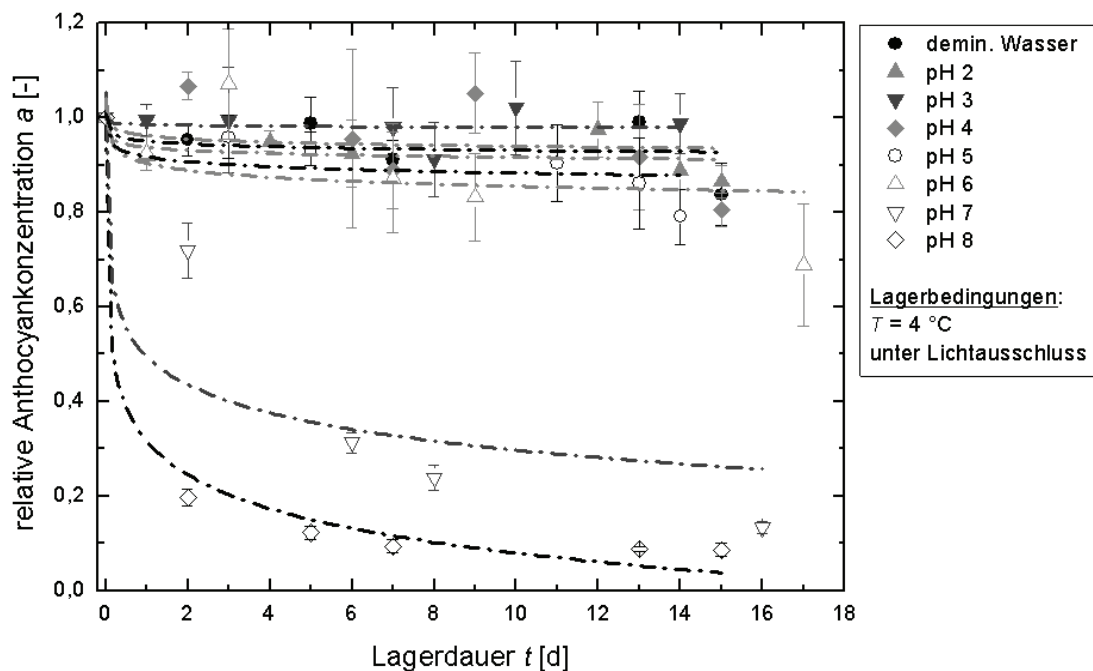


Abb. 4-1: Relative Anthocyankonzentration von HE-Lösungen in Abhängigkeit der Lagerzeit. Lagerung bei Raumtemperatur in Puffern mit unterschiedlichem pH-Wert und in demineralisiertem Wasser. $c_{HE} = 200\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Die Versuche zeigen, dass im untersuchten Zeitraum von mindestens 14 Tagen erst ab pH-Werten > 5 ein beschleunigter Anthocyanabbau stattfindet. Für Heidelbeerextraktlösungen mit $\text{pH} \leq 4$ kommt es im Rahmen der Standardabweichungen zu keiner signifikanten Änderung der relativen Anthocyankonzentration a (siehe Abb. 4-1). Demzufolge ist es für eine zufriedenstellende Anthocyanstabilität ausreichend, wenn in den heidelbeerextrakthaltigen W_1 -Tropfen ein pH-Wert kleiner 4 eingestellt wird. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde der pH-Wert in den folgenden Versuchen immer mit Zitronensäure auf einen Wert von 3,5 eingestellt. Die Zugabe eines puffernden Systems war nicht erforderlich, da das eingesetzte Extrakt selbst eine Pufferwirkung aufweist.

4.2 Einfluss von Pektinen

In der Pflanzenzelle werden Anthocyane oftmals durch Copigmentierung vor beschleunigtem Abbau geschützt. Unter anderem können Pektine als Copigment wirken (siehe Kapitel 2.5.6). Eigene Versuche zur Stabilität von Anthocyanen unter Anwesenheit von Pektin konnten dies bestätigen (siehe Abb. 4-2). In Heidelbeerextraktlösungen ohne Pektin wurde nach 30 Tagen ein Anthocyanabbau von etwa 25 % beobachtet. Durch Zugabe von 1,5 % Pektin konnte der Anthocyanabbau nach 30 Tagen auf weniger als 5 % reduziert werden.

4.3 Stabilität von Anthocyanen im Homogenisierprozess

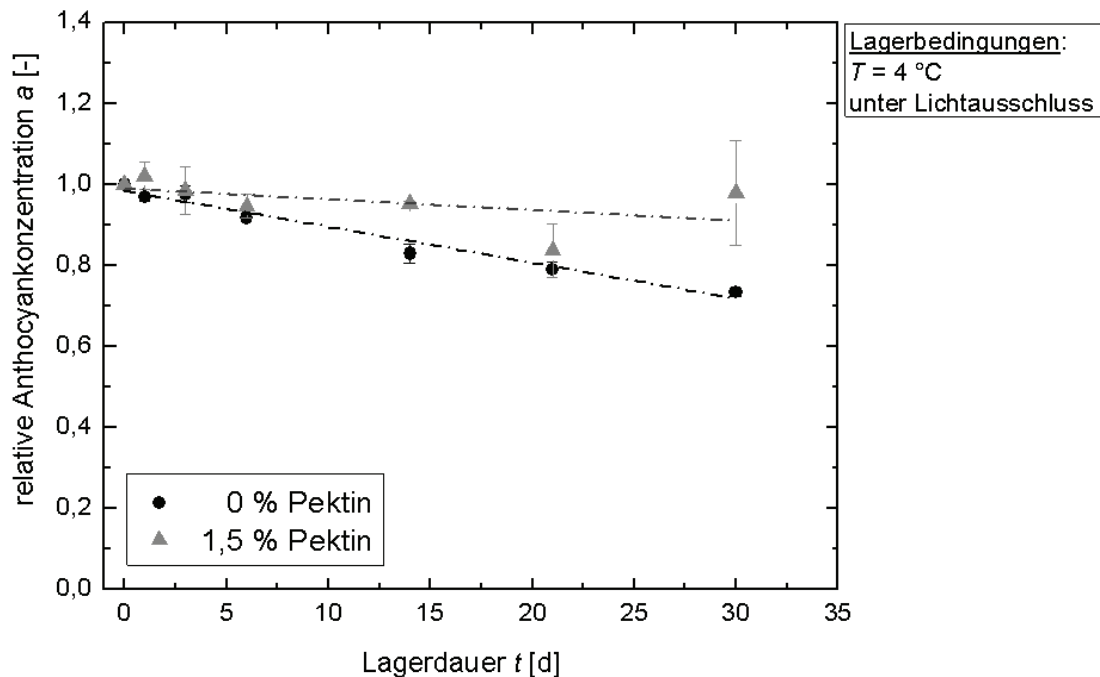


Abb. 4-2: Einfluss von Pektin auf die Anthocyanstabilität in wässriger HE-Lösung über der Lagerzeit. $c_{HE} = 5025\text{ }\mu\text{g/ml}$.

4.3 Stabilität von Anthocyanen im Homogenisierprozess

Der Abbau von Anthocyanmolekülen während des Homogenisierprozesses wurde untersucht, indem wässrige, anthocyanhaltige Heidelbeerextraktlösungen mit pH 3,5 definierten thermischen bzw. kombinierten thermischen und mechanischen Belastungen ausgesetzt wurden, die vergleichbar zu den Beanspruchungen im Emulgierprozess sind.

Abb. 4-3 zeigt Ergebnisse zum thermischen Abbau von Anthocyanen in Heidelbeerextraktlösungen für Temperaturen zwischen 60 °C und 90 °C . Die Behandlungszeit wurde zwischen 1 Sekunde bis zu 120 Minuten variiert. Die relative Anthocyankonzentration a nimmt mit zunehmender Zeit und steigender Temperatur ab. Der Temperatur-Zeit-Effekt des Anthocyanabbaus in wässriger Heidelbeerextraktlösung kann, analog zum Abbau von Anthocyanen in schwarzen Karotten oder Brombeeren [Kirca et al., 2007; Wang et al., 2007], mit einer Reaktion 1. Ordnung (Gleichung 2.15, Kapitel 2.5.4) beschrieben werden. Hierbei ergeben sich die in Tab. 4-1 dargestellten temperaturabhängigen Geschwindigkeitskoeffizienten k bei einer Aktivierungsenergie von 34 kJ/mol und einem Frequenzfaktor k_0 von $10,4\text{ 1/s}$ (Gleichung 2.16, Kapitel 2.5.4). Verglichen hierzu veröffentlichten verschiedene Forschergruppen höhere Aktivierungsenergien für den Anthocyanabbau im Bereich von 67 bis 130 kJ/mol . Es ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit ermittelte,

4 Anthocyanstabilität

niedrigere Aktivierungsenergie, ebenso wie die starke Variation der in der Literatur beschriebenen Werte, durch die unterschiedliche Struktur der Anthocyane erklärt werden kann [Tantshev et al., 1975; Markakis, 1982; Jackman et al., 1987].

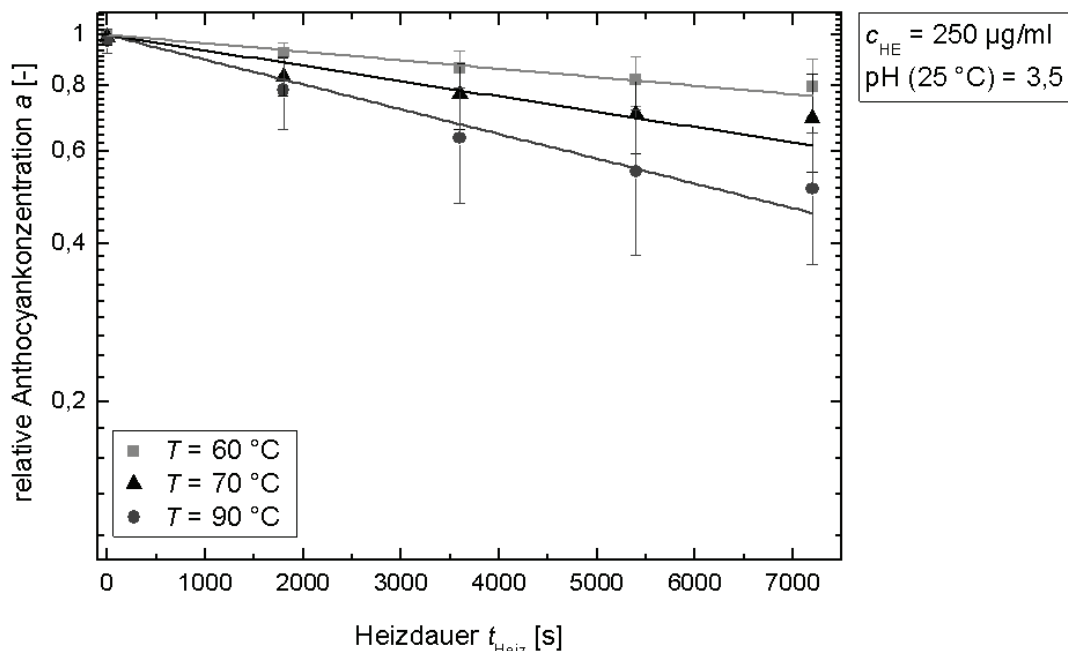


Abb. 4-3: Einfluss thermischer Behandlung auf den Anthocyanabbau. Abnahme der relativen Anthocyankonzentration $a(t)$ in HE-Lösungen. Die durchgezogenen Linien beschreiben die nach Kapitel 2.5.4 angepassten Modelle 1. Ordnung [Frank et al., 2012].

Tab. 4-1: Temperaturabhängiger Geschwindigkeitskoeffizient k für rein thermische Behandlung anthocyanhaltiger HE-Lösungen, angepasst nach einem Modell 1. Ordnung [Frank et al., 2012].

Temperatur T [°C]	$k(T)$ [1/s]
60	$0,4 \cdot 10^{-4} \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$
70	$0,7 \cdot 10^{-4} \pm 0,3 \cdot 10^{-4}$
90	$1,1 \cdot 10^{-4} \pm 0,5 \cdot 10^{-4}$

Abb. 4-4 zeigt die Anthocyanstabilität in Abhängigkeit kombinierter thermischer und mechanischer Beanspruchungen, wie sie im Homogenisierprozess vorherrschen. Die anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktlösungen wurden bei Drücken bis zu 1500 bar im Hochdruckhomogenisator beansprucht.

4.3 Stabilität von Anthocyanen im Homogenisierprozess

Während die Temperatur von 25 °C (vor dem Homogenisieren) auf 46 °C (nach dem Homogenisieren bei 1500 bar, 1 Durchlauf) anstieg, war die relative Anthocyankonzentration a , unabhängig von der eingewogenen Heidelbeerextraktmenge, konstant.

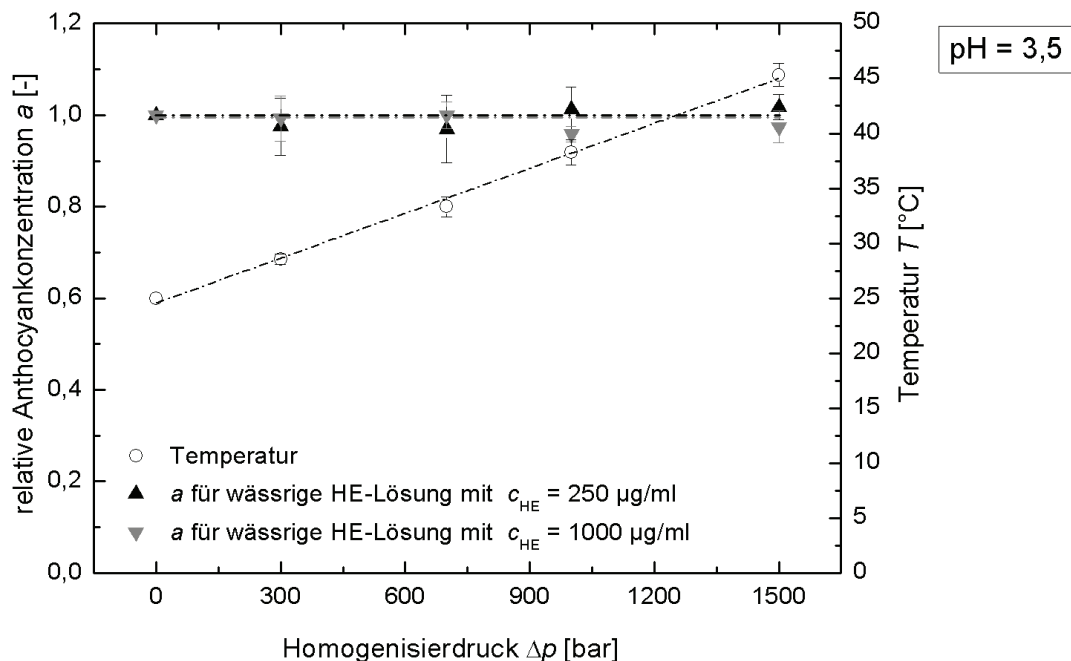


Abb. 4-4: Einfluss kombinierter thermischer und mechanischer Beanspruchung auf den Anthocyanabbau. Relative Anthocyankonzentration a wässriger HE-Lösungen (pH = 3,5) vor ($\Delta p = 0$ bar) und nach der Hochdruckbehandlung bei verschiedenen Homogenisierdrücken Δp . Offene Symbole (\circ): Proben­temperatur vor dem Homogenisieren ($\Delta p = 0$ bar) und nach dem Düsenaustritt. Verweilzeit im Hochdruckhomogenisator und Auslaufrohr (= Zeit bis die Probe wieder auf 25 °C gekühlt ist): $t_{V,HDH} = 105$ s [Frank et al., 2012].

Demzufolge kam es zu keinem thermisch induzierten Anthocyanabbau, was darauf zurückzuführen ist, dass die Proben nach dem Homogenisieren innerhalb von 105 s wieder auf 25°C abgekühlt wurden. Darüber hinaus konnte kein Abbau aufgrund der mechanischen Beanspruchung beobachtet werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Anthocyan­degradation während des Emulgierens nur von der Temperatur abhängt. Unter diesem Aspekt können die temperaturabhängigen Geschwindigkeitskoeffizienten $k(T)$ und die Anthocyan­konzentration c_A bzw. die relative Anthocyan­konzentration a nach der Hochdruckbehandlung mit Gleichung 2.15 und Gleichung 2.16 (siehe Kapitel 2.5.4) unter Verwendung der Aktivierungsenergie für rein thermische Beanspruchung berechnet werden (hier: $E_A = 34$ kJ/mol). Bei 46 °C und einer Heizdauer von 5 Sekunden (Prozesszeit in der Emulgieranlage) führt ein

4 Anthocyanstabilität

Geschwindigkeitskoeffizient k von $0,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ zu einer relativen Anthocyankonzentration von annähernd 1. Wird die Heizdauer von 5 Sekunden auf 100 Sekunden verlängert (hier: Zeit, bis die Probe in Eiswasser auf 25 °C abgekühlt ist), sollte sich eine Degradation von weniger als 0,15 % einstellen. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den durchgeführten Untersuchungen überein.

Während der Einfluss mechanischer Beanspruchungen auf die Anthocyanstabilität laut Literatur kaum untersucht ist, konnte mit den hier durchgeführten Versuchen gezeigt werden, dass es selbst bei Drücken von bis zu 1500 bar keinen signifikanten Einfluss mechanischer Beanspruchungen auf die Anthocyanstabilität gibt. Das bedeutet, dass hohe Scherraten und lokale Kavitationserscheinungen, die bei solchen Hochdruckbehandlungen auftreten, keinen bedeutenden Einfluss auf die Anthocyanstabilität haben.

Folglich kommt es bei pH-Werten von 3,5 nur durch thermische Behandlung zu einem beschleunigten Anthocyanabbau, wobei Temperatur-Zeit-Effekte als Haupteinflussparameter hervorzuheben sind. Unter Berücksichtigung einer möglichst kurzen thermischen Beanspruchung der anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktlösungen während des Emulgierprozesses ist es daher möglich, Anthocyane praktisch verlustfrei in multiplen Emulsionen zu formulieren. Darüber hinaus ist anzumerken, dass die hier durchgeführten Versuche nicht unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt wurden, der den Anthocyanabbau durch direkte Oxidation von Anthocyanmolekülen beschleunigen könnte. Das bedeutet, dass Sauerstoff während des Homogenisierprozesses keinen signifikanten Einfluss auf die Anthocyanstabilität hat [Frank et al., 2012].

Aus den in Kapitel 4.1 bis 4.3 dargestellten Untersuchungen ergeben sich folgende Randbedingungen, die für ein verlustfreies Formulieren von Anthocyanen in multiplen Emulsionen einzuhalten sind:

- Für eine zufriedenstellende Anthocyanstabilität sollten in den heidelbeerextraktlichen W_1 -Tropfen pH-Werte kleiner 4 eingestellt werden (siehe Kapitel 4.1).
- Der Abbau der formulierten Anthocyane kann durch Zugabe eines Copigments wie Pektin zusätzlich reduziert werden (siehe Kapitel 4.2).
- Mechanische Beanspruchungen während des Emulgierens im Hochdruckhomogenisator haben bei Homogenisierdrücken bis zu 1500 bar keinen Einfluss auf die Anthocyanstabilität gezeigt. Darüber hinaus wurden die zur Auslegung des Homogenisierprozesses benötigten Parameter der temperaturabhängigen Abbaukinetik der Anthocyane ermittelt. Daraus ergab sich, dass thermische Beanspruchungen möglichst kurz gehalten werden müssen, z.B. durch sofortiges Abkühlen der anthocyanhaltigen Proben in Eiswasser (siehe Kapitel 4.3).

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

5.1 Phänomene und Hypothesen

Während der Herstellung von W_1/O -Emulsionen mit Heidelbeerextraktlösungen als wässrige Phase kommt es sowohl bei Verwendung von Pflanzenöl als auch bei Verwendung von MCT-Öl zu einem Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase (siehe Abb. 5-1). Dieser Effekt, der im Folgenden auch als „Ölübergang“ bezeichnet wird, ist nach dem Zentrifugieren von heidelbeerextrakthaltigen W_1/O -Emulsionen, die unter hohem mechanischem Energieeintrag hergestellt wurden (z.B. im Hochdruckhomogenisator), deutlich zu sehen. Die folgenden Phänomene konnten bei Untersuchungen zum Ölübergang beobachtet werden:

1. Hohe mechanische Energieeinträge sind notwendig, d.h. langsames Mischen mit einem Propellerrührer oder die rein thermische Behandlung einer Wasser-Öl-Schichtung mit Heidelbeerextrakt in der wässrigen Phase reichten nicht aus, um den beschriebenen Effekt zu induzieren. Dies gilt sowohl für Systeme mit als auch ohne den lipophilen Emulgator PGPR in der Ölphase.
2. Das Extrakt konnte ohne mechanischen Energieeintrag nicht direkt in Öl gelöst werden. Selbst nach 2 Monaten Lagerung wiesen die Proben keine messbare Färbung der Ölphase auf. Eine Behandlung der extrakthaltigen Ölphasen im Hochdruckhomogenisator führte jedoch zu einer Färbung des Öls.
3. Insbesondere bei sehr niedrigen Heidelbeerextraktanteilen ($< 0,05\%$) in der W_1 -Phase war ohne den Emulgator PGPR, unabhängig vom Energieeintrag, keine messbare Färbung der Ölphase zu beobachten. Unter Anwesenheit von PGPR in der umgebenden Ölphase wurde dann ein verstärkter Ölübergang beobachtet.
4. Der Ölübergang konnte außerdem für andere hydrophile Farbstoffe wie Vitamin B12, den roten Azofarbstoff Poly R-478 (Polyvinylamin Sulfonat) oder Brillantblau G 250 beobachtet werden. Nach dem Zentrifugieren der farbstoffhaltigen W_1/O -Emulsionen war die aufgetrahnte Ölphase deutlich in der Farbe des entsprechenden Farbstoffs gefärbt (siehe Abb. 5-1).

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

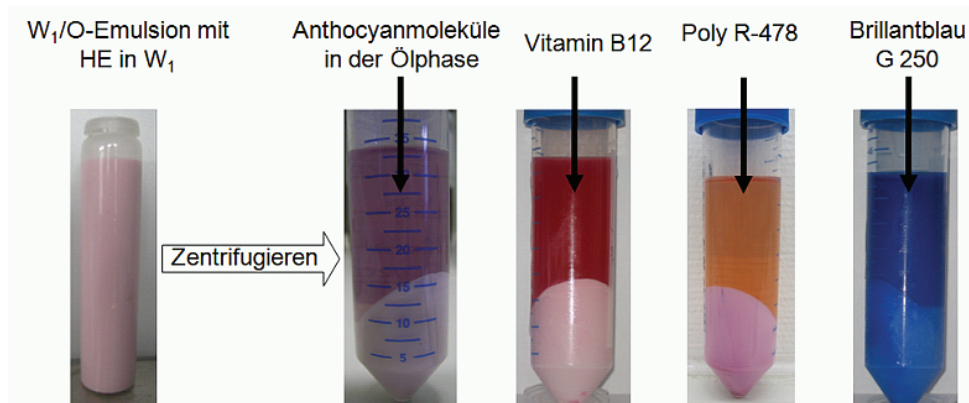


Abb. 5-1: Zentrifugierte W_1/O -Emulsionen mit verschiedenen hydrophilen Farbstoffen. Die Farbe der aufgerahmten Ölphase entspricht bei allen Systemen der Farbe des in W_1 eingebrachten Farbstoffs. Farbstoffanteil in der W_1 -Phase der Emulsion, vor dem Zentrifugieren: 0,05 %. PGPR-Anteil in der Ölphase: 2,5 % [Frank et al., 2011a].

Polymere Farbstoffe wie Vitamin B12 und Poly R-478 werden (bzw. wurden im Fall von Poly R-478, das nicht mehr vertrieben wird) vielfach zur Bestimmung der Erhaltung der inneren Wassertropfen von Doppemulsionen während der Herstellung und Lagerung eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine wichtige Methode zur Beurteilung der physikalischen Stabilität von Doppemulsionen [Zatz et al., 1988; Dickinson et al., 1993; Dickinson et al., 1994; Regan et al., 2009]. Durch den Verlust von Markermolekülen an die Ölphase ändert sich die Farbstoffkonzentration in den Wassertropfen, die von der inneren in die äußere Wasserphase diffundieren bzw. mit ihr koaleszieren. Das bedeutet, dass die berechnete Erhaltung immer zu besseren Werten verfälscht sein wird. Aus diesem Grunde werden in dieser Arbeit keine Erhaltungsgrad-Untersuchungen diskutiert.

Neben den Problemen, die sich durch den Ölübergang der Farbstoffmoleküle bei der Erhaltungsgradbestimmung von Doppemulsionen ergeben, ist es außerdem denkbar, dass dadurch die Einschlusseigenschaften von emulsionsbasierten Kapselsystemen beeinflusst werden. Darüber hinaus kann der Übergang von Anthocyanen in die Ölphase aber auch eine große Chance für die Farbstoffindustrie darstellen, da es bis heute nur wenige natürliche öllösliche Farbstoffe im Farbenspektrum der Anthocyane gibt. Wenn der zugrundeliegende Mechanismus des Ölübergangs verstanden wird, ist es möglich, systematisch natürliche hydrophile Moleküle in die Ölphase zu überführen, um sie als lipophile Farbstoffe z.B. in der Lebensmittelindustrie zu verwenden. Darüber hinaus ist es dann denkbar, eine unkontrollierte Freisetzung oder Phasenübergänge der verkapselten Substanzen zu verhindern.

5.1 Phänomene und Hypothesen

Als Erklärung für den beobachteten Übergang hydrophiler Farbstoffmoleküle in die umgebende Ölphase werden die vier folgenden Hypothesen in Betracht gezogen, die hier exemplarisch an Hand der in dieser Arbeit untersuchten Anthocyane dargestellt werden [Frank et al., 2011a].

1. Der Übergang von Anthocyanen in die Ölphase beruht auf einer Änderung der molekularen Struktur bzw. einer **chemischen Reaktion**. So ist es zum Beispiel denkbar, dass das Flavylumkation, das vor allem bei saurem pH-Wert verstärkt vorliegt (siehe Kapitel 2.5.2), durch Ringöffnung und Deglykosylierung zum lipophileren Chalkon umgesetzt wird. Da diese Reaktionen endotherm sind, könnte das Chromophorengleichgewicht zudem bei höheren Temperaturen auf Seiten des Chalkons liegen [Brouillard et al., 1977a; Brouillard, 1982; Hubbermann, 2005; Sadilova et al., 2007]. Darüber hinaus ist es möglich, dass komplexere chemische Reaktionen während des Homogenisierprozesses ablaufen, wodurch neue, lipophile Strukturen entstehen.
2. In der Natur werden Anthocyane zumeist durch **intermolekulare Copigmentierung** stabilisiert (siehe Kapitel 2.5.6). Hierbei werden die Anthocyanmoleküle gegen Hydratisierung geschützt, was auch Einfluss auf ihr Löslichkeitsverhalten haben kann [Mazza et al., 1987b; Brouillard et al., 1991; Cooper-Driver, 2001]. Daher ist es denkbar, dass die Anthocyane in der inneren Wasserphase durch Copigmentierung (hier: Selbstassoziation) lipophilere Strukturen bilden.
3. Da der Ölübergang in Anwesenheit von PGPR verstärkt zu beobachten war, ist ein Übergang der Farbstoffmoleküle in **inversen Emulgator-mizellen** denkbar, wie von Garti (1997b) in Zusammenhang mit der Freisetzung von Wasser aus den inneren W_1 -Tropfen in die umgebene W_2 -Phase von Doppelemulsionen bzw. von Uskokovic et al. (2007) in Zusammenhang mit der Verwendung von inversen Mizellen als Nanoreaktoren beschrieben wurde [Garti, 1997b; Uskokovic et al., 2007]. Es ist davon auszugehen, dass in diesem Fall erst bei Emulgatorkonzentrationen über der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) ein signifikanter Transport von Emulgatormolekülen in die Ölphase auftritt, auch wenn bei Konzentrationen unter der CMC bereits wenige Mizellen in der Lösung vorliegen können [Leo et al., 1971].
4. Der Übergang von Anthocyanmolekülen in die Ölphase ist bedingt durch das **Löslichkeitsgleichgewicht** der Moleküle in Öl und Wasser. Forschergruppen, die sich mit Flavonoiden wie Quercetin oder Rutin beschäftigen, veröffentlichten, abhängig von deren molekularer Struktur,

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

unterschiedliche Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, die hauptsächlich von den konjugierten Zuckerresten abhängen. Demnach sind Flavonoid-Aglykone zum Beispiel lipophiler als Konjugate [Nakagawa et al., 2000; Rothwell et al., 2005; He et al., 2010]. Das zeigt die potentielle Löslichkeit dieser Flavonoide sowohl in lipophilen als auch in hydrophilen Medien, was insbesondere für die Bioverfügbarkeit und biologische Wirkung im menschlichen Körper wichtig sein kann [Nakagawa et al., 2000; Rothwell et al., 2005; He et al., 2010].

Darüber hinaus hängt der Verteilungskoeffizient von Faktoren wie der Ionisierung oder Dimerisierung der gelösten Moleküle, der Hydratbildung, der Konzentration des gelösten Stoffes (nur bei hohen Konzentrationen) sowie der Temperatur ab [Leo et al., 1971]. Das heißt, das Löslichkeitsgleichgewicht bzw. der Verteilungskoeffizient könnte sich während des Prozesses verändern. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Bildung einer größeren Grenzfläche während des Emulgierens, bei konstantem Verteilungskoeffizienten, den Ölübergang der Anthocyane erleichtert.

Aufgrund der im Folgenden dargestellten Ergebnisse soll aufgezeigt werden, welche der beschriebenen Effekte den Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase erklären können bzw. welche auszuschließen sind.

5.2 Ergebnisse zu Hypothese 1: Chemische Reaktion

Die Anthocyanmoleküle, die mittels HPLC / DAD / MS Messungen in der abzentrifugierten Ölphase detektiert wurden, wiesen dieselben molekularen Strukturen auf, die auch in reinem Wasser vorliegen. Es konnten während der Probenvorbereitung alle vorliegenden Anthocyane mit Methanol, nicht aber mit Heptan, extrahiert und wieder in Wasser gelöst werden. Wären lipophile Anthocyanformen bzw. andere, neu entstandene lipophile Produkte vorhanden gewesen, müssten sie in Heptan anstelle von Methanol gelöst werden können. Demzufolge weisen die Anthocyanmoleküle, die in den Ölphasen gefunden wurden, noch immer ihre ursprüngliche Molekülform auf. Dies macht eine chemische Reaktion zu einer lipophileren Struktur unwahrscheinlich.

5.3 Ergebnisse zu Hypothese 2: Intermolekulare Copigmentierung

Abb. 5-2 zeigt die Spektren einer wässrigen Heidelbeerextraktlösung mit einem Heidelbeerextraktanteil von 0,025 %, die nach Bonerz et al. (2006) für die

5.4 Ergebnisse zu Hypothese 3: Transport in inversen Emulgatormizellen

quantitative Probenanalyse vorbereitet wurde, und einer zentrifugierten Ölphase aus einer W_1/O -Emulsion mit 0,05 % Heidelbeerextrakt in der inneren Wasserphase. Der Extraktanteil in der Emulsion wurde höher gewählt als der in der wässrigen Phase, um einen deutlicheren Peak in der Ölphase aufzeigen zu können. Beim Vergleich der beiden Spektren fällt zunächst deren ähnliche Kurvenform auf. Der einzige Unterschied im Diagramm ist der deutlich flachere Verlauf der Kurve der anthocyanhaltigen Ölphase, trotz des eigentlich höheren Heidelbeerextraktanteils in der Emulsion und der Verdünnung der wässrigen Lösung vor der spektralphotometrischen Untersuchung. Das ist darauf zurückzuführen, dass nicht zu erwarten ist, dass alle Anthocyanmoleküle, die ursprünglich in der W_1 -Phase gelöst wurden, in die umgebende Ölphase übergehen. Das Diagramm lässt aber keine bathochrome Verschiebung erkennen. Daher ist davon auszugehen, dass keine Copigmentierung der Anthocyanmoleküle vorliegt.

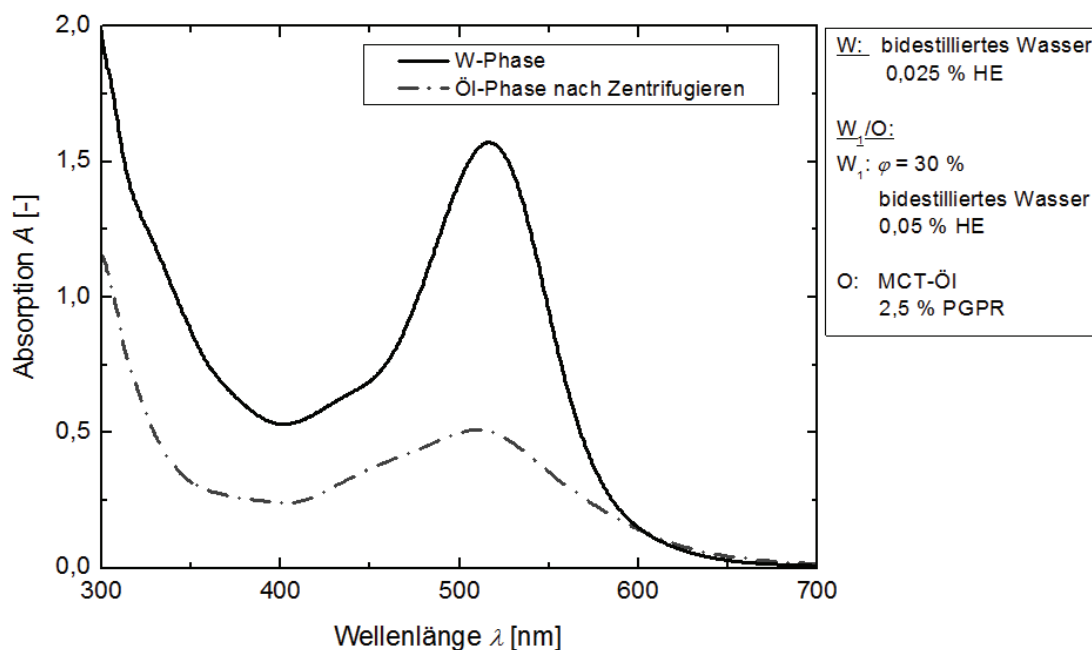


Abb. 5-2: Spektrum einer heidelbeerextrakthaltigen Wasserphase, verdünnt mit Wasser und HCl nach Bonerz (2006) (Verdünnungsfaktor = 20), und einer aus einer W_1/O -Emulsion zentrifugierten Ölphase [Frank et al., 2011a].

5.4 Ergebnisse zu Hypothese 3: Transport in inversen Emulgatormizellen

Erfolgt der Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase über inverse Emulgatormizellen, ist davon auszugehen, dass für Emulgator-

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

konzentrationen unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) keine detektierbare Menge an Farbstoffmolekülen in die Ölphase übergeht.

Für den verwendeten Emulgator PGPR 4150 in Pflanzenöl sowie in MCT-Öl wurde im tropfenfreien System zu Wasser eine CMC von 1 % bestimmt (siehe Anhang, Abb. 11-2). Die Zugabe von 0,1 % Heidelbeerextrakt zur wässrigen Phase hatte zwar einen Einfluss auf den Absolutwert der Grenzflächenspannung, aber keine Auswirkung auf die CMC im tropfenfreien System (siehe Anhang, Kapitel 11.4). Das zeigt, dass im verwendeten Heidelbeerextrakt grenzflächenaktive Moleküle in geringen Mengen vorhanden sind. Welche Moleküle das genau sind, kann aufgrund der komplexen Heidelbeerextraktzusammensetzung nicht spezifiziert werden (siehe Kapitel 3.1.1). Ausgehend von der CMC im tropfenfreien System, wurden anschließend Untersuchungen mit PGPR-Konzentrationen über und unter der CMC (hier: zwischen 0,1 % und 4 %) durchgeführt.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die zuvor bestimmte CMC nur im tropfenfreien System Gültigkeit hat. In einer Emulsion nimmt die zu stabilisierende Phasengrenzfläche mit sinkender Tropfengröße $x_{1,2}$ zu. Das heißt, die Emulgatormenge $c_{E,ges}$, die erforderlich ist, um die gesamte Phasengrenzfläche vollständig zu belegen und die CMC in einer Emulsion zu erreichen, ist umso größer, je kleiner die Tropfen sind. $c_{E,ges}$ setzt sich zusammen aus:

- Emulgatorkonzentration in der kontinuierlichen Phase, die nach dem Emulgieren auch bei vollständiger Belegung der Grenzfläche noch größer als die CMC im tropfenfreien System sein sollte.
- Emulgatormenge, die an der Phasengrenzfläche adsorbiert ist.

In diesem Fall ist davon auszugehen, dass es erst für Emulgatorkonzentrationen $c_E > c_{E,ges}$ zur Mizellbildung kommt.

Mittels der Szyszkowski-Gleichung [Szyszkowski, 1908] und der Gibbs'schen Adsorptionsisothermen [Gibbs, 1928] ist es möglich, die Emulgatormenge $c_{E,ges}$, die zum Erreichen der CMC in einer bestimmten Emulsion (Tropfengröße $x_{1,2}$, Dispersphasenanteil φ) benötigt wird, rechnerisch zu bestimmen. Unter der Voraussetzung, dass die Emulgatormoleküle als Monolayer an der Grenzfläche adsorbieren, ergibt sich folgender Zusammenhang [Karbstein, 1994; Tesch, 2002]:

$$c_{E,ges} = CMC + \Gamma_{max} \cdot \frac{6}{x_{1,2}} \cdot \frac{\varphi}{1 - \varphi} \quad 5.1$$

Hierbei ist Γ_{max} die maximale Grenzflächenbelegungsdichte. Die Bestimmung von Γ_{max} wird im Anhang (Kapitel 11.3) näher erläutert.

5.4 Ergebnisse zu Hypothese 3: Transport in inversen Emulgatormizellen

Mit diesem Zusammenhang lässt sich auch erklären, warum die gemessenen Tropfengrößen $x_{1,2}$ der hier hergestellten W₁/O-Emulsionen umso größer sind, je geringer der Emulgatorgehalt ist (siehe Abb. 5-4). Die Emulgatormenge, die notwendig ist, um die Tropfengrenzflächen in der Emulsion zu belegen, ist umso größer, je kleiner die Tropfengröße ist. Daher sind bei geringem Emulgatorgehalt nicht ausreichend Emulgatormoleküle vorhanden, um die kleinen Tropfen zu stabilisieren, so dass diese wieder koaleszieren. Basierend auf der zuvor diskutierten Theorie, können nur dann stabile Emulsionen hergestellt werden, wenn die in der Emulsion vorhandene Emulgatorkonzentration $\geq c_{E,ges}$ ist.

Ausgehend von den in Abb. 5-4 dargestellten Tropfengrößen, die bei verschiedener Emulgatorkonzentration stabilisiert werden konnten, ergeben sich unterschiedliche Emulgatorkonzentrationen $c_{E,ges}$, bei denen die Grenzflächen vollständig mit Emulgatormolekülen belegt wären. Die tatsächlichen Emulgatorkonzentrationen c_E der hergestellten Emulsionen sowie die mittels Gleichung 5.1 berechneten Werte für $c_{E,ges}$ sind in Abb. 5-3 dargestellt.

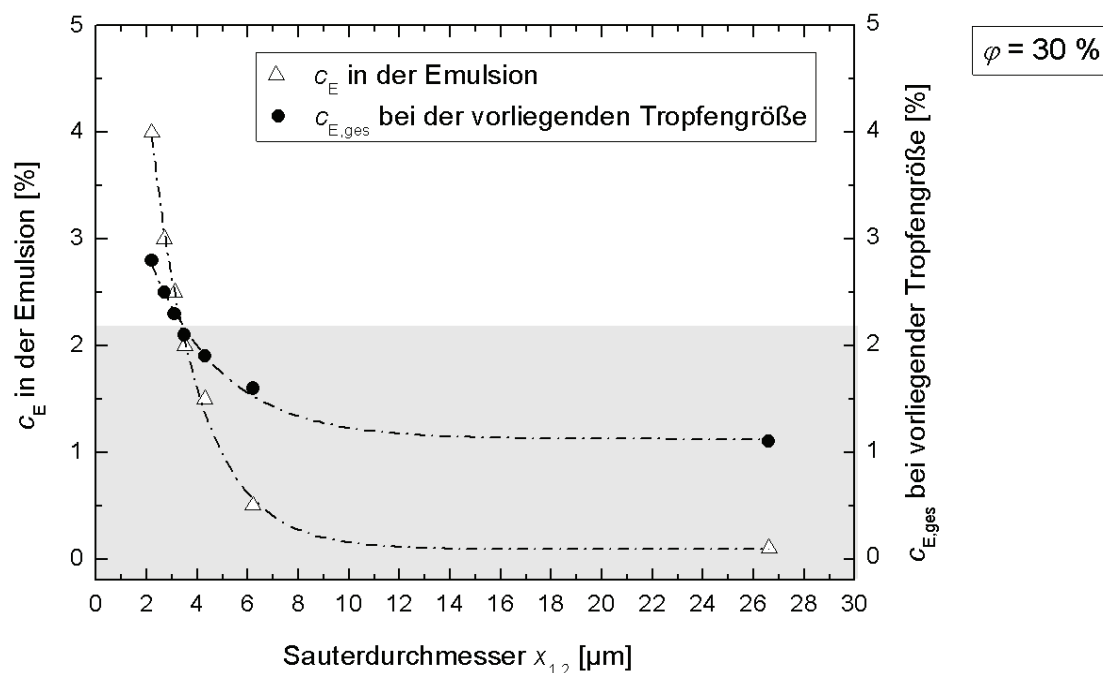


Abb. 5-3: Emulgatorkonzentration c_E der hergestellten Emulsionen sowie $c_{E,ges}$ für Emulsionen in Abhängigkeit des Sauterdurchmessers $x_{1,2}$. Grau unterlegt: Emulgatorkonzentration c_E in der Emulsion ist niedriger als $c_{E,ges}$.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den hergestellten Emulsionen für Emulgatorkonzentrationen kleiner 2,3 % die CMC in der kontinuierlichen Phase der Emulsion nicht erreicht wurde (siehe Abb. 5-3, grau unterlegt). Das bedeutet, dass diese Emulsionen stabilisiert werden konnten, obwohl die

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

maximale Belegungsdichte Γ_{max} nicht erreicht war. Dies widerspricht zwar der zuvor dargelegten Theorie, korreliert aber mit Ergebnissen von zum Beispiel Landfester et al., die für Polystyren-in-Wasser-Emulsionen, stabilisiert mit Natriumdodecylsulfat zeigten, dass Emulgatorkonzentrationen unterhalb $c_{E,ges}$ ausreichen können, um Emulsionen zu stabilisieren. Hecht et al. beobachteten für Methylmethacrylat-in-Wasser-Emulsionen mit Natriumdodecylsulfat denselben Effekt. Das ist darauf zurückzuführen, dass bei der Berechnung von Γ_{max} stets von der Belegung einer ebenen Grenzfläche ausgegangen wird. In Abhängigkeit des verwendeten Emulgators und der Krümmung der Tropfengrenzfläche, können aber auch weniger Emulgatormoleküle ausreichen, um die Grenzfläche ausreichend zu stabilisieren [Landfester et al., 1999; Hecht et al., 2011].

Abb. 5-4 zeigt neben dem Sauterdurchmesser $x_{1,2}$ der W_1/O -Emulsionen mit PGPR-Konzentrationen über und unter der CMC (hier: zwischen 0,1 % und 4 %) auch die Absorption der abzentrifugierten Ölphasen bei einer Wellenlänge λ von 520 nm.

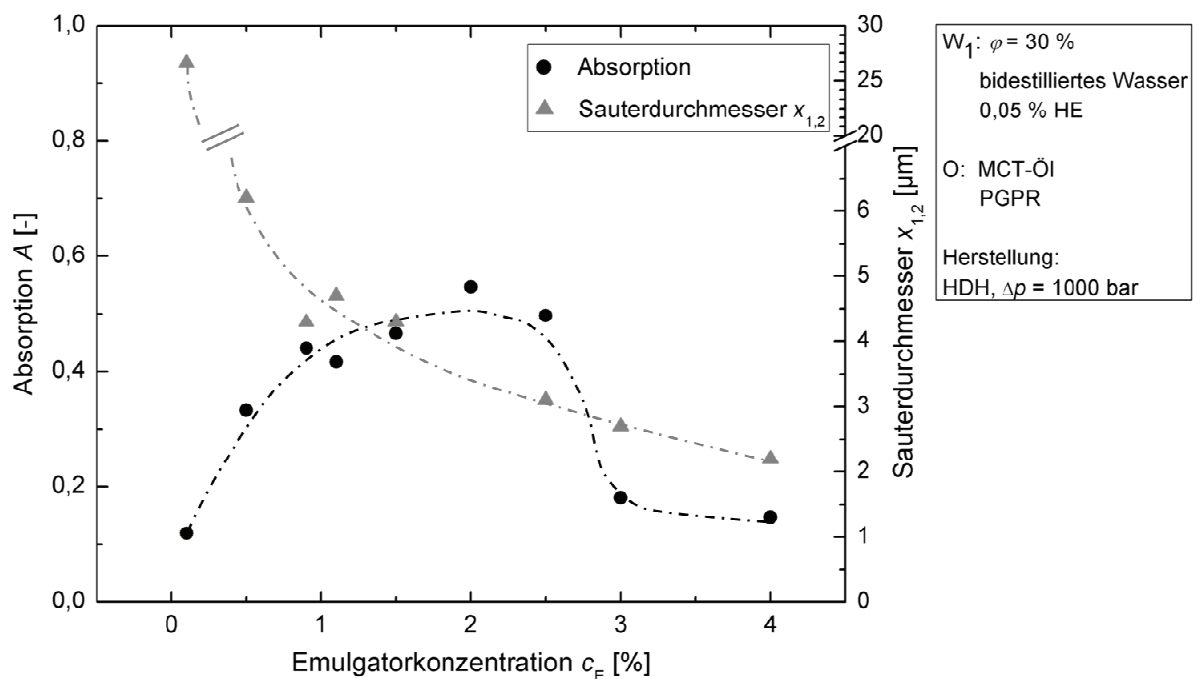


Abb. 5-4: Sauterdurchmesser anthocyanhaltiger W_1/O -Emulsionen und Absorption der zentrifugierten Ölphasen derselben W_1/O -Emulsionen bei $\lambda = 520$ nm [Frank et al., 2011a].

Die gemessenen Absorptionsintensitäten der abzentrifugierten Ölphasen zeigen, dass es ein Absorptionsmaximum im Bereich von 1,0 bis 2,5 % PGPR gibt. Außerdem wird deutlich, dass auch bei Emulgatorkonzentrationen weit

5.5 Ergebnisse zu Hypothese 4: Löslichkeitseffekte

unterhalb von $c_{E,ges}$ eine deutliche Färbung der Ölphase detektiert werden konnte.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wird deutlich, dass es sowohl für $c_E < c_{E,ges}$ als auch für $c_E > c_{E,ges}$ zu einem Übergang von Anthocyanmolekülen in die Ölphase kommt. Daher ist ein Transport in inversen Emulgatormizellen als alleinige Ursache für den Übergang hydrophiler Farbstoffmoleküle in die Ölphase auszuschließen.

5.5 Ergebnisse zu Hypothese 4: Löslichkeitseffekte

Wie zuvor beschrieben kommt es nur unter dem Eintrag hoher mechanischer Energie, wie sie zum Beispiel von einem Hochdruckhomogenisator eingebracht wird, zu einem Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase. Die im Folgenden beschriebenen Effekte sind alle nur nach dem Homogenisieren der heidelbeerextrakthaltigen Lösungen im Hochdruckhomogenisator aufgetreten. Das zeigt, dass die Grenzfläche, die während des Emulgierens mit steigendem Energieeintrag abnimmt [Schuchmann, 2007], einen entscheidenden Einfluss auf den Übergang der Farbstoffmoleküle in die Ölphase hat. Die in Abb. 5-4 dargestellten Ergebnisse bestätigen dies. Es fällt aber auf, dass die im Öl gemessene Anthocyanabsorption für $c_E \geq 2,5\%$ sprunghaft abfällt. In diesem Konzentrationsbereich ist $c_E \geq c_{E,ges}$. Eine mögliche Ursache ist eine dichtere Packung von Emulgatormolekülen an der Grenzfläche für $c_E \geq c_{E,ges}$, wodurch der Übergang der Anthocyane reduziert sein kann. Alternativ ist es denkbar, dass die im Öl gelösten Anthocyanmoleküle durch überschüssige Emulgatormoleküle maskiert werden oder in Mizellen vorliegen und deshalb nicht detektierbar sind. Diese Vermutungen müssen in künftigen Arbeiten näher untersucht werden. Grundlegende Voraussetzung, um die beobachteten Phänomene auf die soeben diskutierte Weise beschreiben zu können, ist allerdings, dass die Anthocyanmoleküle eine Mindestlöslichkeit in Öl aufweisen.

Für niedrige Heidelbeerextraktanteile (hier: $< 0,05\%$) kam es während des Emulgierens nur unter Anwesenheit des Emulgators PGPR zu einem signifikant messbaren Übergang von Anthocyanmolekülen in die Ölphase, was den Schluss zulässt, dass PGPR den Ölübergang unterstützt. Allerdings zeigten Untersuchungen, bei denen höhere Heidelbeerextraktanteile (hier: $0,5\%$) hinzugefügt wurden, um das treibende Konzentrationsgefälle zwischen der Wasser- und der Ölphase zu erhöhen, auch ohne den „Initiator“ PGPR einen deutlich messbaren Übergang hydrophiler Farbstoffmoleküle ins Öl.

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

Darüber hinaus wurden Versuche durchgeführt, bei denen 0,05 % bis 0,5 % Heidelbeerextraktanteil in PGPR-freies Öl hinzugegeben wurden. Das Extrakt löste sich zunächst nicht im Öl. Jedoch konnte unter Einwirken hoher mechanischer Energie im Hochdruckhomogenisator, unabhängig vom Heidelbeerextraktanteil, ein Übergang der Anthocyanmoleküle in die Ölphase beobachtet werden. Abb. 5-5 zeigt beispielhaft die Spektren der anthocyanhaltigen Ölphasen mit 0,05 und 0,5 % Heidelbeerextrakt nach dem Hochdruckhomogenisieren. Der für das Flavyliumkation typische Peak bei einer Wellenlänge λ von 520 nm ist für beide Proben deutlich zu sehen. Die Höhe des Absorptionspeaks bzw. die Menge der ins Öl übergegangenen Anthocyanmoleküle ist umso größer, je höher die anfangs zugegebene Heidelbeerextraktmenge und damit das treibende Konzentrationsgefälle war. Folglich konnten die Anthocyanmoleküle hier direkt im Öl gelöst werden, d.h. ohne dass sie zuvor in wässriger Lösung vorlagen und ohne dass der Emulgator PGPR zugegeben wurde.

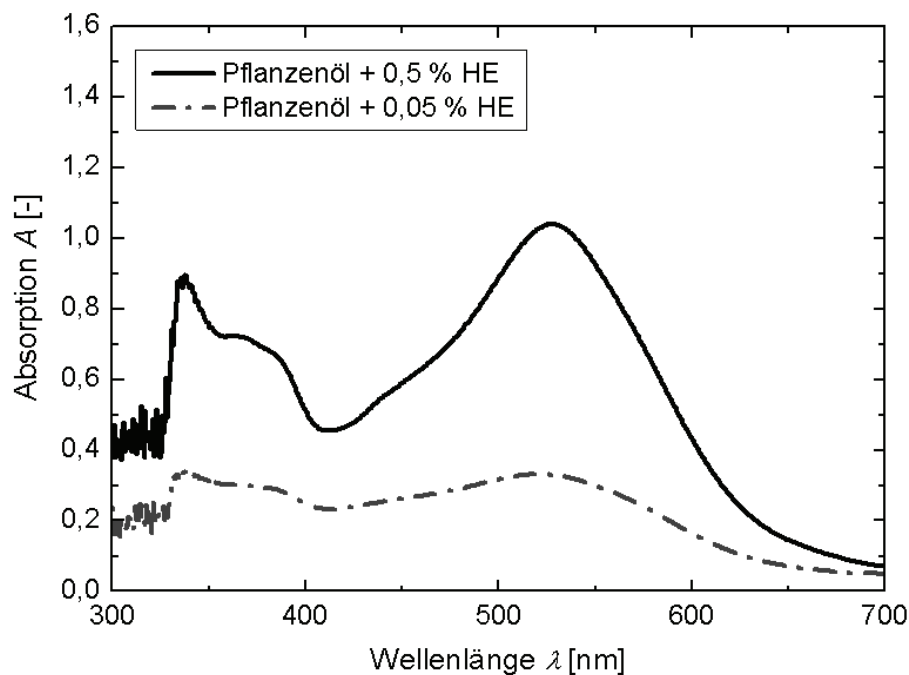


Abb. 5-5: Spektren anthocyanhaltiger Ölphasen. Pflanzenöl mit 0,05 und 0,5 % HE wurde bei einem Homogenisierdruck von $\Delta p = 1000$ bar beansprucht. Nach dem Homogenisieren wurden unlösliche Extraktbestandteile durch Zentrifugieren entfernt bevor die klaren Lösungen spektralphotometrisch untersucht wurden.

Diese Ergebnisse sprechen gegen die zuvor diskutierte Hypothese eines Übergangs in inversen Emulgatormizellen und bekräftigen die Hypothese, dass der Übergang der Farbstoffmoleküle in die Ölphase stark von

5.5 Ergebnisse zu Hypothese 4: Löslichkeitseffekte

Löslichkeitseffekten bzw. dem Löslichkeitsgleichgewicht zwischen Wasser und Öl sowie der Größe der Übertragungsfläche abhängt.

Unter der Annahme, dass der Verteilungskoeffizient P unter gleichbleibenden Umgebungsbedingungen ($T, p = \text{konst}$) konstant ist, werden, aufgrund einer höheren treibenden Kraft, umso mehr Anthocyanmoleküle in die Ölphase übergehen, je höher der im Wasser gelöste Extraktanteil ist. Dies korreliert mit den zuvor dargestellten Ergebnissen.

Bei niedrigen Heidelbeerextraktkonzentrationen (hier $< 0,05\%$) scheint die treibende Kraft in emulgatorfreien Systemen nicht auszureichen, um einen messbaren Übergang von Anthocyanmolekülen ins Öl zu induzieren. Durch die Zugabe von PGPR können kleinere Tropfen stabilisiert werden als in emulgatorfreien Systemen. Daher ist die Phasengrenzfläche zwischen Öl und Wasser und damit die potentielle Übergangsfläche in PGPR-stabilisierten Systemen größer als in unstabilierten Systemen. Dies kann den Übergang der Anthocyanmoleküle ins Öl beschleunigen und stellt damit eine plausible Erklärung für den unter Anwesenheit von PGPR beobachteten Ölübergang dar.

Ein direktes Lösen der Anthocyane in der Ölphase konnte dann beobachtet werden, wenn die Extraktpartikel zusammen mit der Ölphase homogenisiert wurden. Durch den hohen mechanischen Energieeintrag kann es hier zu einem Aufschluss der Heidelbeerextraktfasern und damit zu einem verstärkten Übergang von Anthocyanmolekülen in die Ölphase kommen.

Um diese Hypothese gezielt zu hinterfragen, wurde der Verteilungskoeffizient P unterschiedlicher Anthocyanmoleküle (sowohl Aglykone als auch Glykoside) mittels COSMO-RS-Simulationen berechnet. Hierdurch konnte die potentielle Löslichkeit der Anthocyanmoleküle in Öl bestätigt werden. Die berechneten Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und Öl zeigen, dass die kationischen Formen von Delphinidin und Cyanidin in Öl löslich sind ($\log P > 0$ bzw. $P > 1$), wobei Delphinidin aufgrund der zusätzlichen OH-Gruppe am C5'-Atom (siehe Kapitel 2.5.1) weniger lipophil ist als Cyanidin. Die glykosilierten Formen Cyanidin-3-Glykosid und Delphinidin-3-Glykosid hingegen sind stärker hydrophil ($\log P < 0$ bzw. $P < 1$) (siehe Tab. 5-1). Diese Tendenz konnte sowohl bei den Berechnungen mit wasserfreiem Öl als auch bei den Berechnungen mit Öl, das 0,15 % Wasser enthält, beobachtet werden. Auffällig ist, dass die Löslichkeit der untersuchten Anthocyanmoleküle in der Ölphase umso höher ist, je höher der Wassergehalt der Ölphase ist. Während des Emulgierens ist es denkbar, dass sich zusätzliches Wasser im Öl löst, was die Löslichkeit der Anthocyane in der wasserhaltigen Ölphase weiter erhöhen könnte.

Die hier beobachteten Tendenzen bezüglich der Öllöslichkeit der Anthocyane korrelieren mit Untersuchungen unterschiedlicher Forschergruppen, die sich mit

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von Flavonoiden wie Quercetin, Luteolin oder Rutin beschäftigt haben. Sowohl Nakagawa et al. (2000) als auch Rothwell et al. (2005) konnten zeigen, dass der Haupteinflussfaktor auf das Verteilungsgleichgewicht die molekulare Struktur der Flavonoide ist. Den größten Einfluss spielte der Zuckerrest. Beispiele für von Rothwell et al. bestimmte Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten sind:

- Quercetin: $\log P = 1,82$
- Quercetin-3-Glykosid: $\log P = 0,7$

Auch hier ist das Aglykon ohne Zuckerrest lipophiler als das Konjugat mit Zucker, wobei die hier veröffentlichten Absolutwerte höher sind als die in dieser Arbeit für Anthocyane berechneten Werte [Nakagawa et al., 2000; Rothwell et al., 2005].

Tab. 5-1: Mit COSMO-RS berechnete Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten unterschiedlicher Anthocyanmoleküle bei T = 25 °C und 45 °C.

Name	T [°C]	Log P [-]	P [-]
<i>Phase 2: wasserfreies MCT-Öl</i>			
Cyanidin-Kation	25	0,80	6,31
Delphinidin-Kation	25	0,58	3,80
Cyanidin-3-Glykosid-Kation	25	-0,41	0,39
Delphinidin-3-Glykosid-Kation	25	-1,50	0,03
Cyanidin-Kation	45	0,74	5,50
Delphinidin-Kation	45	0,51	3,24
Cyanidin-3-Glykosid-Kation	45	-0,33	0,47
Delphinidin-3-Glykosid-Kation	45	-1,37	0,04
<i>Phase 2: MCT-Öl mit 0,15 % Wassergehalt</i>			
Cyanidin-Kation	25	0,85	7,08
Delphinidin-Kation	25	0,63	4,27
Cyanidin-3-Glykosid-Kation	25	-0,33	0,47
Delphinidin-3-Glykosid-Kation	25	-1,42	0,04
Cyanidin-Kation	45	0,79	6,17
Delphinidin-Kation	45	0,56	3,63
Cyanidin-3-Glykosid-Kation	45	-0,26	0,55
Delphinidin-3-Glykosid-Kation	45	-1,29	0,05

5.5 Ergebnisse zu Hypothese 4: Löslichkeitseffekte

Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist, dass der beobachtete Ölübergang nur nach hohem mechanischem Energieeintrag beobachtet wurde, nicht aber nach alleinigem Rühren mittels Propellerrührer oder nach Erhitzen der Proben für 2 Stunden auf Temperaturen zwischen 40 und 80 °C. Das weist darauf hin, dass der Übergang der Anthocyanmoleküle in die Ölphase kein thermisch induzierter Prozess ist. Berechnungen des Verteilungskoeffizienten der kationischen und der neutralen Molekülformen bei einer Temperatur von 45 °C (Prozesstemperatur) konnten dies bestätigen. Sie haben gezeigt, dass die Löslichkeit der kationischen Molekülformen in Öl bei 45 °C zwar geringer ist als bei 25 °C, die Moleküle aber immer noch lipophilen Charakter aufweisen. Demzufolge müssen die hohen mechanischen Kräfte und nicht die eingetragene thermische Energie während des Hochdruckhomogenisierens mit den beobachteten Effekten zusammenhängen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass das Löslichkeitsgleichgewicht bzw. der Verteilungskoeffizient in Zusammenhang mit der Größe der Grenzfläche eine plausible Erklärung für die beobachteten Phänomene unter mechanischem Energieeintrag sowie den zugrundeliegenden Mechanismus darstellt. Dennoch sind in der Zukunft weitere Versuche zur tatsächlichen Bestimmung der Löslichkeit von Anthocyanen oder anderen Farbstoffen in wässrigen bzw. öligen Phasen notwendig. Darüber hinaus sollte eine experimentelle Bestimmung der tatsächlichen Verteilungskoeffizienten folgen.

5 Untersuchungen zum Übergang von Anthocyanmolekülen in die umgebende Ölphase

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

Das Ziel dieses Kapitels besteht darin aufzuzeigen, wie die Mikrostruktur, d.h. die Tropfengröße bzw. Tropfengrößenverteilung, von anthocyanhaltigen W_1/O -Emulsionen gezielt beeinflusst werden kann. Das ist notwendig um bei der späteren Herstellung von Doppelemulsionen, lagerstabile W_1/O -Emulsionen mit individuell angepasster Mikrostruktur einsetzen und den Einfluss der Mikrostruktur auf das Freisetzungsverhalten der verkapselten Anthocyane untersuchen zu können. Beim Einstellen der Mikrostruktur ist zu beachten, dass die Herstellungsbedingungen und die Umgebungsbedingungen in den W_1/O -Emulsionen den im Kapitel 4 aufgezeigten Randbedingungen für eine maximale Anthocyanstabilität gerecht werden.

Alle dargestellten Standardabweichungen sind aus einer Dreifachwiederholung der Versuche berechnet. Die Emulsionen wurden jeweils neu hergestellt und wiederum dreifach mit statischer Lichtstreuung analysiert.

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W_1/O -Emulsionen

Unter der Annahme, dass die beim Herstellen der W_1/O -Emulsionen neu geschaffene Grenzfläche ausreichend schnell stabilisiert wird, so dass die Zerkleinerung den Prozess dominiert, sollte es möglich sein, die Mikrostruktur von W_1/O -Emulsionen durch Variation von Rezeptur- sowie Prozessparametern gezielt zu verändern.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Herstellungsverfahren sind das Emulgieren mittels Rotor-Stator-Maschinen sowie das Hochdruckhomo-genisieren, da diese Systeme das größte Anwendungspotential in der Industrie haben.

6.1.1 Einfluss von Elektrolyten und Hydrokolloiden auf die Mikrostruktur von W_1/O -Emulsionen

Rezepturparameter können einen entscheidenden Einfluss auf Tropfenaufbruch und -stabilisierung haben. So wurde zum Beispiel bei Verwendung von PGPR als lipophilem Emulgator eine deutliche Verbesserung der Stabilisierung von W_1/O -Emulsionen beobachtet, wenn Natriumchlorid (NaCl) in der W_1 -Phase

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

gelöst war (siehe Kapitel 2.1). Eigene Versuche konnten eine Abnahme der Grenzflächenspannung PGPR-haltiger Ölphasen mit steigendem NaCl-Gehalt in der Wasserphase bestätigen (siehe Anhang, Kapitel 11.6). Daher ist davon auszugehen, dass durch Zugabe eines Elektrolyten wie NaCl zur inneren Wasserphase eine Verbesserung der Tropfenstabilisierung und damit kleinere Tropfen erreicht werden können. Darüber hinaus üben Hydrokolloide wie Pektin in der inneren W_1 -Phase einen stabilisierenden Effekt auf die später herzustellenden Doppelemulsionen aus. Durch die Ausbildung von viskoelastischen, gelartigen Strukturen an der W_1/O -Grenzfläche oder durch das vollständige Ausgelieren der W_1 -Tropfen kann Koaleszenz zwischen den W_1 -Tropfen und der W_2 -Phase reduziert werden [Surh et al., 2007; Dickinson, 2011]. In Kapitel 4.2 konnte außerdem der stabilisierende Effekt von Pektinen auf die zu formulierenden Anthocyane gezeigt werden. Es wird daher angenommen, dass sich die soeben genannten Stabilisierungseffekte durch die gleichzeitige Zugabe von Pektin und einem Elektrolyten zur W_1 -Phase kombinieren lassen. Das bedeutet, dass zum einen die Tropfengröße der W_1 -Tropfen reduziert und damit der Füllgrad der Emulsionen erhöht werden kann. Zum anderen kann die Einschlusseffizienz der Doppelemulsionen sowie die Stabilität der Anthocyane in der W_1 -Phase erhöht werden.

Ausgehend von den obigen Hypothesen wurde zunächst untersucht, inwieweit auch Calciumsalze (hier: Calciumchlorid ($CaCl_2$)), die zur Induzierung der Gelbildungsreaktion von Pektinen eingesetzt werden können, einen Einfluss auf die Tropfenstabilisierung und damit auf die W_1/O -Mikrostruktur ausüben. Um die zuvor festgelegten Randbedingungen für ein nahezu verlustfreies Formulieren von Anthocyanen in multiplen Emulsionen einzuhalten, wurde der pH-Wert bei den folgenden Untersuchungen immer auf 3,5 eingestellt. Hiermit wird ausgeschlossen, dass mögliche pH-induzierte Wechselwirkungen mit dem Emulgator, den Salzen oder dem Pektin, die sich negativ auf das Emulgierergebnis ausüben könnten, unberücksichtigt bleiben.

Die gemessenen Grenzflächenspannungen calciumchloridhaltiger Wasserphasen gegen PGPR-haltige Ölphasen zeigen für die hier verwendeten Salzkonzentrationen keinen Einfluss des Calciumchlorids auf die statische Grenzflächenspannung (siehe Abb. 6-1). Möglicherweise sind für eine messbare Änderung der Grenzflächenspannung höhere Salzkonzentrationen erforderlich.

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W1/O-Emulsionen

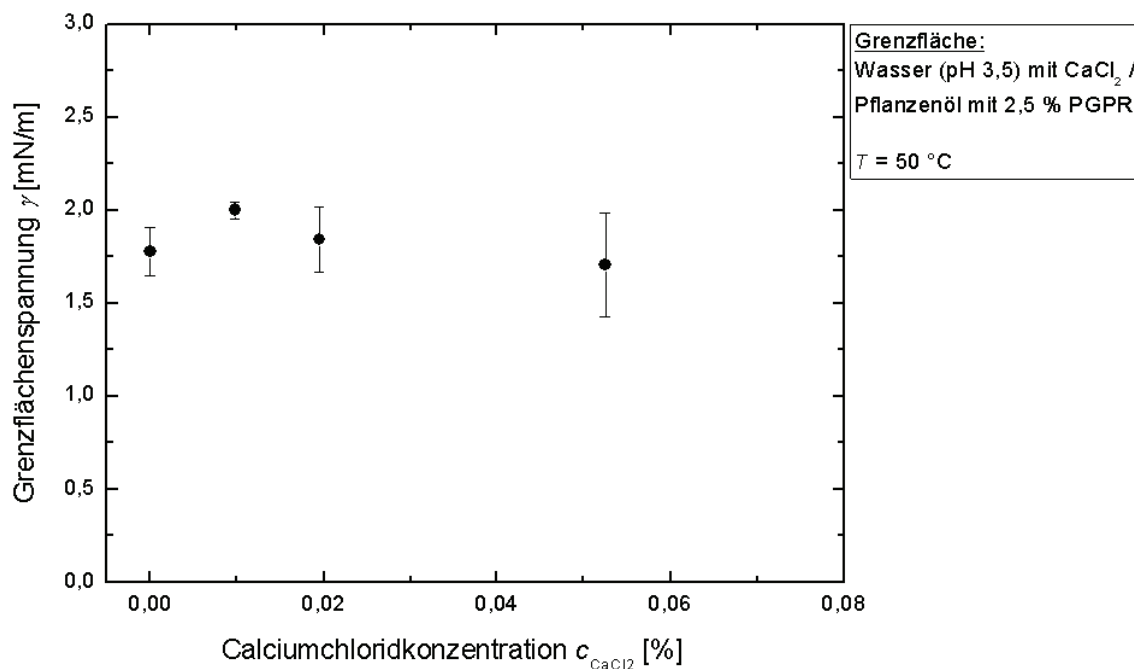


Abb. 6-1: Einfluss der Calciumchloridkonzentration auf die statische Grenzflächenspannung an der ebenen Grenzfläche von Wasser (pH 3,5) mit CaCl_2 zu Pflanzenöl mit 2,5 % PGPR. Messmethode: Wilhelmy-Platte, Data-physics, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dennoch zeigte sich bei der Herstellung von W_1/O -Emulsionen mit einem Dispersphasenanteil φ von 30 % und 2,5 % PGPR als Emulgator, dass die Emulsionen ohne Salz (Δ) einen deutlich höheren Grobgutanteil aufweisen als Emulsionen mit Salz (\blacktriangle) (siehe Abb. 6-2). Auch wenn für die hier verwendeten Calciumchloridkonzentrationen kein Einfluss der Salzkonzentration auf die statische Grenzflächenspannung beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass sich durch die in der Literatur beschriebenen Salz-PGPR-Interaktionen an der Öl-Wasser-Grenzfläche ein stabilerer Grenzflächenfilm ausbildet, der Koaleszenz im Prozess reduzieren kann.

Darüber hinaus wäre es denkbar, dass durch die Salzzugabe auch das Viskositätsverhältnis λ und damit möglicherweise der Tropfenaufbruch beeinflusst werden. Allerdings ist das Viskositätsverhältnis λ für die salzfreie sowie die salzhaltige Emulsion gleich ($\lambda = 0,05$). Das lässt darauf schließen, dass der geringere Grobgutanteil bei Zugabe des Salzes alleine auf eine Verbesserung der Tropfenstabilisierung zurückzuführen ist.

Bei einer zusätzlichen Zugabe von Pektin zur W_1 -Phase ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit verwendeten Pektine, unabhängig von der Pektinkonzentration, keine Grenzflächenaktivität aufweisen (siehe Anhang, Kapitel 11.7). Allerdings könnte sich eine Beeinflussung des Viskositätsverhältnisses λ durch eine zu

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

hohe Viskosität der dispersen Phase oder eine zu schnelle Ausgelierung der pektinhaltigen Tropfen schon während des Prozesses negativ auf den Tropfenaufbruch auswirken. Die Geliertemperatur der pektinhaltigen Tropfen hängt hierbei von den vorhandenen Pektin- bzw. Calciumkonzentrationen, sowie dem löslichen Trockenmasseanteil und dem pH-Wert in der Lösung ab (siehe Kapitel 2.4). Solange die Geliertemperatur unterhalb der Prozesstemperatur liegt ist davon auszugehen, dass der Tropfenaufbruch durch die Gelierung nicht negativ beeinflusst wird. Die Geliertemperaturen für unterschiedliche Lösungen mit 0,9 % des hier verwendeten Pektins sind in Tab. 6-1 zusammengefasst. Die Messkurven zur Bestimmung der Geliertemperaturen sind im Anhang in Kapitel 11.12 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Geliertemperaturen der untersuchten Lösungen unterhalb der Prozesstemperatur liegen.

Tab. 6-1: Geliertemperatur von unterschiedlichen Pektinlösungen.

Pektin-konzentration	CaCl ₂ -Konzentration	Sonstiges	Geliertemperatur
0,9 %	0,021 %	pH 7	9,4 °C
0,9 %	0,021 %	pH 3,5, 0,25 % HE	17,3 °C

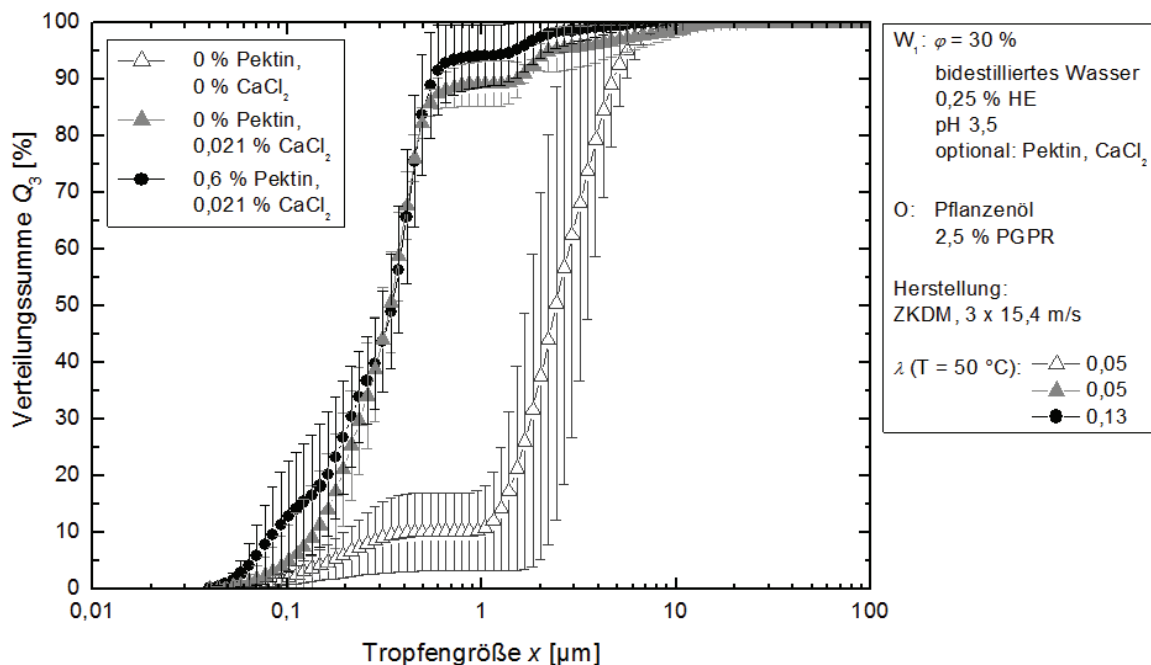


Abb. 6-2: Einfluss von CaCl₂ und Pektin (ungelieert) auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen.

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen

Die in Abb. 6-2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die zusätzliche Zugabe von Pektin zur salzhaltigen W₁-Phase keinen signifikanten Einfluss auf die Mikrostruktur der W₁/O-Emulsionen hat. Das ist damit zu erklären, dass die Stabilisierung der Tropfen durch das nicht grenzflächenaktive Pektin nicht weiter verbessert werden kann. Außerdem scheinen die Calcium-Pektin-Wechselwirkungen in der Wasserphase (siehe Kapitel 2.4) keine negativen Auswirkungen auf die stabilisierend wirkenden PGPR-Elektrolyt-Interaktionen zu haben.

Darüber hinaus hat eine Erhöhung des Viskositätsverhältnisses durch die Pektinzugabe (hier: 0,6 %) auf $\lambda = 0,13$ keinen messbaren Einfluss auf den Tropfenaufbruch. Auch eine Erhöhung der Pektinkonzentration auf bis zu 1,8 % ($\lambda = 0,71$), verändert das Emulgierergebnis bei gleichbleibender Salzkonzentration nicht maßgeblich (siehe Abb. 6-3). Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die hier vorliegenden λ -Werte alle zwischen 0,1 und 1, dem optimalen Bereich für den Tropfenaufbruch in laminarer Strömung, liegen. Diese treten in der Regel neben turbulenten Strömungen bei der Tropfenzerkleinerung in Zahnkranzdispergiermaschinen auf.

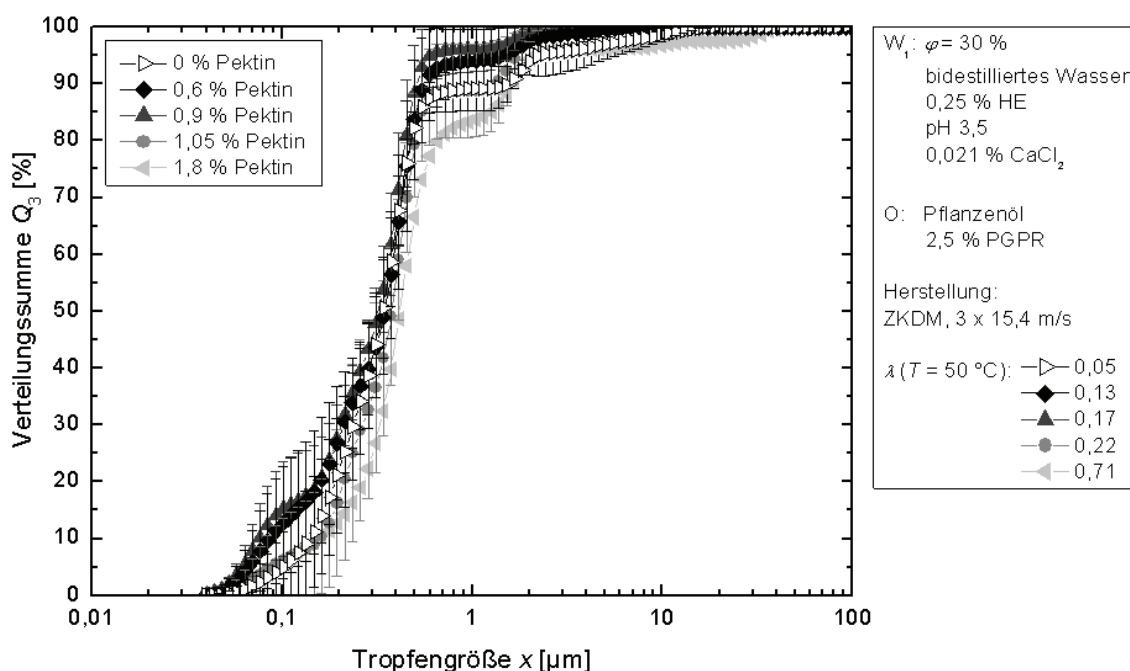


Abb. 6-3: Einfluss der Pektinkonzentration auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen.

Bei einer weiteren Erhöhung der Pektinkonzentration auf einen kritischen Wert (hier: 1,8 %) gelierte die pektinhaltige Wasserphase im untersuchten System bereits bei der Herstellung aus. Das kann damit begründet werden, dass die Gelierungsgeschwindigkeit von Pektinen stark von der vorhandenen Pektin-

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

konzentration abhängt. Das heißt, der Gelierungsprozess läuft umso schneller ab, je höher die Konzentration an Pektin ist. Daher war die Herstellung von W_1/O -Emulsionen mit Pektinanteilen von mehr als 1,8 % nicht möglich.

Außerdem kann eine Überkonzentrierung an Calciumionen bei konstanter Pektin-konzentration dazu führen, dass die Ausgelierung der W_1 -Phase bereits während der Rohemulsionsherstellung und nicht erst beim späteren Auslagern der Proben bei 4 °C einsetzt. Als Folge entstehen Emulsionen mit einem hohen Grobgutanteil (siehe Abb. 6-4). Ein Grund hierfür ist, dass die Gelierungsgeschwindigkeit neben der vorhandenen Pektinkonzentration auch stark von der Calciumionenkonzentration abhängt. Das heißt, der Gelierungsprozess läuft umso schneller ab, je höher die Konzentration an Calciumionen ist.

Demzufolge konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die Zugabe von Pektin zur W_1 -Phase keinen Einfluss auf den Tropfenaufbruch hat, wenn eine Gelierung der pektinhaltigen Wassertropfen im Prozess verhindert werden kann.

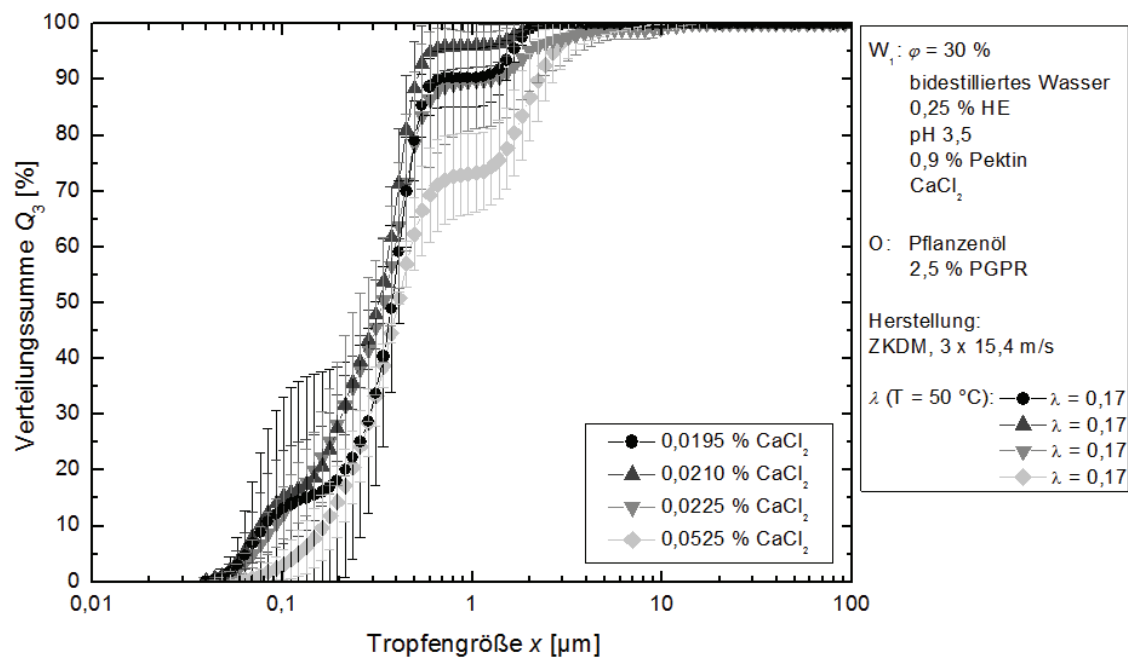


Abb. 6-4: Einfluss verschiedener Calciumchloridkonzentrationen auf die Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tropfenstabilisierung durch die Zugabe von Elektrolyten wie Calciumchlorid wie erwartet verbessert werden konnte. Eine zusätzliche Zugabe des Hydrokolloids Pektin konnte die Kurzzeitstabilisierung nicht weiter verbessern, beeinflusste den Tropfenaufbruch aber auch nicht negativ. Da Pektine die zu formulierenden Anthocyane stabilisieren und die Langzeitstabilität von Doppalemulsionen erhöhen können, jedoch die

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen

Tropfenzerkleinerung nicht negativ beeinflussen, wurde der W₁-Phase in den weiteren Arbeiten stets Pektin und Calciumchlorid zugesetzt.

Um Effekte von Begleitkomponenten in Pektin, welches ein Naturprodukt ist, auszuschließen, wurde in den folgenden Versuchen mit einem standardisierten Pektin (Pektin CB 025 E) gearbeitet, das bereits die entsprechende Menge an Calciumchlorid zur Stabilisierung der Tropfen und zur späteren Ausgelierung der W₁-Phase enthielt. Ausnahmen, bei denen eine separate Dosierung von Salz und Pektin erforderlich war, sind entsprechend gekennzeichnet.

6.1.2 Einfluss von Herstellungsverfahren und Prozessparametern auf die Mikrostruktur der inneren Emulsionen

In diesem Kapitel soll aufgezeigt werden, inwieweit sich unterschiedliche Herstellungsverfahren sowie Prozessparameter auf die Mikrostruktur der inneren W₁/O-Emulsionen auswirken.

Die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen kann durch Variation der Energiedichte E_V gezielt eingestellt werden, wenn der Prozess zerkleinerungsdominiert ist. In diesem Fall führt eine Erhöhung von E_V zu einer Reduktion des Sauterdurchmessers der W₁/O-Emulsionen (siehe Kapitel 2.3.5). Um zu untersuchen, ob es sich bei der Herstellung von pektinhaltigen W₁/O-Emulsionen um einen zerkleinerungsdominierten Prozess handelt, wurde daher die Energiedichte E_V durch unterschiedliche Prozessparameter erhöht. Bei der beispielhaft ausgewählten Zahnkranzdispergiermaschine wurde dies durch Variation der Umfangsgeschwindigkeit v_U (hier: 7,7 bis 15,4 m/s) und der Passagenzahl (hier: 1 bis 3 Durchläufe) realisiert. In Abb. 6-5 sind die Ergebnisse exemplarisch für $\varphi = 30\%$ dargestellt, da hier eine relativ geringe Koaleszenzwahrscheinlichkeit zu erwarten ist. Die zugehörigen Verteilungssummen werden im Anhang in Kapitel 11.8 gezeigt. Der direkte Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen wird in Kapitel 6.1.4 diskutiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Steigerung der Energiedichte E_V eine kontinuierliche Abnahme der Tropfengröße bewirkt. Eine doppeltlogarithmische Auftragung der Messergebnisse (siehe Anhang, Kapitel 11.9) und die Erstellung einer Ausgleichsgeraden nach einem Potenzansatz ergeben den folgenden Zusammenhang:

$$x_{1,2} = 1,4 \cdot E_V^{-0,14} \quad 6.1$$

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

Der Exponent 0,14 entspricht dem in Gleichung 2.14 (Kapitel 2.3.5) dargestellten Exponenten b und ist, wie es für zerkleinerungsdominierte Prozesse typisch ist, > 0 . Darüber hinaus ist mit steigender Energiedichte keine Zunahme des Grobgutanteils zu beobachten (siehe Anhang, Kapitel 11.8). Demzufolge ist der Prozess für die hier untersuchten Prozessparameter weitgehend zerkleinerungsdominiert.

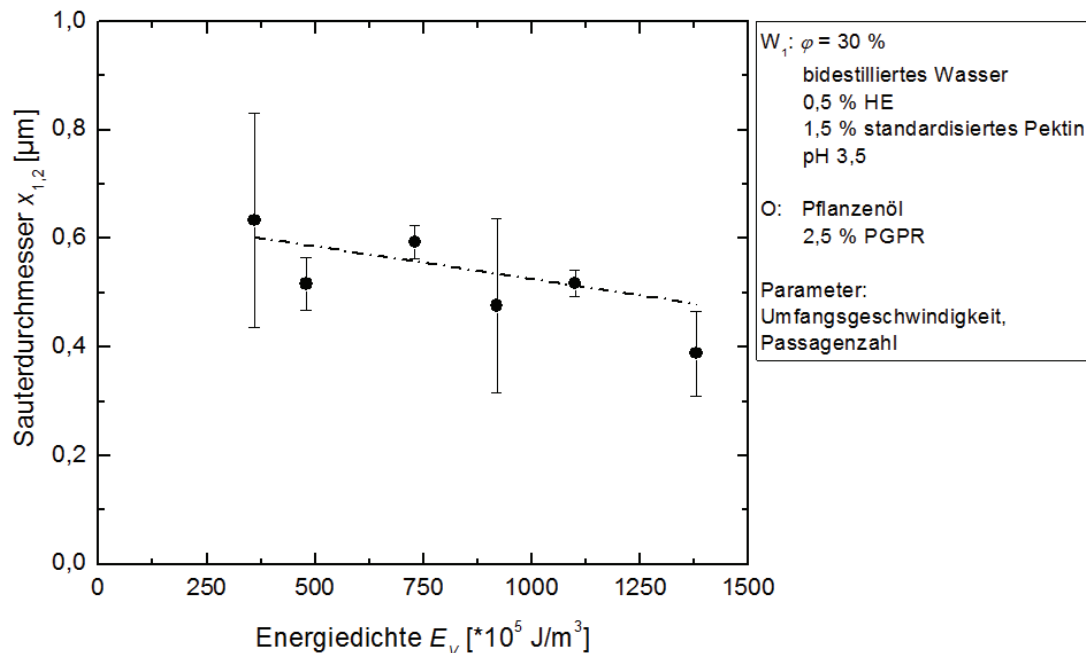


Abb. 6-5: Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren in der ZKDM auf den Sauterdurchmesser von W_1/O -Emulsionen.

Dieser Zusammenhang gilt allerdings nur bis zu einer kritischen Umfangsgeschwindigkeit $v_{U,krit}$ (hier: 15,4 m/s). Für $v_U > v_{U,krit}$ weisen die Emulsionen einen hohen Grobgutanteil auf (siehe Abb. 6-6), was auf Koaleszenz durch eine unzureichende Stabilisierung der Tropfen sowie einen unzureichenden Tropfenaufbruch zurückgeführt werden kann. Das heißt, der Prozess ist weitgehend koaleszenzdominiert. Das liegt darin begründet, dass höhere Umfangsgeschwindigkeiten die Strömungsgeschwindigkeit sowohl radial als auch tangential erhöhen, was zu einer Erhöhung der Kollisionsrate und damit zu verstärkter Koaleszenz führen kann. Die erhöhte Strömungsgeschwindigkeit mit steigender Umfangsgeschwindigkeit führt außerdem zu einer Zunahme des Massenstroms und damit zu einer Abnahme der Verweilzeit in der Zerkleinerungseinheit. Bei einer Umfangsgeschwindigkeit von 7,7 m/s zum Beispiel beträgt der Massenstrom 0,4 g/s, bei 15,4 m/s 2,4 g/s und bei 23 m/s 3,9 g/s. Es ist möglich, dass der Emulgator die unstabilierten Grenzflächen bei den kürzeren Verweilzeiten nicht ausreichend schnell belegt, was die Koaleszenzwahrscheinlichkeit und damit, neben der Kollisionsrate, die

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W1/O-Emulsionen

Tropfenkoaleszenz erhöhen kann. Außerdem ist es denkbar, dass die Deformationszeit in der Zerkleinerungseinheit bei hohen Umfangsgeschwindigkeiten zu kurz ist, um den Tropfen ausreichend über ein kritisches Maß zu deformieren und aufzubrechen (siehe Kapitel 2.3.2).

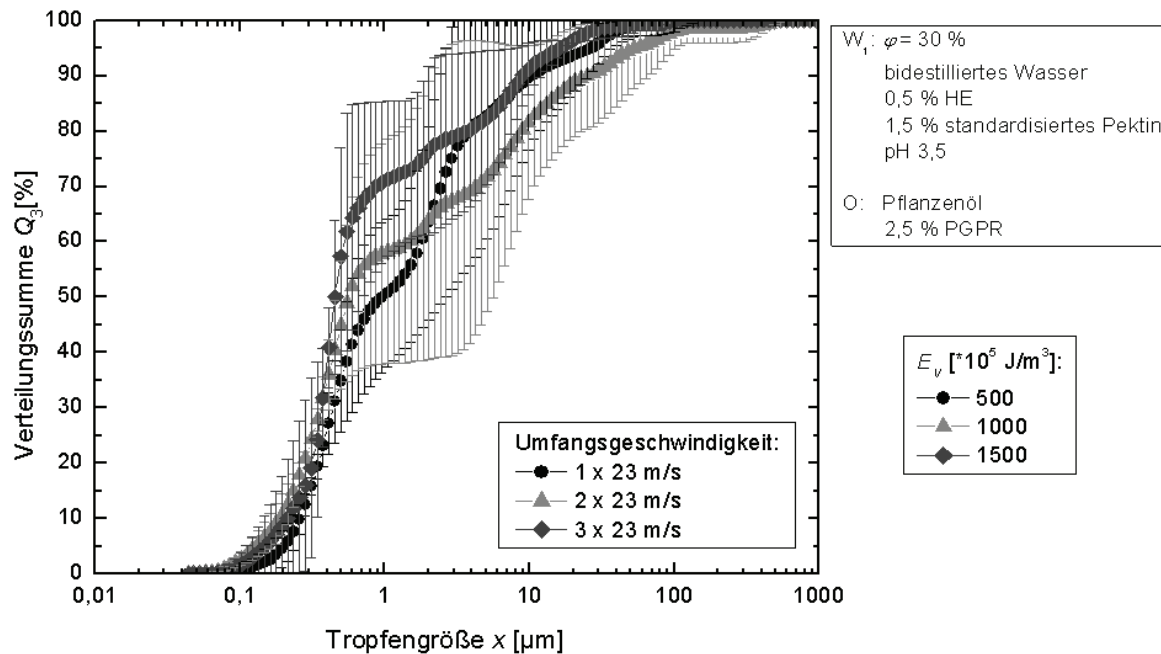


Abb. 6-6: Einfluss der Passagenzahl beim Emulgieren in der ZKDM bei einer Umfangsgeschwindigkeit von 23 m/s auf die Mikrostruktur der W₁/O-Emulsionen.

Um diese Hypothese weiter zu hinterfragen, wurde ein Hochdruckhomogenisator eingesetzt, d.h. ein Emulgierverfahren, bei dem kürzere Verweilzeiten t_V und höhere Spannungen als in einem Rotor-Stator-System auftreten. Eine gezielte Variation der Verweilzeit und der deformierenden Spannung kann hier über die Einstellung des Homogenisierdruckes Δp realisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Druck zwischen 300 und 1000 bar variiert. Da die Koaleszenzwahrscheinlichkeit umso größer ist, je größer der Dispersphasenanteil φ ist, wurde zudem der Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Emulsionsstruktur untersucht. φ wurde zwischen 1 und 40 % verändert.

Die Tropfengrößenverteilungen, die in Abb. 6-7 beispielhaft für Emulsionen dargestellt sind, die bei einem Homogenisierdruck Δp von 700 bar hergestellt wurden, zeigen, dass selbst Emulsionen mit einem Dispersphasenanteil von nur 1 % einen sehr hohen Grobgutanteil mit Tropfengrößen $> 10 \mu\text{m}$ aufweisen. Dieser Zusammenhang konnte für alle im Hochdruckhomogenisator herge-

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

stellten Emulsionen beobachtet werden, unabhängig vom Homogenisierdruck (siehe Anhang, Kapitel 11.10).

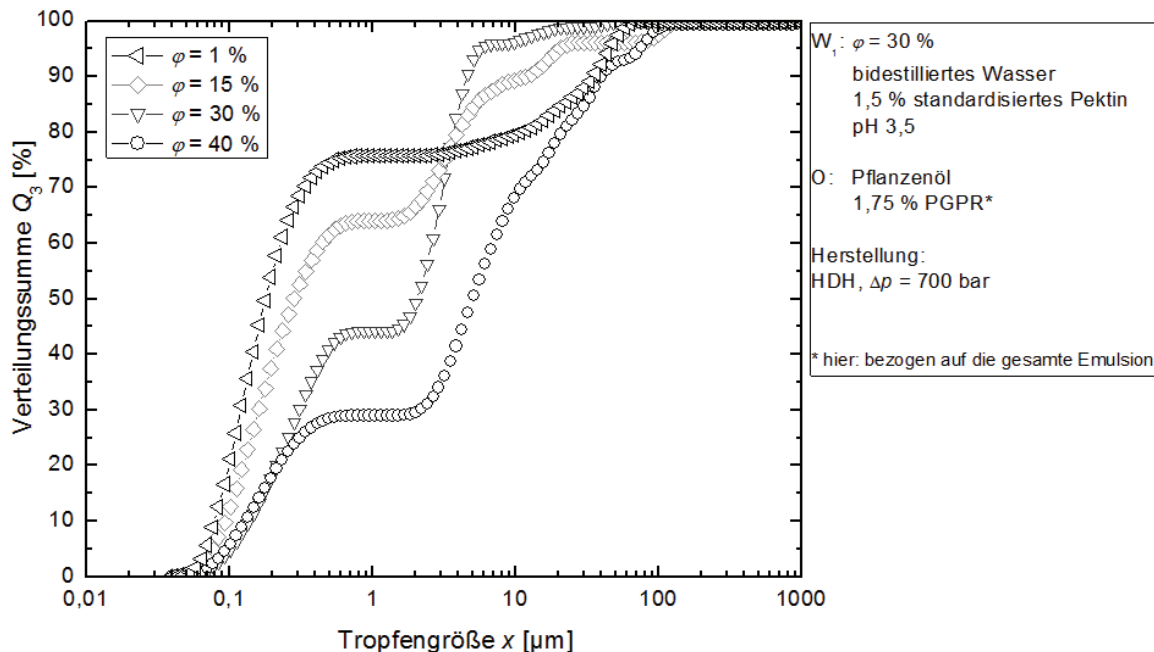


Abb. 6-7: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen, hergestellt im Hochdruckhomogenisator.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die pektinhaltigen Tropfen auch im Hochdruckhomogenisator aggregieren und koaleszieren. Die Versuche wurden ebenfalls mehrfach durchgeführt. In Abb. 6-7 sind keine Standardabweichungen dargestellt, da diese so groß sind, dass die Übersichtlichkeit des Diagrammes leiden würde. Bei allen Versuchen wurde aber ein signifikanter Grobgutanteil mit Tropfen $> 10 \mu\text{m}$ gemessen. Daneben war stets eine Mehrmodalität im Tropfengrößenbereich von $0,3$ bis etwa $10 \mu\text{m}$ zu sehen. Diese Mehrmodalität kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass bei dem hier vorherrschenden Homogenisierdruck noch keine vollturbulente Strömung vorliegt, so dass im Prozess nicht alle Tropfen gleichermaßen beansprucht [Wolf et al., 2011], und daher nicht bis auf die selbe Tropfengröße aufgebrochen werden. Der Grobgutanteil mit Tropfen zwischen 10 und $100 \mu\text{m}$ kann zum einen Folge von Aggregation oder Koaleszenz sein. Zum anderen ist es möglich, dass die pektinhaltigen Tropfen unzureichend aufgebrochen werden. Der Emulgierprozess im Hochdruckhomogenisator zeichnet sich durch eine sehr kurze Verweilzeit der Tropfen im Bereich der zerkleinerungswirksamen Strömungen aus. Da der verwendete Emulgator reine Wasserphasen ausreichend schnell stabilisieren konnte (siehe Anhang, Kapitel 11.10), ist eine unzureichende Stabilisierung der Tropfen aufgrund der Emulgatorkinetik auszuschließen. Durch die Zugabe von $1,5\%$ standardisiertem Pektin erhöht sich allerdings die

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen

dynamische Viskosität bei 50 °C um mehr als das Vierfache. Da die kritische Deformationszeit proportional zur Viskosität der dispersen Phase ist, wäre es denkbar, dass die Tropfen nicht lange genug über ein kritisches Maß deformiert und daher nicht effektiv aufgebrochen werden können (siehe Kapitel 2.3.2).

Demzufolge ist es nicht möglich, höher viskose W₁-Tropfen ausreichend aufzubrechen und zu stabilisieren, wenn die Verweilzeit im Bereich des Einwirkens der zerkleinerungswirksamen Spannungen zu kurz ist. Damit ist es mit Hochdruckhomogenisatoren nicht möglich, über Veränderungen der Prozessparameter gezielt unterschiedliche Mikrostrukturen mit geringem Grobgutanteil einzustellen. Gleiches gilt für Zahnkranzdispergiermaschinen bei sehr hohen Umfangsgeschwindigkeiten ($v_U > v_{U,krit}$).

Um die Effektivität der Zerkleinerung der beiden Verfahren unabhängig vom Verfahren selbst beurteilen zu können, wurden die $x_{90,3}$ -Durchmesser von pektinhaltigen W₁/O-Emulsionen, die im Hochdruckhomogenisator bzw. in einer Zahnkranzdispergiermaschine hergestellt wurden, in Abhängigkeit der Energiedichten dargestellt (siehe Abb. 6-8).

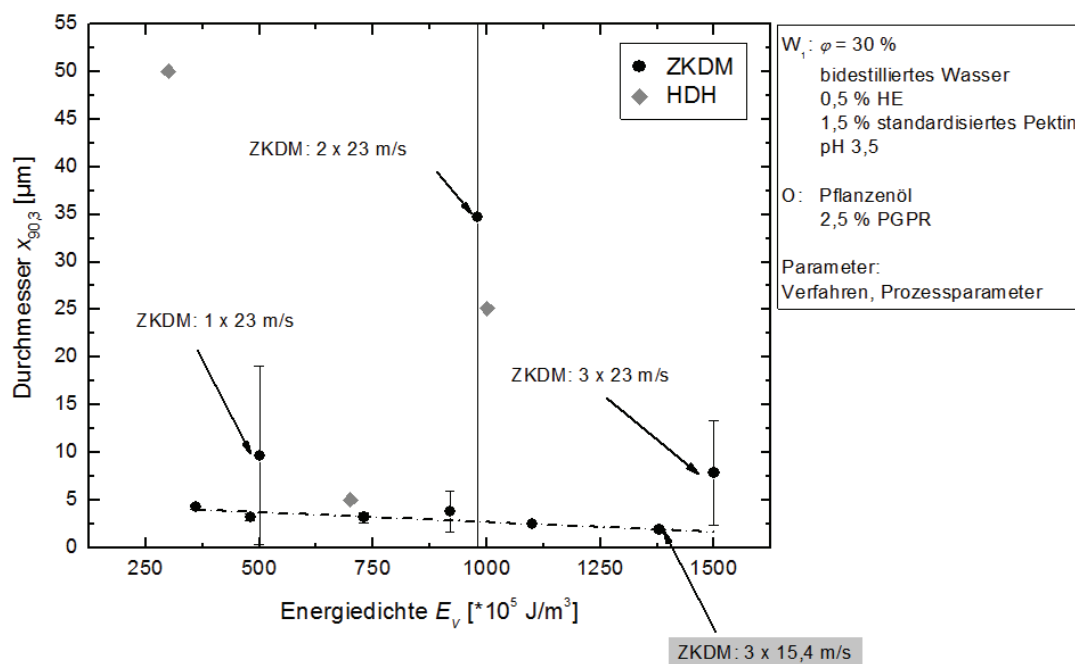


Abb. 6-8: Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren im HDH und in der ZKDM auf den $x_{90,3}$ -Durchmesser von W₁/O-Emulsionen.

Diese Darstellung verdeutlicht noch einmal, dass W₁/O-Emulsionen mit höherer Tropfenviskosität nur im Rotor-Stator-System bei moderaten Umfangsgeschwindigkeiten (hier: bis 15,4 m/s), in Einfach- oder Mehrfachpassagen, effektiv zerkleinert und stabilisiert werden können. Die Tropfenzerkleinerung kann zwar nicht durch eine weitere Erhöhung der im Prozess wirkenden

Spannungen (hier über v_U) verbessert werden, aber durch die Anzahl der Passagen, d.h. die Verlängerung der Verweilzeit unter zerkleinerungswirksamen Spannungen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen resultierte zum Beispiel eine dreimalige Passage der Zerkleinerungseinheit bei 15,4 m/s in einer engen Verteilung mit Tropfengrößen im Bereich von 0,1 bis 2 μm , während eine einmalige Passage bei 25 m/s zu einer breiten Verteilung mit Grobgutanteilen von bis zu 50 μm führte.

Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurden für die Herstellung der inneren W_1/O -Emulsionen folgende Parameter gewählt und konstant gehalten:

Zahnkranzdispergiermaschine, 3 Passagen bei $v_U = 15,4$ m/s (10000 1/min).

6.1.3 Einfluss des Heidelbeerextraktanteils in der W_1 -Phase auf die Mikrostruktur pektinhaltiger W_1/O -Emulsionen

Wie bereits in Kapitel 6.1.1 erwähnt, kann eine Veränderung der Emulsionszusammensetzung stets auch Auswirkungen auf die Struktur der Emulsionen haben. Bei den bisher beschriebenen Versuchen wurden Emulsionen zum Teil mit und zum Teil ohne Heidelbeerextrakt hergestellt. Hierbei wurde die Hypothese zugrunde gelegt, dass eine Zugabe des Heidelbeerextraktes zur W_1 -Phase ohne signifikanten Einfluss auf die Mikrostruktur der Emulsionen möglich ist. Dies ist vor allem dann entscheidend, wenn im Weiteren Dopplemulsionen mit einem maximal hohen Anthocyangehalt hergestellt werden sollen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden W_1/O -Emulsionen mit unterschiedlichen Heidelbeerextraktanteilen hergestellt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine Zugabe bis zu 0,5 % Heidelbeerextrakt im Rahmen der Standardabweichungen keinen signifikanten Einfluss auf die Mikrostruktur der Emulsionen hat. Bei weiterer Erhöhung des Heidelbeerextraktanteils nimmt der Grobgutanteil der Emulsionen jedoch maßgeblich zu (siehe Abb. 6-9).

Darüber hinaus kam es nach der Herstellung von Emulsionen mit Heidelbeerextraktanteilen von über 0,5 % zur Bildung eines dunkelrot gefärbten Sediments (siehe Abb. 6-10). Bis zu einer Lagerdauer von etwa 10 Stunden ist die Sedimentmenge stetig angewachsen.

Mikroskopische Untersuchungen des Sediments ergaben, dass es sich hierbei um sowohl koaleszierte als auch aggregierte Gelpartikel handelt (siehe Abb. 6-11). Eine mikroskopische Aufnahme der verbleibenden, nicht sedimentierenden Emulsion ist in Kapitel 11.14 im Anhang zu sehen.

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W1/O-Emulsionen

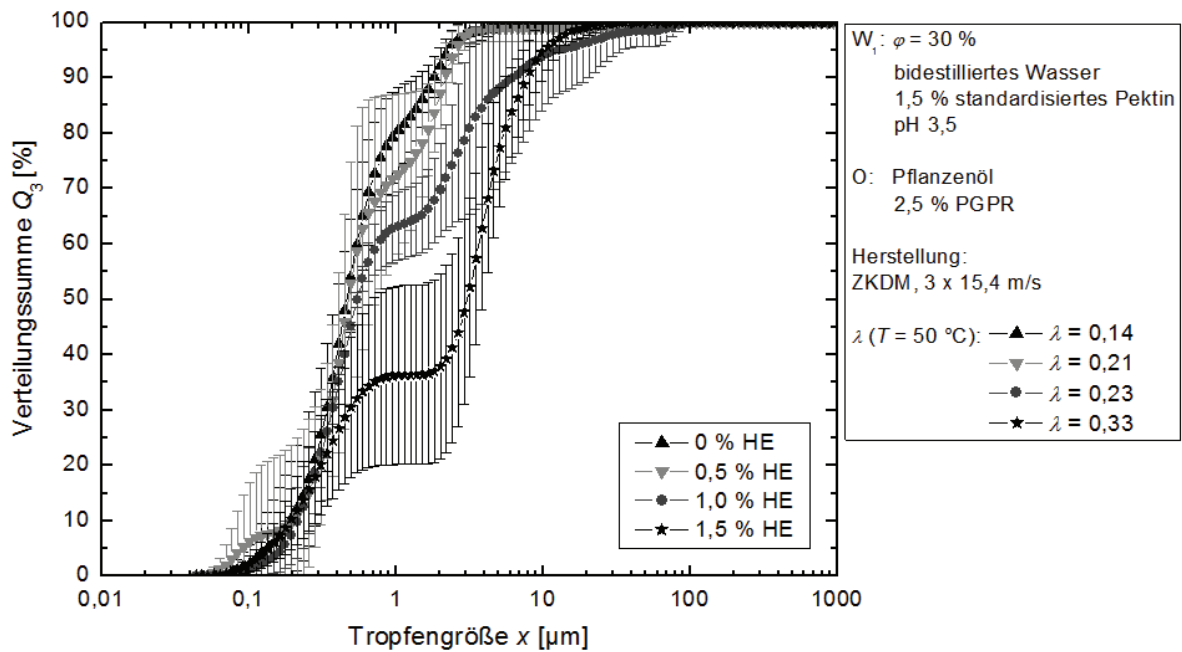


Abb. 6-9: Einfluss des HE-Anteils auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen.



Abb. 6-10: Dunkelrot gefärbtes Sediment am Boden von pektinhaltigen W₁/O-Emulsionen mit Heidelbeerextraktanteilen von mehr als 0,5 % in der W₁-Phase.

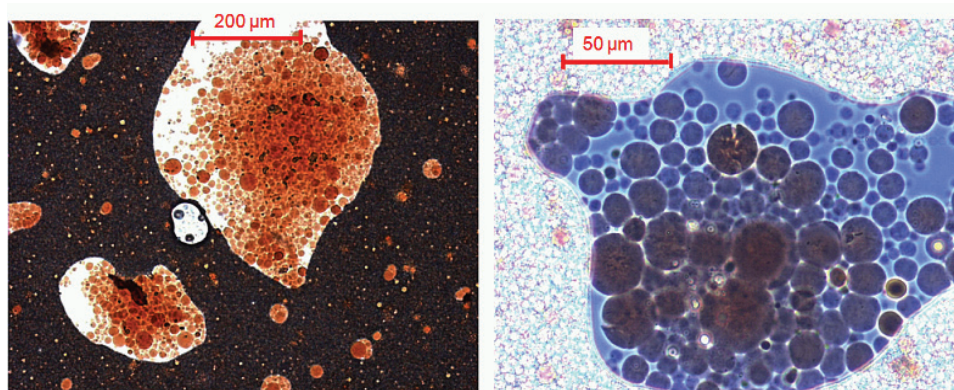


Abb. 6-11: Mikroskopische Aufnahmen des Sediments. Zeiss Axioskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland), 100 bis 1000-fache Vergrößerung, (TU München).

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

Die Bestimmung der Geliertemperatur von 0,9 %-igen Pektinlösungen ohne Heidelbeerextrakt und mit 0,25 % Heidelbeerextrakt ergab, dass die Geliertemperatur durch die Zugabe des Extraktes von etwa 9,4 °C auf etwa 17,3 °C erhöht wird (siehe Anhang, Kapitel 11.12). Demzufolge ist anzunehmen, dass die Geliertemperatur durch eine weitere Erhöhung des Extraktanteils weiter zunimmt. Da es im Prozess zu lokalen Temperaturschwankungen kommen kann, insbesondere auch bei der Herstellung der Rohemulsion und zwischen den einzelnen Emulgierschritten, ist es denkbar, dass die Gelierung der Tropfen bereits im Prozess durch ein lokales Unterschreiten der Geliertemperatur induziert wurde. Das könnte zu einem erschwerten Tropfenaufbruch und damit zu größeren Tropfen führen. Während der Lagerung der Proben könnte es dann zur Sedimentation dieser Tropfen kommen, wobei sich mit zunehmender Zeit immer mehr große Tropfen im Sediment ansammeln und Aggregate bilden.

Die folgenden Betrachtungen sollten klären, inwieweit die Zugabe von mehr als 0,5 % Heidelbeerextrakt die Gelierungseigenschaften des Pektins beeinflussen und damit die soeben diskutierte Sedimentbildung induzieren kann. Mögliche gelbildungsrelevante Parameter, die durch das Heidelbeerextrakt verändert werden könnten, sind der pH-Wert sowie der lösliche Trockenmasseanteil in der W_1 -Phase.

Obwohl der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Geliertemperatur haben kann, wird beim Betrachten der pH-Werte wässriger Lösungen mit 0,1 bis 1,5 % Heidelbeerextrakt deutlich, dass die pH-Wert-Unterschiede von Lösungen mit unterschiedlichen Extraktanteilen vernachlässigbar gering sind (siehe Tab. 6-2). Daher ist eine pH-Wert-Änderung als Ursache für die Sedimentbildung auszuschließen.

Tab. 6-2: pH-Wert im anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktfiltrat in Abhängigkeit des eingewogenen HE-Anteils.

HE-Anteil [%]	pH-Wert im Wasser vor Zugabe des HE	pH-Wert des anthocyanhaltigen HE-Filtrats
0,1	3,5	3,4
1	3,5	3,3
1,5	3,5	3,2

Der Trockenmasseanteil, der dem verwendeten, standardisierten Pektin zur Einstellung der Geliereigenschaften von Seiten des Herstellers zugegeben wurde, ist unbekannt. Bei der Herstellung von Emulsionen mit dem nicht

6.1 Einfluss von Prozess- und Rezepturparametern auf die Mikrostruktur von W₁/O-Emulsionen

standardisierten Pektin wurden im Rahmen dieser Arbeit, ausgehend von Herstellerangaben, 0,234 % Trockenmasse in Form von Dextrose hinzugefügt. Im Vergleich dazu enthält das Heidelbeerextrakt etwa 30 % Trockenmasse (siehe Kapitel 3.1.1). Das heißt, der Trockenmasseanteil einer wässrigen Lösung mit 0,5 % Heidelbeerextrakt beträgt ca. 0,15 %, einer Lösung mit 1,0 % Heidelbeerextrakt bereits 0,30 %. Demzufolge ist die Menge an Trockenmasse, die durch 1,0 % Heidelbeerextrakt eingebracht wird, größer als der Trockenmassenanteil, der standardmäßig zur Einstellung der Gelierungseigenschaften der Pektine hinzugefügt wird. Das lässt den Schluss zu, dass die durch das Extrakt eingebrachte Trockenmasse die Gelierung der pektinhaltigen Tropfen maßgeblich beschleunigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bis zu einem kritischen Heidelbeerextraktanteil (hier 0,5 %) kein Einfluss auf die Struktur von pektinhaltigen W₁/O-Emulsionen mit standardisiertem Pektin beobachtet werden konnte. Bei höheren Konzentrationen führt vermutlich der lösliche Trockenmassegehalt des Heidelbeerextraktes bereits im Prozess zu einer beginnenden Ausgelierung der pektinhaltigen Tropfen. Daher wurde bei den folgenden Arbeiten stets mit maximal 0,5 % Heidelbeerextrakt gearbeitet. Ist für eine spätere Anwendung ein höherer Heidelbeerextraktanteil in der herzustellenden Doppelemulsion gewünscht, so ist es denkbar, dass dies unter Verwendung von nicht standardisiertem Pektin erreicht werden kann. Bei diesem kann der Trockenmassegehalt durch Reduzierung des Dextroseanteils in der Mischung vermindert werden. Hierdurch wäre es möglich, größere Mengen an Heidelbeerextrakt zu formulieren, ohne dass es zu signifikanten Veränderungen der Mikrostruktur der Emulsionen kommt. Darüber hinaus kann mit Extrakten gearbeitet werden, die einen niedrigeren Trockenmasseanteil als das hier verwendete Heidelbeerextrakt aufweisen.

6.1.4 Einfluss des Dispersphasenanteils φ auf die Mikrostruktur der W₁/O-Emulsionen

Wenn der innere Dispersphasenanteil φ keinen Einfluss auf die Mikrostruktur der W₁/O-Emulsionen hätte, könnte der Anthocyangehalt der W₁/O-Emulsionen bzw. der im Weiteren hergestellten Doppelemulsionen auch über eine Erhöhung der extrakthaltigen W₁-Phase gesteigert werden. Ausgehend von der Theorie zur Tropfenkoaleszenz (siehe Kapitel 2.3.3) ist aber zu erwarten, dass die Kollisionsfrequenz C und damit die Koaleszenzrate Ω mit steigendem Dispersphasenanteil zunimmt.

Untersuchungen, bei denen W₁/O-Emulsionen mit Dispersphasenanteilen von 5 bis 60 % hergestellt wurden, konnten diese Annahme bestätigen. Die Ergebnisse

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

zeigen, dass der Grobgutanteil der Emulsionen mit steigendem Dispersphasenanteil leicht zunimmt (siehe Abb. 6-12).

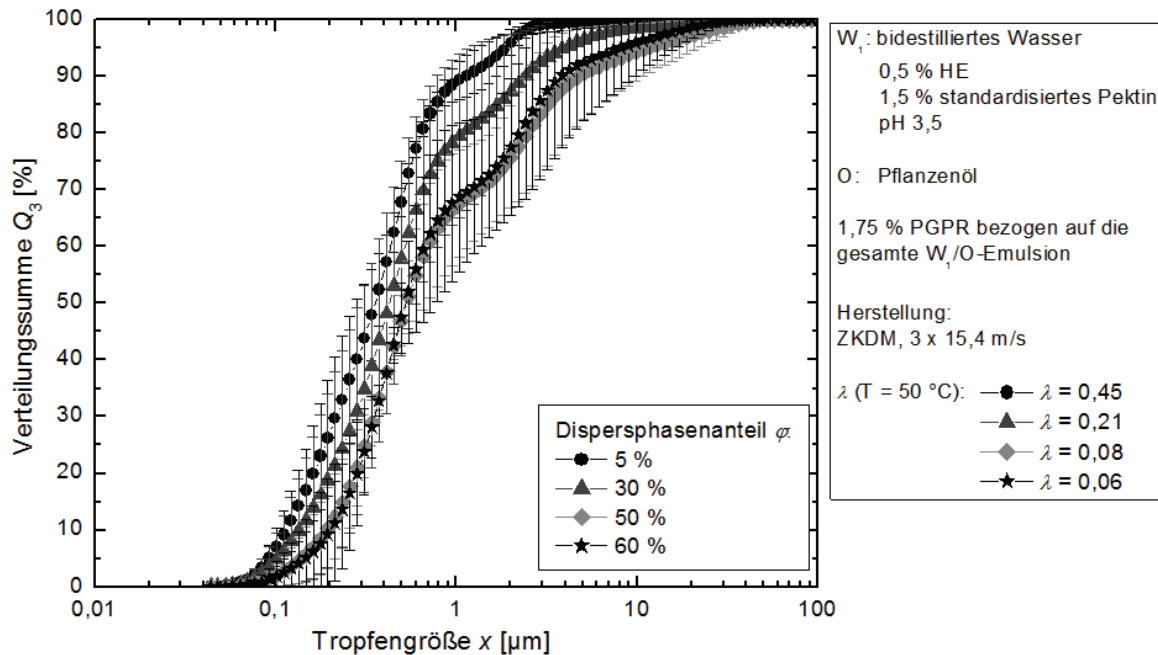


Abb. 6-12: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von W_1/O -Emulsionen.

Der Grobgutanteil nimmt bei einer Erhöhung des inneren Dispersphasenanteils von 30 auf 60 % im Rahmen der Standardabweichungen nur relativ wenig zu. Dies wird insbesondere bei Betrachtung der in Tab. 6-3 dargestellten $x_{90,3}$ -Durchmesser der Emulsionen deutlich.

Tab. 6-3: $x_{90,3}$ -Durchmesser von W_1/O -Emulsionen mit unterschiedlichem inneren Dispersphasenanteil φ .

φ [%]	5	30	50	60
$x_{90,3}$ [µm]	$1,2 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,1$	$4,9 \pm 3,3$	$6,3 \pm 3,4$

Daher ist davon auszugehen, dass es, je nach gewünschter Mikrostruktur der inneren Emulsionen, möglich ist, Doppelemulsionen mit W_1/O -Emulsionen herzustellen, die bis zu 60 % W_1 -Phase enthalten. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass die Koaleszenzrate der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase umso größer ist, je höher der Dispersphasenanteil φ ist. Zudem weisen W_1/O -Emulsionen mit einem Dispersphasenanteil von mehr als 40 % elastisches Fließverhalten auf [Chanamai et al., 2000]. Dies wird den Tropfenaufbruch im zweiten Emulgierschritt bei der Herstellung von Doppelemulsionen entscheidend beeinflussen [Mighri et al., 1998; Mechbal et al., 2009]. Daher

6.2 Langzeitstabilisierung der inneren Tropfen

wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Mikrostruktur von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen stets mit einem Dispersphasenanteil φ von 30 % gearbeitet.

6.2 Langzeitstabilisierung der inneren Tropfen

Die Langzeitstabilität der hergestellten Emulsionen ist von großem Interesse, insbesondere mit Hinblick auf die Haltbarkeit emulsionsbasierter Produkte.

Es ist anzunehmen, dass durch die Zugabe von Elektrolyten zur inneren Wasserphase die Langzeitstabilität der W_1/O -Emulsionen erhöht werden kann. Wie im Kapitel 2.1 beschrieben, beobachteten Scherze et al. (2006) nach der Zugabe von NaCl zur inneren Wasserphase eine Erhöhung der Koaleszenzstabilität von PGPR-stabilisierten W_1/O -Emulsionen. Zudem wurde eine Reduktion von durch Ostwaldreifung ausgelösten Instabilitäten beschrieben [Koroleva et al., 2003]. Opawale et al. (1998) postulierten außerdem, dass NaCl den PGPR-stabilisierten Grenzflächenfilm festigt und somit sowohl die Kurz- als auch die Langzeitstabilität der Emulsionen erhöhen kann.

Darüber hinaus ist zu erwarten, dass die Koaleszenzstabilität der W_1/O -Emulsionen durch Zugabe von Makromolekülen wie z.B. Gelatine oder anderen Hydrokolloiden (siehe Kapitel 2.4) zur inneren Wasserphase erhöht werden. Dies führt zur Ausbildung von viskoelastischen, gelartigen Strukturen an der W_1/O -Grenzfläche oder zum kompletten Ausgelieren der inneren Wasserphase, was die Koaleszenz unter den W_1 -Tropfen reduzieren kann [Surh et al., 2007; Dickinson, 2011].

Um diese Hypothesen gezielt zu hinterfragen, wurde der Einfluss eines Elektrolyten (hier: Calciumchlorid) und eines Hydrokolloids (hier: Pektin) auf die Lagerstabilität von W_1/O -Emulsionen untersucht. Darüber hinaus wurde der Effekt des in dieser Arbeit verwendeten Heidelbeerextrakts auf die Stabilität der inneren Emulsionen analysiert.

Abb. 6-13 bestätigt die zuvor beschriebene Hypothese einer besseren Lagerstabilität von PGPR-haltigen W_1/O -Emulsionen unter Zusatz von Elektrolyten auch für Calciumchlorid.

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

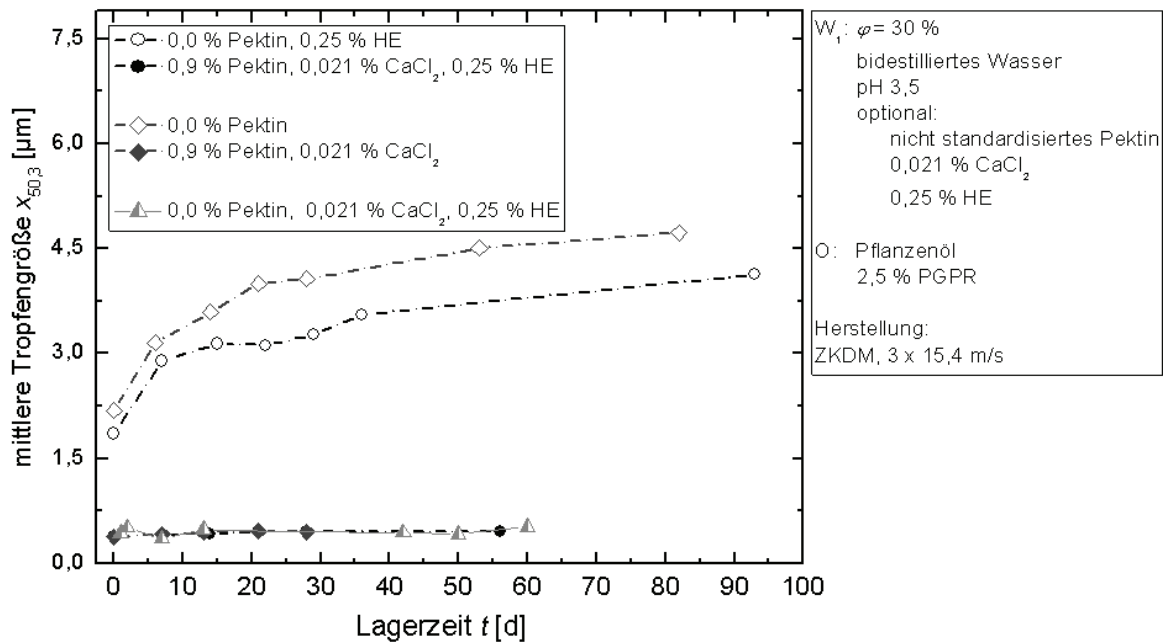


Abb. 6-13: Einfluss von Calciumchlorid, Pektin und Heidelbeerextrakt auf die Lagerstabilität von W_1/O -Emulsionen.

Emulsionen mit Heidelbeerextrakt in der W_1 -Phase von salz- und pektinfreien Emulsionen wiesen außerdem kleinere und stabilere Tropfen auf als die Emulsionen ohne das Extrakt (siehe Abb. 6-13, leere Symbole). Eine mögliche Erklärung ist in der Tatsache zu finden, dass die Grenzflächenspannung γ an der Pflanzenöl-Wasser-Grenzfläche mit steigendem Heidelbeerextraktanteil abnimmt (siehe Abb. 6-14 sowie Kapitel 5.4). Dies weist auf Anteile grenzflächenaktiver Bestandteile hin, die den Zerkleinerungs- sowie Stabilisierungsvorgang unterstützen. Ob eine der im Extrakt vorhandenen Einzelsubstanzen oder eine Kombination aus verschiedenen Bestandteilen des Extraktes für diesen Effekt verantwortlich ist, kann aufgrund der komplexen Extraktzusammensetzung (siehe Kapitel 3.1.1) nicht spezifiziert werden. Bei zusätzlicher Zugabe von Calciumchlorid und Pektin ist kein Einfluss des Heidelbeerextraktanteils auf die Tropfengröße der Emulsionen und deren Lagerstabilität mehr zu erkennen. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Tropfenstabilisierung von den Salz-PGPR-Interaktionen dominiert wird, so dass eine weitere Stabilisierung durch die grenzflächenaktiven Bestandteile des Extraktes keinen signifikanten Effekt mehr hat.

6.2 Langzeitstabilisierung der inneren Tropfen

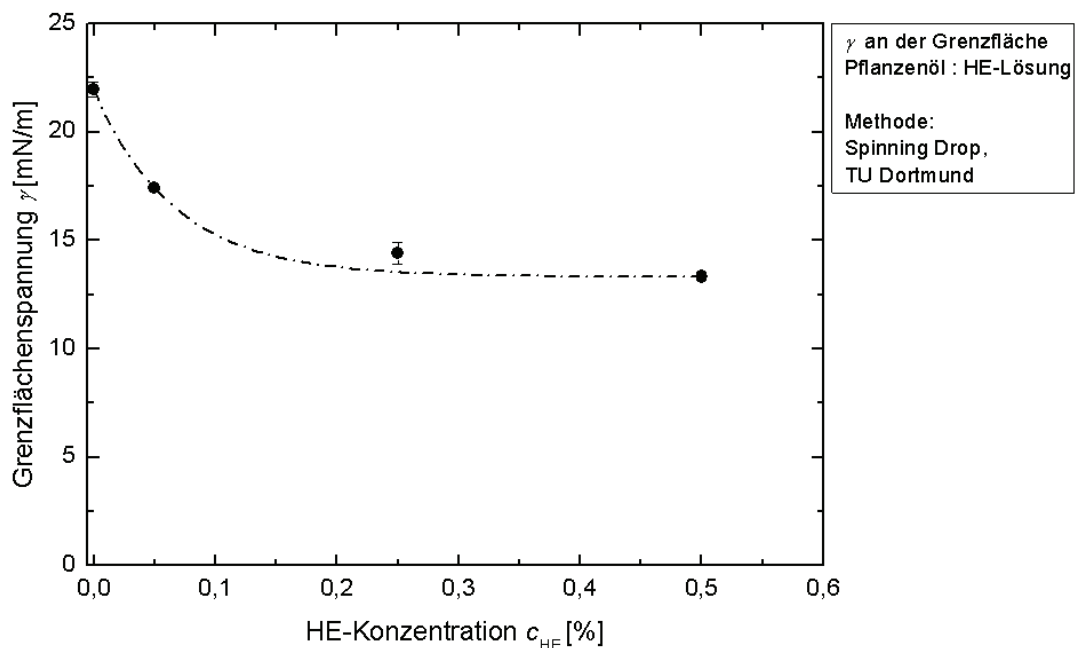


Abb. 6-14: Einfluss der HE-Konzentration in der wässrigen Phase auf die Grenzflächen-spannung an der Öl-Wasser-Grenzfläche.

Neben diesen Betrachtungen wurde der Einfluss des Dispersphasenanteils der Emulsionen auf deren Lagerstabilität untersucht. Unter Anwesenheit einer höheren Anzahl an Tropfen ist davon auszugehen, dass es zu einer verstärkten Koaleszenzrate während der Lagerung kommt.

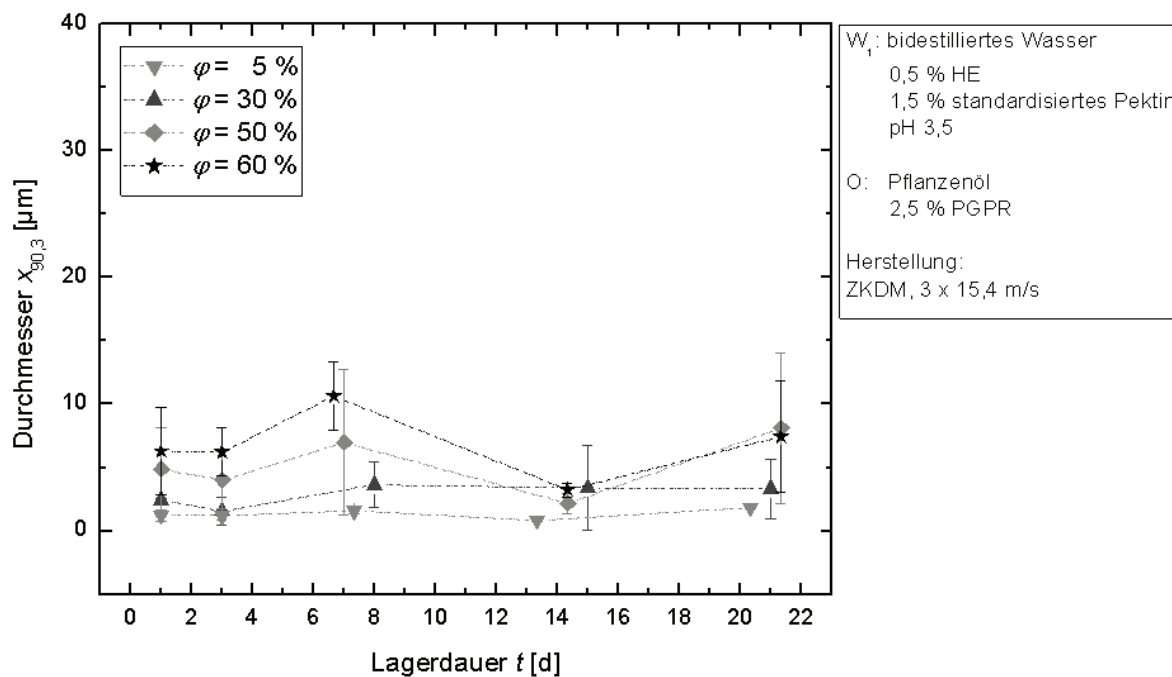


Abb. 6-15: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Lagerstabilität von W_1/O -Emulsionen.

6 Einstellung der Mikrostruktur der inneren Emulsionen

Abb. 6-15 zeigt jedoch, dass die Emulsionen im beobachteten Zeitraum unabhängig vom Dispersphasenanteil stabil sind. Das heißt, die Grenzflächenfilme in diesen Emulsionen sind so fest, dass die Koaleszenzwahrscheinlichkeit der Tropfen während der Lagerung marginal ist. Als Folge sind die Emulsionen im beobachteten Zeitraum auch bei hohen Dispersphasenanteilen und damit hoher Kollisionsfrequenz stabil.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Lagerstabilität von PGPR-stabilisierten W_1/O -Emulsionen mit Dispersphasenanteilen bis zu 60 % durch die Zugabe eines Elektrolyten zur inneren Wasserphase verbessert werden kann. Eine zusätzliche Addition von Hydrokolloiden zur W_1 -Phase hat dann keinen weiteren Effekt mehr auf die Lagerstabilität der W_1/O -Emulsionen.

7 Einstellung der Mikrostruktur der äußeren Emulsionen

Ziel dieser Arbeit ist es, Grundlagen zu erarbeiten, die es ermöglichen, emulsionsbasierte Formulierungssysteme für labile hydrophile Bioaktivstoffe zu entwickeln, die diese ausreichend stabilisieren und an der gewünschten Stelle im Magen-Darm-Trakt freisetzen. Als Modellsystem dient ein anthocyanhaltiger Heidelbeerextrakt, der in einem $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionssystem formuliert wird. In diesem Kapitel soll aufgezeigt werden, inwieweit es möglich ist, Doppelemulsionen so zu gestalten, dass sie stabil in den Dünndarm gelangen und dort die eingeschlossenen Anthocyane freisetzen. Einflüsse von Stoff- und Prozessparametern auf die Stabilität und Struktur der Doppelemulsionen sowie das Freisetzungsverhalten der Bioaktivstoffe aus diesen Systemen werden untersucht.

In den Kapiteln 4 und 6 wurde gezeigt, welche Stoff- und Prozessparameter die Mikrostruktur der inneren W_1/O -Emulsionen sowie die Stabilität der eingeschlossenen Bioaktivstoffe und der Formulierung beeinflussen. Für die Untersuchungen zum stabilen Einbringen der inneren Emulsion in die äußere Emulsions“hülle“ werden nun die Zusammensetzung und Herstellungsparameter der inneren W_1/O -Emulsion konstant gehalten:

- Dispersphasenanteil $\varphi = 30 \%$
- Herstellung:
Zahnkranzdispergiermaschine, 3 Passagen, $v_U = 15,4 \text{ m/s}$
- W_1 -Tropfen:
 - pH = 3,5 zur Gewährleistung einer optimalen Anthocyanstabilität
 - 1,5 % calciumchloridhaltiges, standardisiertes Pektin.
- Ölphase: 2,5 % PGPR als lipophiler Emulgator

Die dargestellten Tropfengrößen bzw. -verteilungen beziehen sich immer auf die äußeren W_1/O -Tropfen. Allen dargestellten Standardabweichungen liegt eine Dreifachwiederholung der Versuche zugrunde. Die jeweils hergestellten Emulsionen wurden wiederum dreifach mit statischer Lichtstreuung analysiert.

7.1 Einfluss von Emulgatortyp und Prozessparameter auf die Mikrostruktur von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen

Auch im zweiten Emulgierschritt ist davon auszugehen, dass die Mikrostruktur der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen durch Variation von Prozess- sowie Rezepturparametern gezielt verändert werden kann, wenn die beim Herstellen der Emulsionen neu geschaffenen Grenzflächen ausreichend schnell stabilisiert werden.

Beim Einbringen der inneren W_1/O -Emulsionen in der äußeren W_2 -Phase ist allerdings zu berücksichtigen, dass hohe Scherkräfte zu einer verstärkten Freisetzung eingeschlossener W_1 -Tropfen führen können (siehe Kapitel 2.3). Daher sind die Anpassungsmöglichkeiten bezüglich des Verfahrens bzw. der Prozessparameter limitiert. Hochdruckhomogenisatoren und Zahnkranzdispergiermaschinen sind zum Beispiel im zweiten Emulgierschritt aufgrund der darin herrschenden hohen Scherkräfte in der Dispergierzone ungeeignet. Sie führen zu einem sehr geringen Erhalt an inneren Wassertropfen [Schuch et al., 2012]. Verfahren, die ein schonendes Einbringen der inneren Emulsion ermöglichen, sind das Emulgieren mit Membranen oder mit Kolloidmühlen bei geringen Drehzahlen. Da sich Membranen, im Gegensatz zu Kolloidmühlen, in der Industrie bisher kaum zur effektiven Emulsionsherstellung etablieren konnten, wurden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit einer Kolloidmühle (KM) gemacht. Um möglichst schonende Emulgierbedingungen zu realisieren, wurde nur eine Drehzahl von 3000 1/min gewählt, was einer maximalen Umfangsgeschwindigkeit von 3,5 m/s entspricht. Der Energieeintrag wurde durch Variation der Emulgierspaltweite verändert.

Langkettige, hochmolekulare Emulgatoren benötigen mehr Zeit zur Adsorption und Ausrichtung an der Tropfengrenzfläche als kurzkettige (siehe Kapitel 2.1). Das heißt, bei Verwendung von langkettigen Emulgatoren ist mehr Zeit erforderlich, bis sich an der Grenzfläche eine stabilisierende Emulgatorschicht ausgebildet hat. Folglich ist der Zeitraum, in dem Koaleszenz stattfinden kann, länger, was zu größeren Tropfen nach dem Emulgieren führt. Daher ist anzunehmen, dass die Verwendung von hydrophilen Emulgatoren mit unterschiedlicher Adsorptionskinetik in Mikrostrukturen mit verschiedener W_1/O -Tropfengröße resultiert. Um diese Hypothese gezielt zu untersuchen, wurden die kurzkettigen Emulgatoren Tween 20 und Gallensäure (GS) sowie die langkettigen Emulgatoren Molkenproteinisolat (MPI) und β -Lactoglobulin eingesetzt.

Die Bestimmung der dynamischen Grenzflächenspannung der verwendeten Emulgatoren mittels Pendant-Drop-Methode [Leick et al., 2009] konnte belegen,

7.1 Einfluss von Emulgatortyp und Prozessparameter auf die Mikrostruktur von W1/O/W2-Emulsionen

dass die kurzkettigen Emulgatoren die Grenzflächenspannung deutlich schneller senken als die langkettigen (siehe Abb. 7-1).

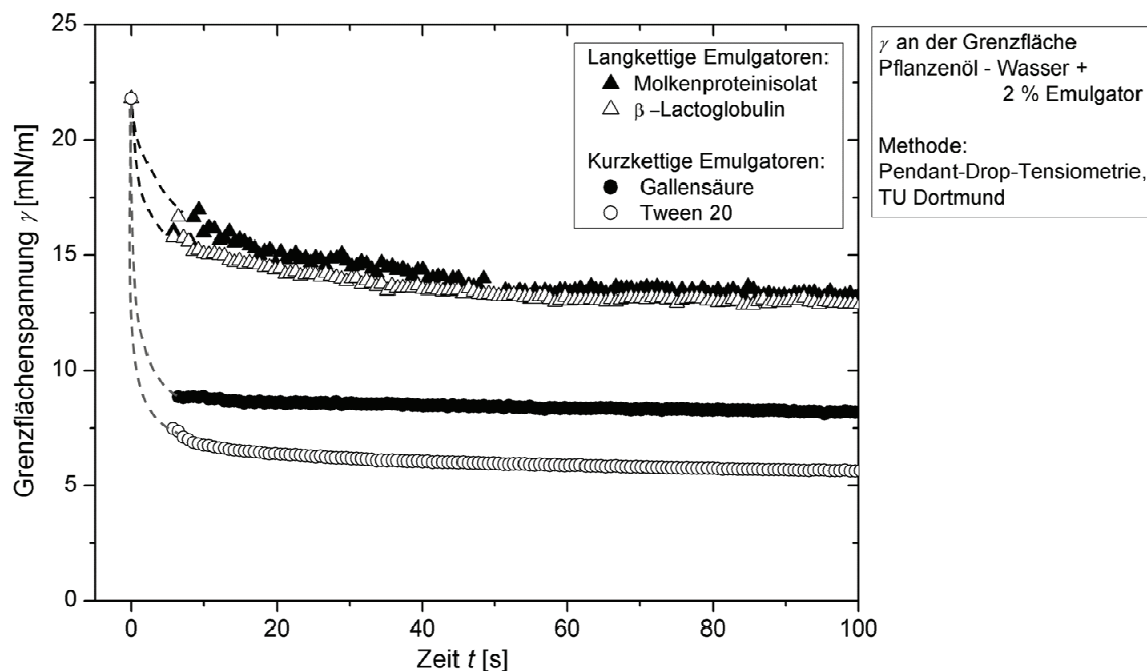


Abb. 7-1: Dynamische Grenzflächenspannung der verwendeten hydrophilen Emulgatoren bei $T = 20^\circ\text{C}$.

Darüber hinaus wiesen die mit Gallensäure und Tween 20 stabilisierten Emulsionen, unabhängig von der Spaltweite und damit des Energieeintrages, kleinere Tropfengrößen auf als die Emulsionen mit Molkenproteinisolat oder β -Lactoglobulin (siehe Abb. 7-2).

Allerdings fällt auf, dass die Geschwindigkeiten, mit denen die Grenzflächenspannung abgesenkt werden konnte, nicht vollständig mit den gemessenen Tropfengrößen korrelieren. Die Versuche konnten zwar bestätigen, dass die verwendeten kurzkettigen Emulgatoren die Grenzflächenspannung schneller absenkten und damit die Tropfen schneller stabilisieren als die langkettigen, was zu kleineren Tropfen in der Emulsion führt. Gleichzeitig stellte sich aber heraus, dass die kleinsten Tropfen mit Gallensäure stabilisiert werden konnten, obwohl die Pendant-Drop-Messungen ergaben, dass Tween 20 die Grenzflächenspannung schneller absenkt als Gallensäure. Für die Proteine ergibt sich derselbe Zusammenhang. β -Lactoglobulin kann die Tropfen laut der durchgeführten Grenzflächenspannungsmessungen schneller stabilisieren als Molkenproteinisolat. Ungeachtet dessen weisen Emulsionen mit Molkenproteinisolat kleinere Tropfen auf als Emulsionen mit β -Lactoglobulin. Da alle Emulgatoren in Konzentrationen weit über der CMC eingesetzt wurden (CMC-Messungen siehe im Anhang, Kapitel 11.16), ist eine unzureichende

7 Einstellung der Mikrostruktur der äußeren Emulsionen

Emulgatormenge als Ursache hierfür auszuschließen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die angewendete Messmethodik den Kurzzeitbereich von einigen Millisekunden, in dem bereits ein großer Teil der Emulgatormoleküle adsorbiert (siehe Abb. 7-1), nicht auflösen kann. Daher ist nicht auszuschließen, dass der Abfall der Grenzflächenspannung im Millisekundenbereich bei Gallensäure steiler verläuft als bei Tween 20 bzw. bei Molkenproteinisolat steiler als bei β -Lactoglobulin. Darüber hinaus könnten diese Effekte auch durch Wechselwirkungen zwischen dem lipophilen Emulgator PGPR und dem entsprechenden hydrophilen Emulgator an der O/W_2 -Grenzfläche ausgelöst werden. Das bedeutet, dass sich innerhalb der Emulgatorgruppen (langkettig – kurzkettig) keine klare Aussage über den Zusammenhang von Tropfengröße und Emulgatorkinetik machen lässt.

Die Tatsache, dass die Adsorptionskinetik einen maßgeblichen Einfluss auf die Struktur der Doppelemulsionen hat, lässt den Schluss zu, dass das Emulgierergebnis von Koaleszenz bestimmt wird. In Abb. 7-2 ist aber auch deutlich zu erkennen, dass der Prozess dennoch zerkleinerungsdominiert ist. Eine geringere Spaltweite und damit ein höherer mechanischer Energieeintrag führt zu einem effektiveren Aufbruch der W_1/O -Tropfen und damit zu kleineren Tropfen, wie es auch für einfache O/W -Emulsionen bekannt ist [Karbstein, 1994; Schubert, 2005]. Dies gilt für alle verwendeten Emulgatorsysteme.

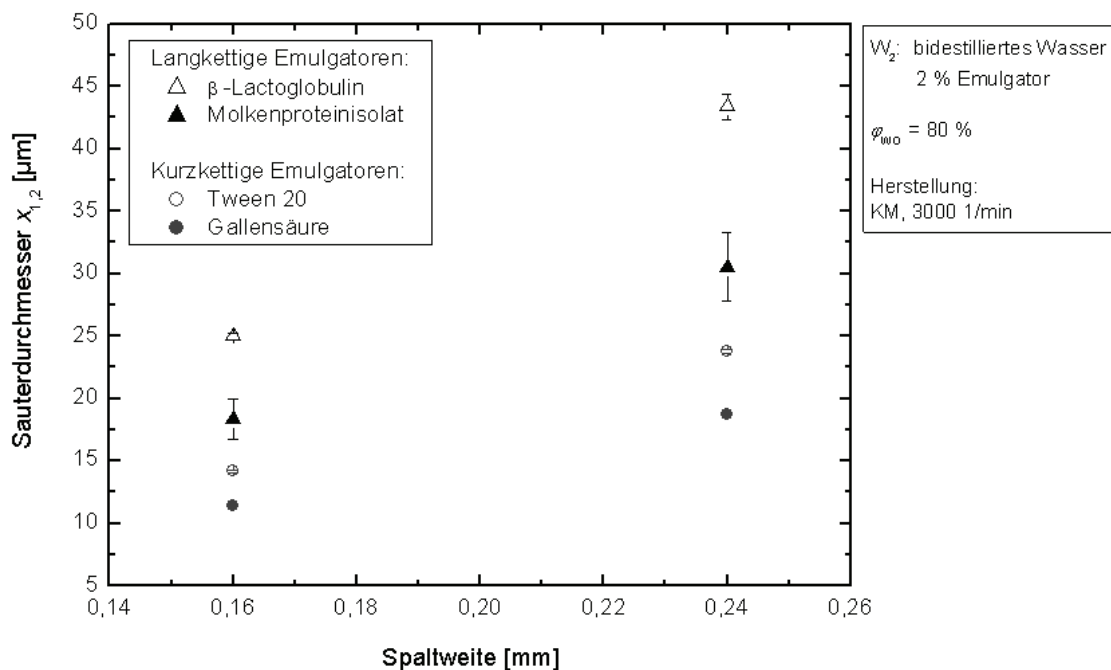


Abb. 7-2: Einfluss des verwendeten hydrophilen Emulgators (\rightarrow Emulgatorkinetik) und der eingestellten Spaltweite der KM (\rightarrow Energiedichte) auf den Sauterdurchmesser der W_1/O -Tropfen [Frank et al., 2011b].

7.2 Einfluss eines Gelbildners in W₂ auf die Mikrostruktur von W₁/O/W₂-Emulsionen

Das heißt, Parameter, die die äußere Mikrostruktur beeinflussen und es ermöglichen, gezielt Doppelemulsionen mit unterschiedlicher Tropfengrößenverteilung herzustellen, sind die verwendeten Emulgatoren und die dazugehörige Adsorptionskinetik sowie der Energieeintrag. Beim Emulgieren in Kolloidmühlen ist letzteres zum Beispiel durch eine gezielte Veränderung der Spaltweite oder der Drehzahl möglich. Da im Falle von engeren Spaltweiten oder höheren Umfangsgeschwindigkeiten aber auch höhere Scherkräfte auf die Tropfen wirken, was zu einem verstärkten Verlust an eingeschlossenen Wassertropfen führen kann, wurden die weiteren Untersuchungen bei einer Spaltweite von 0,24 mm und einer moderaten Umfangsgeschwindigkeit (hier: 3,5 m/s) durchgeführt.

7.2 Einfluss eines Gelbildners in W₂ auf die Mikrostruktur von W₁/O/W₂-Emulsionen

Wie bereits zuvor beschrieben, kann der Tropfenaufbruch stark vom Viskositätsverhältnis λ abhängen. Im Fall von Doppelemulsionen könnte daher das Andicken der kontinuierlichen W₂-Phase mit Stabilisatoren wie z.B. Hydrokolloiden den Aufbruch der W₁/O-Tropfen verbessern (siehe Kapitel 2.3.2). Darüber hinaus kann eine Viskositätserhöhung der kontinuierlichen Phase zu einem langsameren Ausfließen der Zwickelflüssigkeit zwischen den Tropfen führen, wodurch die Koaleszenzwahrscheinlichkeit und damit auch die Koaleszenzrate nach dem Tropfenaufbruch sinken. Demzufolge sollte es möglich sein, durch Zugabe eines Hydrokolloids wie Pektin zur kontinuierlichen W₂-Phase, sowohl den Tropfenaufbruch der W₁/O-Tropfen als auch deren Kurzzeitstabilisierung zu verbessern und damit die Mikrostruktur der Doppelemulsionen maßgeblich zu beeinflussen.

Um die zuvor getroffene Annahme gezielt zu untersuchen, wurden Doppelemulsionen mit einem äußeren Dispersphasenanteil φ_{WO} von 80 % sowohl mit als auch ohne standardisiertes Pektin in der W₂-Phase hergestellt. Die Versuche wurden exemplarisch mit einem kurz- und einem langkettigen Emulgator durchgeführt. Es wurden Gallensäure und Molkenproteinisolat gewählt, da sie in den vorab durchgeführten Untersuchungen unter gleichen Emulgierbedingungen zur jeweils besten Tropfenstabilisierung führten. Durch die Zugabe des Pektins wurde die Viskosität der kontinuierlichen Phase bei 50 °C unabhängig vom verwendeten Emulgator von 0,55 mPa*s auf mehr als 10 mPa*s erhöht (siehe Anhang, Kapitel 11.18). Die Viskosität der inneren W₁/O-Emulsion betrug 600 mPa*s (siehe Anhang, Kapitel 11.17). Eine Berechnung des Viskositätsverhältnisses $\lambda = \eta_d/\eta_e$ ist nur schwer möglich, da

7 Einstellung der Mikrostruktur der äußeren Emulsionen

die resultierenden $W_1/O/W_2$ -Emulsionen bei einem äußeren Dispersphasenanteil von 80 % viskoelastische Fließeigenschaften besitzen.

Die in Abb. 7-3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Zugabe von Pektin zur kontinuierlichen W_2 -Phase, unabhängig vom verwendeten Emulgator, zu Emulsionen mit kleineren W_1/O -Tropfen und, insbesondere im Fall des langkettigen Molkenproteinisolats, einer engeren Tropfengrößenverteilung führt. Dies bestätigt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass es möglich ist, durch die Zugabe eines Hydrokolloids die Mikrostruktur maßgeblich zu beeinflussen. Welchen Anteil eine Verbesserung der Kurzzeitstabilisierung bzw. des Tropfenaufbruchs daran hat, kann jedoch durch diese Versuche nicht endgültig geklärt werden. Sicherlich wird die Koaleszenzwahrscheinlichkeit durch die erhöhte Viskosität der kontinuierlichen Phase sinken. Das bedeutet, dass eine Verbesserung der Kurzzeitstabilisierung einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis hat. Zudem können die tropfenerkleinernden Kräfte durch die, im Vergleich zur dispersen W_1/O -Phase sehr niedrige Viskosität der pektinfreien kontinuierlichen Phase, schwer auf die disperse Phase übertragen werden. Die Zugabe des Pektins in die W_2 -Phase erhöht deren Viskosität und verbessert damit die Kraftübertragung und dadurch den Tropfenaufbruch.

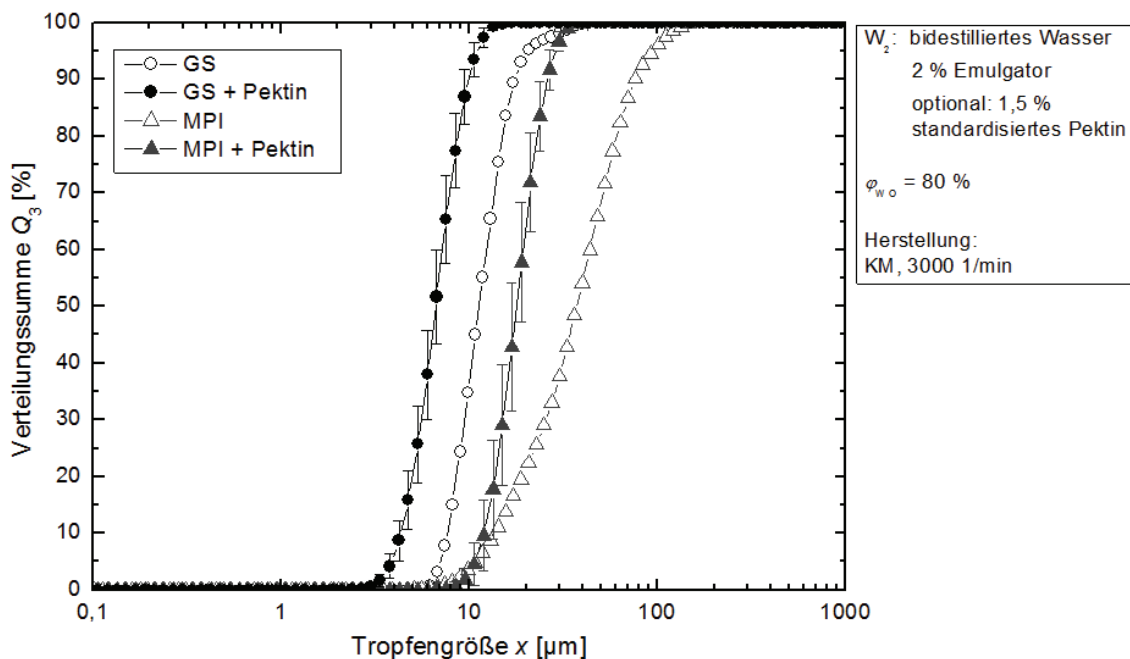


Abb. 7-3: Verteilungssumme $Q_3(x)$ der W_1/O -Tropfen von Doppelemulsionen stabilisiert mit einem langsamen (MPI) oder einem schnellen Emulgator (GS). Einstellung der Viskosität der kontinuierlichen Phase durch Zugabe von 0 % oder 1,5 % Pektin.

7.3 Einfluss des äußeren Dispersphasenanteils φ_{WO} auf die Mikrostruktur von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Tropfengrößenverteilung von Dopplemulsionen durch die Einstellung der Viskosität der W_2 -Phase gezielt verändert werden kann.

Da durch die Zugabe von Stabilisatoren wie Pektin zur W_2 -Phase außerdem die Sedimentationsgeschwindigkeit v_{st} und damit die Langzeitstabilität der Emulsionen erhöht werden kann (siehe Kapitel 2.1), wurden die folgenden Untersuchungen stets mit 1,5 % standardisiertem Pektin in der äußeren Wasserphase durchgeführt.

7.3 Einfluss des äußeren Dispersphasenanteils φ_{WO} auf die Mikrostruktur von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen

Der äußere Dispersphasenanteil φ_{WO} der Dopplemulsionen bestimmt, neben dem inneren Dispersphasenanteil φ , den Gesamtanteil an innerer Wasserphase und damit auch an eingeschlossenen bioaktiven Substanzen sowie den Fettgehalt der Emulsionen. Diese Parameter können daher nur frei variiert werden, wenn der äußere Dispersphasenanteil keinen signifikanten Einfluss auf die Emulsionsstruktur und -stabilität hat. Nach der in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Theorie ist aber anzunehmen, dass die Kollisionsfrequenz C und damit die Koaleszenzrate Ω auch bei $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit dem Dispersphasenanteil zunimmt.

Untersuchungen, bei denen der äußere Dispersphasenanteil φ_{WO} von 30 auf 80 % erhöht wurde, zeigten allerdings, dass die W_1/O -Tropfengröße mit steigendem Dispersphasenanteil, unabhängig vom verwendeten Emulgator, abnimmt. Hier wurden beispielhaft Gallensäure, Molkenproteinisolat sowie ein Protein-Polysaccharid-Konjugat eingesetzt (siehe Abb. 7-4).

Das kann auf die Energiedichte E_V beim Emulgieren zurückgeführt werden (siehe Kapitel 2.3.5). Beim Emulgieren in Rotor-Stator-Maschinen kann die Energiedichte u.a. durch Bestimmung der im Prozess anliegenden Leistung $P_{Prozess}$, der Leerlaufleistung der verwendeten Maschine $P_{Leerlauf}$ und dem Volumenstrom \dot{V} berechnet werden (Gleichung 7.1).

$$E_V = \bar{P}_V \cdot \bar{t}_V = \frac{P_{Prozess} - P_{Leerlauf}}{\dot{V}} \quad 7.1$$

Da bei den hier durchgeführten Versuchen stets dieselbe Kolloidmühle unter gleichen Emulgierbedingungen verwendet wurde, war $P_{Leerlauf}$ konstant. Allerdings wurde mit zunehmendem äußerem Dispersphasenanteil eine

7 Einstellung der Mikrostruktur der äußeren Emulsionen

steigende Leistung $P_{Prozess}$ gemessen. Des Weiteren war \dot{V} umso niedriger, je höher der Dispersphasenanteil war, was auf eine steigende Viskosität der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit zunehmendem Dispersphasenanteil zurückzuführen ist. Unter Berücksichtigung von Gleichung 7.1 ist ersichtlich, dass die beim Emulgieren eingetragene Energiedichte E_V mit dem Dispersphasenanteil zunimmt. Daher können die W_1/O -Tropfen bei höherem φ_{WO} effizienter aufgebrochen werden.

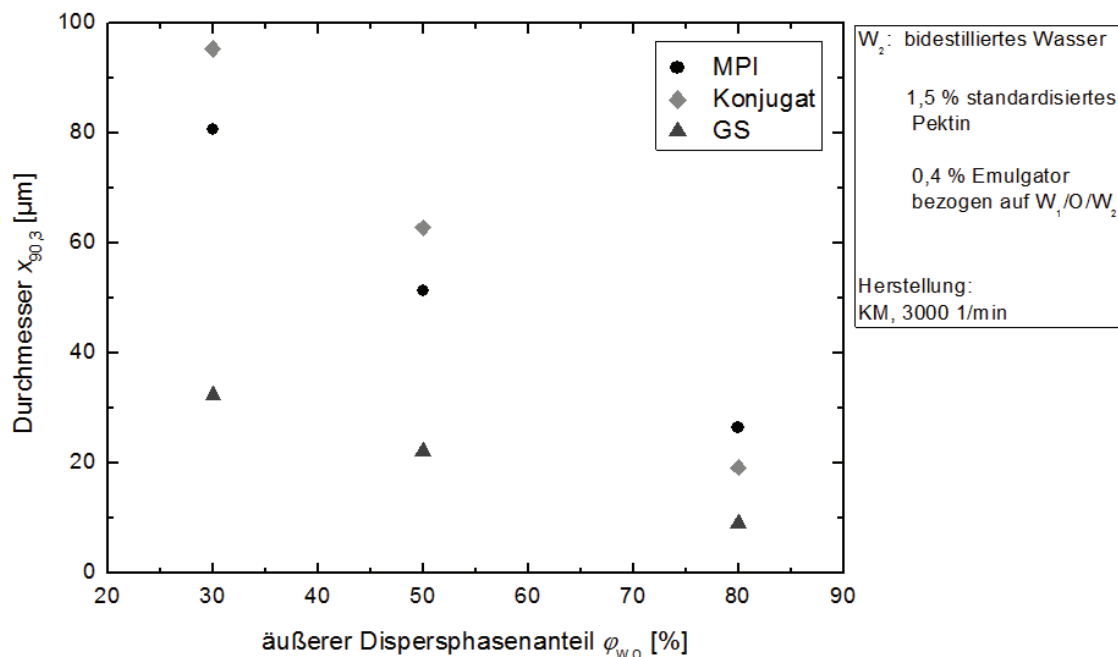


Abb. 7-4: Einfluss des Dispersphasenanteils auf den $x_{90,3}$ -Durchmesser von W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit verschiedenen Emulgatoren. HE-Anteil in W_1 : 0,5 %.

Darüber hinaus weisen die untersuchten Emulsionen auch bei $\varphi_{WO} = 80\%$ eine sehr enge Tropfengrößenverteilung auf. Die Ergebnisse sind in Abb. 7-5 exemplarisch für molkenproteinisolatstabilisierte Emulsionen dargestellt. Die Tropfengrößenverteilungen für Emulsionen mit Gallensäure und Protein-Polysaccharid-Konjugat verlaufen ähnlich (siehe Anhang, Kapitel 11.17).

7.3 Einfluss des äußeren Dispersphasenanteils φ_{WO} auf die Mikrostruktur von W1/O/W2-Emulsionen

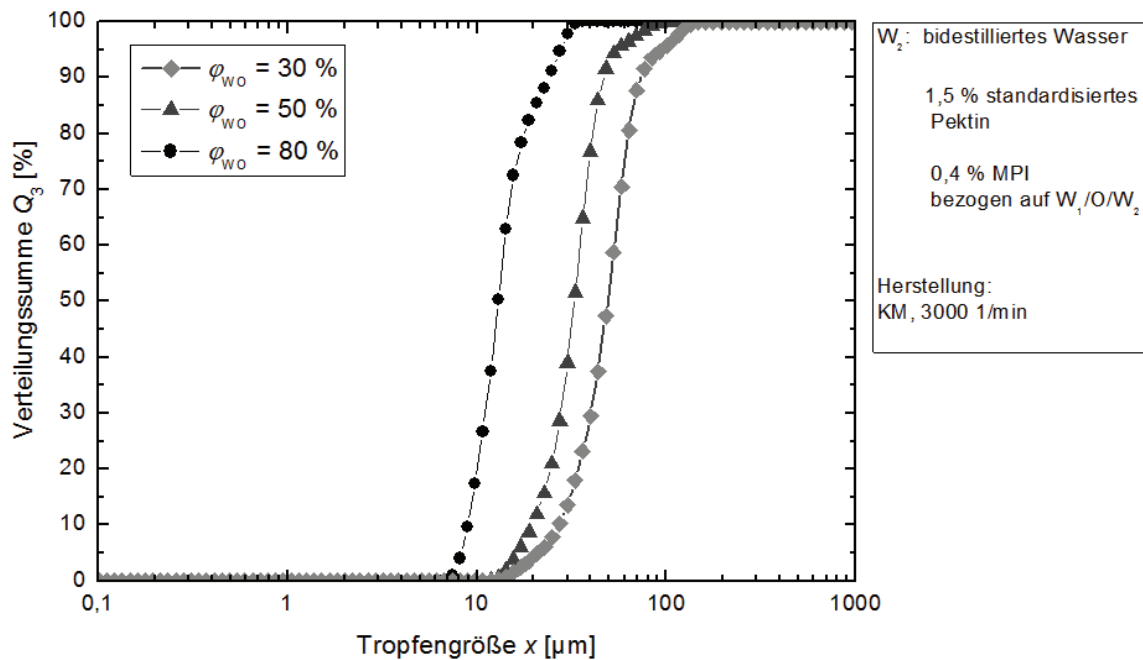


Abb. 7-5: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von MPI-stabilisierten Emulsionen.

Das heißt, die neu gebildeten Tropfen werden auch bei Dispersphasenanteilen φ_{WO} von bis zu 80 % ausreichend schnell gegen Koaleszenz stabilisiert. Daher ergibt sich ein weiterer Parameter zur gezielten Veränderung der Mikrostruktur der Doppelemulsionen. Je höher der äußere Dispersphasenanteil ist, umso mehr Energie wird beim Emulgieren eingetragen. Dies führt dazu, dass die W₁/O-Tropfengrößen umso kleiner sind, je höher φ_{WO} ist.

Hierbei ist aber stets abzuwägen, wie klein die W₁/O-Tropfen sein müssen und welcher Verlust innerer Wassertropfen an die umgebende W₂-Phase noch akzeptabel ist. Dies wird in Kapitel 8.2 noch weiter erörtert.

Ein Vergleich der Emulsionsstrukturen, die sich unter Verwendung unterschiedlicher hydrophiler Emulgatoren einstellen ließen (siehe Anhang, Kapitel 11.17), zeigt außerdem erneut den in Kapitel 7.1 diskutierten Einfluss der Belegungskinetik auf die Mikrostruktur der Doppelemulsionen. Unabhängig vom Dispersphasenanteil ergeben sich bei Verwendung der kurzkettigen Gallensäure Doppelemulsionen mit kleineren $x_{90,3}$ -Durchmessern als bei Verwendung der beiden langkettigen Emulgatoren Molkenproteinisolat und Polysaccharid-Protein-Konjugat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Veränderung des äußeren Dispersphasenanteils φ_{WO} auch immer einen Einfluss auf die Energiedichte E_V und damit auf die Tropfengrößenverteilung der Doppelemulsionen hat. Damit ergibt sich neben den in Kapitel 7.1 und 7.2 diskutierten Prozess- und

7 Einstellung der Mikrostruktur der äußeren Emulsionen

Rezepturparametern eine weitere Größe zur gezielten Veränderung der Mikrostruktur der Doppelemulsionen.

8 Stabilität von Doppemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

8.1 Lagerstabilität

Ein Faktor, der die kommerzielle Nutzung von Doppemulsionen entscheidend beeinflusst, ist deren Lagerstabilität. Prinzipiell ist davon auszugehen, dass die Koaleszenzrate während der Lagerung umso größer ist, je höher der Anteil an W_1/O -Tropfen in der Doppemulsion ist. Im Falle einer sterischen Stabilisierung ist zu erwarten, dass die Lagerstabilität der Doppemulsionen besser ist, wenn die W_1/O -Tropfen mit langkettigen hydrophilen Emulgatoren anstelle von kurzkettigen Emulgatoren stabilisiert werden (siehe Kapitel 2.1).

Zur Evaluierung der Lagerstabilität von Doppemulsionen wurde im Folgenden der $x_{90,3}$ -Wert der Tropfengrößenverteilungen ausgewertet, da er sensibel auf beginnende Koaleszenz und Aggregation reagiert [Schubert, 2005].

Untersuchungen zur Lagerstabilität von molkenproteinisolatstabilisierten Doppemulsionen mit einem Dispersphasenanteil von 30 bis 80 % zeigten im beobachteten Zeitraum keine signifikanten Veränderungen des $x_{90,3}$ -Durchmessers der W_1/O -Tropfen (siehe Abb. 8-1). Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C. Durch Kombination des Emulgators Molkenproteinisolat mit dem Stabilisator Pektin in der äußeren Wasserphase können daher auch Doppemulsionen mit einem äußeren Dispersphasenanteil von 80 % über einen Zeitraum von mindestens 3 Wochen ohne signifikante Veränderung der W_1/O -Tropfengröße stabilisiert werden.

Für Doppemulsionen, die mit dem kurzkettigen Emulgator Gallensäure und dem langkettigen Emulgator Protein-Polysaccharid-Konjugat stabilisiert waren, konnten im beobachteten Zeitraum, unabhängig vom äußeren Dispersphasenanteil, ebenfalls keine Strukturveränderungen oder Sedimentationseffekte nachgewiesen werden (siehe Anhang, Kapitel 11.20).

8 Stabilität von Dopplemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

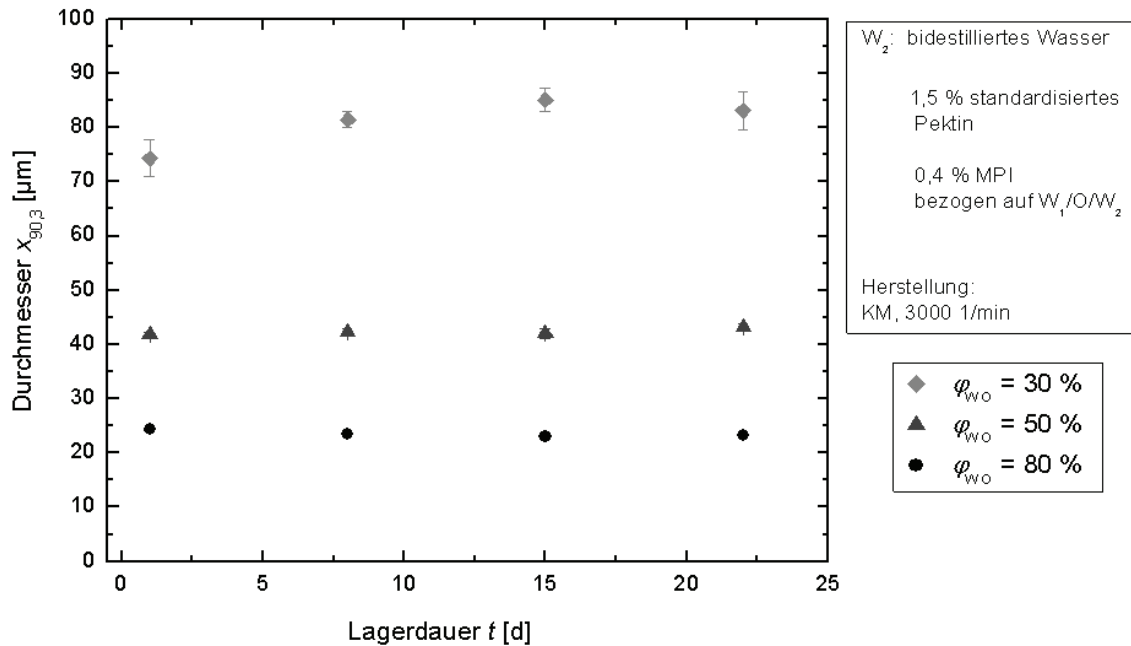


Abb. 8-1: Lagerstabilität der W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit MPI. Lagerung unter Lichtausschluss bei $T = 4\text{ °C}$. HE-Anteil in W_1 : 0,5 %.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die W_1/O -Tropfen im untersuchten Emulsionssystem mit einem Hydrokolloid wie Pektin in der W_2 -Phase sowohl mit kurzkettigen Emulgatoren wie Gallensäure als auch mit langkettigen Emulgatoren wie Molkenproteinisolat oder Polysaccharid-Protein-Konjugat effektiv über einen Mindestzeitraum von 3 Wochen stabilisiert werden können.

8.2 Freisetzung von Anthocyanen in wässrigen Systemen während der Formulierung und Lagerung

Eine (unerwünschte) Freisetzung der formulierten Anthocyane in die umgebende W_2 -Phase bzw. in ein hydrophiles Freisetzungsmedium nach dem Einbringen der Emulsionen in ein Lebensmittel erfolgt basierend auf den in Kapitel 2.1 beschriebenen Destabilisierungsmechanismen. Sie kann durch Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes, durch Anwendung von Druck oder Scherung, durch den Zusatz von Emulgatoren, Enzymen sowie durch osmotische Kräfte oder einfach nur durch die Zeit induziert werden [Pothakamury et al., 1995; Gouin, 2004; Weiß, 2006].

Kommt es zur Wirkstofffreisetzung durch Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase, ist davon auszugehen, dass die freigesetzte Menge einer Substanz nicht direkt mit der Größe der Übertragungsfläche korreliert. In diesem

8.2 Freisetzung von Anthocyanen in wässrigen Systemen während der Formulierung und Lagerung

Fall kommt es zu einer instantanen Freisetzung der im zerstörten Tropfen eingeschlossenen Bioaktivstoffe.

Die diffusive Freisetzung von in W_1 formulierten Substanzen in die umgebende W_2 -Phase bzw. in ein hydrophiles Freisetzungsmedium erfolgt über die W_1/O -Grenzfläche, über die Ölphase sowie die O/W_2 -Grenzfläche. Die O/W_2 -Grenzfläche wird im Folgenden auch als äußere Freisetzungsfäche bezeichnet. Sie setzt sich aus der Summe der Oberflächen aller W_1/O -Tropfen zusammen. Bei konstantem Volumen an innerer W_1/O -Emulsion ist die äußere Freisetzungsfäche umso größer, je kleiner die W_1/O -Tropfen sind. Sie entspricht der volumenspezifischen Oberfläche S_V , die direkt proportional zum reziproken Sauterdurchmesser $1/x_{1,2}$ ist [DIN ISO 9276-2, 2009]:

$$S_V = \frac{6}{x_{1,2}} \quad 8.1$$

Die freigesetzte Menge einer Substanz \dot{m} ist wiederum proportional zur Übertragungsfläche. Unter Berücksichtigung von Gleichung 8.1 gilt der folgende Zusammenhang [Baehr et al., 2010]:

$$\dot{m} \propto \frac{6}{x_{1,2}} \cdot |c - c_F| \quad 8.2$$

Hierbei steht c für die Konzentration der Substanz in den inneren Wassertropfen und c_F für die Konzentration im Freisetzungsmedium.

Nach Gleichung 8.2 ist davon auszugehen, dass eingeschlossene Wirkstoffe im Falle einer diffusiven Freisetzung umso schneller freigesetzt werden, je kleiner die W_1/O -Tropfen sind. Zudem wird angenommen, dass die langkettigen Emulgatoren (hier: Molkenproteinisolat und Protein-Polysaccharid-Konjugat) zu einem besseren Wirkstoffeinschluss führen als kurzkettige (hier: Gallensäure), da langkettige Emulgatoren dichtere Grenzflächenfilme ausbilden als kurzkettige (siehe Kapitel 2.1). Diese Grenzflächenfilme sollen sowohl die diffusive Freisetzung verlangsamen, als auch Koaleszenz der inneren Wassertropfen mit der umgebenden W_2 -Phase verhindern.

Ausgehend von diesen Hypothesen wurde die Freisetzung der formulierten Anthocyane aus $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit unterschiedlicher W_1/O -Tropfengröße untersucht. Die verschiedenen Tropfenrößen konnten durch Variation des Dispersphasenanteils von 30 bis 80 % eingestellt werden (siehe Kapitel 7.3). Die Freisetzung wird über den in Gleichung 3.2 (siehe Seite 71) definierten Freisetzungsfaktor F charakterisiert.

Obwohl die zur Abtrennung der W_2 -Phase verwendeten hydrophilen Filter auch als Vorfilter bei der HPLC-Analytik von Anthocyanen eingesetzt werden, wurde bei der Durchführung dieser Versuche beobachtet, dass ein Teil der entnommenen Anthocyane immer am hydrophilen Filtermedium adsorbierte. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist daher zu berücksichtigen, dass die gemessenen Werte keine Absolutwerte darstellen. Bei identischer Versuchsdurchführung können sie aber dennoch zum Vergleich der Freisetzung aus unterschiedlichen Doppemulsionssystemen herangezogen werden. Ausführliche Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten der eingesetzten Filter sind im Anhang, Kapitel 11.21 dargestellt.

Freisetzungsversuche mit Protein-Polysaccharid-Konjugat- (siehe Abb. 8-2) und gallensäurestabilisierten (siehe Abb. 8-3) Emulsionen zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen dem äußeren Dispersphasenanteil φ_{WO} bzw. der W_1/O -Tropfengröße und dem Freisetzungsfaktor F nach 30 Minuten Lagerung in bidestilliertem Wasser. Je höher φ_{WO} war und je kleiner die W_1/O -Tropfen waren, umso höher war der initiale Freisetzungsfaktor. Darüber hinaus weist die zeitliche Änderung des Freisetzungsfaktors dF/dt , die die Geschwindigkeit der Anthocyanfreisetzung beschreibt, unabhängig vom äußeren Dispersphasenanteil und damit der W_1/O -Tropfengröße, keine signifikanten Unterschiede auf.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der initialen Freisetzung ist, dass die durch die Beanspruchungen im Herstellungsprozess verursachte Freisetzung von Anthocyanen durch Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der W_2 -Phase vom äußeren Dispersphasenanteil φ_{WO} sowie der Energiedichte im Prozess abhängt. Es ist davon auszugehen, dass die Kollisionsfrequenz C und damit die Koaleszenzrate Ω der anthocyanbeladenen W_1 -Tropfen mit der W_2 -Phase umso höher ist, je höher φ_{WO} ist. Darüber hinaus sind im Prozess wirkende Beanspruchungen wie Scherkräfte, Dehnung und Turbulenz umso höher, je höher der Energieeintrag ist. Das bedeutet, dass die Freisetzung eingeschlossener W_1 -Tropfen durch Koaleszenz von inneren W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase umso höher ist, je höher die eingetragene Energie ist (siehe Kapitel 2.3). Daher sind die unterschiedlichen Freisetzungsfaktoren nach 30 Minuten vermutlich nicht direkt auf die Größe der äußeren Übertragungsfläche, sondern auf φ_{WO} sowie den damit in Verbindung stehenden Energieeintrag in der Kolloidmühle zurückzuführen.

In Anbetracht der Tatsache, dass dF/dt , unabhängig vom äußeren Dispersphasenanteil und damit der W_1/O -Tropfengröße ist, konnte die zuvor getroffene Hypothese, dass die Geschwindigkeit der Anthocyanfreisetzung im Freisetzungsmedium über die W_1/O -Tropfengröße gesteuert werden kann, für die untersuchten Emulsionssysteme nicht bestätigt werden.

8.2 Freisetzung von Anthocyanen in wässrigen Systemen während der Formulierung und Lagerung

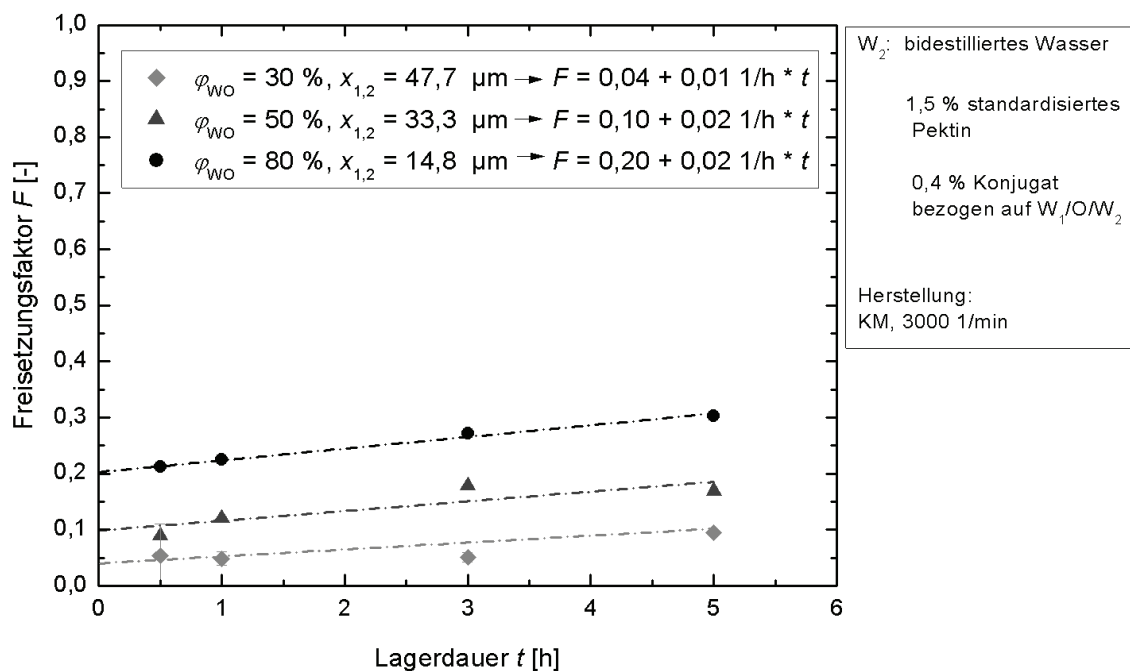


Abb. 8-2: Freisetzungsfaktor F für konjugatstabilisierte $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit unterschiedlichem äußerem Dispersphasenanteil $\varphi_{W_{O}}$ und damit unterschiedlicher Tropfengröße $x_{1,2}$. c_{HE} in W_1 : 0,5 %.

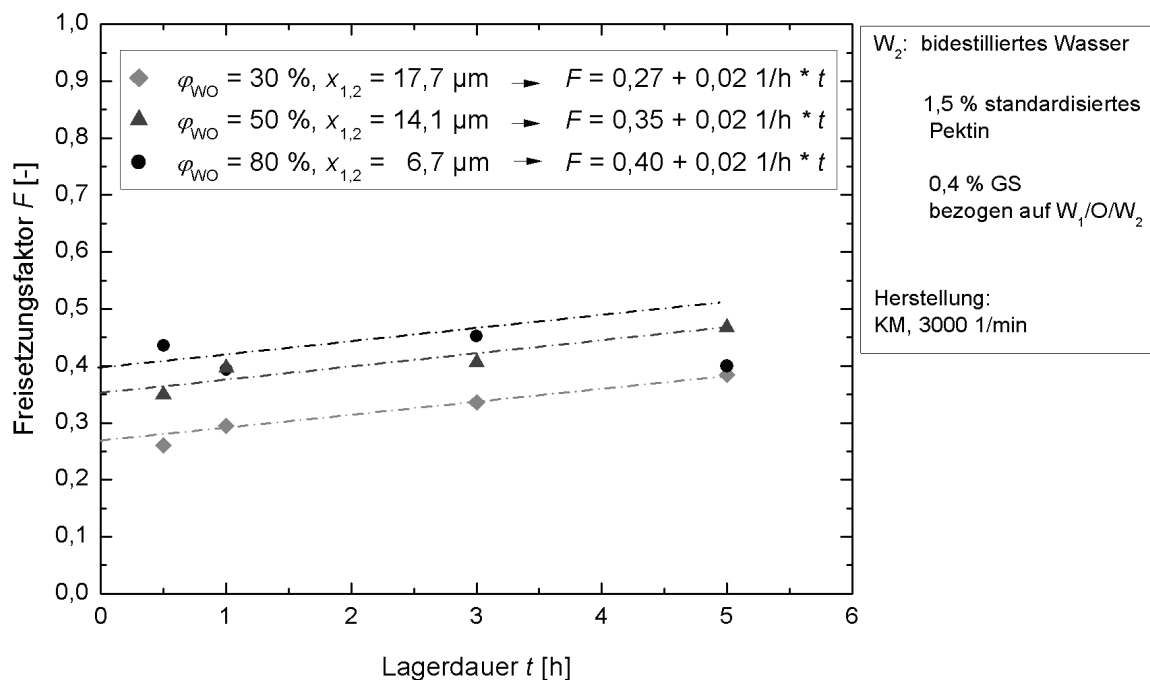


Abb. 8-3: Freisetzungsfaktor F für GS-stabilisierte $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit unterschiedlichem äußerem Dispersphasenanteil $\varphi_{W_{O}}$ und damit unterschiedlicher Tropfengröße $x_{1,2}$. c_{HE} in W_1 : 0,5 %.

8 Stabilität von Dopplemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

Auch bei molkenproteinisolatstabilisierten Emulsionen wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Tropfengröße und der zeitlichen Änderung des Freisetzungsfaktors dF/dt beobachtet (siehe Abb. 8-4). Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen auch kein direkter Zusammenhang zwischen φ_{W_1} und der nach 30 Minuten gemessenen Freisetzung beobachtet. Der Verlauf von $F(t)$ ist für Emulsionen mit 30 % und 80 % äußerem Dispersphasenanteil nahezu identisch. Für Emulsionen mit $\varphi_{W_1} = 50\%$ ist F etwa 4 Mal so hoch wie bei den Emulsionen mit 30 und 80 % äußerem Dispersphasenanteil. Es ist anzunehmen, dass die nach 30 Minuten gemessenen Freisetzungsfaktoren auch hier auf Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase zurückzuführen sind. Warum kein direkter Zusammenhang zwischen φ_{W_1} und F nach 30 Minuten beobachtet werden konnte, müssen weitere Versuche zum Erhalt der W_1 -Tropfen im Herstellungsprozess klären.

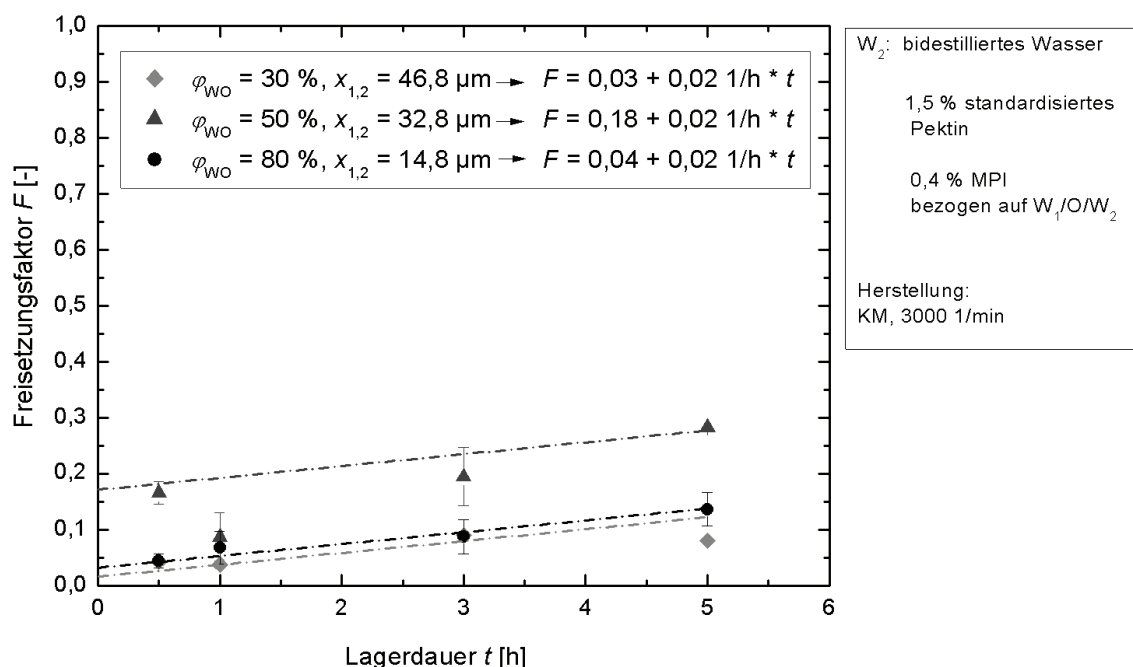


Abb. 8-4: Freisetzungsfaktor F für MPI-stabilisierte $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit unterschiedlichem äußerem Dispersphasenanteil und damit unterschiedlicher Tropfengröße. c_{HE} in W_1 : 0,5 %.

Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Einfluss der verwendete Emulgator auf die Freisetzung der Anthocyane hat. Hierfür wurden die Freisetzungsfaktoren von molkenproteinisolat-, konjugat- sowie gallensäurestabilisierten Emulsionen mit gleichem Dispersphasenanteil gegenübergestellt (siehe Abb. 8-5).

8.2 Freisetzung von Anthocyanen in wässrigen Systemen während der Formulierung und Lagerung

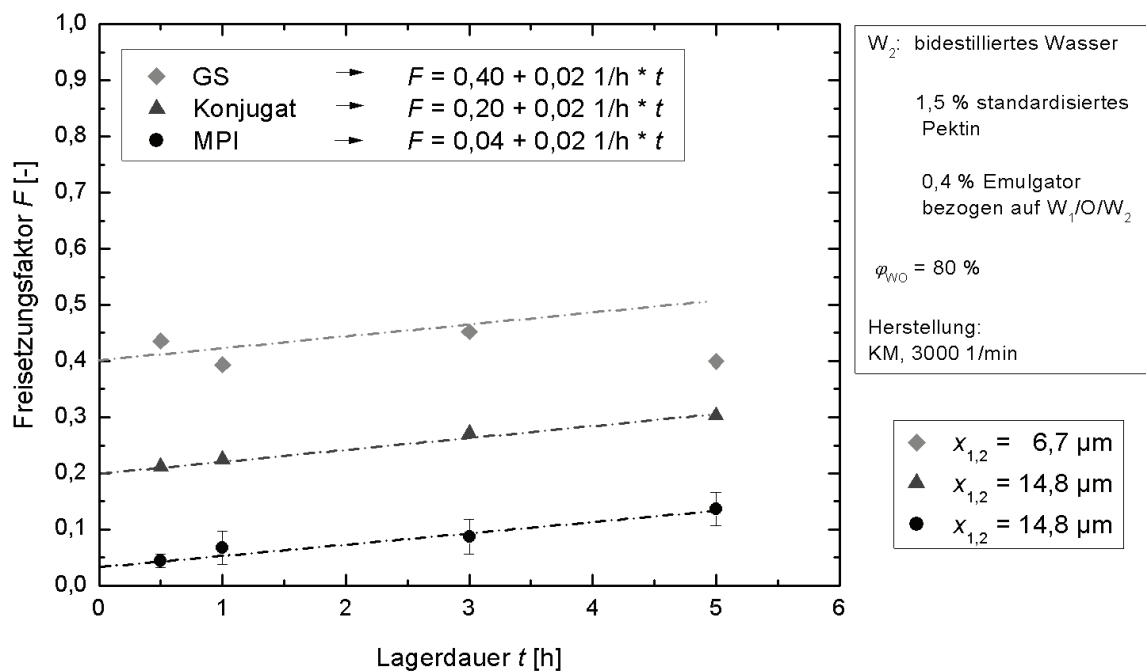


Abb. 8-5: Freisetzungsfaktor F für $W_1/O/W_2$ -Emulsionen, stabilisiert durch unterschiedliche Emulgatoren, aber mit gleichem äußerem Dispersphasenanteil φ_{WO} . c_{HE} in W_1 : 0,5 %.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Freisetzungsfaktor nach 30 Minuten für die molkenproteinisolatstabilisierten und konjugatstabilisierten Emulsionen niedriger ist als für gallensäurehaltige Emulsionen. Es wurde allerdings kein Einfluss des Emulgators auf die zeitliche Änderung des Freisetzungsfaktors dF/dt beobachtet. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die langkettigen Emulgatoren besser vor Koaleszenz zwischen den W_1 -Tropfen und der W_2 -Phase schützen.

Im Vergleich zu Proteinen sollen Konjugate laut Literatur eine zusätzliche viskoelastische Polysaccharidschicht um die Öltropfen bilden (siehe Kapitel 2.1). Dies soll die Einschlusseffizienz verkapselter Substanzen erhöhen. Dennoch wurde hier beobachtet, dass die zeitliche Freisetzung dF/dt aus Protein-Polysaccharid-Konjugat-stabilisierten Emulsionen ebenso schnell abläuft wie aus molkenproteinisolat- oder gallensäurestabilisierten. Der Freisetzungsfaktor nach 30 Minuten war bei konjugatstabilisierten Emulsionen sogar höher als bei molkenproteinisolatstabilisierten. Das kann möglicherweise auf die Eigenschaften der Proteine oder Polysaccharide zurückgeführt werden, aus denen das Konjugat hergestellt wurde. So spielt zum Beispiel die Größe der Polysaccharidmoleküle eine entscheidende Rolle. In der Literatur wird berichtet, dass Dextrane mit Molekülmassen über 150000 g/mol keine weitere Verbesserung der Emulsionsstabilität bewirken. Als Ursache vermuten die Autoren eine unvollständige Sättigung der O/W-Grenzfläche mit den an die

Dextrane gekoppelten Proteinen. Der Grund hierfür soll die hohe Dextranmolekülmasse und der damit verbundene große hydratisierte Dextranmolekülradius sein [Nagasawa et al., 1996; Dunlap et al., 2005]. Außerdem werden die Konjugateigenschaften entscheidend durch die Temperatur während der Inkubation, die Inkubationsdauer und das Protein-Polysaccharid-Mengenverhältnis beeinflusst. Für jede Protein-Polysaccharid-Kombination werden unterschiedliche Reaktionsbedingungen vorgeschlagen, die in [Knoth et al., 2007] zusammengefasst sind. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wäre es möglich, dass die Reaktion zwischen Protein und Polysaccharid für die in dieser Arbeit verwendeten Rohstoffe nicht optimal abgelaufen ist. Es ist auch denkbar, dass eine Kombination aus Lacprodan und Dextran in einem anderen Mischungsverhältnis zu Konjugaten mit besseren Einschlusseigenschaften führt. Zudem könnten die großen Molekülradien des verwendeten Dextran 500 zur Ausbildung eines Grenzflächenfilms führen, der weniger dicht ist als der Grenzflächenfilm der molkenproteinisolatstabilisierten Emulsionen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die im Beobachtungszeitraum freigesetzte Anthocyanmenge relativ hoch ist. Bereits während der Herstellung, Lagerung und der ersten halben Stunde im Freisetzungsmedium wurden zum Teil bis zu 35 % der eingeschlossenen Anthocyane freigesetzt. Der Freisetzungsfaktor war umso größer, je höher der Dispersphasenanteil war. Außerdem wiesen die langkettigen Proteine bessere Einschlusseigenschaften auf als die kurzkettige Gallensäure. Bei molkenproteinisolatstabilisierten Doppelemulsionen wurde selbst bei einem äußeren Dispersphasenanteil von 80 % ein anfänglicher Freisetzungsfaktor von nur 4 % gemessen. Das ist vermutlich damit zu erklären, dass es insbesondere bei Verwendung kurzkettiger Emulgatoren bereits im Emulgierprozess zu verstärkter Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der W_2 -Phase kommt. Darüber hinaus nimmt die Koaleszenz bei unzureichend stabilisierten Tropfen mit steigendem Dispersphasenanteil zu. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums wurden dann zum Teil bis zu 50 % der eingeschlossenen Anthocyane freigesetzt. Das ist unter anderem damit zu erklären, dass als Freisetzungsmedium demineralisiertes Wasser verwendet wurde. Da in der W_1 -Phase aber osmotisch aktive Substanzen enthalten sind, kommt es durch den osmotischen Gradienten zwischen der W_1 -Phase und dem Freisetzungsmedium zu einer osmotisch bedingten Freisetzung. Beim Einbringen der Emulsionen in Lebensmittel ist zu erwarten, dass die Freisetzung während der Lagerung durch Anpassung der osmotischen Verhältnisse, z.B. durch Zugabe von Elektrolyten zum Lebensmittel, verzögert werden kann. Die diffusive Freisetzung der eingeschlossenen Anthocyane kann außerdem über die Ölphase gesteuert werden. Denkbar wäre zum Beispiel eine Erhöhung der Diffusionsbarriere durch Verwendung hochschmelzender Fette (siehe Kapitel 2.1, Seite 13).

8.3 Stabilität der Doppelemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die wichtigsten Einflussparameter auf die Freisetzungskinetik die W_1/O -Tropfengröße in Verbindung mit dem äußeren Dispersphasenanteil und der eingetragenen Energiedichte sind. Kleinere Tropfen, die für Emulsionen mit einem höheren Dispersphasenanteil bei höheren Energiedichten hergestellt werden, führen zu verstärkter Koaleszenz zwischen den W_1 -Tropfen und der umgebenden W_2 -Phase und damit zu einer schnelleren Anthocyanfreisetzung bereits im Prozess. Langkettige Emulgatoren bilden eine effektivere Freisetzungsbarrriere gegen die beobachtete initiale Freisetzung als kurzkettige. Die anschließend beobachtete zeitliche Freisetzung dF/dt hingegen ist unabhängig vom Dispersphasenanteil, der Tropfengröße oder der Art des hydrophilen Emulgators.

Um eine möglichst geringe Freisetzung der eingeschlossenen Bioaktivstoffe zu gewährleisten, müssen daher Doppelemulsionen mit möglichst großen W_1/O -Tropfen hergestellt werden, die im zweiten Emulgierschritt mit langkettigen Emulgatoren wie zum Beispiel Molkenproteinisolat oder Polysaccharid-Protein-Konjugat stabilisiert werden.

8.3 Stabilität der Doppelemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt

Die zuvor beschriebenen Freisetzungsversuche in wässrigem Medium konnten einen direkten Zusammenhang zwischen den verwendeten Emulgatoren und der Freisetzung eingeschlossener Anthocyane zu Beginn der Untersuchungen aufzeigen. Als Ursache wurde eine unterschiedliche Stabilität der Grenzflächenfilme gegen Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase während der Emulsionsherstellung und anschließenden Lagerung diskutiert. Daher ist davon auszugehen, dass durch Verwendung unterschiedlicher Emulgatoren auch die Freisetzung der anthocyanhaltigen W_1 -Tropfen im Gastrointestinaltrakt gezielt beeinflusst werden kann.

8.3.1 Stabilität der Doppelemulsionen im Gastrointestinaltrakt

Einfluss des Emulgatortyps und der Verdauungsenzyme

Zur Untersuchung der Stabilität der Doppelemulsionen im Gastrointestinaltrakt wurden $W_1/O/W_2$ -Emulsionen, stabilisiert mit Gallensäure, Molkenproteinisolat oder Konjugat, mit einem äußeren Dispersphasenanteil φ_{WO} von 80 % *in vitro* Verdauungsversuchen unterzogen. Die hohen äußeren Dispersphasenanteile wurden gewählt, um einen möglichst hohen Anthocyan Gehalt der

Doppemulsionen zu erreichen. Die Versuche wurden einmal mit und einmal ohne die Verdauungsenzyme Pepsin und Pankreatin durchgeführt, um explizit den Effekt der Verdauungsenzyme während der Inkubation unter gastrointestinalen Bedingungen zu untersuchen.

Da Molkenproteinisolat bei den in Kapitel 8.2 dargestellten Freisetzungsversuchen im Vergleich zu Gallensäure und Protein-Polysaccharid-Konjugat die besten Einschlusseigenschaften gezeigt hat (siehe Abb. 8-5), wurden Untersuchungen zum Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Stabilität der Emulsionen im Gastrointestinaltrakt mit molkenproteinisolatstabilisierten Emulsionen durchgeführt. Hierfür wurden molkenproteinisolatstabilisierte Emulsionen mit $\varphi_{WO} = 30$ bis 80 % im *in vitro* Verdauungsmodell mit Enzymen inkubiert.

Die mit Gallensäure stabilisierten Doppemulsionen waren bereits während der Inkubation unter Magenbedingungen instabil. Der Grobgutanteil an W_1/O -Tropfen nahm, sowohl bei den Inkubationen mit als auch ohne Pepsin, stark zu. Während der darauffolgenden fünfständigen Inkubation unter Darmbedingungen nahmen die Tropfengrößen allerdings wieder ab (siehe Abb. 8-6). Das ist damit zu erklären, dass Gallensäure im Magensaft instabil ist und Flocken bildet. Versuche, bei denen nur Gallensäure in den simulierten Magensaft zugegeben wurde, konnten dies bestätigen. Daher kann Gallensäure die W_1/O -Tropfen unter diesen Bedingungen nicht stabilisieren. Es kommt zu Flockung und Koaleszenz, was zu Veränderungen in der Emulsionsstruktur führt. Da Gallensäuren aber auch Bestandteil des menschlichen Darmsaftes sind, werden während der Darminkubation weitere Gallensäuren zugegeben. Aufgrund der Rührbewegung im Versuch, kann dies zu einem erneuten Emulgieren der zuvor koaleszierten W_1/O -Tropfen führen bzw. zu einem Auflösen der Flocken. Das würde die kleineren Tropfen nach der Inkubation unter Darmbedingungen erklären. Zudem weisen die Tropfengrößenverteilungen der Doppemulsionen, die mit Enzymen inkubiert wurden, einen größeren Feingutanteil auf als die Tropfengrößenverteilungen der Doppemulsionen, die ohne Enzyme inkubiert wurden. Daher ist davon auszugehen, dass hier der enzymatische Triglyceridabbau zu einer Reduzierung der Tropfengröße führt.

Darüber hinaus zeigen die Bilder der FPIA-Analysen, dass die Tropfen nach 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen keine W_1 -Tropfen mehr enthalten, wenn Enzyme zum Verdauungssaft hinzugegeben wurden. Ohne Enzyme kommt es hier zu keiner sichtbaren Veränderung des Füllgrades der Öltropfen. Aufgrund der zuvor erwähnten Flockenbildung der Emulsionen im simulierten Magensaft konnten die gallensäurestabilisierten Emulsionen nach der Inkubation im simulierten Magensaft nicht mit dem FPIA analysiert werden. Daher sind

8.3 Stabilität der Doppelemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt

Aussagen zum Füllgrad der Tropfen nach der Inkubation unter Magenbedingungen nicht möglich.

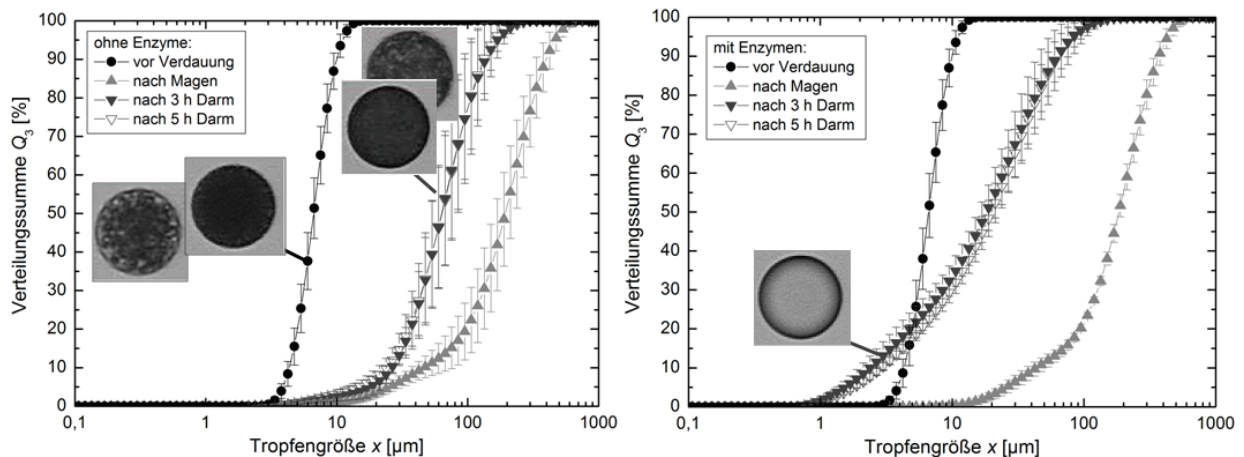


Abb. 8-6: Verteilungssumme Q_3 von W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit GS, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Links: ohne Enzyme. Rechts: mit Enzymen. Bilder: Mikroskopische Bilder der Doppelemulsionen, aufgenommen mit dem FPIA. Umgebende Phase: äußere W_2 -Phase. Große Tropfen: Öltropfen. Kleine, schwarze Tropfen: innere W_1 -Tropfen.

Im Gegensatz zu den gallensäurestabilisierten Doppelemulsionen waren molkenproteinisolatstabilisierte W_1/O -Tropfen während der Inkubation unter Magenbedingungen sowohl mit als auch ohne Enzyme stabil. Nach 1 Stunde Inkubation unter Magenbedingungen konnte keine Veränderung der Verteilungssumme beobachtet werden (siehe Abb. 8-7). Zudem zeigten die FPIA-Analysen, dass nach der Inkubation unter Magenbedingungen noch zahlreiche Wassertropfen in den Öltropfen enthalten sind. Erst nach weiteren 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen konnte eine Veränderung der Verteilungssumme der W_1/O -Tropfen beobachtet werden. Der Grobgutanteil hatte zugenommen. Außerdem ist ein Anteil an Tropfen entstanden, die kleiner sind, als die in der Ausgangsemulsion enthaltenen Tropfen. Bei der Inkubation unter Darmbedingungen mit Enzymen kam es außerdem zu einer Freisetzung der eingeschlossenen W_1 -Tropfen, was an den ungefüllten Öltropfen in den Bildern der FPIA-Analyse zu erkennen ist.

8 Stabilität von Doppemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

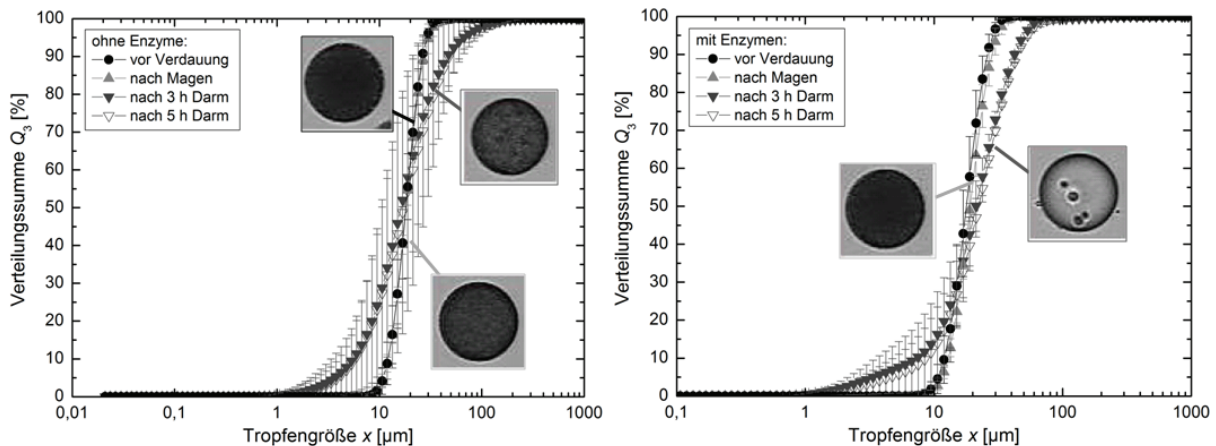


Abb. 8-7: Verteilungssumme Q_3 von (W_1/O)-Tropfen, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Links: ohne Enzyme. Rechts: mit Enzymen. Bilder: Mikroskopische Bilder der Doppemulsionen, aufgenommen mit dem FPIA. Umgebende Phase: äußere W_2 -Phase. Große Tropfen: Öltropfen. Kleine, schwarze Tropfen: innere W_1 -Tropfen.

Ergebnisse zur *in vitro* Verdauung von konjugatstabilisierten Doppemulsionen zeigen, dass es hier bereits im Magensaft zu einer Veränderung der Mikrostruktur kommt. Der Grobgutanteil nimmt sowohl im System mit Enzymen, als auch im System ohne Enzyme während der simulierten Magenpassage zu. Dies kann vermutlich auf Aggregatbildung der Tropfen im Magensaft zurückgeführt werden. Es ist denkbar, dass Proteinmoleküle aufgrund der in Kapitel 8.2 diskutierten sterischen Hinderung durch die Polysaccharidketten nicht an der Grenzfläche adsorbiert sind oder dass die langen Polysaccharidketten unter den veränderten Umgebungsbedingungen im Magen Polymerbrücken ausbilden, wodurch es zu „bridging flocculation“ kommt.

Nach der Inkubation unter Darmbedingungen ohne Enzyme ist auch hier wieder eine Abnahme des Grobgutanteils zu beobachten. Bei der Inkubation mit Enzymen, nimmt der Grobgutanteil nicht ab. Hier wurden aber wieder W_1/O -Tropfen gemessen, die kleiner sind als die Tropfen in der Doppemulsion vor der Verdauung. Darüber hinaus zeigen die FPIA-Bilder, dass die Öltropfen nach der Inkubation unter Magenbedingungen noch mit W_1 -Tropfen gefüllt sind. Erst während der Inkubation unter Darmbedingungen mit Enzymen kam es zu einer Freisetzung der eingeschlossenen W_1 -Tropfen. Bei Inkubation in enzymfreiem simuliertem Magen- sowie Darmsaft kann mit dem FPIA wiederum keine Freisetzung eingeschlossener W_1 -Tropfen beobachtet werden.

8.3 Stabilität der Doppelemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt

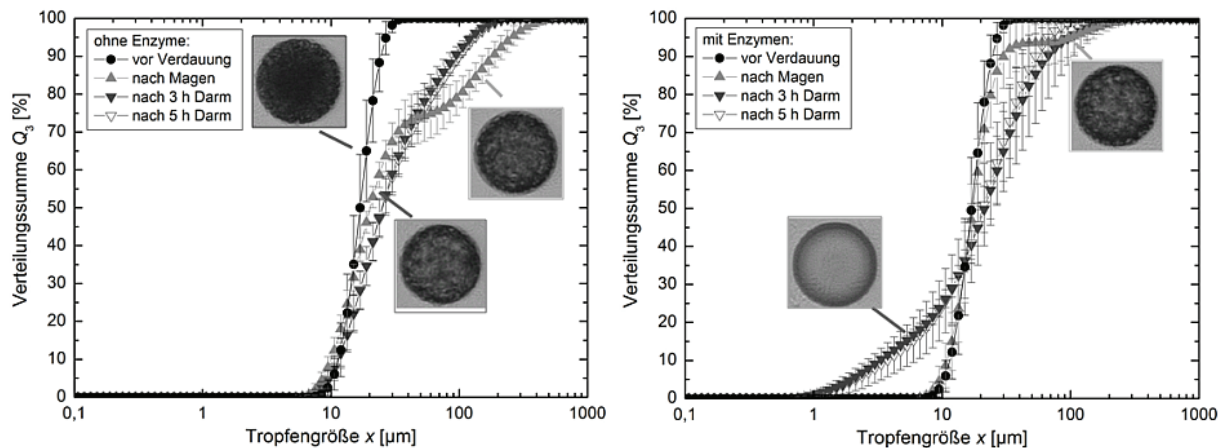


Abb. 8-8: Verteilungssumme Q_3 von (W_1/O)-Tropfen, stabilisiert mit Konjugat, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Links: ohne Enzyme. Rechts: mit Enzymen. Bilder: Mikroskopische Bilder der Doppelemulsionen, aufgenommen mit dem FPIA. Umgebende Phase: äußere W_2 -Phase. Große Tropfen: Öltropfen. Kleine, schwarze Tropfen: innere W_1 -Tropfen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Wahl des Emulgators die Stabilität der Doppelemulsionen im Gastrointestinaltrakt entscheidend beeinflusst. Unter Verwendung von Gallensäure wurde bereits während der Inkubation im Magensaft eine Veränderung der Emulsionsstruktur beobachtet. Bei Verwendung von Molkenproteinisolat hingegen kam es erst während der Inkubation unter Darmbedingungen zu den ersten strukturellen Veränderungen der Emulsionen. Zudem zeigten die in Kapitel 8.2 dargestellten Ergebnisse, dass Molkenproteinisolat die W_1 -Tropfen besser gegen Koaleszenz mit der W_2 -Phase stabilisieren kann als Gallensäure oder Protein-Polysaccharid-Konjugat. Daher ist davon auszugehen, dass molkenproteinisolatstabilisierte Emulsionen am besten geeignet sind, um eine maximale Menge an Anthocyanen stabil in den Darm zu transportieren. Im simulierten Darmsaft kommt es dann unter Anwesenheit von Enzymen, unabhängig vom Emulgator, zur Freisetzung der W_1 -Tropfen und damit auch der verkapselten Anthocyane.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum es bei der Inkubation unter Darmbedingungen unabhängig vom Emulgator nur mit Enzymen zu einer vollständigen Freisetzung der W_1 -Tropfen kommt. Darüber hinaus bleibt zu klären, wie die Freisetzung der W_1 -Tropfen erfolgt.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass Enzyme für die Freisetzung der W_1 -Tropfen notwendig sind, ist eine Freisetzung bedingt durch den osmotischen Gradienten zwischen den inneren Wassertropfen und dem Umgebungsmedium. Es ist denkbar, dass sich die Osmolarität des Freisetzungsmediums durch Zugabe der Enzyme signifikant verändert.

8 Stabilität von Doppemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde die Osmolarität der Freisetzungsm Medien mit und ohne Enzyme bestimmt.

Tab. 8-1: Osmolarität der Freisetzungsm Medien.

Medium	pH	Osmolarität
Magenelektrolyt	2,02	137
Magenelektrolyt + Pepsin	2,03	150
Magenelektrolyt + Darnelektrolyt +	8,09	248
Magenelektrolyt + Pepsin + Darnelektrolyt + Gallensäure + Pankreatin	8,13	245

Die Ergebnisse, die in Tab. 8-1 zusammengefasst sind, zeigen allerdings, dass die Enzymzugabe nur einen marginalen Einfluss auf die Osmolarität der Freisetzungsm Medien hat. Darüber hinaus nimmt der W_1/O -Tropfendurchmesser für Doppemulsionen mit einem inneren Dispersphasenanteil von $\varphi = 30\%$ bei kompletter Freisetzung der W_1 -Tropfen nur um etwa 11% ab. Die hier untersuchten Emulsionssysteme weisen aber nach der Inkubation unter Darmbedingungen Öltropfen auf, deren Tropfengröße zum Teil um mehr als 90% abnahm. Zudem kommt es gleichzeitig zu einem Anwachsen des Grobgutanteils mit Tropfen im Bereich des fünf- bis achtfachen des ursprünglichen Tropfendurchmessers. Diese Strukturänderungen können durch eine rein osmotische Freisetzung nicht erklärt werden. Sie müssen auf Koaleszenz oder Flockung in Kombination mit einem enzymatisch bedingten Abbau von Triglyceriden beruhen.

Da es durch die Enzyme im Verdauungsprozess zu einer Verdrängung der Emulgatormoleküle von der Grenzfläche kommen kann, ist es denkbar, dass die auf diese Weise destabilisierten Öltropfen koaleszieren (siehe Kapitel 2.7) [Mun et al., 2007]. Dies kann eine Erklärung für die Zunahme des Grobgutanteils während der Inkubation unter Darmbedingungen sein. Gleichzeitig ist es möglich, dass es während der Koaleszenz der Öltropfen auch zu einer verstärkten Koaleszenz der W_1 - mit der W_2 -Phase kommt, was eine Erklärung für die Freisetzung der inneren Wasserphase während der Inkubation unter Darmbedingungen wäre. Die Zugabe von Gallensäuren zum simulierten Darmsaft und die durch den Rührer eingetragene mechanische Energie während des *in vitro* Verdauungsversuchs könnten zudem erklären, warum die Tropfengröße während der Inkubation unter Darmbedingungen auch abnimmt. Des Weiteren führt der enzymatische Abbau der im Öl enthaltenen Triglyceride zu einer Abnahme der Tropfengröße.

8.3 Stabilität der Doppemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt

Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der Verteilungssumme von grobdispersen Emulsionen alleine durch die Rührbewegung im Magen-Darm-Modell (siehe Kapitel 3.2.12) in Kombination mit der emulgierenden Wirkung von Gallensäure initiiert werden kann, wurden molkenproteinisolatstabilisierte Rohemulsionen mit den Verdauungsmedien, aber ohne Enzyme, mit einem Paddelrührer (6 Rührblätter, Durchmesser 50 mm) bei einer konstanten Drehzahl von 280 1/min vermischt. Die in Abb. 8-9 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die W_1/O -Tropfengröße durch die Rührbewegung nach Zugabe der Darmelektrolyte und der Gallensäure stark reduziert wird. Die Verteilungssumme weist nach 3 Stunden Inkubation im enzymfreien Darmsaft Tropfen auf, deren Durchmesser seit der Inkubation im enzymfreien Magensaft um bis zu 90 % kleiner wurden. Allerdings weisen die kleinsten gemessenen Tropfen einen Durchmesser von etwa 10 μm auf. Da während der Inkubation der Emulsionen unter Darmbedingungen aber auch Tropfen mit Durchmessern um 1 μm gebildet wurden, stellt der Energieeintrag im Versuch keine ausreichende Erklärung für das beobachtete Phänomen dar.

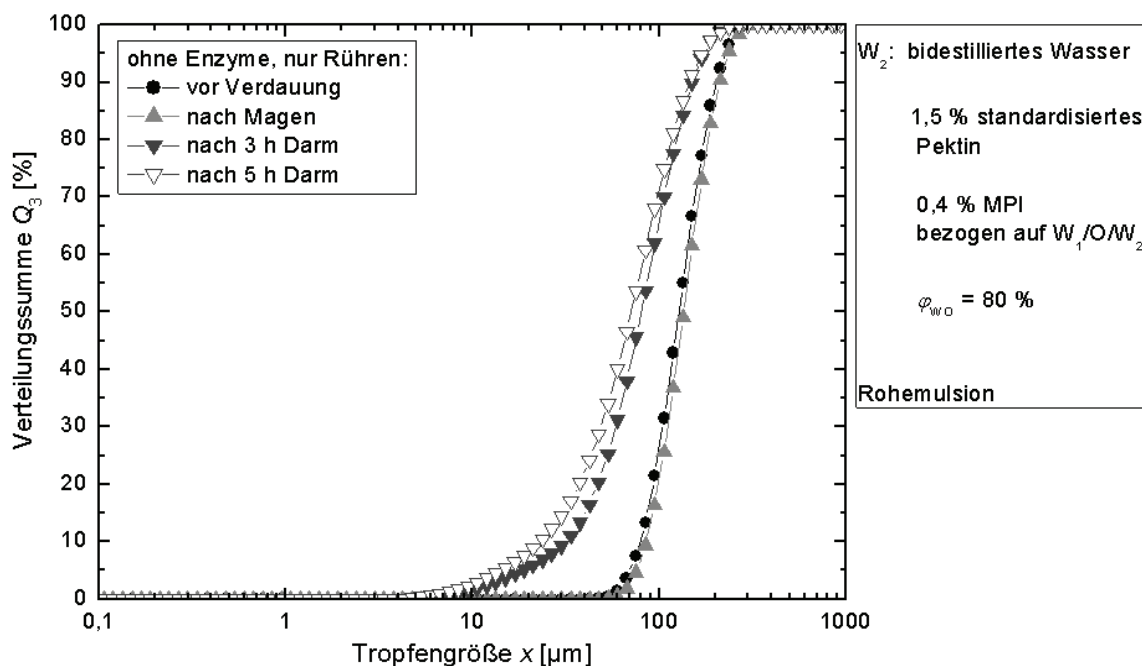


Abb. 8-9: Verteilungssumme Q_3 von W_1/O -Rohemulsionstropfen einer $W_1/O/W_2$ -Voremulsion, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Inkubation ohne Enzyme, unter Rühren mit einem Paddelrührer (6 Rührblätter, Durchmesser 50 mm) bei einer konstanten Drehzahl von 280 1/min.

Darüber hinaus wurden die gleichen Rohemulsionen im Verdauungsmedium mit Enzymen inkubiert, allerdings ohne mechanischen Energieeintrag (siehe Abb.

8 Stabilität von Dopplemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

8-10). Hierbei wurde beobachtet, dass durch die Zugabe der Darmelektrolyte, des Pankreatins sowie der Gallensäuren auch Tropfen mit einem Durchmesser von 1 μm gebildet werden. Es ist denkbar, dass es hier zu einem enzymatischen Abbau der Triglyceride und damit zu einer Reduzierung der Tropfendurchmesser kam. Dies muss aber in zukünftigen Versuchen durch Bestimmung der Triglyceridzusammensetzung vor und nach der *in vitro* Verdauung näher untersucht werden.

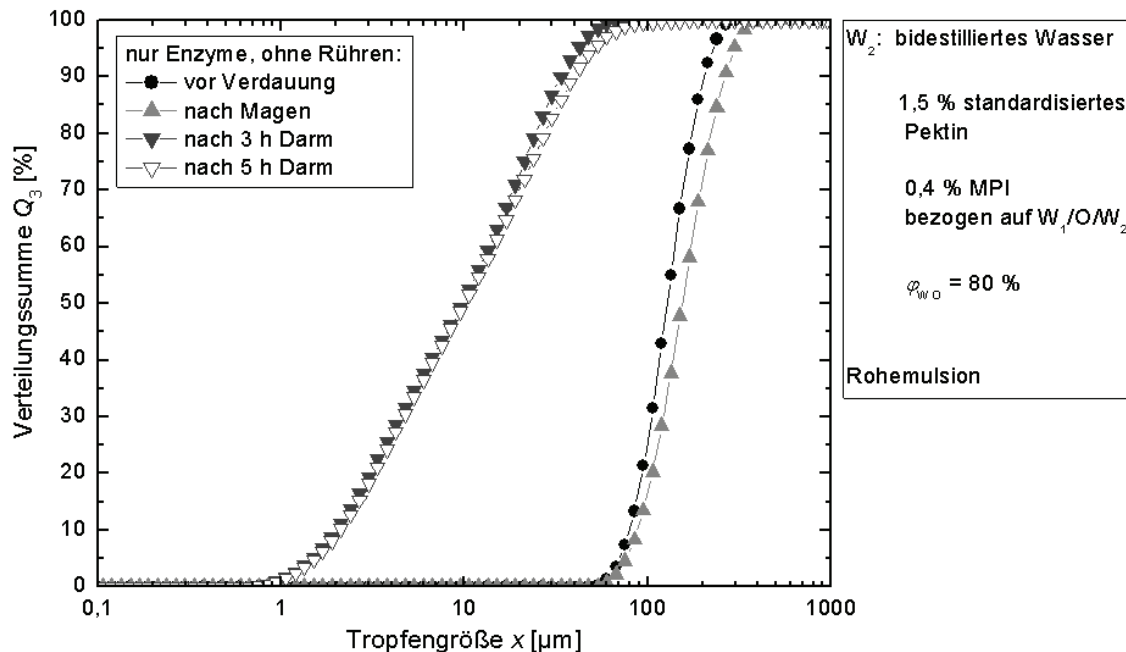


Abb. 8-10: Verteilungssumme Q_3 von (W_1/O)-Rohemulsionstropfen einer $W_1/O/W_2$ -Voremulsion, $\varphi_{WO} = 80 \%$, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Ohne mechanischen Energieeintrag.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist es möglich, dass die Kombination aus Gallensäure, Verdauungsenzymen und mechanischem Energieeintrag während des Verdauungsversuchs zu einem Wiederemulgieren bereits koaleszierter Öltröpfen führen kann. Diese wiederemulgierten Tropfen enthalten dann vermutlich weniger bzw. keine inneren Wassertropfen mehr. Darüber hinaus kann es während der enzymatischen Inkubation unter Magen-Darm-Bedingungen zu einem Abbau von Triglyceriden und damit zu einer Reduzierung der Öltröpfengröße kommen.

Allerdings bleibt die Frage offen, warum es ohne Enzyme zwar zu einer Änderung der Emulsionsstruktur kommt, aber nicht zu einer vollständigen Freisetzung der W_1 -Tropfen. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Emulgatormoleküle ohne Enzyme nicht von der Grenzfläche verdrängt werden

8.3 Stabilität der Doppemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt

[Mun et al., 2007]. Es ist daher davon auszugehen, dass der stabilisierend wirkende viskoelastische Grenzflächenfilm noch intakt ist, weshalb es zu weniger Koaleszenzvorgängen zwischen den Öltröpfen sowie den W_1 -Tropfen und der W_2 -Phase kommt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stabilität der Emulsionen im Gastrointestinaltrakt durch geschickte Wahl des Emulgatorsystems beeinflusst werden kann. So kam es zum Beispiel unter Verwendung der kurzkettigen Gallensäure bereits während der Inkubation unter Magenbedingungen zu einer Veränderung der Tropfengrößenverteilung. Doppemulsionen, stabilisiert mit langkettigen Emulgatoren wie Molkenproteinisolat zeigten hingegen unter simulierten Magenbedingungen keine Veränderung der Emulsionsstruktur. Daher ist davon auszugehen, dass langkettige Emulgatoren wie Molkenproteinisolat am besten geeignet sind, um eine maximale Menge an Anthocyanen stabil in den Darm zu transportieren. Die unter Anwesenheit von Enzymen beobachtete Freisetzung der W_1 -Tropfen im Gastrointestinaltrakt konnte überwiegend auf Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase zurückgeführt werden.

Einfluss des Dispersphasenanteils

Bei der gastrointestinalen Inkubation von molkenproteinisolatstabilisierten Doppemulsionen mit einem Dispersphasenanteil von 30 bis 50 % zeigte sich, dass diese Emulsionen, genauso wie molkenproteinisolatstabilisierte Doppemulsionen mit $\varphi_{WO} = 80 \%$, im Magen stabil sind. Erst im Darm konnten Änderungen in der Verteilungssumme beobachtet werden. Dies ist in Abb. 8-11 beispielhaft für $\varphi_{WO} = 30 \%$ dargestellt.

8 Stabilität von Doppalemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

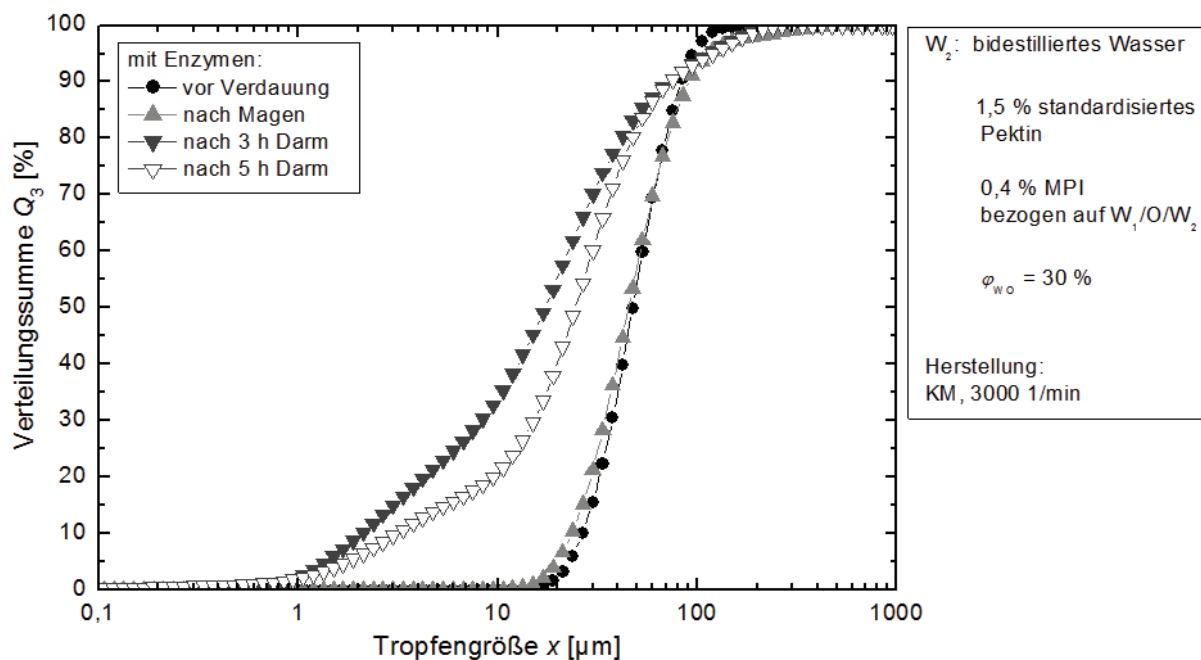


Abb. 8-11: Verteilungssumme Q₃ von W₁/O-Tropfen, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation im Magenmilieu, nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation in intestinalem Milieu.

Abb. 8-12 zeigt einen Vergleich der Verteilungssummen von Doppalemulsionen mit einem äußeren Dispersphasenanteil φ_{wO} von 30 und 80 % vor und nach der Inkubation unter Magen-Darm-Bedingungen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verteilungssummen nach der Inkubation in simuliertem Darmsaft, unabhängig von der ursprünglichen Tropfengrößenverteilung tendenziell ähnlich verlaufen. Das unterstützt die zuvor getroffene Schlussfolgerung, dass die Tropfen während der Inkubation unter Darmbedingungen zunächst koaleszieren, weil der Emulgator durch die Verdauungsenzyme von der Grenzfläche verdrängt wird. Anschließend werden die koaleszierten Tropfen durch die Gallensäure, die Enzyme und den durch die Verdauungsapparatur eingetragenen mechanischen Energieeintrag wieder emulgiert. Darüber hinaus führt ein enzymatisch bedingter Triglyceridabbau zu einer Abnahme der Öltropfengröße. Dass sich nach dem Darm für alle Emulsionen ähnliche Strukturen einstellen, ist damit zu erklären, dass die Emulgierbedingungen im *in vitro* Verdauungsversuch, d.h. der mechanische Energieeintrag sowie die Konzentration an Enzymen und zugefügter Gallensäure, stets konstant waren.

8.3 Stabilität der Dopplemulsionen und Anthocyanfreisetzung im Gastrointestinaltrakt

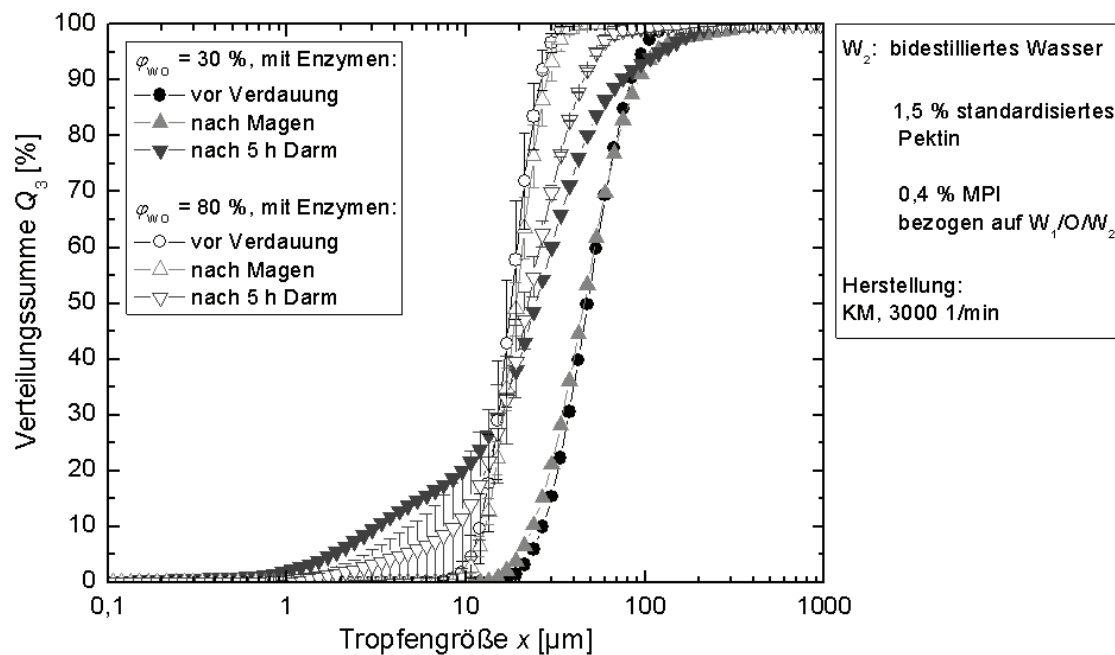


Abb. 8-12: Einfluss des äußeren Dispersphasenanteils φ_{WO} auf die Mikrostruktur MPI-stablierter W_1/O -Tropfen vor und nach der Verdauung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der äußere Dispersphasenanteil keinen Einfluss auf die gastrointestinale Stabilität von Dopplemulsionen hat, die mit langkettigen Emulgatoren wie Molkenproteinisolat stabilisiert werden. Unabhängig von φ_{WO} kam es erst im Darm zu einer signifikanten Änderung in der Emulsionsstruktur.

8.3.2 Aufnahme der Anthocyane im Gastrointestinaltrakt

Neben der Stabilität der Emulsionsstrukturen im Gastrointestinaltrakt wurde die Anthocyanfreisetzung aus $W_1/O/W_2$ -Emulsionen während der *in vitro* Verdauungsversuche bzw. deren Aufnahme in den menschlichen Körper untersucht. Hierfür wurden die Emulsionen während der Inkubation in simulierten Darmsaft durch einen Dialyseschlauch mit einer Porengröße von 1000 Dalton gepumpt. Auf der gegenüberliegenden Membranseite befand sich als Freisetzungsmedium physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Hierdurch sollte die Anthocyanaufnahme über die menschliche Darmwand, die in diesem Fall dem Dialyseschlauch entspricht, in vereinfachter Weise nachgestellt werden.

Abb. 8-13 zeigt die Absorption der nach Bonerz et al. (2006) aufbereiteten Proben in Abhängigkeit der Inkubationszeit im simulierten Darmsaft. Je höher die gemessene Absorption ist, umso höher ist die im Freisetzungsmedium enthaltene Anthocyanmenge.

8 Stabilität von Doppemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

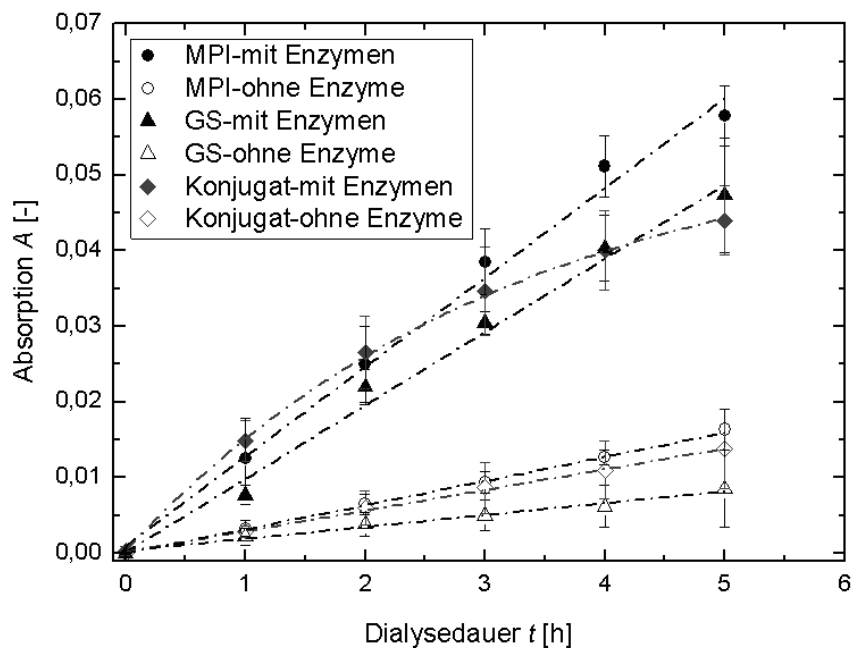


Abb. 8-13: Absorption der nach Bonerz et al. (2006) aufbereiteten Proben in Abhängigkeit der intestinalen Inkubationszeit (=Dialysedauer).

Die Ergebnisse zeigen, dass während der enzymfreien Inkubation weniger Anthocyane freigesetzt wurden als während der Inkubation mit Enzymen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Anthocyanfreisetzung durch die enzymatisch bedingten Strukturveränderungen beschleunigt wird.

Aufgrund der vielen Aufreinigungs- und Verdünnungsschritte, die während der gastrointestinalen Verdauungsversuche notwendig sind, ist keine quantitative Aussage bezüglich des Einflusses des verwendeten Emulgators auf die freigesetzte Anthocyanmenge möglich. Dennoch stellen die Ergebnisse eine gute Basis dar, um die Freisetzung aus unterschiedlichen Emulsionssystemen qualitativ zu vergleichen.

Die tatsächlich aufgenommenen Anthocyanmengen müssen in zukünftigen Versuchen, z.B. durch Charakterisierung der freigesetzten Anthocyane mittels HPLC näher bestimmt werden. Mit Hinblick auf die biologische Aktivität der Moleküle muss außerdem die chemische Zusammensetzung der Anthocyanmoleküle nach der Freisetzung ermittelt werden.

8.4 Chemopräventive Wirkung der heidelbeerextrakthaltigen Doppalemulsionen

Um zu untersuchen, inwieweit die krebspräventive Wirkung des in dieser Arbeit verwendeten Heidelbeerextraktes durch die Formulierung in Doppalemulsionen beeinflusst wird, wurden die chemopräventive Wirkung von reinen Heidelbeerextraktlösungen sowie von extrakthaltigen Doppalemulsionen an humanen Kolonkarzinomzellen untersucht.

Wie bereits im Kapitel 3.2.14 erwähnt, wurden diese Arbeiten im Rahmen des Clustervorhabens „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ von Christopher Kropat als Teil seiner Dissertation am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien, durchgeführt und ausgewertet.

8.4.1 Modulation der EGFR-Phosphorylierung

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR von Epidermal Growth Factor Receptor) ist ein zellwachstumsstimulierendes Protein, das beim Menschen in allen Zellarten vorkommt. In verschiedenen Tumorarten ist der EGFR hochreguliert und/oder in mutierter Form aufzufinden. Infolge dieser hochregulierten und mutierten Rezeptoren kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum der betroffenen Zellen und schließlich zur Ausbildung eines Tumors kommen. Daher sind neue Krebstherapien darauf ausgelegt, das EGFR-Signal zu hemmen und dadurch das Tumorstadium zu unterdrücken. Um zu untersuchen, ob eine potente Hemmung der Rezeptoraktivität im intakten Zellsystem in Form einer Hemmung der Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors zum Tragen kommt, wurde der Western Blot Assay angewandt [Teller et al., 2009].

Unverkapseltes Heidelbeerextrakt

In Abb. 8-14 sind die Ergebnisse des Western Blot Assays des unverkapselten Heidelbeerextraktes dargestellt. pEGFR steht hier für den phosphorylierten EGF-Rezeptor, der die Wachstumssignale weitergibt. Das unverkapselte Heidelbeerextrakt verminderte nach Inkubation über 45 Minuten konzentrationsabhängig den Phosphorylierungsstatus des EGFR in HT29-Zellen (graue Balken). Die Hemmung der Aktivität des Rezeptors wurde dabei über eine verminderte Phosphorylierung intrazellulärer Tyrosinreste am Rezeptor ersichtlich. Ab einer Konzentration von 100 µg/ml konnte die Aktivität um 50 % gegenüber der Kontrolle (1 % Dimethylsulfoxid DMSO) gehemmt werden. In der höchsten eingesetzten Konzentration von 200 µg/ml zeigte sich dabei eine

8 Stabilität von Doppalemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

Hemmung der Phosphorylierung um ca. 70 % gegenüber der Kontrolle (1 % DMSO). Die Gesamtaktivität des Rezeptors (schwarze Balken) wurde dabei durch die Inkubation mit dem Heidelbeerextrakt nicht signifikant beeinflusst.

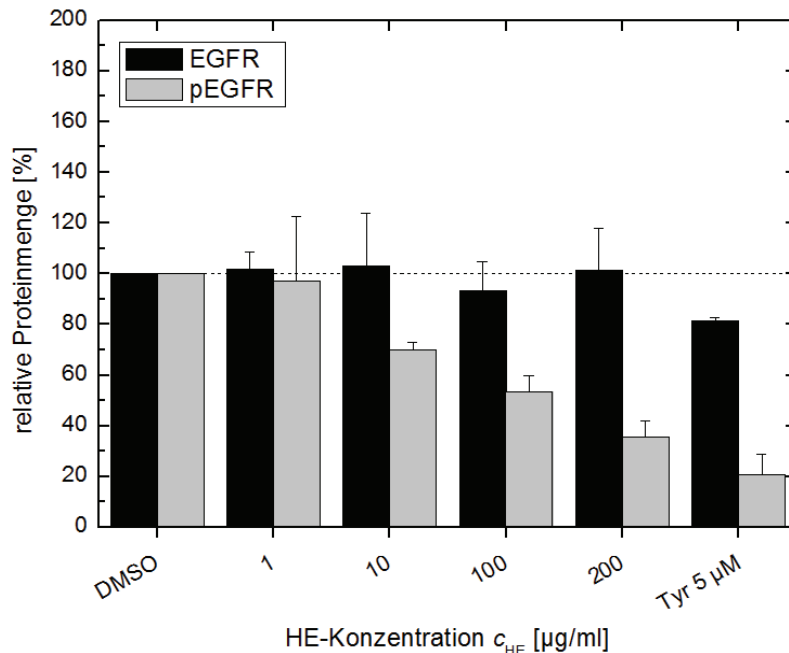


Abb. 8-14: Modulation der EGF-Rezeptorphosphorylierung (Western Blot Analyse) durch das unverkapselte HE nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. HT29-Zellen wurden serumfrei mit unterschiedlichen Konzentrationen an HE und 100 U/ml Katalase inkubiert.

Heidelbeerextraktbeladene Doppalemulsionen

Eine heidelbeerextraktbeladene Doppalemulsion wurde in nichtaufgeschlossenem Zustand hinsichtlich ihrer EGFR-hemmenden Wirkung im Western Blot Assay untersucht. Um die Emulsionsmenge bei ansteigender Extraktkonzentration in allen Versuchsansätzen konstant zu halten, wurde das Volumen der heidelbeerextraktbeladenen Emulsion mit unbeladener Referenzemulsion ausgeglichen. Als Positivkontrolle wurde unverkapselter Extrakt in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ (ohne Referenzemulsion) mitgeführt. Bei den Versuchen mit den heidelbeerextraktbeladenen Doppalemulsionen konnte, im Gegensatz zu den Versuchen mit dem unverkapselten Extrakt, keine Unterdrückung der EGFR-Aktivität beobachtet werden (siehe Abb. 8-15). Auch ein Einfluss auf die Gesamtmenge des Rezeptors (schwarze Balken) wurde nicht detektiert. Bei der Positivkontrolle wurde die Rezeptoraktivität im selben Maße reduziert wie in der vorangegangenen Untersuchung.

8.4 Chemopräventive Wirkung der heidelbeerextrakthaltigen Doppalemulsionen

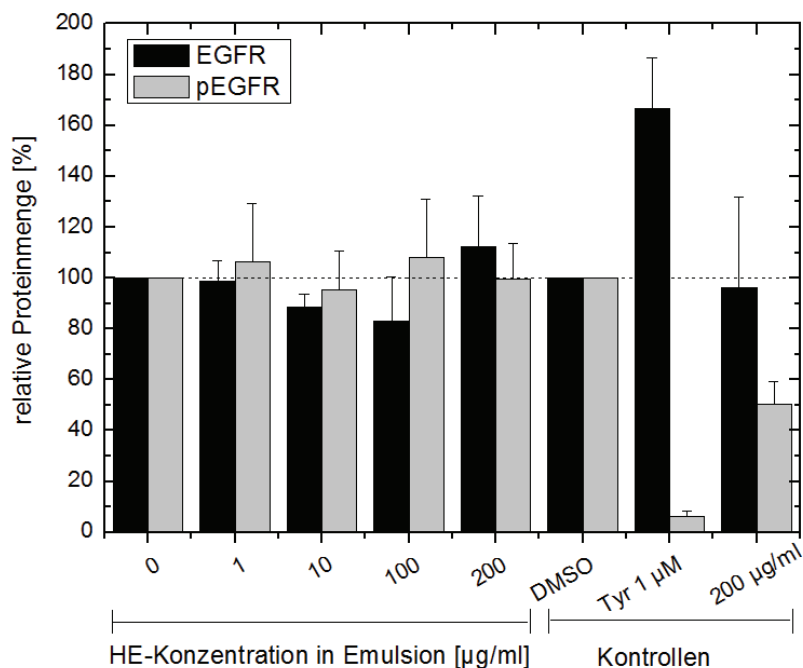


Abb. 8-15: Modulation der EGF-Rezeptorphosphorylierung (Western Blot Analyse) durch den HE aus der W/O/W-Doppalemulsion nach 45 min Inkubation. HT29-Zellen wurden serumfrei mit unterschiedlichen Konzentrationen an HE und 100 U/ml Katalase inkubiert.

Mittels dieser Untersuchungen konnte somit keine biologische Wirkung des in Doppalemulsionen verkapselten Heidelbeerextraktes hinsichtlich der EGFR-Aktivität beobachtet werden.

Da die Freisetzung des Extraktes aufgrund des Lipidanteils der Emulsion nicht mittels HPLC untersucht werden konnte, können die Gründe für dieses Verhalten nicht mit Sicherheit beschrieben werden. Vermutlich ist der Extrakt in der Doppalemulsion so gut verkapselt, dass er nicht, oder nur sehr langsam freigesetzt wird, so dass während der kurzen Inkubationszeit von 45 Minuten keine Interaktion zwischen Heidelbeerextraktbestandteilen und dem EGF-Rezeptor stattfindet. Da in diesem Zellkulturmodell keine fettabbauenden Prozesse wie vergleichsweise im Darm stattfinden, wird die *in vivo* Situation nur bedingt widerspiegelt. Das Ausbleiben der Bioaktivität kann in diesem Fall nicht mit der physiologischen Situation im humanen Dünndarm bzw. Kolon korrelieren.

Eine weitere Ursache für das Ausbleiben des biologischen Effekts könnte allerdings auch der Abbau von für die Rezeptorinhibierung verantwortlichen Inhaltsstoffen während der Lagerung der Emulsion darstellen.

8.4.2 Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen

Neben den Versuchen zur Modulation der EGFR-Phosphorylierung, die Effekte nach einer Inkubation von nur 45 Minuten aufzuzeigen, wurde die durch das Extrakt induzierte Wachstumshemmung humaner Kolonkarzinomzellen mittels Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) untersucht [Kern et al., 2007].

Unverkapseltes Heidelbeerextrakt

Durch das unverkapselte Heidelbeerextrakt konnte nach 72 Stunden Inkubation das Zellwachstum der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 konzentrationsabhängig verringert werden (siehe Abb. 8-16). Das relative Zellwachstum wurde aus dem Quotienten des Probenwertes (T) zum Kontrollwert (C) gebildet. Zur Bestimmung des Kontrollwertes wurde 1 %-ige DMSO-Lösung verwendet. Die Konzentration, bei der 50 % Inhibierung beobachtet wurden, lag für das Heidelbeerextrakt bei $333 \pm 29 \mu\text{g/ml}$.

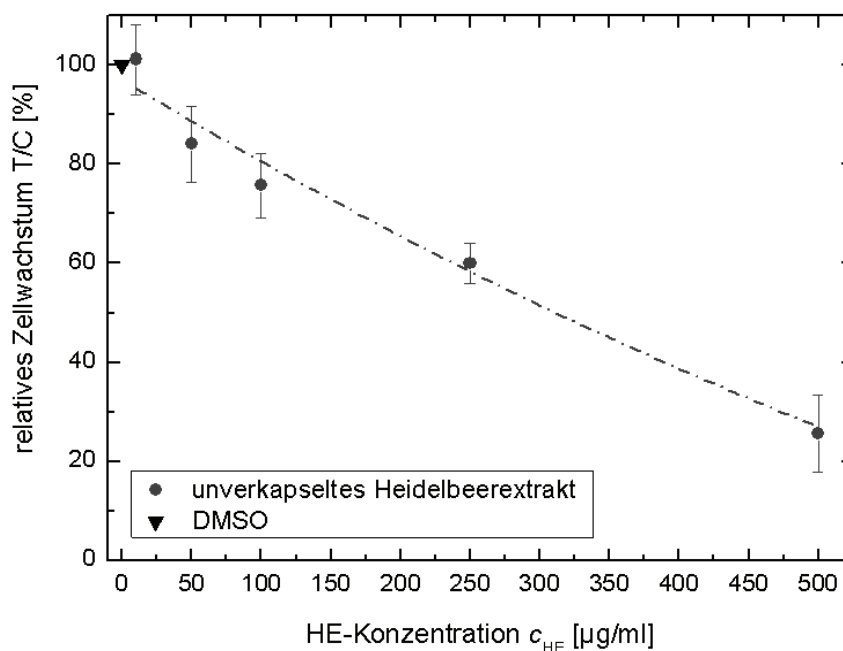


Abb. 8-16: Modulation des Zellwachstums nach 72 h Inkubation mit unverkapseltem Heidelbeerextrakt.

Heidelbeerextraktbeladene Doppalemulsion

Zur Untersuchung der Wirkung heidelbeerextraktbeladener Doppalemulsionen wurde zunächst die Wirkung einer Referenzemulsion ohne Heidelbeerextrakt auf das Zellwachstum untersucht. Hierdurch sollten Effekte aufgezeigt werden, die durch das Hüllmaterial selbst verursacht werden. Abb. 8-17 zeigt, dass die

8.4 Chemopräventive Wirkung der heidelbeerextrakt haltigen Doppalemulsionen

Referenzemulsion, eingesetzt in aufsteigender Konzentration von 0,5 bis 10 % im Zellkulturmedium, eine marginale Wirkung auf das Zellwachstum hat.

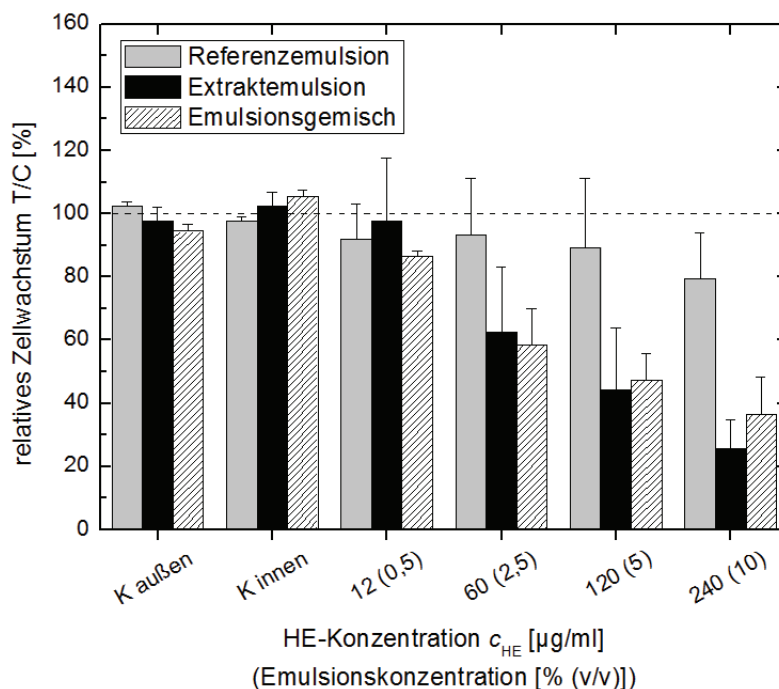


Abb. 8-17: Modulation des Zellwachstums nach 72 h Inkubation mit einer HE-beladenen W/O/W-Doppalemulsion.

Die heidelbeerextraktbeladenen Doppalemulsionen wurden in zwei verschiedenen Ansätzen inkubiert. Zum einen wurden heidelbeerextraktbeladene Doppalemulsionen in Konzentrationen von 0,5 bis 10 % (v/v) im Zellmedium inkubiert (Extraktemulsion). Zum anderen wurden die extrakt haltigen Doppalemulsionen mit unbeladenen Doppalemulsionen vermischt, um den eingebrachten Extraktanteil bei einem gleichbleibenden Emulsionsanteil zu variieren (Emulsionsgemische). Auf diese Weise wurden Emulsionsgemische mit Heidelbeerextraktkonzentrationen von 12 bis 240 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Anschließend wurden die Emulsionsgemische in einem Verhältnis von 1:9 mit dem Zellkulturmedium vermischt und inkubiert. In diesem Fall ändert sich also nur die Heidelbeerextraktkonzentration, nicht jedoch der Emulsionsanteil. Sowohl die Ansätze mit den Extraktemulsionen als auch die Ansätze mit den Emulsionsgemischen zeigten nach 72 Stunden Inkubation eine vergleichbare Unterdrückung des Zellwachstums um 70 % gegenüber der Kontrolle. Diese Abnahme ist eindeutig auf den Extraktanteil der Emulsion und nicht auf das Hüllmaterial zurückzuführen, da beim Ausgleich mit unbeladener Emulsion (siehe Versuche mit Emulsionsgemischen) keine signifikanten Änderungen zu beobachten waren.

8 Stabilität von Doppelemulsionen und Freisetzung eingeschlossener Anthocyane

Diese Ergebnisse zeigen, dass das in Doppelemulsionen verkapselte Extrakt eine ebenso hohe biologische Aktivität bzgl. der Wachstumshemmung humaner Kolonkarzinomzellen aufweist wie das unverkapselte Extrakt. Das heißt, durch die Herstellung, Lagerung sowie den Transport der Proben wurde die biologische Aktivität nicht negativ beeinflusst.

Daher ist auch davon auszugehen, dass das Ausbleiben der Bioaktivität in Kapitel 8.4.1 (Modulation der EGF-Rezeptoren) nicht auf den Abbau von für die Rezeptorinhibierung verantwortlichen Inhaltsstoffen während Produktion und Lagerung der Emulsionen zurückzuführen ist, sondern darauf, dass die Extraktbestandteile nicht, oder nur sehr langsam, freigesetzt werden. In diesem Fall können während der kurzen Inkubationszeit von 45 Minuten keine Interaktion zwischen Heidelbeerextraktbestandteilen und dem EGF-Rezeptor stattfinden. Um dennoch konkrete Aussagen zur Rezeptorinhibierung anthocyanhaltiger Doppelemulsionen treffen zu können, sollten die hier durchgeführten Versuche an Doppelemulsionen wiederholt werden, die zuvor in einem *in vitro* Verdauungsmodell inkubiert wurden. Da die Doppelemulsionen durch die Verdauungsmedien aufgeschlossen und eingeschlossene Wirkstoffe freigesetzt würden, ist zu erwarten, dass in diesem Fall auftretende Interaktionen zwischen den Heidelbeerextraktbestandteilen und dem EGF-Rezeptor messbar sind.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Anthocyanhaltige Lebensmittel weisen ein hohes antioxidatives, antikanzerogenes sowie immunstimulierendes Potential auf. Daher gewinnen sie in der Lebensmittelindustrie, insbesondere in den Bereichen funktionelle Lebensmittel oder Nahrungsergänzungsmittel, zunehmend an Bedeutung. Ohne geeignete Schutzmaßnahmen gelingt es aber oftmals nicht, aus Pflanzenzellen isolierte oder chemisch synthetisierte Anthocyanmoleküle im Lebensmittel zu stabilisieren. Daher werden nach dem Genuss eines mit Anthocyanen angereicherten Lebensmittels nur äußerst geringe Mengen an Anthocyanen resorbiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein emulsionsbasiertes Formulierungsverfahren für die Verkapselung eines anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes in den inneren Wassertropfen einer $W_1/O/W_2$ -Doppel-emulsion entwickelt. Es wurde aufgezeigt, wie die Herstellungsbedingungen sowie die Zusammensetzung und Mikrostruktur der Doppelemulsionen gezielt modifiziert werden können, um hydrophile bioaktive Substanzen wie Anthocyane stabil in den Dünndarm zu transportieren, wo sie resorbiert werden.

In Versuchen mit extrakthaltigen wässrigen Lösungen konnte zunächst gezeigt werden, dass eine gute Anthocyanstabilität erreicht werden kann, wenn der pH-Wert der W_1 -Phase kleiner 4 ist. Die Zugabe von Pektin führte durch Copigmentierung zu einer weiteren Verbesserung der Anthocyanstabilität. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Beanspruchungen im Homogenisierprozess selbst bei Hochdruckbehandlungen bis zu 1500 bar keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität der Anthocyanmoleküle haben. Bei pH-Werten von 3,5 wurde nur ein thermisch induzierter Anthocyanabbau beobachtet, wobei der Temperatur-Zeit-Effekt als Hauptparameter zu sehen ist. Wenn die Beanspruchungszeiten kurz gehalten werden ($t < 100$ s), werden auch bei Prozesstemperaturen von bis zu 46 °C weniger als 1 % der gelösten Anthocyanmoleküle abgebaut. Diese Ergebnisse sind Voraussetzung für die weitere Entwicklung technischer Prozesse zum Verkapseln und Stabilisieren des anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes in multiplen Emulsionen.

Während der Verkapselung des anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktes sowie beim Einbringen der hydrophilen Farbstoffe Vitamin B12, Poly-R-478 und Brillantblau G 250 in W_1/O - oder $W_1/O/W_2$ -Emulsionen, wurde ein Übergang von ursprünglich in der W_1 -Phase gelösten hydrophilen Molekülen in die umgebende Ölphase beobachtet. Dies kann einen entscheidenden Einfluss auf die Einschlusseigenschaften der Doppelemulsionen haben. Gleichzeitig bietet

dieses Phänomen neue Möglichkeiten bezüglich des Färbens lipophiler Phasen, z.B. in Lebensmittelanwendungen. Daher ist das Verständnis des zugrundeliegenden Mechanismus von großem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb 4 Hypothesen aufgestellt und untersucht, die eine Erklärung für den Übergang der hydrophilen Farbstoffmoleküle in die Ölphase während des Emulgierprozesses darstellen können. Eine chemische Reaktion, die zu lipophileren Molekülstrukturen führt, konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da die analysierten Anthocyanmoleküle, die in den Lipidphasen mittels HPLC / DAD / MS Messungen detektiert wurden, weiterhin ihren hydrophilen Charakter aufwiesen. Intermolekulare Copigmentierung ist ebenfalls als Ursache auszuschließen, da beim Vergleich von anthocyanhaltigen Öl- und Wasserphasen keine bathochrome Verschiebung im Absorptionsspektrum detektiert werden konnte. Die Hypothese eines Übergangs der Farbstoffmoleküle in inversen Emulgatormizellen kann dieses Phänomen ebenfalls nicht vollständig erklären, da es auch für Emulgatorkonzentrationen deutlich unter der kritischen Mizellbildungskonzentration zu einem beträchtlichen Übergang von Anthocyanmolekülen in die Ölphase kam. Als vierte Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens wurden schließlich Löslichkeitseffekte bzw. der Verteilungskoeffizient der Farbstoffmoleküle zwischen der Öl- und Wasserphase in Betracht gezogen. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass das Löslichkeitsgleichgewicht bzw. der Verteilungskoeffizient in Zusammenhang mit der Größe der Grenzfläche eine plausible Erklärung für die beobachteten Phänomene darstellt. Begleitende Simulationen des Verteilungskoeffizienten unterschiedlicher Anthocyanidine sowie Anthocyanglykoside mit COSMO-RS konnten die Versuchsergebnisse bestätigen.

Unter Berücksichtigung der für die Formulierung von Anthocyanen relevanten Eigenschaften wurden die in der Literatur beschriebenen Herstellungsverfahren für einfache und multiple Emulsionen für die Beladung der Trägersysteme mit Anthocyanen angepasst und praktikable Prozesswege aufgezeigt. Besonderes Augenmerk galt dabei der gezielten Variation der Mikrostruktur der inneren W_1/O - sowie der $W_1/O/W_2$ -Emulsionen. Ziel war es, aufzuzeigen, wie durch geeignete Einstellung der Mikrostruktur der inneren und äußeren Emulsionen lagerstabile Formulierungen hergestellt werden können, die es ermöglichen, die bioaktiven Moleküle bis in den Dünndarm zu transportieren.

Sowohl die Kurz- als auch die Langzeitstabilisierung der W_1 -Tropfen von PGPR-haltigen W_1/O -Emulsionen konnte durch die Zugabe des Elektrolyten Calciumchlorid zur inneren Wasserphase verbessert werden. Als Ursache kommen bereits in der Literatur diskutierte Interaktionen zwischen PGPR und Elektrolyten in Frage, die zu einer Verfestigung der Wasser-Öl-Grenzschicht und damit zu einer verbesserten Koaleszenzstabilität der Tropfen im Prozess und

bei der Lagerung führen. Eine zusätzliche Zugabe eines Hydrokolloids wie Pektin konnte die Kurzzeitstabilisierung nicht weiter verbessern, führte aber auch zu keiner Verschlechterung des Tropfenaufbruchs, wenn eine Gelierung des Hydrokolloids während des Prozesses verhindert werden konnte. Die effektive Zerkleinerung und Stabilisierung pektinhaltiger W_1 -Tropfen war in Rotor-Stator-Systemen bis zu einer kritischen Umfangsgeschwindigkeit (hier: 15,4 m/s) in Einfach- oder Mehrfachpassagen möglich. Höhere Umfangsgeschwindigkeiten sowie das Emulgieren im Hochdruckhomogenisator führten zu einem hohen Grobgutanteil. Dies konnte zum einen auf Koaleszenz bedingt durch eine erhöhte Kollisionsfrequenz zurückgeführt werden. Zum anderen ist es denkbar, dass es aufgrund der zu kurzen Verweilzeit bei hohen Umfangsgeschwindigkeiten in der Zahnkranzdispergiermaschine sowie im Hochdruckhomogenisator zu einem unzureichenden Tropfenaufbruch der höher viskosen, pektinhaltigen Tropfen kommt.

Untersuchungen zum Einfluss des Heidelbeerextraktes in der W_1 -Phase auf die Mikrostruktur von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen zeigten, dass es möglich ist, bis zu 0,5 % Heidelbeerextrakt ohne eine messbare Veränderung der Emulsionsstruktur einzubringen. Da die Gelierungsgeschwindigkeit von Pektinen vom Trockenmassegehalt der Lösung abhängt, führte der Trockenmassegehalt des Heidelbeerextraktes bei höheren Extraktkonzentrationen zu einer Ausgelierung der pektinhaltigen Tropfen bereits im Emulgierprozess. Die gelierten Tropfen konnten dann im Prozess nicht weiter aufgebrochen werden.

Darüber hinaus konnten die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es, je nach gewünschter Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen möglich ist, die Öltropfen von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen mit bis zu 60 % W_1 -Phase zu beladen. Der Grobgutanteil nahm bei einer Erhöhung des inneren Dispersphasenanteils von 30 auf 60 % im Rahmen der Standardabweichungen nur relativ wenig zu. Auch während einer Lagerung von 3 Wochen waren die Emulsionen unabhängig vom inneren Dispersphasenanteil φ stabil. Dies ermöglicht eine Erhöhung des Gesamtanthocyangehalts der Emulsionen und eine Reduzierung des Fettgehalts.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, inwieweit es möglich ist, Doppelemulsionen so zu gestalten, dass sie stabil in den Dünndarm gelangen und dort die eingeschlossenen Anthocyane freigesetzt werden. Der pH-Wert der W_1 -Tropfen war zur Gewährleistung einer optimalen Anthocyanstabilität auf 3,5 eingestellt. Die inneren Tropfen enthielten stets Pektin. Als Emulgator wurden 2,5 % PGPR in der Ölphase gelöst. Die W_1/O -Emulsionen wurden in die W_2 -Phase mittels einer Kolloidmühle bei einer maximalen Umfangsgeschwindigkeit von 3,5 m/s eingebracht. Hierdurch war ein schonendes Einbringen der beladenen W_1/O -Tropfen möglich. Die inneren W_1/O -Emulsionen wurden,

ausgehend von den Untersuchungen zur Einstellung der W_1/O -Mikrostruktur, stets mit einem Dispersphasenanteil von 30 % in einer Zahnkranz-dispergiermaschine hergestellt.

Eine Variation der W_1/O -Tropfengröße war durch Anpassung des Emulgatorsystems sowie des Energieeintrages möglich. So führte die Verwendung von kurzkettigen Emulgatoren wie Gallensäure oder Tween 20, die die Grenzflächenspannung an der O/W_2 -Grenzfläche schneller absenken als langkettige Emulgatoren, zu einer effektiveren Stabilisierung der erzeugten W_1/O -Tropfen und damit zu kleineren Tropfen als langkettige Proteine. Zum anderen konnten die multiplen W_1/O -Tropfen durch Reduktion der Spaltweite der Kolloidmühle, was eine Erhöhung der eingetragenen Energie bewirkt, effizienter aufgebrochen werden, wie es auch für einfache O/W -Emulsionen bekannt ist.

Die Zugabe des Hydrokolloids Pektin zur kontinuierlichen W_2 -Phase der Doppelemulsionen führte, unabhängig vom verwendeten hydrophilen Emulgator, zu Emulsionen mit kleineren W_1/O -Tropfen und zu engeren Tropfengrößenverteilungen. Dies konnte zum einen mit einer Verbesserung der Kurzzeitstabilisierung der Tropfen erklärt werden, da die erhöhte Viskosität der kontinuierlichen W_2 -Phase zu einer Reduktion der Koaleszenzwahrscheinlichkeit führt. Zum anderen wird vermutet, dass der Tropfenaufbruch durch die Erhöhung der Viskosität der umgebenden Wasserphase verbessert werden konnte.

Der Einfluss des Anteils an W_1/O -Tropfen in der Doppelemulsion, der hier als äußerer Dispersphasenanteil bezeichnet wird, auf die Mikrostruktur und Stabilität der Doppelemulsionen spielt eine entscheidende Rolle, wenn Doppelemulsionen mit einem hohen Anteil an W_1/O -Tropfen hergestellt werden sollen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die W_1/O -Tropfengröße der multiplen Systeme kleiner wird, wenn der äußere Dispersphasenanteil von 30 auf 80 % erhöht wird. Dies konnte damit erklärt werden, dass die beim Emulgieren in Rotor-Stator-Systemen eingetragene Energiedichte E_V mit dem äußeren Dispersphasenanteil zunimmt. Die untersuchten Doppelemulsionen waren während der Lagerung bei 4 °C, unabhängig vom Dispersphasenanteil und der Tropfengrößenverteilung, über den beobachteten Zeitraum von 3 Wochen stabil gegen Veränderungen in der Mikrostruktur und gegen Sedimentation.

Bei Freisetzungsversuchen in bidestilliertem Wasser konnte ein direkter Zusammenhang zwischen dem äußeren Dispersphasenanteil φ_{WO} der Doppelemulsionen und dem zu Beginn der Untersuchungen gemessenen Freisetzungsfaktor F gezeigt werden. Je höher φ_{WO} war, umso höher war der

initiale Freisetzungsfaktor. Dies konnte damit erklärt werden, dass der zu Beginn der Versuche gemessene Freisetzungsfaktor auch die Anthocyane erfasst, die bereits während des Emulgierprozesses in die W_2 -Phase freigesetzt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Kollisionsfrequenz C und damit die Koaleszenzrate Ω der anthocyanbeladenen W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase umso höher ist, je höher φ_{WO} ist. Darüber hinaus sind im Prozess wirkende Beanspruchungen wie Scherkräfte, Dehnung und Turbulenz umso höher, je höher der Energieeintrag ist. Daher kann angenommen werden, dass die zu Beginn der Untersuchungen beobachtete Freisetzung auf Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase beruht. Die zeitliche Änderung des Freisetzungsfaktors dF/dt , die die Geschwindigkeit der Anthocyanfreisetzung beschreibt, wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen erfasst. Es wurde kein Zusammenhang zwischen dF/dt und dem äußeren Dispersphasenanteil φ_{WO} oder der W_1/O -Tropfengröße beobachtet. Demzufolge ist die zeitliche Freisetzung der Anthocyane im Freisetzungsmedium unabhängig von der W_1/O -Tropfengröße oder dem äußeren Dispersphasenanteil φ_{WO} . Darüber hinaus wurde gezeigt, dass langkettige Emulgatoren besser vor Koaleszenz zwischen den W_1 -Tropfen und der W_2 -Phase im Emulgierprozess schützen. Im weiteren Verlauf der Freisetzungsversuche konnte aber auch hier kein Zusammenhang zwischen dem verwendeten Emulgator und der zeitlichen Änderung des Freisetzungsfaktors beobachtet werden. Die untersuchten Emulgatoren haben demnach keinen Einfluss auf die zeitliche Anthocyanfreisetzung. Die beste Einschlusseffizienz der W_1 -Tropfen im Prozess ist durch langkettige Emulgatoren wie Molkenproteinisolat gegeben.

Darüber hinaus wurde die physikalische Stabilität der Doppelemulsionen im Magen-Darm-Trakt durch Inkubation der Proben in einem *in vitro* Verdauungsmodell untersucht. Die Proben wurden vor und nach der Inkubation mittels statischer Lichtstreuung und dynamischer Bildanalyse charakterisiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der Emulsionen im Gastrointestinaltrakt durch geschickte Wahl des Emulgatorsystems beeinflusst werden kann. So kommt es zum Beispiel unter Verwendung von Gallensäure bereits im Magen zu einer Veränderung der Tropfengrößenverteilung. Dies konnte damit erklärt werden, dass Gallensäure im Magen ausflockt und somit die W_1/O -Tropfen nicht mehr ausreichend stabilisiert werden können. Doppelemulsionen, stabilisiert mit Molkenproteinisolat hingegen zeigten im Magen keine Veränderung der Emulsionsstruktur. Demnach ist davon auszugehen, dass langkettige Emulgatoren wie Molkenproteinisolat am besten geeignet sind, um eine maximale Menge an Anthocyanen stabil in den Darm zu transportieren.

Um den Einfluss der Verdauungsenzyme Pepsin und Pankreatin auf die Stabilität der Doppelemulsionen sowie die Mechanismen der Freisetzung im Gastrointestinaltrakt zu untersuchen, wurden *in vitro* Verdauungsversuche mit und ohne die Verdauungsenzyme durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es nur unter Anwesenheit der Verdauungsenzyme Pepsin und Pankreatin zu einer Freisetzung eingeschlossener W_1 -Tropfen kommt. Da die Verdauungsenzyme die im System vorhandenen Emulgatoren von der Grenzfläche verdrängen, kommt es zu einer Destabilisierung der O/ W_2 -Grenzfläche, was auch zu einer verstärkten Koaleszenz der eingeschlossenen W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase führen kann. Demzufolge ist die hier beobachtete Freisetzung der W_1 -Tropfen im Gastrointestinaltrakt überwiegend auf Koaleszenz der W_1 -Tropfen mit der umgebenden W_2 -Phase zurückzuführen.

Untersuchungen, bei denen während der Inkubation der Emulsionen unter Magen-Darm-Bedingungen die Anthocyanaufnahme über eine simulierte Darmwand (Diffusionsschlauch mit Porengröße 1000 Dalton) ermittelt wurde, bestätigten zudem, dass die über die Membran aufgenommene Anthocyanmenge größer ist, wenn Enzyme im simulierten Verdauungssaft vorhanden sind. Diese Ergebnisse unterstützen die zuvor getroffene Aussage zum Freisetzungsmechanismus.

Untersuchungen der biologischen Wirksamkeit des Heidelbeerextraktes, die in Kooperation mit der Universität Wien durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass das in Doppelemulsionen verkapselte Extrakt, nach 72-stündiger Substanzinkubation (SRB-Assay), eine ebenso hohe biologische Aktivität bzgl. der Wachstumshemmung humaner Kolonkarzinomzellen aufweist wie das unverkapselte Heidelbeerextrakt. Untersuchungen zur Modulation der EGF-Rezeptoren, bei denen der Western Blot Assay angewendet wurde, zeigten keine Wirkung des verkapselten Extraktes. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Extraktbestandteile nicht, oder nur sehr langsam, freigesetzt werden. Da in dem angewandten Zellkulturmodell keine enzymatisch bedingte Veränderungen der Emulsionsstruktur sowie fettabbauende Prozesse wie vergleichsweise im Darm stattfinden, wird in diesem Fall die *in vivo* Situation nur bedingt widerspiegelt. Während der kurzen Inkubationszeit von nur 45 Minuten konnte demnach keine Interaktion zwischen Heidelbeerextraktbestandteilen und dem EGF-Rezeptor stattfinden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass $W_1/O/W_2$ -Doppelemulsionen nach Anpassung der Herstellungsbedingungen und der Zusammensetzung ein geeignetes Trägersystem für hydrophile bioaktive Substanzen wie Anthocyane darstellen, in denen sie stabil bis in den Dünndarm, den Ort der Resorption, transportiert werden können. Möglichkeiten zur

gezielten Beeinflussung der Mikrostruktur der Doppelemulsionen sowie der Stabilität und Freisetzung der Anthocyane konnten aufgezeigt werden.

Um die Stabilität der eingeschlossenen Anthocyane auch während der Lagerung im Doppelemulsionssystem untersuchen zu können, ist die Entwicklung von Messverfahren notwendig, die eine Quantifizierung des Anthocyangehaltes in den inneren Wassertropfen ermöglichen. Eine Möglichkeit könnten zum Beispiel NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-basierte Verfahren darstellen. Für eine erfolgreiche Anwendung in Lebensmitteln sollte außerdem der PGPR-Gehalt der Emulsionen noch weiter reduziert werden. Eine Reduktion des Emulgatorgehaltes ist nur dann möglich, wenn die W_1 -Tropfen auf eine andere Art stabilisiert werden können. Dies wäre zum Beispiel durch Verwendung von höherschmelzenden Fetten in der Ölphase oder durch ein Ausgelieren der inneren W_1 -Tropfen bereits im Prozess möglich. Darüber hinaus ist es wünschenswert, den Heidelbeerextraktanteil in der inneren Wasserphase weiter zu erhöhen, ohne die Mikrostruktur der Emulsionen signifikant zu beeinflussen. Dies könnte dadurch realisiert werden, dass der Trockenmasseanteil der inneren Wasserphase durch Verwendung von Pektin-Salz-Mischungen mit niedrigerem Dextrosegehalt reduziert wird. Darüber hinaus könnten anthocyanhaltige Extrakte mit geringerem Trockenmasseanteil verwendet werden. Um außerdem auch Aussagen zur EGF-Rezeptorinhibierung anthocyanhaltiger Doppelemulsionen treffen zu können, sollten die in dieser Arbeit mittels Western Blot durchgeführten Versuche an Doppelemulsionen wiederholt werden, die zuvor in einem *in vitro* Verdauungsmodell inkubiert wurden. Da die Doppelemulsionen durch die Verdauungsmedien aufgeschlossen und eingeschlossene Wirkstoffe freigesetzt werden, ist zu erwarten, dass in diesem Fall auftretende Interaktionen zwischen den Heidelbeerextraktbestandteilen und dem EGF-Rezeptor messbar sind. Zudem ist es notwendig, Lagerversuche der entwickelten Systeme in verschiedenen Produkten und *in vivo* Versuche zur biologischen Wirkung sowie der Bioverfügbarkeit der verkapselten Anthocyane durchzuführen.

10 Summary and outlook

Foods containing anthocyanins have high antioxidative, anticarcinogenic as well as immune stimulating potential. Therefore, they gain increasing significance in the fields of functional foods or nutritional supplements. However, without adapted protective measures it is impossible to stabilize anthocyanin molecules, both isolated from plant cells and chemically synthesized, in foods. Thus, after the consumption of an anthocyanin-enriched food only very low amounts of these bioactive substances are resorbed by the human body. In the frame of this thesis an emulsion-based formulation process was developed for the encapsulation of an anthocyanin-rich bilberry extract in the inner aqueous droplets of $W_1/O/W_2$ -double emulsions. It was shown how the process conditions as well as the composition and microstructure of double emulsions can be specifically modified in order to enable a stable transport of bioactive ingredients like anthocyanins to the small intestine, where they are resorbed by the human body.

In experiments with aqueous solutions containing bilberry extract it was first shown that good anthocyanin stability can be achieved if the pH-value of the W_1 -phase is below 4. The addition of pectin resulted in a further increase of anthocyanin stability due to copigmentation. Moreover, it could be shown that there is no significant influence of mechanical stresses on anthocyanin stability, even at high-pressure treatment up to 1500 bar. At pH values of 3.5 anthocyanin degradation could be detected only for thermal treatment, showing the temperature-time-load as main parameter. When limiting processing times to a few seconds ($t < 100$ s), less than 1 % of the initially dissolved anthocyanins were degraded, even at process temperatures of 46 °C. These results open the opportunity to develop technical processes for the encapsulation and stabilization of anthocyanin-rich extracts in multiple emulsions.

During the encapsulation of the anthocyanin-containing bilberry extract as well as the hydrophilic dyes Vitamin B12, Poly R 478 or Brilliant Blue G 250 in W_1/O - or $W_1/O/W_2$ -emulsions, a transfer of the dye molecules, originally dissolved in the inner aqueous phase of the emulsion, to the surrounding lipid phase was observed. This can strongly influence the encapsulation efficiency of double emulsions. Further, the transfer of hydrophilic dye molecules to the oil phase implies a chance for the coloration of lipophilic phases, e.g. in food applications, as there are only few natural lipophilic dyes in the color range of anthocyanins. Therefore, understanding the transfer mechanism is of great interest. Within the scope of this study four hypotheses possibly explaining a

transfer of hydrophilic dye molecules to the lipid phase during emulsification were constructed and evaluated. A chemical reaction leading to more lipophilic molecular structures could be excluded as the analyzed anthocyanin molecules which could be found in the lipid phases via HPLC / DAD / MS measurements still exhibited their hydrophilic character. Intermolecular copigmentation could also be rejected as no bathochromic shift in the absorption spectrum could be detected when comparing anthocyanin-containing oil- and water-phases. The hypothesis of a transfer of dye molecules in inverse emulsifier micelles cannot completely explain the whole phenomenon as there is also a considerable transition of anthocyanin molecules to the oil-phase for emulsifier concentrations well below the critical micelle concentration (CMC). Therefore, the hypothesis which is most suitable to explain the movement of anthocyanin molecules to the oil phase is the solubility respectively partition coefficient of the dye molecules in combination with the interfacial area which is increased during emulsification. COSMO RS simulations of the water-oil partition coefficient of different anthocyanidins as well as anthocyanin-glycosides confirmed the experimental results.

Considering the properties relevant for the formulation of anthocyanins, emulsifying processes for the preparation of simple and multiple emulsions, which have already been described in literature, were adapted to the encapsulation of anthocyanins in the carrier system. Practical process routes were shown. Especially the systematic variation of the W_1/O - as well as $W_1/O/W_2$ -microstructure was in the centre of interest. The aim of this study was to show how stable formulations, which enable for a transport of bioactive molecules to the small intestine, can be prepared via an appropriate adaptation of the microstructure of inner and outer emulsions.

Both the short-term and long-term stability of the W_1 -droplets of PGPR-stabilized W_1/O -emulsions could be increased by the addition of the electrolyte calcium chloride to the inner water phase. This can be caused by interactions between PGPR and electrolytes, which have already been discussed in literature, leading to a more rigid interfacial water-oil film and therewith to an improved coalescence stability of the droplets during the process and during storage. An extra addition of a hydrocolloid like pectin could not improve the short-term stability any further. However, droplet breakup was not deteriorated as long as gelification of the hydrocolloid could be avoided during the process. The effective break up and stabilization of pectin-containing W_1 -droplets was possible in rotor-stator devices up to a critical peripheral speed (here: 15.4 m/s) while passing the dispersing zone once or multiple times. Higher peripheral speeds as well as the emulsification in high pressure homogenizers led to high coarse fractions. On the one hand, this can be attributed to coalescence in

consequence of an increased collision frequency. On the other hand, it is possible that higher viscous, pectin-containing droplets are insufficiently disrupted due to the short dwell time at high peripheral speeds in the rotor-stator device as well as in high pressure homogenizers.

Examinations of the influence of the bilberry extract dissolved in the W_1 -phase on the microstructure of pectin-containing W_1/O -emulsions showed no measurable influence of the extract on the emulsion's structure for extract concentrations up to 0.5 %. For higher extract concentrations the dry matter content of the bilberry extract induced the gelification of the inner water droplets during the emulsifying process. This can be attributed to the fact that the gelification of pectins is the faster, the higher the dry matter content of the solution is.

Moreover, it was shown that up to 60 % of W_1 -droplets can be incorporated into the oil-phase of pectin-containing W_1/O -emulsions, depending on the requested microstructure of the emulsions. In case of an increase of the inner disperse phase content from 30 to 60 % no significant influence on the coarse fraction was observed in terms of standard deviations. Also during a storage period of 3 weeks the emulsions were stable, independent of the inner disperse phase content φ . This enables an increase of the total anthocyanin content and a reduction of the fat content of the emulsions.

In the frame of this study it was also investigated to what extent anthocyanin-rich double emulsions can be designed that are stable during gastric passage and allow for a release of the encapsulated anthocyanins in the small intestine. The pH-value of the W_1 -droplets was adjusted to 3.5 to enable optimal anthocyanin stability. Further, pectin was added to the inner droplets. 2.5 % PGPR were dissolved in the oil phase as lipophilic emulsifier. For the incorporation of the W_1/O -emulsions into the surrounding W_2 -phase a colloid mill was used at a maximum peripheral speed of 3.5 m/s. Hereby, a mild incorporation of the anthocyanin-loaded W_1/O -droplets was possible. Based on the results on the adjustment of the W_1/O -microstructure, the inner W_1/O -emulsions were prepared with a disperse phase content of 30 % in a gear rim dispersing device.

The W_1/O -droplet size could be specifically modified by adjusting the emulsifier systems as well as the energy input. Short-chain emulsifiers like bile acid or Tween 20 induce a faster decrease of the interfacial tension than long-chain emulsifiers. Consequently, the use of short-chain emulsifiers led to a more effective stabilization of the generated W_1/O -droplets and hence to smaller droplets than long-chain proteins. Further, the multiple W_1/O -droplets could be disrupted more efficiently when reducing the gap width of the colloid mill,

which leads to an increase of the energy input. This effect is also well-known for simple O/W-emulsions.

The addition of a hydrocolloid like pectin to the continuous W_2 -phase of the double emulsions resulted in smaller W_1/O -droplets with narrower droplet size distributions, independent of the used hydrophilic emulsifier. On the one hand, this could be explained by an improved short-term stabilization of the droplets as the higher viscosity of the continuous W_2 -phase reduces the coalescence probability. On the other hand, it is assumed that the droplet disruption could be improved due to the increased viscosity of the surrounding water phase.

The influence of the amount of W_1/O -droplets in the double emulsions, which is called the ‘exterior disperse phase content’ in this thesis, on the microstructure and the stability of the emulsions is very important when double emulsions with a high amount of W_1/O -droplets are to be prepared. Within this thesis it could be shown that the W_1/O -droplet size of the multiple systems will decrease, if the exterior disperse phase content is increased from 30 to 80 %. This could be explained by the fact that the specific energy input E_V , introduced by rotor-stator devices during emulsification, increases with increasing exterior disperse phase contents. During the investigation period of 3 weeks the examined double emulsions, stored at 4 °C, were stable against microstructural changes and sedimentation, independent of the disperse phase content and the droplet size distribution.

Release experiments with double distilled water as release medium showed a direct correlation between the exterior disperse phase content φ_{WO} of the double emulsions and the release factor F determined at the beginning of the examinations. This initial release factor F was the higher, the higher φ_{WO} was. This could be explained by the fact that the release factor, measured at the beginning of the experiments, also collects the anthocyanins which have already been released to the W_2 -phase during the emulsifying process. It can be expected that the collision frequency C and hence the collision rate Ω of anthocyanin-loaded W_1 -droplets with the surrounding W_2 -phase is the higher, the higher φ_{WO} is. Moreover, process-related stresses like shear forces, elongation and turbulence are the higher, the higher the energy input is. Thus, it can be assumed that the release observed at the beginning of the experiments is based on coalescence of the W_1 -droplets with the surrounding W_2 -phase. The temporal alteration of the release factor dF/dt , which describes the speed of anthocyanin release, was determined in the proceeding experiments. No connection between dF/dt and the exterior disperse phase content φ_{WO} or the W_1/O -droplet size could be observed. Therefore, the diffusive release of anthocyanins to the release medium is independent of the W_1/O -droplet size and the exterior disperse phase

content ϕ_{WO} . In addition, it could be shown that long-chain emulsifiers exhibited better protective effects against coalescence between the W_1 -droplets and the W_2 -phase during emulsification. In the further course of the release experiments no connection between the used emulsifier and the temporal alteration of the release factor dF/dt could be observed. Accordingly, the examined emulsifiers do not have any effect on the diffusive release of anthocyanins. The best encapsulation efficiency of the W_1 -droplets during emulsification is given by long-chain emulsifiers like whey protein isolate.

In addition, the physical stability of double emulsions in the gastrointestinal tract was examined by incubation of the samples in an *in vitro* digestion model. Samples were characterized by static light scattering and dynamic image analysis before and after the gastrointestinal incubation. Through this, it could be shown that the stability of the emulsions in gastrointestinal environment can be influenced by smart selection of the emulsifier systems. For example, there is already a change in the droplet size distribution during gastric incubation when using bile acid as hydrophilic emulsifier. This could be explained by the fact that bile acid tends to flocculate in gastric environment and hence cannot sufficiently stabilize the W_1/O -droplets. In contrast, double emulsions stabilized by whey protein isolate did not show any changes in the emulsion structure. Thus, it can be assumed that long-chain emulsifiers like whey protein isolate are the most appropriate to transport a maximum amount of stable anthocyanins to the intestine.

To evaluate the influence of digestive enzymes like pepsin and pancreatin on the stability of double emulsions as well as on the mechanisms of release in gastrointestinal environment, *in vitro* digestion experiments were conducted with and without the digestive enzymes. It could be shown that there is only a release of entrapped W_1 -droplets when pepsin and pancreatin are added. As the digestive enzymes can replace the existing emulsifier molecules from the interface, the O/W_2 -interface is destabilized. This can enhance coalescence between W_1 -droplets and the W_2 -phase, leading to the release of W_1 -droplets. Thus, the release of W_1 -droplets which was observed during gastrointestinal incubation can be mainly attributed to coalescence of the W_1 -droplets with the surrounding W_2 -phase.

Examinations determining anthocyanin absorption across a simulated intestinal wall (diffusion tube with pore size 1000 Dalton) confirmed that the anthocyanin amount taken up across the membrane will be higher if enzymes are present in the digestive juices. These results support the afore stated conclusion concerning the release mechanism.

Investigations on the biological efficacy of the bilberry extract, which were conducted in cooperation with the University of Vienna, showed that the biological activity, concerning the inhibitory effect on the growth of human colon cancer cells, of the extract encapsulated in double emulsions is as high as the activity of the non encapsulated extract after substance incubation (SRB-Assay) for 72 hours. Examinations regarding the modulation of the EGF-receptors, in which the Western Blot Assay was applied, showed no effect of the encapsulated extract. This can be due to the fact that the extract components are not, or only very slowly, released. As in the used cell culture model no enzyme-related changes of the emulsion structure as well as no fat-degrading processes, comparable to those in the human intestine, are taking place, the *in vivo* situation is only reflected to a limited extend. Thus, during the short incubation time of only 45 minutes no interactions between the components of the bilberry extract and the EGF-receptor could take place.

Consequently, in the frame of this thesis it could be shown that $W_1/O/W_2$ -double emulsions are an appropriate carrier system for instable hydrophilic bioactive ingredients like anthocyanins, after the adaption of the process conditions and the composition. They enable a stable transport of these ingredients to the small intestine, where they are absorbed by the human body. Possibilities for specifically influencing the microstructure of the double emulsions as well as the stability and release of anthocyanins could be shown.

To enable the investigation of anthocyanin stability during storage in double emulsion systems, measurement methods have to be developed which allow for the quantification of the anthocyanin content in the inner water droplets. One possibility might be NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-based processes. For a successful application in foods the PGPR-content of the emulsions must be further reduced. However, a reduction of the emulsifier content will only be possible if the W_1 -droplets are stabilized otherwise. This might be feasible by using fats with higher melting points in the oil phase or by gelification of the inner W_1 -droplets already during the emulsifying process. Moreover, it is desirable to further increase the bilberry extract content in the inner aqueous phase without significantly influencing the microstructure of the emulsions. This might be realized by using pectin-salt-mixtures with low dextrose contents in order to reduce the dry matter content in the W_1 -phase. In addition, anthocyanin-containing extracts with lower dry matter contents could be used. In order to examine the EGF-receptor inhibition of anthocyanin-containing double emulsions, the experiments which were conducted in this study by means of Western Blot should be repeated with double emulsions that have been incubated in an *in vitro* digestion model before. As the double emulsions are digested and encapsulated ingredients are released in presence of digestive

10 Summary and outlook

media, it can be expected that interactions occurring between the bilberry extract components and the EGF-receptor will be measurable then. Further, investigations on the storage stability of the developed systems in different products and *in vivo* experiments on the biological effects as well as the bioavailability of the encapsulated anthocyanins are necessary.

Literaturverzeichnis

- Adams, J. B.: *Color Stability of Red Fruits*, Food Manufacture, 48, (2), 19-&, **1973a**.
- Adams, J. B.: *Thermal-Degradation of Anthocyanins with Particular Reference to 3-Glycosides of Cyanidin .1. Acidified Aqueous-Solution at 100 Degrees C*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 24, (7), 747-762, **1973b**.
- Adams, J. B., Ongley, M. H.: *The degradation of anthocyanins in canned strawberries I. the effect of various processing parameters on the retention of pelargonidin-3-glucoside*, J. Fd Technol., 8, 139-145, **1973a**.
- Adams, J. B., Woodman, J. S.: *Thermal-Degradation of Anthocyanins with Particular Reference to 3-Glycosides of Cyanidin .2. Anaerobic Degradation of Cyanidin-3-Rutinoside at 100 Degrees C and Ph3.0 in Presence of Sodium Sulfite*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 24, (7), 763-768, **1973b**.
- Allouche, J., Tyrode, E., Sadtler, V., Choplin, L., Salager, J. L.: *Single- and two-step emulsification to prepare a persistent multiple emulsion with a surfactant-polymer mixture*, Ind. Eng. Chem. Res., 42, (17), 3982-3988, **2003**.
- Appelqvist, I. A. M., Golding, M., Vreeker, R., Zuidam, N. J.: *Emulsions as Delivery Systems in Foods* in Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems (Editor: Lakkis, J. M.), 41-81, Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA, **2007**.
- Arai, K., Konno, M., Matunaga, Y., Saito, S.: *Effect of Dispersed-Phase Viscosity on the Maximum Stable Drop Size For Breakup in Turbulent Flow*, J. Chem. Eng. Jap., 10, (4), 325-330, **1977**.
- Armbruster, H.: *Untersuchungen zum kontinuierlichen Emulgierprozeß in Kolloidmühlen unter Berücksichtigung spezifischer Emulgatoreigenschaften und der Strömungsverhältnisse im Dispergierspalt*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), **1990**.
- Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H.: *Copigmentation of Anthocyanins in Plant-Tissues and Its Effect on Color*, Phytochemistry, 11, (3), 1139-1144, **1972a**.
- Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H.: *Copigmentation of Aurone and Flavone from Petals of Antirrhinum-Majus*, Phytochemistry, 11, (9), 2739-2741, **1972b**.
- Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H., Massie, D. R.: *A stable blue non-metallic co-pigment complex of delphinin and c-glycosylflavones in Prof. Blaauw Iris*, Phytochemistry, 9, 619-627, **1970**.
- Attoe, E. L., Vonelbe, J. H.: *Photochemical Degradation of Betanine and Selected Anthocyanins*, Journal of Food Science, 46, (6), 1934-1937, **1981**.

Literaturverzeichnis

- Ax, K.: *Emulsionen und Liposomen als Trägersysteme für Carotinoide*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), 3-8322-2754-7, **2003**.
- Badolato, G. G., Freudig, B., Idda, P., Lambrich, U., Schubert, H., Schuchmann, H.: *Membrane Emulsification Processes and Characterisation Methods in Monitoring and Visualizing Membrane-based Processes* (Editor: Güell, C., Ferrando, M., and López, F.), Wiley VCH, Weinheim, 3-527-32006-7, **2007**.
- Baehr, H. D., Stephan, K.: *Wärme- und Stoffübertragung*, 7th, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2010**.
- Baldyga, J., Makowski, L., Orciuch, W., Sauter, C., Schuchmann, H. P.: *Agglomerate dispersion in cavitating flows*, Chem. Eng. Res. Des., 87, (4A), 474-484, **2009**.
- Bancroft, W. D.: *The Theory of Emulsification, V*, J. Phys. Chem., 17, (6), 501-519, **1913**.
- Bancroft, W. D.: *The Theory of Emulsification, VI*, J. Phys. Chem., 19, (6), 513-529, **1915**.
- Bauer, E., Jakob, S., Mosenthin, R.: *Principles of physiology of lipid digestion*, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 18, (2), 282-295, **2005**.
- Bayer, E., Egeter, H., Fink, A., Nether, K., Wegmann, K.: *Complex Formation and Flower Colors*, Angew. Chem., Int. Ed., 5, (9), 791-798, **1966**.
- Becher, P.: *Emulsions: theory and practice*, 2. Auflage, Reinhold Pub. Corp., New York, **1965**.
- Becher, P.: *Encyclopedia of emulsion technology, Volume 1: Basic Theory*, (Vol. 1), Marcel Dekker, New York, Basel, **1983**.
- Behrend, O., Schubert, H.: *Potential of power ultrasound applied for continuous Emulsification*, (auf CD-ROM / Abstracts Buch S. 219), **2002**
- Belitz, H.-D., Grosch, W.: *Food Chemistry*, 2, Springer, Berlin Heidelberg New York, **1999**.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 978-3-540-73202-0, **2008**.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N.: *Polyols, high pressure, and refractive indices equalization for improved stability of W/O emulsions for food applications*, Journal of dispersion science and technology, 22, (2-3), 269-280, **2001**.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N.: *Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters*, Adv Colloid Interface Sci, 108-09, 29-41, **2004**.
- Benoy, C. J., Schneide, R., Elson, L. A.: *Multiple Emulsions, A Suitable Vehicle to Provide Sustained Release of Cancer Chemotherapeutic Agents*, British Journal of Pharmacology, 45, (1), 135-&, **1972**.

Literaturverzeichnis

- Bonerz, D., Würth, K., Patz, C. D., Dietrich, H.: Der Monomerindex: Eine schnelle und kostengünstige Methode zur Bestimmung von Anthocyanen und Anthocyanaddukten in Buntsäften, Nektaren, Konzentraten und Rotweinen, *Deutsche Lebensmittelrundschau*, 102. Jahrgang, Heft 5, **2006**.
- Bonnaire, L., Sandra, S., Helgason, T., Decker, E. A., Weiss, J., McClements, D. J.: *Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, (10), 3791-3797, **2008**.
- Bridle, P., Timberlake, C. F.: *Anthocyanins as natural food colours - Selected aspects*, *Food Chemistry*, 58, (1-2), 103-109, **1997**.
- Brouillard, R.: *The Chemistry of Anthocyanin Pigments .7. Origin of the Exceptional Colour Stability of the Zebrina Anthocyanin*, *Phytochemistry*, 20, (1), 143-145, **1981**.
- Brouillard, R.: *Chemical Structure of Anthocyanins* in *Anthocyanins as Food Colors* (Editor: Markakis, P.), 1-40, Academic Press, New York, London, Paris, **1982**.
- Brouillard, R., Delaporte, B.: *Chemistry of Anthocyanin Pigments .2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton-Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside*, *Journal of the American Chemical Society*, 99, (26), 8461-8468, **1977a**.
- Brouillard, R., Delaporte, B., Dubois, J.-E.: *Chemistry of Anthocyanin Pigments Part 3 Relaxation Amplitudes in Ph Jump Experiments*, *Journal of the American Chemical Society*, 100, (19), 6206-6205, **1978**.
- Brouillard, R., Dubois, J. E.: *Mechanism of Structural Transformations of Anthocyanins in Acidic Media*, *Journal of the American Chemical Society*, 99, (5), 1359-1364, **1977b**.
- Brouillard, R., Wigand, M. C., Dangles, O., Cheminat, A.: *Ph and Solvent Effects on the Copigmentation Reaction of Malvin with Polyphenols, Purine and Pyrimidine-Derivatives*, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, (8), 1235-1241, **1991**.
- Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G., Briviba, K.: *Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice*, *European Journal of nutrition*, 40, (3), 113-120, **2001**.
- Bundesministerium der Justiz: *Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung - ZZulV)*, **1998**.
- Buscall, R., Goodwin, J. W., Ottewill, R. H., Tadros, T. F.: *The settling of particles through Newtonian and non-Newtonian media*, *J. Colloid Interface Sci.*, 85, (1), 78-86, **1982**.
- Cao, Y., Dickinson, E., Wedlock, D. J.: *Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide*, *Food Hydrocolloids*, 4, (3), 185-195, **1990**.

Literaturverzeichnis

- Carlsen, C., Stapelfeldt, H.: *Light sensitivity of elderberry extract. Quantum yields for photodegradation in aqueous solution*, Food Chemistry, 60, (3), 383-387, **1997**.
- Chanamai, R., McClements, D. J.: *Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration*, Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects, 172, (1-3), 79-86, **2000**.
- Cheng, J., Xu, S., Wen, L. X., Chen, J. F.: *Steric repulsion between internal aqueous droplets and the external aqueous phase in double emulsions*, Langmuir, 21, (25), 12047-12052, **2005**.
- Chesters, A. K.: *The modelling of coalescence processes in fluid- liquid dispersions: A review of current understanding*, Chem. Eng. Res. Des., 69, (4), 259-270, **1991**.
- Clifford, M. N.: *Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, (7), 1063-1072, **2000**.
- Cooper-Driver, G. A.: *Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins*, Phytochemistry, 56, (3), 229-236, **2001**.
- Danner, T.: *Tropfenkoaleszenz in Emulsionen*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), **2001**.
- Das, K. P., Kinsella, J. E.: *Stability of Food Emulsions: Physicochemical Role of Protein and Non-protein Emulsifiers*, Advances in Food and Nutrition Research, (34), 81-201, **1991**.
- Davis, S. S., Hadgraft, J., Palin, K. J.: *Medical and Pharmaceutical Applications of Emulsions* in Encyclopedia of emulsion technology, Volume 2: Applications (Editor: Becher, P.), 159-238, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, **1985**.
- Davis, S. S., Hardy, J. G., Fara, J. W.: *Transit of Pharmaceutical Dosage Forms Through the Small-Intestine*, Gut, 27, (8), 886-892, **1986**.
- Debicki-Pospisil, J., Lovric, T., Trinajstic, N., Sabljic, A.: *Anthocyanin Degradation in the Presence of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural*, Journal of Food Science, 48, 411-416, **1983**.
- Decareau, R. V., Livingston, G. E., Fellers, C. R.: *Color Changes in Strawberry Jellies*, Food Technology, 10, (3), 125-128, **1956**.
- Delgado-Vargas, F., Paredes-Lopez, O.: *Anthocyanins and betalains* in Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses (Editor: Delgado-Vargas, F. and Paredes-Lopez, O.), 167-219, CRC Press, Boca Raton, FL, **2003**.
- Di Maio, S., Carrier, R. L.: *Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: In vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery*, Journal of controlled Release, 151, (2), 110-122, **2011**.

- Dickinson, E.: *Coalescence Stability of Emulsion-Sized Droplets at a Planar Oil-Water Interface and the Relationship to Protein Film Surface Rheology*, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 84, (3), 871-883, **1988**.
- Dickinson, E.: *Structure and Composition of Adsorbed Protein Layers and the Relationship to Emulsion Stability*, Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, 88, (20), 2973-2983, **1992**.
- Dickinson, E.: *Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems*, Food Hydrocolloids, 17, (1), 25-39, **2003**.
- Dickinson, E.: *Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers*, Food Hydrocolloids, 23, (6), 1473-1482, **2009**.
- Dickinson, E.: *Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers*, Food Biophysics, 6, (1), 1-11, **2011**.
- Dickinson, E., Evison, J., Owusu, R., Zhu, Q.: *Studies of water-in-oil-in-water (W/O/W) multiple emulsions: stabilization and controlled nutrient release*, Royal Soc. of Chemistry: Special Publication, 113, 276-279, **1993**.
- Dickinson, E., Evison, J., Owusu, R. K., Williams, A.: *Protein-stabilized water-in-oil-in-water emulsions*, Gums and stabilizers for the food industry, Oxford, England, 91-101, **1994**.
- Dickinson, E., Golding, M.: *Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate*, Food Hydrocolloids, 11, (1), 13-18, **1997a**.
- Dickinson, E., Golding, M.: *Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions*, J. Colloid Interface Sci., 191, (1), 166-176, **1997b**.
- DIN 19738: *Bodenbeschaffenheit - Resorptionsverfügbarkeit von organischen und anorganischen Schadstoffen aus kontaminiertem Bodenmaterial*, **2004**. (Art Work)
- DIN ISO 9276-2: *Darstellung der Ergebnisse von Partikelgrößenanalysen - Teil 2: Berechnung von mittleren Partikelgrößen/-durchmessern und Momenten aus Partikelgrößenverteilungen (ISO 9276-2:2001)*, **2009**. (Art Work)
- Dunlap, C. A., Cote, G. L.: *beta-lactoglobulin-dextran conjugates: Effect of polysaccharide size on emulsion stability*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, (2), 419-423, **2005**.
- Eckert, F., Klamt, A.: *Fast solvent screening via quantum chemistry: COSMO-RS approach*, AIChE Journal, 48, (2), 369-385, **2002**.
- Engel, R.: *Flüssige, wasserdispergierbare Phytosterol-Formulierungen zur Senkung des Cholesterolspiegels*, Dissertation, 978-3-89963-676-5, **2007a**.

Literaturverzeichnis

- Engel, R.: *Flüssige, wasserdispergierbare Phytosterol-Formulierungen zur Senkung des Serum-Cholesterolspiegels*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), 978-3-89963-676-5, **2007b**.
- Erni, P., Fischer, P., Windhab, E. J.: *Deformation of single emulsion drops covered with a viscoelastic adsorbed protein layer in simple shear flow*, Applied Physics Letters, 87, (24), **2005**.
- Ficheux, M. F., Bonakdar, L., Leal-Calderon, F., Bibette, J.: *Some stability criteria for double emulsions*, Langmuir, 14, (10), 2702-2706, **1998**.
- Fillerytravis, A. J., Foster, L. H., Robins, M. M.: *Stability of Emulsions Stabilized by 2 Physiological Surfactants - L-Alpha-Phosphatidylcholine and Sodium Taurocholate*, Biophysical Chemistry, 54, (3), 253-260, **1995**.
- Fleschhut, J.: *Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen*, Dissertation, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH), **2004**.
- Fletcher, P. D. I.: *Interaction of emulsion drops in: Drops and Bubbles in Drops and Bubbles in Interfacial Research* (Editor: Möbius, D. and Miller, R.), 563-592, Elsevier Science B.V., Amsterdam, **1998**.
- Florence, A. T., Jenkins, A. W., Loveless, A. H.: *Effect of Formulation of Intramuscular Injections of Phenothiazines on Duration of Activity*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 65, (11), 1665-1668, **1976**.
- Florence, A. T., Whitehill, D.: *Some Features of Breakdown in Water-In-Oil-In-Water Multiple Emulsions*, J. Colloid Interface Sci., 79, (1), 243-256, **1981**.
- Flügel, S.: *Casein-dextran conjugate. A natural high molecular mass surfactant-function for dispersed food systems*, Dissertation, Diplomarbeit, University Leeds und Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2003**.
- Francis, F. J.: *Food Colorants - Anthocyanins*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 28, (4), 273-314, **1989**.
- Frank, K., Köhler, K., Schuchmann, H. P.: *Stability of anthocyanins in high pressure homogenization*, Food Chemistry, 130, (3), 716-719, 10.1016/j.foodchem.2011.07.086, **2012**.
- Frank, K., Leick, S., Skrebek, S., Köhler, K., Rehage, H., Schuchmann, H. P.: *Transfer of hydrophilic dyes from the water to the oil-phase of W/O-emulsions during emulsification*, Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects, **2011a**.
- Frank, K., Köhler, K., Schuchmann, H. P.: *Formulation of labile hydrophilic ingredients in multiple emulsions: Influence of the formulation's composition on the emulsion's stability and on the stability of entrapped bioactives*, Journal of dispersion science and technology, 32, 1-6, 10.1080/01932691.2011.616147, **2011b**.

Literaturverzeichnis

- Fuchigami, T., Toki, M., Nakanishi, K.: *Membrane emulsification using sol-gel derived macroporous silica glass*, Journal of Sol-Gel Science and Technology, 19, 337-341, **2000**.
- Furtado, P., Figueiredo, P., Dasneves, H. C., Pina, F.: *Photochemical and Thermal-Degradation of Anthocyanidins*, Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry, 75, (2), 113-118, **1993**.
- Garti, N.: *Double emulsions - Scope, limitations and new achievements*, Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, 123, 233-246, **1997a**.
- Garti, N.: *Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications*, Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 30, (3), 222-235, **1997b**.
- Garti, N.: *A new approach to improved stability and controlled release in double emulsions, by the use of graft-comb polymeric amphiphiles*, Acta polymerica, 49, (10-11), 606-616, **1998**.
- Garti, N., Aserin, A.: *Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants*, Adv Colloid Interface Sci, 65, 37-69, **1996**.
- Garti, N., Benichou, A.: *Double emulsions for controlled release applications - Progress and trends* in Encyclopedic Handbook of Emulsions Technology (Editor: Sjoblom, J.), 377-408, Marcel Dekker, Inc., New York, **2011**.
- Garti, N., Bisperink, C.: *Double emulsions: progress and applications*, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 3, 657-667, **1998**.
- Gibbs, J. W.: *The collected works of J.W. Gibbs*, Longmans, New York, **1928**.
- Gmehling, J.: *Present status of group-contribution methods for the synthesis and design of chemical processes*, Fluid Phase Equilibria, 144, (1-2), 37-47, **1998**.
- Goto, T., Tamura, H., Kawai, T., Hoshino, T., Harada, N., Kondo, T.: *Chemistry of Metalloanthocyanins*, Annals of the New York Academy of Sciences, 471, 155-173, **1986**.
- Gouin, S.: *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends*, Trends Food Sci. Technol., 15, (7-8), 330-347, **2004**.
- Grace, H. P.: *Dispersion Phenomena in High-Viscosity Immiscible Fluid Systems and Application of Static Mixers As Dispersion Devices in Such Systems*, Chemical Engineering Communications, 14, (3-6), 225-277, **1982**.
- Groeneweg, F., Agterof, W. G. M., Jaeger, P., Janssen, J. J. M., Wieringa, J. A., Klahn, J. K.: *On the mechanism of the inversion of emulsions*, Trans I Chem E, 76, Part A, 55-63, **1998**.

Literaturverzeichnis

- Grossiord, J. L., Seiller, M.: *W/O/W multiple emulsions: a review of the release mechanisms by break-up of the oily membrane*, *Stp Pharma Sciences*, 11, (5), 331-339, **2001**.
- Hager, T. J., Howard, L. R., Prior, R. L.: *Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blackberry Products*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 689-695, **2008**.
- Harborne, J. B.: *The Flavonoids: Recent Advances in Plant Pigments* (Editor: Goodwin, T. W.), 299-343, Academic Press, **1988**.
- He, J. A., Giusti, M. M.: *Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties*, *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 1, 1, 163-186, **2010**.
- Hecht, L. L., Wagner, C., Landfester, K., Schuchmann, H. P.: *Surfactant Concentration Regime in Miniemulsion Polymerization for the Formation of MMA Nanodroplets by High-Pressure Homogenization*, *Langmuir*, 27, (6), 2279-2285, **2011**.
- Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken: *Die Spezialisten für Pektin*, **2008a**.
- Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken: *Rheologische Methoden zur Charakterisierung von Pektinen in Lösungen und Gelen*, **2008b**.
- Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken: *Spezifikation Pektin Amid CB 025-E, Pektin Amid CU-L 077/10*, **2010** (Persönliche Mitteilung).
- Hinze, J. O.: *Fundamentals of the Hydrodynamic Mechanism of Splitting in Dispersion Processes*, *AIChE Journal*, 1, (3), 289-295, **1955**.
- Hrazdina, G., Borzell, A. J., Robinson, W. B.: *Studies on Stability of Anthocyanidin-3,5-Diglucosides*, *American Journal of Enology and Viticulture*, 21, (4), 201-&, **1970**.
- Hubbermann, E. M.: *Functional Properties of Anthocyanin Concentrates and the Influence of Physicochemical Parameters and Food Additives on the Color and Stability of Isolated Anthocyanins in Food*, Dissertation, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel, ISBN-10: 3899593898, ISBN-13: 978-3899593891, **2005**.
- Hubbermann, E. M., Heins, A., Stockmann, H., Schwarz, K.: *Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates*, *European Food Research and Technology*, 223, (1), 83-90, **2006**.
- Israelachvili, J. N.: *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd, Academic Press, New York, **1992**.
- IUPAC: *Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure*, *Pure and Applied Chemistry*, 67, 1307-1375, **1995**.

Literaturverzeichnis

- Ivanov, I. B., Danov, K. D., Kralchevsky, P. A.: *Flocculation and coalescence of micron-size emulsion droplets*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects, 152, 161-182, **1999**.
- Ivanov, I. B., Kralchevsky, P. A.: *Stability of emulsions under equilibrium and dynamic conditions*, Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, 128, (1-3), 155-175, **1997**.
- Jackman, R. L., Smith, J. L.: *Anthocyanins and betalains in Natural food colorants* 2nd, (Editor: Hendry, G. A. F. and Hoghton, J. D.), 244-309, Springer, Berlin, **1995**.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., Speers, R. A.: *Anthocyanins As Food Colorants - A Review*, Journal of food biochemistry, 11, (3), 201-247, **1987**.
- Jäger, H., Juadjur, A., Jerz, G., Winterhalter, P., Knorr, D.: *Prozessinduzierte Ausbeutesteigerung von wertgebenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Blaubeeren und Vergleich ihrer Stabilität in Multikapselsystemen gegenüber konventionellen Produkten in Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen*, Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn, **2011**.
- Jager-Lezer, N., Terrisse, I., Bruneau, F., Tokgoz, S., Ferreira, L., Clause, D., Seiller, M., Grossiord, J. L.: *Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion*, Journal of controlled Release, 45, (1), 1-13, **1997**.
- Jansen, K. M. B., Agterof, W. G. M., Mellema, J.: *Droplet breakup in concentrated emulsions*, Journal of Rheology, 45, (1), 227-236, **2001**.
- Janssen, J. M. H., Meijer, H. E. H.: *Dynamics of Liquid-Liquid Mixing: A 2-Zone Model*, Polymer Engineering And Science, 22, (22), 1766-1780, **1995**.
- Jiao, J., Rhodes, D. G., Burgess, D. J.: *Multiple emulsion stability: Pressure balance and interfacial film strength*, J. Colloid Interface Sci., 250, (2), 444-450, **2002**.
- Jurd, L.: *Some Advances in the Chemistry of Anthocyanin-Type Plant Pigments in The chemistry of plant pigments* (Editor: Chichester, C. O.), 123-142, Academic Press, New York, London, **1972**.
- Kaden Biochemical GmbH, D.: *Zusammensetzung "600761 Bilberry Extract 25 %"*, **2008** (Persönliche Mitteilung).
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B., Reppas, C.: *Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies*, Pharmaceutical Research, 23, (1), 165-176, **2006**.
- Kalt, W., McDonald, J. E., Ricker, R. D., Lu, X.: *Anthocyanin content and profile within and among blueberry species*, Canadian Journal of Plant Science, 79, (4), 617-623, **1999**.

Literaturverzeichnis

- Kanouni, M., Rosano, H. L., Naouli, N.: *Preparation of a stable double emulsion (W1/O/W2): role of the interfacial films on the stability of the system*, Adv Colloid Interface Sci, 99, (3), 229-254, doi: DOI: 10.1016/S0001-8686(02)00079-9, **2002**.
- Karbstein, H.: *Untersuchungen zum Herstellen und Stabilisieren von Öl-in-Wasser-Emulsionen*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), **1994**.
- Kawakatsu, T., Kikuchi, Y., Nakajima, M.: *Regular-sized cell creation in microchannel emulsification by visual microprocessing method*, J. Am. Oil Chem. Soc., 74, 317-321, **1997**.
- Kawakatsu, T., Tragardh, G., Tragardh, C., Nakajima, M., Oda, N., Yonemoto, T.: *The effect of the hydrophobicity of microchannels and components in water and oil phases on droplet formation in microchannel water-in-oil emulsification*, Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects, 179, 29-37, **2001**.
- Kawashima, Y., Hino, T., Takeuchi, H., Niwa, T.: *Stabilization of Water/Oil/Water Multiple Emulsion with Hypertonic Inner Aqueous Phase*, Chem. Pharm. Bull., 40, (5), 1240-1246, **1992**.
- Keith, E. S., Powers, J. J.: *Plant Pigments - Polarographic Measurement and Thermal Decomposition of Anthocyanin Compounds*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 13, (6), 577-&, **1965**.
- Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S., Nussler, A., Hofem, S., Vatter, S., Pahlke, G., Rüfer, C., Marko, D.: *Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid*, Molecular Nutrition&Food Research, 51, (9), 1163-1172, **2007**.
- Kirca, A., Ozkan, M., Cemeroglu, B.: *Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins*, Food Chemistry, 101, (1), 212-218, **2007**.
- Klahn, J. K., Janssen, J. M. M., Vaessen, G. E. J., de Swart, R., Agterof, W. G. M.: *On the escape process during phase inversion of an emulsion*, Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects, 210, (2-3), 167-181, **2002**.
- Klamt, A.: *Conductor-Like Screening Model for Real Solvents - A New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena*, Journal of Physical Chemistry, 99, (7), 2224-2235, **1995**.
- Knoth, A., Scherze, I., Fechner, A.: *Emulgatoren zur Bildung von multiplen Emulsionen in Multiple Emulsionen - Herstellung und Eigenschaften* (Editor: Muschiolik, G. and Bunjes, H.), 71-135, Behr's Verlag, 3 89947 339 6, **2007**.
- Kobayashi, I., Wada, Y., Uemura, K., Nakajima, M.: *Microchannel emulsification for mass production of uniform fine droplets: integration of microchannel arrays on a chip*, Microfluidics and Nanofluidics, 8, (2), 255-262, **2010**.

- Koglin, B., Pawlowski, J., Schnöring, H.: *Kontinuierliches Emulgieren mit Rotor/Stator-Maschinen: Einfluß der volumenbezogenen Dispergierleistung und der Verweilzeit auf die Emulsionsfeinheit*, Chem. -Ing. -Tech., 53, (8), 641-647, **1981**.
- Koli, R., Erlund, I., Jula, A., Marniemi, J., Mattila, P., Alfthan, G.: *Bioavailability of Various Polyphenols from a Diet Containing Moderate Amounts of Berries*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58, (7), 3927-3932, **2010**.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R.: *Analysis and biological activities of anthocyanins*, Phytochemistry, 64, (5), 923-933, **2003**.
- Koroleva, M. Y., Yurtov, E. V.: *Effect of ionic strength of dispersed phase on Ostwald ripening in water-in-oil emulsions*, Colloid Journal, 65, (1), 40-43, **2003**.
- Kramer, M., Weiß, J., Preissler, P., Muschiolik, G.: *Beeinflussung der Eigenschaften von multiplen Emulsionen* in Multiple Emulsionen - Herstellung und Eigenschaften (Editor: Muschiolik, G. and Bunjes, H.), 137-206, Behr's Verlag, 3 89947 339 6, **2007**.
- Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., Williamson, G.: *How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?*, American Journal of Clinical Nutrition, 80, (1), 15-21, **2004**.
- Kuehnau, J.: *The Flavonoids A Class of Semi Essential Food Components Their Role in Human Nutrition*, Bourne, Geoffrey H. (Ed.). World Review of Nutrition and Dietetics, Vol. 24. X+262P. Illus. S. Karger: Basel, Switzerland; New York, N. Y. , Usa. Isbn 3-8055-2344-0, 117-191, **1976**.
- Lakkis, J. M.: *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 1, Wiley-Blackwell, 978-0-8138-2855-8, **2007**.
- Lambrich, U., Schubert, H.: *Emulsification using microporous systems*, Journal of Membrane Science, 257, (1-2), 76-84, **2005**.
- Lambrich, U., Vladisavljevic, G. T.: *Emulgieren mit mikrostrukturierten Systemen*, Chemie Ingenieur Technik, 76, (4), 376-383, **2004**.
- Landfester, K., Bechthold, N., Tiarks, F., Antonietti, M.: *Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions*, Macromolecules(USA), 32, (16), 5222-5228, **1999**.
- Leick, S., Degen, P., Köhler, B., Rehage, H.: *Film formation and surface gelation of gelatin molecules at the water/air interface*, Physical Chemistry Chemical Physics, 11, 2468-2474, **2009**.
- Leick, S., Henning, S., Degen, P., Suter, D., Rehage, H.: *Deformation of liquid-filled calcium alginate capsules in a spinning drop apparatus*, Physical Chemistry Chemical Physics, 12, (12), 2950-2958, **2010**.
- Leo, A., Hansch, C., Elkins, D.: *Partition Coefficients and Their Uses*, Chemical Reviews, 71, (6), 525-616, **1971**.

Literaturverzeichnis

- Lewis, C. E., Walker, J. R. L., Lancaster, J. E.: *Effect of Polysaccharides on the Color of Anthocyanins*, Food Chemistry, 54, (3), 315-319, **1995**.
- Lin, S. T., Sandler, S. I.: *Infinite dilution activity coefficients from ab initio solvation calculations*, AIChE Journal, 45, (12), 2606-2618, **1999**.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Perez, A., Rodriguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Perez-Alonso, C., Vernon-Carter, E. J.: *Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W-1/O/W-2 emulsions and skim milk*, LWT Food Sci. Technol., 41, (10), 1847-1856, **2008**.
- Magdassi, S., Garti, N.: *A Kinetic Model for Release of Electrolytes from Water in Oil in Water Multiple Emulsions*, Journal of controlled Release, 3, (4), 273-278, **1986**.
- Mao, L. K., Xu, D. X., Yang, J., Yuan, F., Gao, Y. X., Zhao, J.: *Effects of Small and Large Molecule Emulsifiers on the Characteristics of beta-Carotene Nanoemulsions Prepared by High Pressure Homogenization*, Food Technology and Biotechnology, 47, (3), 336-342, **2009**.
- Markakis, P.: *Stability of Anthocyanins in Foods*, Markakis, P. (Ed.). Food Science and Technology: A Series of Monographs: Anthocyanins As Food Colors. Xiii+263P. Academic Press: New York, N. Y. , Usa; London, England. Illus, 163-180, **1982**.
- Markakis, P., Livingston, G. E., Fellers, C. R.: *Quantitative Aspects of Strawberry Pigment Degradation*, Food Technology, 10, (12), 31-31, **1956**.
- Markakis, P., Lurd, L.: *Anthocyanins and their stability in foods*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 4, (4), 437-456, 10.1080/10408397409527165, **1974**.
- Marti-Mestres, G., Nielloud, F.: *Emulsions in health care applications - An overview*, Journal of dispersion science and technology, 23, (1-3), 419-439, **2002**.
- Matsumoto, S., Inoue, T., Kohda, M., Ikura, K.: *Water permeability of oil layers in w/o/w emulsions under osmotic pressure gradients*, J. Colloid Interface Sci., 77, (2), 555-563, **1980**.
- Matsumoto, S., Kang, W. W.: *Formation and Applications of Multiple Emulsions*, Journal of dispersion science and technology, 10, (4-5), 455-482, **1989**.
- Maubois, J. L., Fauquant, J., Famelart, M. H., Caussin, F.: *Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives*, 3rd International Whey Conference (Munich), 59-72, **2001**
- Mazza, G., Brouillard, R.: *Color Stability and Structural Transformations of Cyanidin 3,5-Diglucoside and 4 3-Deoxyanthocyanins in Aqueous-Solutions*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35, (3), 422-426, **1987a**.
- Mazza, G., Brouillard, R.: *Recent Developments in the Stabilization of Anthocyanins in Food-Products*, Food Chemistry, 25, (3), 207-225, **1987b**.

Literaturverzeichnis

- Mazza, G., Brouillard, R.: *The Mechanism of Copigmentation of Anthocyanins in Aqueous-Solutions*, *Phytochemistry*, 29, (4), 1097-1102, **1990**.
- McClements, D. J.: *Food emulsions: Principles, practice and techniques.*, CRC Press., Boca Raton, FL: **2005**.
- McClements, D. J., Decker, E. A.: *Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems*, *Journal of Food Science*, 65, (8), 1270-1282, **2000**.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y.: *Physicochemical and structural aspects of lipid digestion* in *Understanding and Controlling the Microstructure of Complex Foods* (Editor: McClements, D. J.), 483-503, CRC Press, Boca Raton, FL, 2042-8049(print), **2007**.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J.: *Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, (6), 577-606, **2009**.
- McClements, D. J., Dickinson, E.: *Advances In Food Colloids*, Springer, 978-0-7514-0203-2, **1996**.
- McConnell, E. L., Fadda, H. M., Basit, A. W.: *Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery*, *International Journal of Pharmaceutics*, 364, (2), 213-226, **2008**.
- Mechbal, N., Bousmina, M.: *In situ observations of unusual drop deformation and wobbling in simple shear flow*, *Rheologica Acta*, 48, 653-663, **2009**.
- Merken, H. M., Beecher, G. R.: *Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (3), 577-599, **2000**.
- Meschter, E. E.: *Effects of Carbohydrates and Other Factors on Strawberry Products*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, (8), 574-579, **1953**.
- Mezzena, R., Folmer, B. M., Hughes, E.: *Design of double emulsions by osmotic pressure tailoring*, *Langmuir*, 20, (9), 3574-3582, **2004**.
- Michaut, F., Perrin, P., Hebraud, P.: *Interface composition of multiple emulsions: Rheology as a probe*, *Langmuir*, 20, (20), 8576-8581, **2004**.
- Middleton, E.: *Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function*, *Flavonoids in the Living System*, 439, 175-182, **1998**.
- Mighri, F., Carreau, P. J.: *Influence of elastic properties on drop deformation and breakup in shear flow*, *Journal of Rheology*, 42, (6), 1477-1490, **1998**.
- Mollet, H., Grubenmann, A.: *Formulierungstechnik - Emulsionen, Suspensionen, Feste Formen*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.

Literaturverzeichnis

- Müller, R. H., Böhm, B. H. L., Grau, N. J.: *Nanosuspensionen - Formulierungen für schwerlösliche Arzneistoffe mit geringer Bioverfügbarkeit. 1. Mitteilung: Herstellung und Eigenschaften*, Pharm. Ind., 61, (1), 64-78, **1999**.
- Mun, S., Decker, E. A., McClements, D. J.: *Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase*, Food Res. Int., 40, (6), 770-781, **2007**.
- Muschiolik, G., Bunjes, H.: *Multiple Emulsionen - Herstellung und Eigenschaften*, 1. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, **2007**.
- Nagasawa, K., Ohgata, K., Takahashi, K., Hattori, M.: *Role of the polysaccharide content and net charge on the emulsifying properties of beta-lactoglobulin-carboxymethyldextran conjugates*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, (9), 2538-2543, **1996**.
- Nakagawa, K., Kawagoe, M., Yoshimura, M., Arata, H., Minamikawa, T., Nakamura, M., Matsumoto, A.: *Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generators in hepatic lysosomal fractions of mice*, Journal of Health Science, 46, (6), 509-512, **2000**.
- Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K.: *New Antimicrobial Characteristics of Lysozyme Dextran Conjugate*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, (4), 647-650, **1991**.
- Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K.: *Bifunctional Lysozyme Galactomannan Conjugate Having Excellent Emulsifying Properties and Bactericidal Effect*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, (5), 735-739, **1992a**.
- Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K.: *Enhanced Antioxidative Effect of Ovalbumin Due to Covalent Binding of Polysaccharides*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, (11), 2033-2037, **1992b**.
- Nakashima, T., Shimizu, M., K. M.: *Membrane Emulsification Operation Manual*, **1991**.
- Narayanan, J., Deotare, V. W., Bandyopadhyay, R., Sood, A. K.: *Gelation of aqueous pectin solutions: A dynamic light scattering study*, J. Colloid Interface Sci., 245, (2), 267-273, **2002**.
- Nebesky, E. A., Esselen, W. B., McConnell, J. E. W., Fellers, C. R.: *Stability of Color in Fruit Juices*, Food Research, 14, (3), 261-274, **1949**.
- Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., Voutilainen, S.: *Metabolism of Berry Anthocyanins to Phenolic Acids in Humans*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, (6), 2274-2281, **2009**.
- Opawale, F. O., Burgees, D. J.: *Influence of interfacial properties of lipophilic surfactants on water-in-oil emulsion stability*, J. Colloid Interface Sci., 197, 142-150, **1998a**.

Literaturverzeichnis

- Opawale, F. O., Burgess, D. J.: *Influence of interfacial rheological properties of mixed emulsifier films on the stability of water-in-oil-in-water emulsions*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 50, (9), 965-973, **1998b**.
- Paalsgard - Dänemark: Molmasse und Struktur von PGPR, **2010** (Persönliche Mitteilung).
- Pafumi, Y., Lairon, D., de la Porte, P. L., Juhel, C., Storch, J., Hamosh, M., Armand, M.: *Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase*, Journal of Biological Chemistry, 277, (31), 28070-28079, **2002**.
- Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., Leal-Calderon, F.: *Double emulsions: how does release occur?*, Journal of controlled Release, 79, (1-3), 193-205, **2002**.
- Peng, S. J., Williams, R. A.: *Controlled production of emulsions using a crossflow membrane*, Particle & Particle Systems Characterization, 15, (1), 21-25, **1998**.
- Pothakamury, U. R., BarbosaCanovas, G. V.: *Fundamental aspects of controlled release in foods*, Trends Food Sci. Technol., 6, (12), 397-406, **1995**.
- Powell, D. A., Morris, E. R., Gidley, M. J., Rees, D. A.: *Conformations and Interactions of Pectins .2. Influence of Residue Sequence on Chain Association in Calcium Pectate Gels*, Journal of Molecular Biology, 155, (4), 517-531, **1982**.
- Prausnitz, J. M., Lichtenthaler, R. M., de Azevedo, E. G.: *Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase-Equilibria*, 3rd, Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, NJ, 0-13-977745-8, **1999**.
- Prior, R. L., Wu, X. L.: *Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities*, Free Radical Research, 40, (10), 1014-1028, **2006**.
- Rechkemmer, G., Watzl, B.: *Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe auf die Gesundheit*, Ernährungsbericht 2004, Kap. 7, 325-346, **2004**.
- Regan, J. O., Mulvihill, D. M.: *Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate*, Food Hydrocolloids, 23, (8), 2339-2345, **2009**.
- Reid, R. C., Prausnitz, J. M., Poling, B. E.: *The Properties of Gases and Liquids*, 5th, McGraw-Hill, New York, 0-07-011682-2, **2001**.
- Ribeiro, H. S., Schuchmann, H. P., Engel, R., Briviba, K., Walz, E.: *Encapsulation of Carotenoids and Vitamins*. in Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing (Editor: Zuidam, N. J. and Nedovic, V. A.), Springer Heidelberg, **2009**.
- Robinson, G. M.: *Notes on Variable Colors of Flower Petals*, J. Am. Chem. Soc., 61, (6), 1606-1607, 10.1021/ja01875a510, **1939**.

Literaturverzeichnis

- Robinson, G. M., Robinson, R.: *A survey of anthocyanins. I*, Biochemical Journal, 25, (5), 1687-1705, **1931**.
- Rondon-Gonzalez, M., Madariaga, L. F., Sadtler, V., Choplin, L., Salager, J. L.: *Emulsion Catastrophic Inversion from Abnormal to Normal Morphology. 8. Effect of Formulation on the Inversion Produced by Continuous Stirring*, Ind. Eng. Chem. Res., 48, (6), 2913-2919, **2009**.
- Rosano, H. L., Gandolfo, F. G., Hidrot, J. D. P.: *Stability of W-1/O/W-2 multiple emulsions - Influence of ripening and interfacial interactions*, Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects, 138, (1), 109-121, **1998**.
- Ross, S. L., Verhoff, F. H., Curl, R. L.: *Droplet Breakage and Coalescence Processes in an Agitated Dispersion. 2. Measurement and Interpretation of Mixing Experiments*, Ind. Eng. Chem. Fundamen., 17, (2), 101-108, **1978**.
- Rothwell, J. A., Day, A. J., Morgan, M. R. A.: *Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, (11), 4355-4360, **2005**.
- Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F. C.: *Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity*, Molecular Nutrition & Food Research, 51, (12), 1461-1471, **2007**.
- Salager, J. L.: *Emulsion Phase Inversion Phenomena* in Emulsions and Emulsion Stability (Editor: Johan Sjöblom), CRC Press, 9780824726959, **2006**.
- Salager, J. L., Anton, R. E., Briceno, M. I., Choplin, L., Marquez, L., Pizzino, A., Rodriguez, M. P.: *The emergence of formulation engineering in emulsion making - transferring know-how from research laboratory to plant*, Polym. Int., 52, (4), 471-478, **2003**.
- Sandler, S. I.: *Chemical and Engineering Thermodynamics*, 4th, John Wiley & Sons Inc., 0-471-66174-0, **2006**.
- Scherze, I., Knoth, A., Muschiolik, G.: *Effect of emulsification method on the properties of lecithin- and PGPR-stabilized water-in-oil-emulsions*, Journal of dispersion science and technology, 27, (4), 427-434, **2006**.
- Schubert, H.: *Emulgiertechnik*, 1, Behr's Verlag, Hamburg, 3-89947-086-9, **2005**.
- Schuch, A., Bernewitz, R., Frank, K., Wolf, F.: *Multiple Emulsionen* in Emulgiertechnik (in press) 2. Auflage, (Editor: Schuchmann, H. P. and Köhler, K.), Behr's Verlag, Hamburg, **2012**.
- Schuchmann, H. P.: *Emulgieren und Schäumen* in Lebensmittelverfahrenstechnik: Rohstoffe - Prozesse - Produkte (Editor: Schuchmann, H. P. and Schuchmann, H.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2005**.
- Schuchmann, H. P.: *Emulsification Techniques for the Formulation of Emulsions and Suspensions* in Product Design and Engineering: Best Practices (Editor: Bröckel, U.,

Literaturverzeichnis

- Meier, W., and Wagner, G.), 63-93, Wiley-VCH, Weinheim, 978-3-527-31529-1, **2007**.
- Schuchmann, H. P., Schuchmann, H.: *Lebensmittelverfahrenstechnik: Rohstoffe - Prozesse - Produkte*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 3-527-31230-7, **2005**.
- Schultz, S., Wagner, G., Ulrich, J.: *Hochdruckhomogenisation als ein Verfahren zur Emulsionsherstellung*, Chemie Ingenieur Technik, 74, 10.1002/1522-2640(200207)74:7<901::AID-CITE901>3.0.CO;2-7, **2002**.
- Segal, B., Negutz, G.: *Zur thermischen Zersetzung von Keracyanin*, Die Nahrung, 13, (6), 531-535, **1969**.
- Shenoy, V. R.: *Anthocyanins - Prospective Food Colors*, Current Science, 64, (8), 575-579, **1993**.
- Shinoda, K., Arai, H.: *The correlation between phase inversion temperature in emulsion and cloud point in solution of nonionic emulsifier*, The Journal of Physical Chemistry, 68, (12), 3485-3490, **1964**.
- Shu, Y. W., Sahara, S., Nakamura, S., Kato, A.: *Effects of the length of polysaccharide chains on the functional properties of the Maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, (9), 2544-2548, **1996**.
- Smith, M. R., Wilson, R., Hepburn, P. A.: *Assessment of the Carcinogenic Potential of Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR) in Rats and Mice*, Food and Chemical Toxicology, 36, (9-10), 747-754, **1998**.
- Stieß, M.: *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikeltechnologie I*, Berlin Heidelberg, 978-3-540-32551-2, **2009**.
- Stone, H. A.: *Dynamics of Drop Deformation and Breakup in Viscous Fluids*, Annual Review of Fluid Mechanics, 26, 65-102, **1994**.
- Sugiura, S., Nakajima, M., Iwamoto, S., Seki, M.: *Interfacial tension driven monodispersed droplet formation from microfabricated channel array*, Langmuir, 17, (18), 5562-5566, **2001**.
- Surh, J., Vladisavljevic, G. T., Mun, S., McClements, D. J.: *Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, (1), 175-184, **2007**.
- Suzuki, K., Shuto, I., Hagura, Y.: *Characteristics of the membrane emulsification method with preliminary emulsification for preparing corn oil-in-water emulsions*, Food Science Technology International, 2, (1), 43-47, **1996**.
- Szyszkowski, B. v.: *Experimentelle Studien über kapillare Eigenschaften der wässrigen Lösungen von Fettsäuren*, Zeitschrift der physikalischen Chemie, 64, 385-414, **1908**.

Literaturverzeichnis

- Tadros, T. F.: *Emulsion Stability* in Encyclopedia of emulsion technology, Volume 1: Basic theory (Editor: Becher, P.), 129-285, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, **1983**.
- Tadros, T. F.: *Applied Surfactants: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 3-527-30629-3, **2005**.
- Takeoka, G., Dao, L.: *Anthocyanins* in Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals Second Edition, (Editor: Hurst, W. J.), CRC Press, 978-0-8493-7314-5, **2008**.
- Tantschev, St., Jontschewa, N.: *Kinetik des thermischen Abbaues der Anthocyane Pelargonidin-3-Glucosid und Cyanidin-3-Glucosid*, Die Nahrung, 19, (8), 629-633, 10.1002/food.19750190803, **1975**.
- Teller, N., Thiele, W., Boettler, U., Sleeman, J., Marko, D.: *Delphinidin inhibits a broad spectrum of receptor tyrosine kinases of the ErbB and VEGFR family*, Molecular Nutrition&Food Research, 53, (9), 1075-1083, **2009**.
- Tesch, S.: *Charakterisieren mechanischer Emulgierverfahren: Herstellen und Stabilisieren von Tropfen als Teilschritte beim Formulieren von Emulsionen*, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), **2002**.
- Thibault, J. F., Rinaudo, M.: *Chain Association of Pectic Molecules During Calcium-Induced Gelation*, Biopolymers, 25, (3), 455-468, **1986**.
- Tinsley, J. T., Bockian, A. H.: *Some effects of sugar on the breakdown of pelargonidin-3-glucoside in model systems at 90° C*, Food Research, 161-172, **1960**.
- Töpel, A.: *Chemie und Physik der Milch*, 3, Behr's Verlag, 3899471318, **2004**.
- Tsai, P. J., Hsieh, Y. Y., Huang, T. C.: *Effect of sugar on anthocyanin degradation and water mobility in a roselle anthocyanin model system using O-17 NMR*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, (10), 3097-3099, **2004**.
- Tsukihara, T., Honda, Y., Sakai, R., Watanabe, T., Watanabe, T.: *Mechanism for oxidation of high-molecular-weight substrates by a fungal versatile peroxidase, MnP2*, Applied and Environmental Microbiology, 74, (9), 2873-2881, **2008**.
- Uskokovic, V., Drofenika, M.: *Reverse micelles: Inert nano-reactors or physico-chemically active guides of the capped reactions*, Adv Colloid Interface Sci, 133, 23-34, **2007**.
- Utada, A. S., Chu, L. Y., Fernandez-Nieves, A., Link, D. R., Holtze, C., Weitz, D. A.: *Dripping, Jetting, Drops, and Wetting: The Magix of Microfluidics*, MRS Bulletin, 32, 702-708, **2007**.
- Utada, A. S., Lorenceau, E., Link, D. R., Kaplan, P. D., Stone, H. A., Weitz, D. A.: *Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device*, Science, 308, (5721), 537-541, **2005**.

Literaturverzeichnis

- Van Aken, G. A.: *Relating food microstructure to sensory quality* in Understanding and Controlling the Microstructure of Complex Foods (Editor: McClements, D. J.), 449-482, CRC Press, Boca Raton, FL, 2042-8049(print), **2007**.
- Vladislavljevic, G. T., Schlender, M.: *Emulgieren mit mikrostrukturierten Systemen* in Emulgiertechnik (in press) 2. Auflage (Editor: Schuchmann, H. P. and Köhler, K.), Behr's Verlag, Hamburg, **2012**.
- Vrij, A.: *Polymers at Interfaces and Interactions in Colloidal Dispersions*, Pure and Applied Chemistry, 48, (4), 471-483, **1976**.
- Walstra, P.: *Formation of Emulsions* in Encyclopedia of Emulsion Technology, Vol. 1: Basic Theory (Editor: Becher, P.), 57-127, Marcel Dekker, Inc., New York, **1983**.
- Walstra, P.: *Principles of Emulsion Formation*, Chem. Eng. Sci., 48, (2), 333-349, **1993**.
- Walstra, P., Smulders, P. E. A.: *Emulsion Formation* in Modern Aspects of Emulsion Science (Editor: B.P.Binks), 56-99, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1998**.
- Wang, L. S., Stoner, G. D.: *Anthocyanins and their role in cancer prevention*, Cancer Letters, 269, (2), 281-290, **2008**.
- Wang, L. Y., Ma, G. H., Su, Z. G.: *Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug*, Journal of controlled Release, 106, 62-75, **2005**.
- Wang, W. D., Xu, S. Y.: *Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate*, J Food Eng, 82, (3), 271-275, **2007**.
- Watzl, B., Briviba, K., Rechkemmer, G.: *Anthocyane*, Ernährungs-Umschau, 49, (4), 148-140, **2002**.
- Watzl, B., Leitzmann, C.: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*, 3, Verlag: Hippokrates, 3830453086, **2005**.
- Weiß, J.: *Untersuchungen zur Permeation verkapselter hydrophiler nutritiver Zusätze durch unterschiedlich strukturierte Lebensmittelmatriices*, Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2006**.
- Wilson, R., Smith, M.: *Human studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR)*, Food and Chemical Toxicology, 36, (9-10), 743-745, **1998**.
- Wolf, F., Schuch, A., Köhler, K., Schuchmann, H. P.: *Ansatz zur Beschreibung der zerkleinerungsrelevanten Strömungsverhältnisse beim Emulgieren von W/O-Emulsionen mit Lochblenden*, Chemie Ingenieur Technik, **2011**.
- Wrolstad, R. E., Skrede, G., Lea, P., Enersen, G.: *Influence of Sugar on Anthocyanin Pigment Stability in Frozen Strawberries*, Journal of Food Science, 55, (4), 1064-1065, **1990**.

Literaturverzeichnis

Wu, X. L., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L.: *Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, (11), 4069-4075, **2006**.

Zatz, J. L., Cueman, G. H.: *Assessment of Stability in Water-In-Oil-In-Water Multiple Emulsions*, Journal of the Society of Cosmetic Chemists, 39, (3), 211-222, **1988**.

Formelzeichen und Abkürzungen

Lateinische Formelzeichen

a	relative Anthocyankonzentration	-
A	Absorption	-
b	Exponent	-
C	Kollisionsfrequenz	$s^{-1} m^{-3}$
c	Konzentration	$mg l^{-1}$
c (t)	Konzentration zur Zeit t; nach thermischer oder mechanischer Belastung	$mg l^{-1}$
c (t ₀)	Konzentration vor thermischer oder mechanischer Belastung	$mg l^{-1}$
c _{A,GGW}	Gleichgewichtskonzentration an Anthocyanen	$mg l^{-1}$
c _{E,ges}	Notwendige Emulgatormenge zur vollständigen Belegung der Phasengrenzflächen	$mol l^{-1}$
c _{Lj}	Konzentration der Anthocyanmoleküle in der entsprechenden flüssigen Phase, j = 1, 2	$mg l^{-1}$
d _{3,2}	alternative Bezeichnung für den Sauterdurchmesser, insbesondere in englischsprachiger Literatur	m
E	Energie	J
E _A	Aktivierungsenergie	$J mol^{-1}$
E _V	volumenspezifischer Energieeintrag (Energiedichte)	$J m^{-3}$
F	Freisetzungsfaktor	-
g	Erdbeschleunigung	$m s^{-2}$
G'	Speichermodul	Pa
G''	Verslustmodul	Pa
h _{krit}	kritische Filmdicke	m

Formelzeichen und Abkürzungen

J	Flüssigkeitsstrom	$\text{kg s}^{-1} \text{ m}^{-2}$
k(T)	Temperaturabhängiger Geschwindigkeitskoeffizient	s^{-1}
k_0	Frequenzfaktor	s^{-1}
k_1	Konstante	N m^{-1}
k_2	Konstante	l mol^{-1}
K	Konstante	-
L_p	Permeabilitätskoeffizient der Ölmembran für Wasser	s m^{-1}
m	Masse	g
\dot{m}	Massestrom	g s^{-1}
M_W	molare Masse	g mol^{-1}
n	Anzahl an Tropfen pro Volumen	m^{-3}
p	Druck	$\text{bar} = 10^5 \text{ Pa}$
p_k	Kapillar- bzw. Laplace-Druck	Pa
p_{Koal}	Koaleszenzwahrscheinlichkeit	-
P	Leistung	W
P	Verteilungskoeffizient	-
P_{Leerlauf}	Leerlaufleistung	W
P_{Prozess}	im Prozess gemessene Leistung	W
P_V	volumenspezifischer Leistungseintrag (Leistungsdichte)	W m^{-3}
\bar{P}_V	mittlerer volumenspezifischer Leistungseintrag	W m^{-3}
Q_3	Volumenverteilungssumme	%
r	Konstante	-
R	universelle Gaskonstante	J (K mol)^{-1}
t	Lagerzeit	d
$t_{\text{def,krit}}$	kritische Deformationszeit	s
t_{Drain}	Drainagezeit	s

Formelzeichen und Abkürzungen

t_{Heiz}	Heizdauer	s
t_{Koll}	Kollisionszeit	s
t_{merge}	Zeit zwischen Haftung und Koaleszenz	s
t_{Sep}	Separationszeit	s
T	Temperatur	K, °C
t_V	Verweilzeit	s
\bar{t}_V	mittlere Verweilzeit	s
\dot{V}	Volumenstrom	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$
V	Volumen	m^3
V_1	Volumen des Wassers in W_1	m^3
V_2	Volumen des Wassers in W_2	m^3
v	Geschwindigkeit	m s^{-1}
v_{St}	Sedimentationsgeschwindigkeit nach Stokes	m s^{-1}
$v_{\text{St,eff}}$	effektive Sedimentationsgeschwindigkeit	m s^{-1}
v_U	Umfangsgeschwindigkeit	m s^{-1}
x	Durchmesser	m
$x_{50,3}$	50 %-Quantil der Volumenverteilung bzw. Medianwert der Verteilung	m
$x_{90,3}$	90 %-Quantil der Volumenverteilung	m
$x_{1,2}$	Sauterdurchmesser	m

Griechische Formelzeichen

ρ	Dichte	kg m^{-3}
Φ	Funktion	-
γ	Grenzflächenspannung	N m^{-1}
γ_0	Grenzflächenspannung ohne Emulgator	N m^{-1}
$\dot{\gamma}$	Scherrate	s^{-1}
Γ_{max}	maximale Grenzflächenbelegungsichte	mol m^{-2}

Formelzeichen und Abkürzungen

η	dynamische Viskosität	Pa s
φ	innerer Dispersphasenanteil: Massenanteil an W_1 -Tropfen bezogen auf die W_1/O -Emulsion	%
φ_V	Volumenanteil an disperser Phase	-
$\varphi_{V,krit}$	Volumenanteil an disperser Phase bei dichtester Packung	-
$\varphi_{W/O}$	äußerer Dispersphasenanteil: Massenanteil an (W_1/O) -Tropfen bezogen auf die $W_1/O/W_2$ -Emulsion	%
λ	Viskositätsverhältnis der Viskosität der dispersen Phase bezogen auf die Viskosität der kontinuierlichen Phase	-
λ	Wellenlänge	nm
Π	Osmotischer Druck	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$
σ	deformierende Spannung	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$
σ_η	viskose Spannung	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$
Ω	Koaleszenzrate	$\text{s}^{-1} \text{m}^{-3}$

Indizes

A	Anthocyane
d	disperse Phase
e	Emulsion
E	Emulgator
F	Freisetzungsmedium
HE	Heidelbeerextrakt
j	Phase 1 oder 2 bei Berechnung des Verteilungskoeffizienten
k	kontinuierliche Phase
W_1	W_1 -Phase
W_2	W_2 -Phase

Abkürzungen

CaCl ₂	Calciumchlorid
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
COSMO	Conductor-like Screening Model
COSMO-RS	Conductor-like Screening Model for Real Solvents
DAD	Diodenarraydetektor
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EU	Europäische Union
FPIA	Flow Particle Image Analyzer
GCM	Group Contribution Method
GS	Gallensäure
HDH	Hochdruckhomogenisator
HE	Heidelbeerextrakt
HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance
HMF	5-Hydroxy-Methylfurfural
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HT29	humane Kolonkarzinomzellen
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KM	Kolloidmühle
Konjugat	Protein-Polysaccharid-Konjugat
LLE	Liquid Liquid Equilibrium
MCT	Medium Chain Triglyceride
MPI	Molkenproteinisolat
MS	Massenspektroskopie
NaCl	Natriumchlorid

Formelzeichen und Abkürzungen

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRTL	Non Random Two Liquid
O/W	Öl-in-Wasser-Emulsion
O/W/O	Öl-in-Wasser-in-Öl-Emulsion
pEGFR	phosphorylierter epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
PGPR	Polyglycerin-Polyricinoleat
PIDS	Polarized Intensity Differential Scattering
PIT	Phaseninversionstemperatur
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RSM	Rotor-Stator-Maschine
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
SLE	Solid Liquid Equilibrium
SRB	Sulforhodamin B
UNIFAC	Universal Quasichemical Functional Group Activity Coefficients
UNIQUAC	Universal Quasichemical
USDA	United State Department of Agriculture
VLE	Vapor Liquid Equilibrium
W ₁	innere Wasserphase
W ₂	äußere Wasserphase
W/O	Wasser-in-Öl-Emulsion
W/O/W	Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion
ZKDM	Zahnkranzdispergiermaschine
ZZulV	Zusatzstoff-Zulassungsverordnung

Dimensionslose Kennzahlen

Ca	Kapillar-Zahl	-
Oh	Ohnsorge-Zahl	-
Re	Reynolds-Zahl	-

Formelzeichen und Abkürzungen

We Weber-Zahl -

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	Schematische Darstellung der Struktur von Doppelemulsionen: links: $W_1/O/W_2$ Emulsion, rechts: $O_1/W/O_2$ -Emulsion.	5
Abb. 2-2:	Schematische Darstellung der möglichen Destabilisierungsmechanismen in multiplen Emulsionen vom Typ $W_1/O/W_2$	12
Abb. 2-3:	Abhängigkeit der laminaren kritischen Kapillar-Zahl $Ca_{lam,krit}$ vom Viskositätsverhältnis λ , nach [Grace, 1982].	21
Abb. 2-4:	Schematische Darstellung der zur Tropfenkoaleszenz in Emulsionen führenden Vorgänge [Danner, 2001].	24
Abb. 2-5:	Struktur der Pektinhauptketten.	30
Abb. 2-6:	Kernaglykon der Anthocyane und die wichtigsten in der Natur vorkommenden Anthocyanidine (nach [Mazza et al., 1987b; Prior et al., 2006]).	33
Abb. 2-7:	Struktur einiger ausgewählter, natürlich vorkommender Anthocyane, nach [Fleschhut, 2004].	35
Abb. 2-8:	Strukturelle Veränderung der Anthocyane in Abhängigkeit des pH-Wertes. R^1, R^2 : H, OH oder OCH_3 . R^3 : Glykosyl, R^4 : H oder Glykosyl, nach [Brouillard et al., 1977a; Mazza et al., 1987b].	36
Abb. 2-9:	Spektrum von Cyanidin-3,5-Diglucosid bei verschiedenen pH-Werten, nach [Mazza et al., 1987a; Hubbermann, 2005].	37
Abb. 2-10:	Produkt aus der Hydrolyse des angeregten Flavyliumkations bei photochemischer Degradation nach [Furtado et al., 1993]. R^1, R^2 : H, OH oder CH_3	40
Abb. 2-11:	Theorie zum Anthocyanzerfall, nach [Markakis 1957] (oben), und [Adams et al., 1973b] (unten). Zeichnung nach [Jackman et al., 1987]. Gly = Glykosid.	42
Abb. 3-1:	Struktur von PGPR. Die Reste R_1, R_2 sowie R_3 am Polyglycerinmolekül können Wasserstoff oder Polyricinoleat sein. Nach [Wilson et al., 1998].	54
Abb. 3-2:	Zweistufiges Emulgierverfahren zur Herstellung von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen. Im ersten Schritt wird eine W_1/O -Emulsion hergestellt. Im zweiten Schritt wird diese W_1/O -Emulsion in der W_2 -Phase emulgiert.	65
Abb. 3-3:	Schematischer Aufbau der durchgeführten Freisetzungsversuche. 71	
Abb. 4-1:	Relative Anthocyankonzentration von HE-Lösungen in Abhängigkeit der Lagerzeit. Lagerung bei Raumtemperatur in	

	Puffern mit unterschiedlichem pH-Wert und in demineralisiertem Wasser. $c_{HE} = 200 \mu\text{g/ml}$	78
Abb. 4-2:	Einfluss von Pektin auf die Anthocyanstabilität in wässriger HE-Lösung über der Lagerzeit. $c_{HE} = 5025 \mu\text{g/ml}$	79
Abb. 4-3:	Einfluss thermischer Behandlung auf den Anthocyanabbau. Abnahme der relativen Anthocyankonzentration $a(t)$ in HE-Lösungen. Die durchgezogenen Linien beschreiben die nach Kapitel 2.5.4 angepassten Modelle 1. Ordnung [Frank et al., 2012].	80
Abb. 4-4:	Einfluss kombinierter thermischer und mechanischer Beanspruchung auf den Anthocyanabbau. Relative Anthocyankonzentration a wässriger HE-Lösungen (pH = 3,5) vor ($\Delta p = 0 \text{ bar}$) und nach der Hochdruckbehandlung bei verschiedenen Homogenisierdrücken Δp . Offene Symbole (\circ): Probertemperatur vor dem Homogenisieren ($\Delta p = 0 \text{ bar}$) und nach dem Düsenaustritt. Verweilzeit im Hochdruckhomogenisator und Auslaufrohr (= Zeit bis die Probe wieder auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt ist): $t_{V,HDH} = 105 \text{ s}$ [Frank et al., 2012]. .	81
Abb. 5-1:	Zentrifugierte W_1/O -Emulsionen mit verschiedenen hydrophilen Farbstoffen. Die Farbe der aufgerahmten Ölphase entspricht bei allen Systemen der Farbe des in W_1 eingebrachten Farbstoffs. Farbstoffanteil in der W_1 -Phase der Emulsion, vor dem Zentrifugieren: 0,05 %. PGPR-Anteil in der Ölphase: 2,5 % [Frank et al., 2011a].	84
Abb. 5-2:	Spektrum einer heidelbeerextrakthaltigen Wasserphase, verdünnt mit Wasser und HCl nach Bonerz (2006) (Verdünnungsfaktor = 20), und einer aus einer W_1/O -Emulsion zentrifugierten Ölphase [Frank et al., 2011a].	87
Abb. 5-3:	Emulgatorkonzentration c_E der hergestellten Emulsionen sowie $c_{E,ges}$ für Emulsionen in Abhängigkeit des Sauterdurchmessers $x_{1,2}$. Grau unterlegt: Emulgatorkonzentration c_E in der Emulsion ist niedriger als $c_{E,ges}$	89
Abb. 5-4:	Sauterdurchmesser anthocyanhaltiger W_1/O -Emulsionen und Absorption der zentrifugierten Ölphasen derselben W_1/O -Emulsionen bei $\lambda = 520 \text{ nm}$ [Frank et al., 2011a].	90
Abb. 5-5:	Spektren anthocyanhaltiger Ölphasen. Pflanzenöl mit 0,05 und 0,5 % HE wurde bei einem Homogenisierdruck von $\Delta p = 1000 \text{ bar}$ beansprucht. Nach dem Homogenisieren wurden unlösliche Extraktbestandteile durch Zentrifugieren entfernt bevor die klaren Lösungen spektralphotometrisch untersucht wurden.	92

Abb. 6-1:	Einfluss der Calciumchloridkonzentration auf die statische Grenzflächenspannung an der ebenen Grenzfläche von Wasser (pH 3,5) mit CaCl ₂ zu Pflanzenöl mit 2,5 % PGPR. Messmethode: Wilhelmy-Platte, Dataphysics, T = 50 °C.	99
Abb. 6-2:	Einfluss von CaCl ₂ und Pektin (ungeliert) auf die Mikrostruktur von W ₁ /O-Emulsionen.	100
Abb. 6-3:	Einfluss der Pektinkonzentration auf die Mikrostruktur von W ₁ /O-Emulsionen.	101
Abb. 6-4:	Einfluss verschiedener Calciumchloridkonzentrationen auf die Mikrostruktur der W ₁ /O-Emulsionen.	102
Abb. 6-5:	Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren in der ZKDM auf den Sauterdurchmesser von W ₁ /O-Emulsionen.	104
Abb. 6-6:	Einfluss der Passagenzahl beim Emulgieren in der ZKDM bei einer Umfangsgeschwindigkeit von 23 m/s auf die Mikrostruktur der W ₁ /O-Emulsionen.	105
Abb. 6-7:	Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von pektinhaltigen W ₁ /O-Emulsionen, hergestellt im Hochdruckhomogenisator.	106
Abb. 6-8:	Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren im HDH und in der ZKDM auf den x _{90,3} -Durchmesser von W ₁ /O-Emulsionen.	107
Abb. 6-9:	Einfluss des HE-Anteils auf die Mikrostruktur von W ₁ /O-Emulsionen.	109
Abb. 6-10:	Dunkelrot gefärbtes Sediment am Boden von pektinhaltigen W ₁ /O-Emulsionen mit Heidelbeerextraktanteilen von mehr als 0,5 % in der W ₁ -Phase.	109
Abb. 6-11:	Mikroskopische Aufnahmen des Sediments. Zeiss Axioskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland), 100 bis 1000-fache Vergrößerung, (TU München).	109
Abb. 6-12:	Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von W ₁ /O-Emulsionen.	112
Abb. 6-13:	Einfluss von Calciumchlorid, Pektin und Heidelbeerextrakt auf die Lagerstabilität von W ₁ /O-Emulsionen.	114
Abb. 6-14:	Einfluss der HE-Konzentration in der wässrigen Phase auf die Grenzflächen-spannung an der Öl-Wasser-Grenzfläche.	115
Abb. 6-15:	Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Lagerstabilität von W ₁ /O-Emulsionen.	115
Abb. 7-1:	Dynamische Grenzflächenspannung der verwendeten hydrophilen Emulgatoren bei T = 20 °C.	119
Abb. 7-2:	Einfluss des verwendeten hydrophilen Emulgators (→ Emulgator kinetik) und der eingestellten Spaltweite der KM (→	

	Energiedichte) auf den Sauterdurchmesser der W_1/O -Tropfen [Frank et al., 2011b].....	120
Abb. 7-3:	Verteilungssumme $Q_3(x)$ der W_1/O -Tropfen von Doppelemulsionen stabilisiert mit einem langsamen (MPI) oder einem schnellen Emulgator (GS). Einstellung der Viskosität der kontinuierlichen Phase durch Zugabe von 0 % oder 1,5 % Pektin.	122
Abb. 7-4:	Einfluss des Dispersphasenanteils auf den $x_{90,3}$ -Durchmesser von W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit verschiedenen Emulgatoren. HE-Anteil in W_1 : 0,5 %.	124
Abb. 7-5:	Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von MPI-stabilisierten Emulsionen.	125
Abb. 8-1:	Lagerstabilität der W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit MPI. Lagerung unter Lichtausschluss bei $T = 4\text{ °C}$. HE-Anteil in W_1 : 0,5 %.....	128
Abb. 8-2:	Freisetzungsfaktor F für konjugatstabilisierte $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit unterschiedlichem äußerem Dispersphasenanteil φ_{WO} und damit unterschiedlicher Tropfengröße $x_{1,2}$. c_{HE} in W_1 : 0,5 %.	131
Abb. 8-3:	Freisetzungsfaktor F für GS-stabilisierte $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit unterschiedlichem äußerem Dispersphasenanteil φ_{WO} und damit unterschiedlicher Tropfengröße $x_{1,2}$. c_{HE} in W_1 : 0,5 %.....	131
Abb. 8-4:	Freisetzungsfaktor F für MPI-stabilisierte $W_1/O/W_2$ -Emulsionen mit unterschiedlichem äußerem Dispersphasenanteil und damit unterschiedlicher Tropfengröße. c_{HE} in W_1 : 0,5 %.	132
Abb. 8-5:	Freisetzungsfaktor F für $W_1/O/W_2$ -Emulsionen, stabilisiert durch unterschiedliche Emulgatoren, aber mit gleichem äußerem Dispersphasenanteil φ_{WO} . c_{HE} in W_1 : 0,5 %.....	133
Abb. 8-6:	Verteilungssumme Q_3 von W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit GS, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Links: ohne Enzyme. Rechts: mit Enzymen. Bilder: Mikroskopische Bilder der Doppelemulsionen, aufgenommen mit dem FPIA. Umgebende Phase: äußere W_2 -Phase. Große Tropfen: Öltropfen. Kleine, schwarze Tropfen: innere W_1 -Tropfen.	137
Abb. 8-7:	Verteilungssumme Q_3 von (W_1/O)-Tropfen, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Links: ohne Enzyme. Rechts: mit Enzymen. Bilder: Mikroskopische Bilder der Doppelemulsionen, aufgenommen mit dem FPIA. Umgebende Phase: äußere W_2 -	

	Phase. Große Tropfen: Öltropfen. Kleine, schwarze Tropfen: innere W_1 -Tropfen.	138
Abb. 8-8:	Verteilungssumme Q_3 von (W_1/O)-Tropfen, stabilisiert mit Konjugat, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Links: ohne Enzyme. Rechts: mit Enzymen. Bilder: Mikroskopische Bilder der Doppelemulsionen, aufgenommen mit dem FPIA. Umgebende Phase: äußere W_2 -Phase. Große Tropfen: Öltropfen. Kleine, schwarze Tropfen: innere W_1 -Tropfen.	139
Abb. 8-9:	Verteilungssumme Q_3 von W_1/O -Rohemulsionstropfen einer $W_1/O/W_2$ -Voremulsion, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Inkubation ohne Enzyme, unter Rühren mit einem Paddelrührer (6 Rührblätter, Durchmesser 50 mm) bei einer konstanten Drehzahl von 280 1/min.	141
Abb. 8-10:	Verteilungssumme Q_3 von (W_1/O)-Rohemulsionstropfen einer $W_1/O/W_2$ -Voremulsion, $\varphi_{WO} = 80 \%$, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation unter Magenbedingungen und nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation unter Darmbedingungen. Ohne mechanischen Energieeintrag. ...	142
Abb. 8-11:	Verteilungssumme Q_3 von W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit MPI, vor der Verdauung, nach einer Stunde Inkubation im Magenmilieu, nach 3 sowie 5 Stunden Inkubation in intestinalem Milieu.	144
Abb. 8-12:	Einfluss des äußeren Dispersphasenanteils φ_{WO} auf die Mikrostruktur MPI-stabilisierter W_1/O -Tropfen vor und nach der Verdauung.	145
Abb. 8-13:	Absorption der nach Bonerz et al. (2006) aufbereiteten Proben in Abhängigkeit der intestinalen Inkubationszeit (=Dialysedauer). .	146
Abb. 8-14:	Modulation der EGF-Rezeptorphosphorylierung (Western Blot Analyse) durch das unverkapselte HE nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. HT29-Zellen wurden serumfrei mit unterschiedlichen Konzentrationen an HE und 100 U/ml Katalase inkubiert.	148
Abb. 8-15:	Modulation der EGF-Rezeptorphosphorylierung (Western Blot Analyse) durch den HE aus der $W/O/W$ -Doppelemulsion nach 45 min Inkubation. HT29-Zellen wurden serumfrei mit unterschiedlichen Konzentrationen an HE und 100 U/ml Katalase inkubiert.	149

Abb. 8-16: Modulation des Zellwachstums nach 72 h Inkubation mit unverkapseltem Heidelbeerextrakt.	150
Abb. 8-17: Modulation des Zellwachstums nach 72 h Inkubation mit einer HE-beladenen W/O/W-Doppelemulsion.	151
Abb. 11-1: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Anthocyankonzentration ausgehend von Cyanidin-3-O-Glykosid.	208
Abb. 11-2: Bestimmung der CMC von PGPR in MCT-Öl zu Wasser, tropfenfreies System, T = 20 °C. Messung: Spinning Drop Tensiometrie, TU Dortmund.	209
Abb. 11-3: Bestimmung der CMC von PGPR in Pflanzenöl bzw. MCT-Öl an der ebenen Grenzfläche zu Wasser bzw. Wasser und 0,1 % HE, T = 20 °C. Messung: Spinning Drop Tensiometrie, TU Dortmund.	210
Abb. 11-4: Einfluss der NaCl-Konzentration in Wasser auf die Grenzflächenspannung im System Öl + PGPR zu Wasser + NaCl, T = 20 °C. Methode: Spinning Drop-Methode, TU Dortmund [Leick et al., 2010].	211
Abb. 11-5: Einfluss der Pektinkonzentration in Wasser auf die Grenzflächenspannung im System Öl zu Wasser + Pektin. Methode: Wilhelmy-Platte, T = 50 °C.	212
Abb. 11-6: Einfluss der Passagenzahl beim Emulgieren in der ZKDM bei einer Umfangsgeschwindigkeit von 7,7 m/s auf die Mikrostruktur der W ₁ /O-Emulsionen.	213
Abb. 11-7: Einfluss der Passagenzahl beim Emulgieren in der ZKDM bei einer Umfangsgeschwindigkeit von 15,4 m/s auf die Mikrostruktur der W ₁ /O-Emulsionen.	213
Abb. 11-8: Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren in der ZKDM auf den Sauterdurchmesser von W ₁ /O-Emulsionen.	214
Abb. 11-9: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von pektinhaltigen W ₁ /O-Emulsionen, hergestellt im Hochdruckhomogenisator bei $\Delta p = 300$ bar.	215
Abb. 11-10: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von pektinhaltigen W ₁ /O-Emulsionen, hergestellt im Hochdruckhomogenisator bei $\Delta p = 1000$ bar.	216
Abb. 11-11: Einfluss der Energiedichte beim Hochdruckhomogenisieren auf den Sauterdurchmesser von W ₁ /O-Emulsionen.	217
Abb. 11-12: Bestimmung der Geliertemperatur von 0,9 % nicht standardisiertem Pektin in bidestilliertem Wasser mit Calciumchlorid.	218

Abbildungsverzeichnis

Abb. 11-13: Bestimmung der Geliertemperatur von 0,9 % nicht standardisiertem Pektin in bidestilliertem Wasser mit Calciumchlorid und 0,25 % Heidelbeerextrakt bei pH 3,5.....	218
Abb. 11-14: Mikroskopische Aufnahmen der verbleibenden Emulsion. Zeiss Axioskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland), 100 bis 1000-fache Vergrößerung, (TU München).....	220
Abb. 11-15: Einfluss des Heidelbeerextraktanteils auf die dynamische Viskosität von wässrigen HE-Pektinlösungen, $c_{\text{Pektin}} = 1,5 \%$	221
Abb. 11-16: Bestimmung der CMC der verwendeten hydrophilen Emulgatoren in bidestilliertem Wasser zu Pflanzenöl, tropfenfreies System, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Messung: Pendant Drop Tensiometrie, TU Dortmund.....	222
Abb. 11-17: Viskositätskurve einer W_1/O -Emulsion mit $\varphi = 30 \%$. Messung: Zylindergeometrie. $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$	223
Abb. 11-18: Viskositätskurve wässriger Phasen mit 2 % hydrophilem Emulgator bzw. 2 % Emulgator + 1,5 % standardisiertem Pektin. Messung: Zylindergeometrie. $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$	224
Abb. 11-19: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von GS-stabilisierten Emulsionen.	225
Abb. 11-20: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von konjugatstabilisierten Emulsionen.	225
Abb. 11-21: Lagerstabilität der W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit GS. Lagerung unter Lichtausschluss bei $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. HE-Anteil in W_1 : 0,25 %.....	227
Abb. 11-22: Lagerstabilität der W_1/O -Tropfen, stabilisiert mit Konjugat. Lagerung unter Lichtausschluss bei $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. HE-Anteil in W_1 : 0,25 %.....	227
Abb. 11-23: Gemessene Anthocyankonzentrationen einer puren Heidelbeerextraktlösung sowie Heidelbeerextraktlösungen mit MPI und GS vor (ausgefüllt) und nach (schraffiert) der Filterpassage.....	229

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Beispiele für Trägersysteme zur Formulierung von bioaktiven Substanzen und deren Eigenschaften.....	17
Tab. 2-2:	Zusammenstellung des Anthocyangehalts einiger ausgewählter Lebensmittel [Clifford, 2000; Wu et al., 2006].	32
Tab. 3-1:	Hauptbestandteile des verwendeten HE [Kaden Biochemical GmbH, 2008].	52
Tab. 3-2:	Für bestimmte Anwendungen eingesetzte Chemikalien und deren Spezifikationen.....	56
Tab. 3-3:	Bei den Cosmo-RS-Berechnungen zugrundeliegende Zusammensetzung der beiden Phasen.	64
Tab. 3-4:	Verwendete optische Modelle zur Bestimmung der W_1 - bzw. der W_1/O -Tropfengröße.	69
Tab. 3-5:	Zusammensetzung der in den <i>in vitro</i> Verdauungsversuchen eingesetzten Verdauungsmedien.....	72
Tab. 4-1:	Temperaturabhängiger Geschwindigkeitskoeffizient k für rein thermische Behandlung anthocyanhaltiger HE-Lösungen, angepasst nach einem Modell 1. Ordnung [Frank et al., 2012].....	80
Tab. 5-1:	Mit COSMO-RS berechnete Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten unterschiedlicher Anthocyanmoleküle bei $T = 25\text{ °C}$ und 45 °C	94
Tab. 6-1:	Gelirtemperatur von unterschiedlichen Pektinlösungen.	100
Tab. 6-2:	pH-Wert im anthocyanhaltigen Heidelbeerextraktfiltrat in Abhängigkeit des eingewogenen HE-Anteils.....	110
Tab. 6-3:	$x_{90,3}$ -Durchmesser von W_1/O -Emulsionen mit unterschiedlichem inneren Dispersphasenanteil φ	112
Tab. 8-1:	Osmolarität der Freisetzungsmedien.	140
Tab. 11-1:	Zusammensetzung der Pektin-Salz-Mischungen bei der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Mikrostruktur der inneren W_1/O -Emulsionen. Variation der Pektinkonzentration. Alle Angaben beziehen sich auf die innere Wasserphase.	219
Tab. 11-2:	Zusammensetzung der Pektin-Salz-Mischungen bei der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Mikrostruktur der inneren W_1/O -Emulsionen. Variation der Calciumkonzentration. Alle Angaben beziehen sich auf die innere Wasserphase.	219

11 Anhang

11.1 Realteil des Brechungsindex in Abhängigkeit des Heidelbeerextraktanteils in wässriger Lösung

Stoffsystem	Realteil des Brechungsindex
Bidestilliertes Wasser	1,333
0,025 % HE in bidestilliertem	1,333
0,5 % HE in bidestilliertem Wasser	1,333

11.2 Kalibriergerade zur Bestimmung der Anthocyankonzentration

Zur Bestimmung der Kalibriergeraden für Anthocyanlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert wurden zunächst Verdünnungsreihen von Cyanidin-3-O-Glykosid in bidestilliertem Wasser oder in einer der in Abb. 11-1 genannten Lösungsmittel mit eingestelltem pH-Wert hergestellt. Diese wurden dann wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, nach der Methode von Bonerz et al. (2006) präpariert und direkt nach 20 Minuten spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm charakterisiert. Durch Auftragen der erhaltenen Absorptionswerte über den eingewogenen Cyanidin-3-O-Glykosid-Konzentrationen ergeben sich die in Abb. 11-1 dargestellten Kalibriergeraden für die wässrigen Lösungen mit unterschiedlichem pH-Wert.

Abb. 11-1 zeigt, dass sich für die verschiedenen Lösungsmittel annähernd identische Kalibriergeraden ergeben. Daher ist es möglich, die Anthocyankonzentration von wässrigen Heidelbeerextraktlösungen unabhängig vom pH-Wert der Lösungen mit folgender Gleichung zu bestimmen:

$$c_A = \frac{A_{520\text{ nm}}}{0,003} \quad 11.1$$

Die Bestimmung der Anthocyankonzentration erfolgt damit in Form von Cyanidin-3-O-Glykosid Äquivalenten.

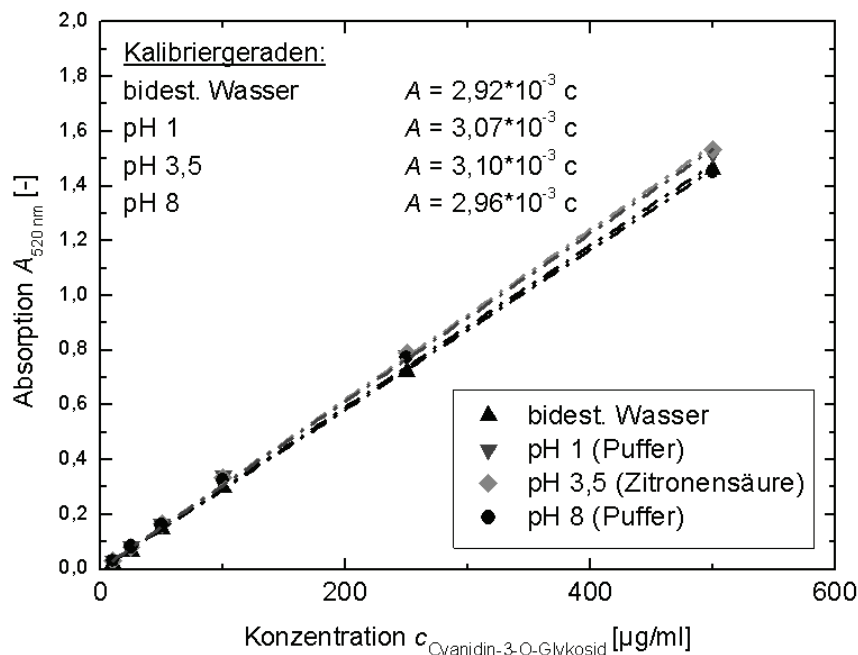


Abb. 11-1: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Anthocyankonzentration ausgehend von Cyanidin-3-O-Glykosid.

Darüber hinaus zeigen die in Abb. 11-1 dargestellten Ergebnisse, dass der lineare Messbereich des UV/VIS-Spektrometers bis zu einer Absorption von 1,6 uneingeschränkt gilt. Daher wurden die Proben in den folgenden Untersuchungen stets so verdünnt, dass das Absorptionsmaximum bei $\lambda = 520 \text{ nm}$ unterhalb von 1,6 lag.

11.3 Kritische Mizellbildungskonzentration von PGPR in MCT-Öl

In Abb. 11-2 ist die Messkurve zur Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von PGPR in MCT-Öl zu Wasser an der ebenen Grenzfläche bzw. im tropfenfreien System aufgetragen. Ausgehend von diesen Messungen kann für das tropfenfreie System eine CMC von 1 % ermittelt werden.

Die Emulgatormenge $c_{E,ges}$, die erforderlich ist, um die gesamte Phasengrenzfläche in einer Emulsion vollständig zu belegen, kann mit Gleichung 5.1 (Kapitel 5.4) berechnet werden, wenn die maximale Belegungsdichte Γ_{max} bekannt ist.

Γ_{max} kann unter Anwendung der Gibbs'schen Adsorptionsisothermen [Gibbs, 1928; Karbstein, 1994; Tesch, 2002] mit der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$\Gamma_{max} = \frac{k_1}{R \cdot T} \cdot \frac{k_2 \cdot CMC}{1 + k_2 \cdot CMC} \quad 11.2$$

Mit: k_1 Konstante
 k_2 Konstante
 R universelle Gaskonstante

Die Bestimmung der Konstanten k_1 und k_2 ist durch Anpassung der in Gleichung 11.3 dargestellten Szyszkowski-Gleichung, die für Emulgatorkonzentrationen $c_E < CMC$ gilt, möglich [Szyszkowski, 1908]:

$$\gamma = \gamma_0 - k_1 \cdot \ln(1 + k_2 \cdot c_E) \quad 11.3$$

Hierbei ist γ_0 die Grenzflächenspannung im System ohne Emulgator.

γ_0 kann direkt aus der in Abb. 11-2 dargestellten Kurve ermittelt werden. k_1 und k_2 ergeben sich dann durch Anpassen der Szyszkowski-Gleichung an die gleiche Kurve.

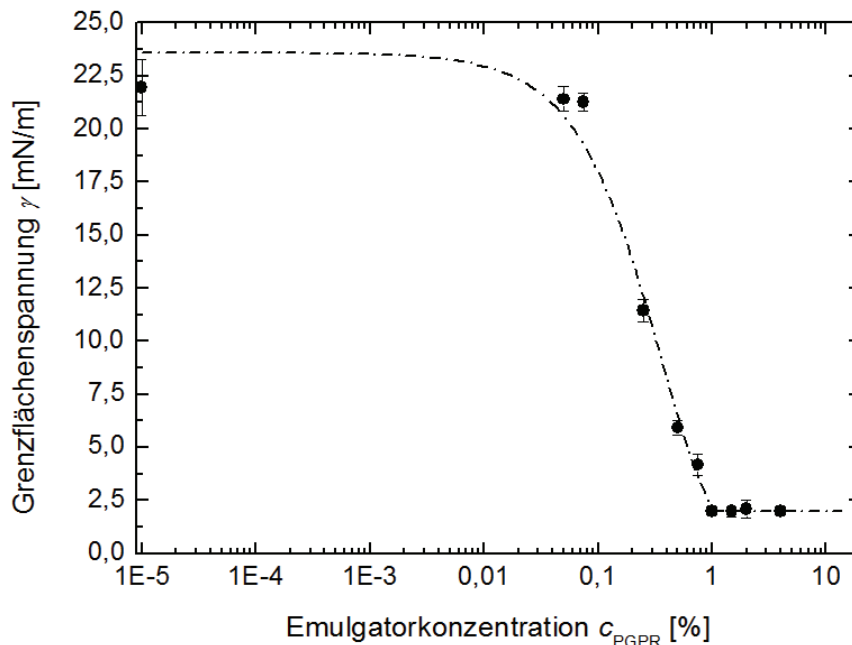


Abb. 11-2: Bestimmung der CMC von PGPR in MCT-Öl zu Wasser, tropfenfreies System, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Messung: Spinning Drop Tensiometrie, TU Dortmund.

Für die hier durchgeführten Untersuchungen mit PGPR ergeben sich bei $T = 25 \text{ °C}$ folgende Parameter:

M_{PGPR} [g/mol]	1766
CMC [mol/l]	$5,3 \cdot 10^{-3}$
R [J/(mol*K)]	8,314
γ_0 [mN/m]	22
k_1 [mN/m]	650
k_2 [mN/m]	5,9

Demzufolge kann $c_{E,erf}$ für eine Emulsion mit einem Dispersphasenanteil von 30 % und einer Tropfengröße von $1 \text{ }\mu\text{m}$ als $2,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$ bzw. 5 % berechnet werden.

11.4 Einfluss Öltyp und Heidelbeerextrakt auf die kritische Mizellbildungskonzentration von PGPR

In Abb. 11-3 sind die Messkurven zur Bestimmung der CMC von PGPR in Pflanzenöl zu Wasser, in MCT-Öl zu Wasser sowie in MCT-Öl zu Wasser mit 0,1 % Heidelbeerextrakt dargestellt. Unabhängig vom Öltyp und vom Heidelbeerextraktgehalt konnte eine CMC von 1 % bestimmt werden.

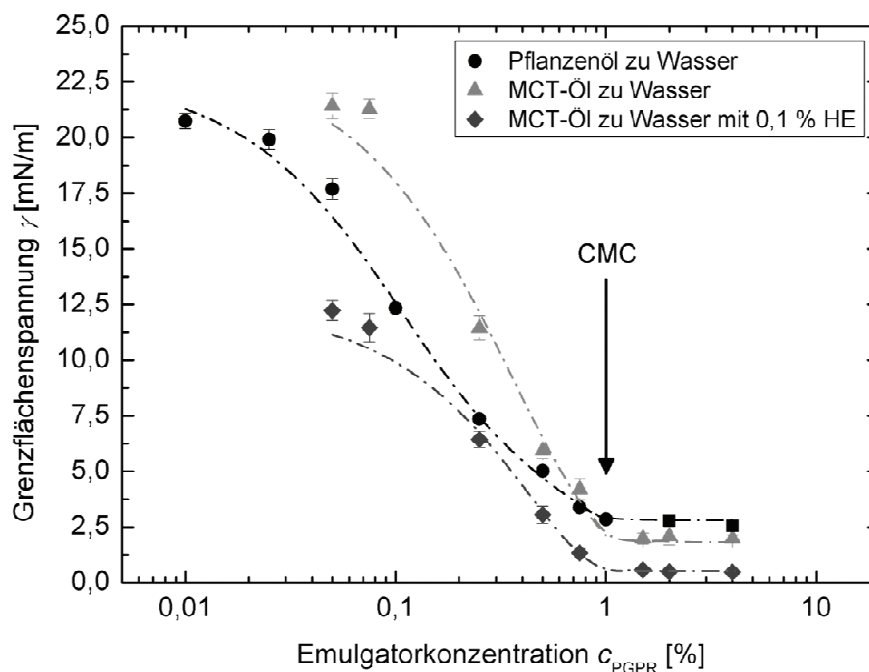


Abb. 11-3: Bestimmung der CMC von PGPR in Pflanzenöl bzw. MCT-Öl an der ebenen Grenzfläche zu Wasser bzw. Wasser und 0,1 % HE, $T = 20 \text{ °C}$. Messung: Spinning Drop Tensiometrie, TU Dortmund.

11.5 Zusammensetzung des in den COSMO-RS-Berechnungen zugrunde gelegten MCT-Öls

Miglyol 812	Anteil [%]	Anteil in COSMO-RS-Rechnung
Capronsäure (C 6:0)	max. 2	2
Caprylsäure (C 8:0)	50 – 65	58
Caprinsäure (C 10:0)	30 – 45	38
Laurinsäure (C 12:0)	max. 2	2
Myristinsäure (C 14:0)	max. 1	0

11.6 Einfluss von Natriumchlorid auf die Grenzflächen- spannung

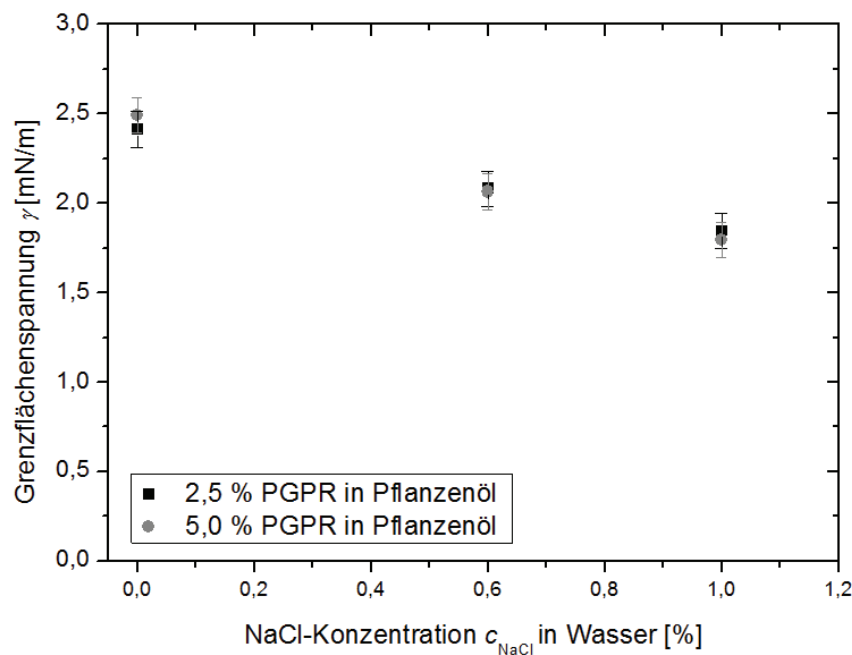


Abb. 11-4: Einfluss der NaCl-Konzentration in Wasser auf die Grenzflächenspannung im System Öl + PGPR zu Wasser + NaCl, $T = 20\text{ °C}$. Methode: Spinning Drop-Methode, TU Dortmund [Leick et al., 2010].

Abb. 11-4 zeigt, dass die Grenzflächenspannung im untersuchten System mit steigender NaCl-Konzentration abnimmt. Dieser Effekt ist auf Wechselwirkungen von NaCl mit PGPR an der Grenzfläche zurückzuführen (siehe Kapitel 2.1). NaCl alleine, d.h. ohne PGPR, hat allerdings keinen Effekt auf die Grenzflächenspannung, was Untersuchungen im System Wasser + NaCl zu Pflanzenöl bestätigt haben.

11.7 Einfluss von Pektin auf die Grenzflächenspannung

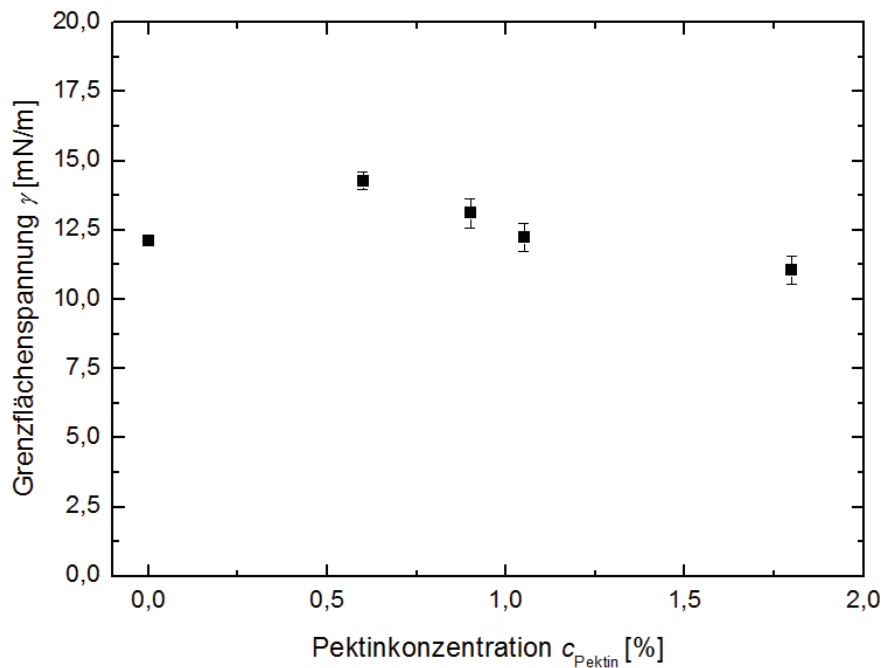


Abb. 11-5: Einfluss der Pektinkonzentration in Wasser auf die Grenzflächenspannung im System Öl zu Wasser + Pektin. Methode: Wilhelmy-Platte, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Abb. 11-5 zeigt, dass Pektin, unabhängig von der Konzentration, keinen signifikanten Einfluss auf die Grenzflächenspannung im untersuchten System hat.

11.8 Einfluss der Umfangsgeschwindigkeit und Passagenzahl auf die Verteilungssumme von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen

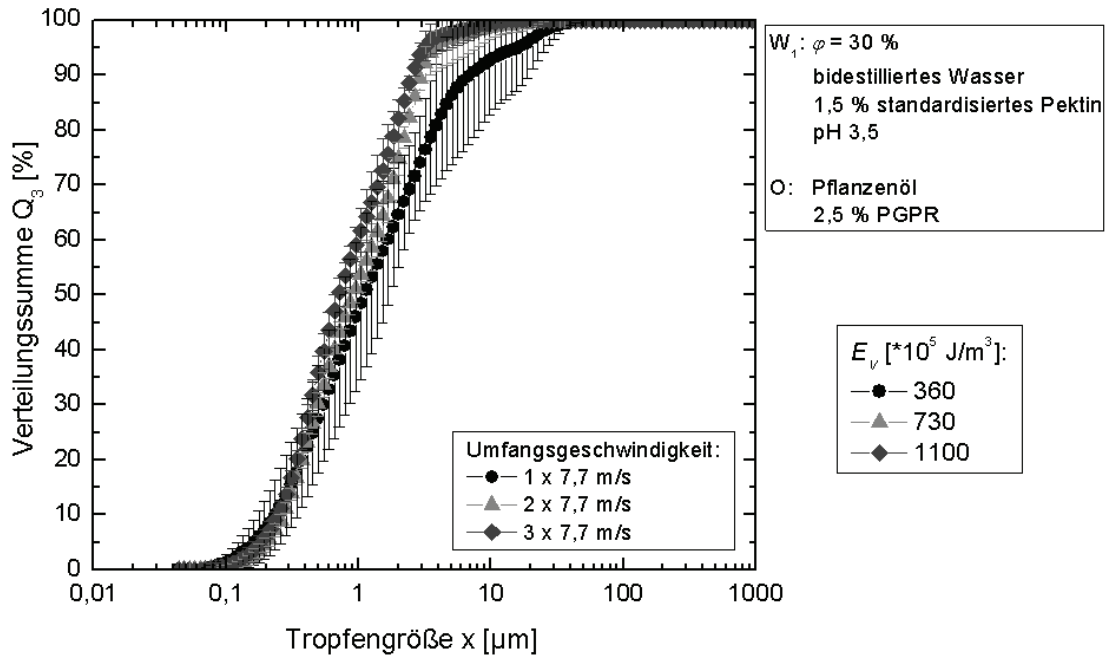


Abb. 11-6: Einfluss der Passagenzahl beim Emulgieren in der ZKDM bei einer Umfangsgeschwindigkeit von 7,7 m/s auf die Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen.

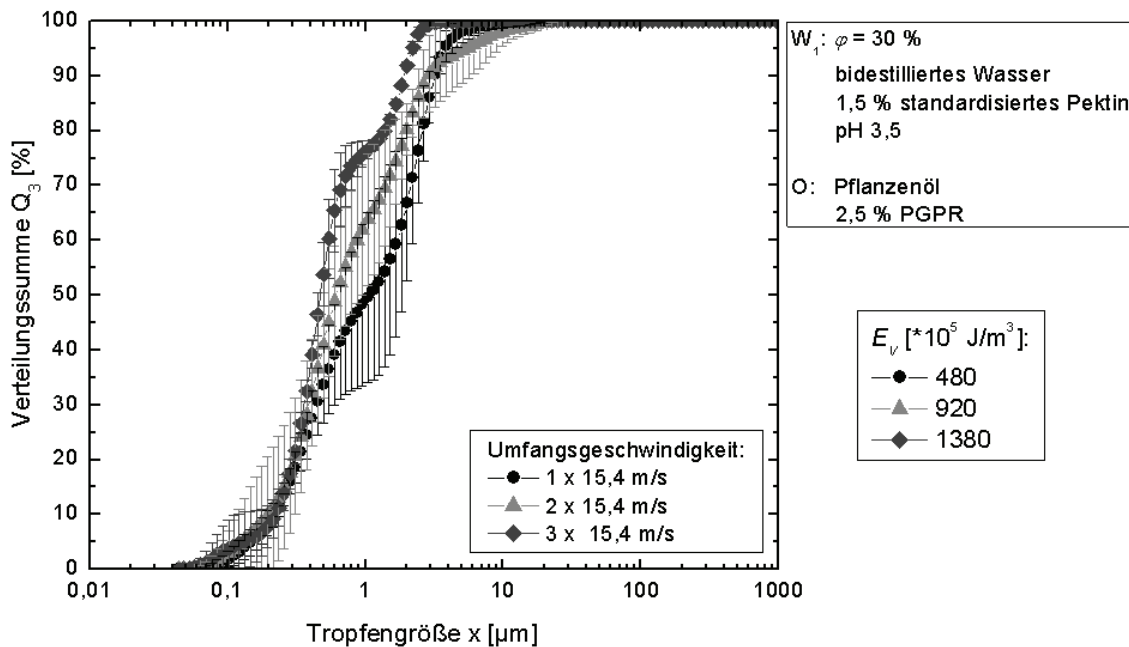


Abb. 11-7: Einfluss der Passagenzahl beim Emulgieren in der ZKDM bei einer Umfangsgeschwindigkeit von 15,4 m/s auf die Mikrostruktur der W_1/O -Emulsionen.

11.9 Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren in der ZKDM auf den Sauterdurchmesser der inneren Emulsionen

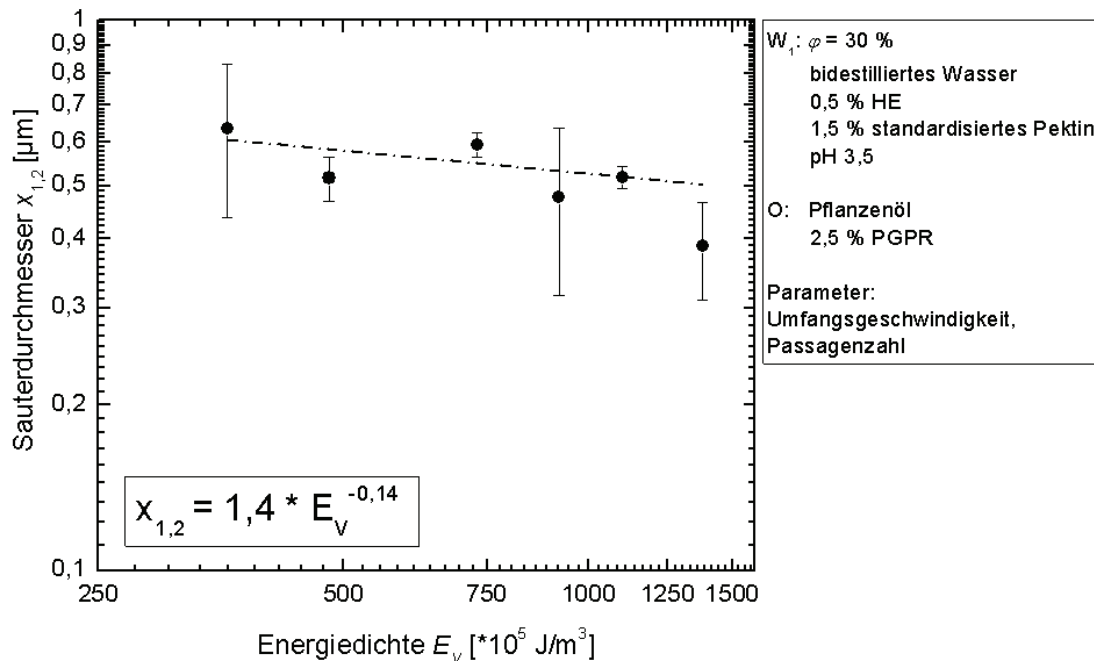


Abb. 11-8: Einfluss der Energiedichte beim Emulgieren in der ZKDM auf den Sauterdurchmesser von W_1/O -Emulsionen.

Die in Abb. 11-8 in doppellogarithmischer Auftragung dargestellten Messergebnisse zeigen, dass eine Steigerung der Energiedichte E_V eine kontinuierliche Abnahme der Tropfengröße bewirkt. Durch die Erstellung einer Ausgleichsgeraden nach einem Potentialansatz ergibt sich der folgende Zusammenhang:

$$x_{1,2} = 1,4 \cdot E_V^{-0,14} \quad 11.4$$

11.10 Einfluss des Homogenisierdruckes auf die Verteilungssumme von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen

Die in Abb. 11-9 und Abb. 11-10 dargestellten Ergebnisse zeigen am Beispiel von W_1/O -Emulsionen, die bei Homogenisierdrücken Δp von 300 und 1000 bar hergestellt wurden, dass sich beim Emulgieren im Hochdruckhomogenisator, unabhängig von Δp Emulsionen mit einem sehr hohen Grobgutanteil mit Tropfengrößen $> 10 \mu\text{m}$ ergeben.

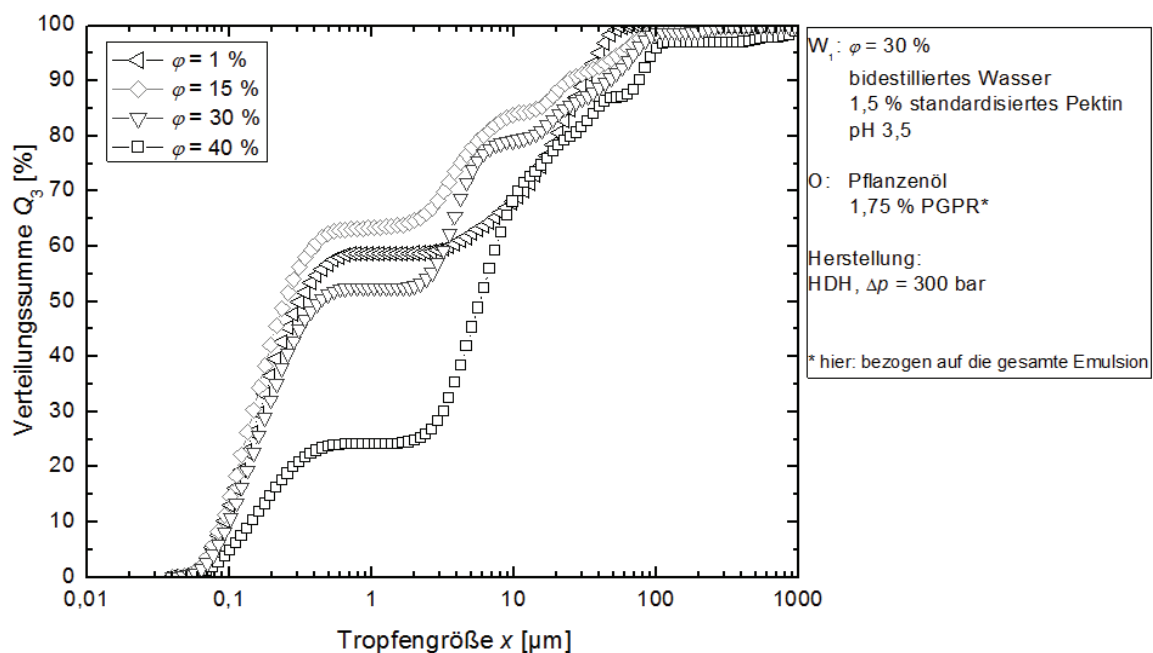


Abb. 11-9: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen, hergestellt im Hochdruckhomogenisator bei $\Delta p = 300$ bar.

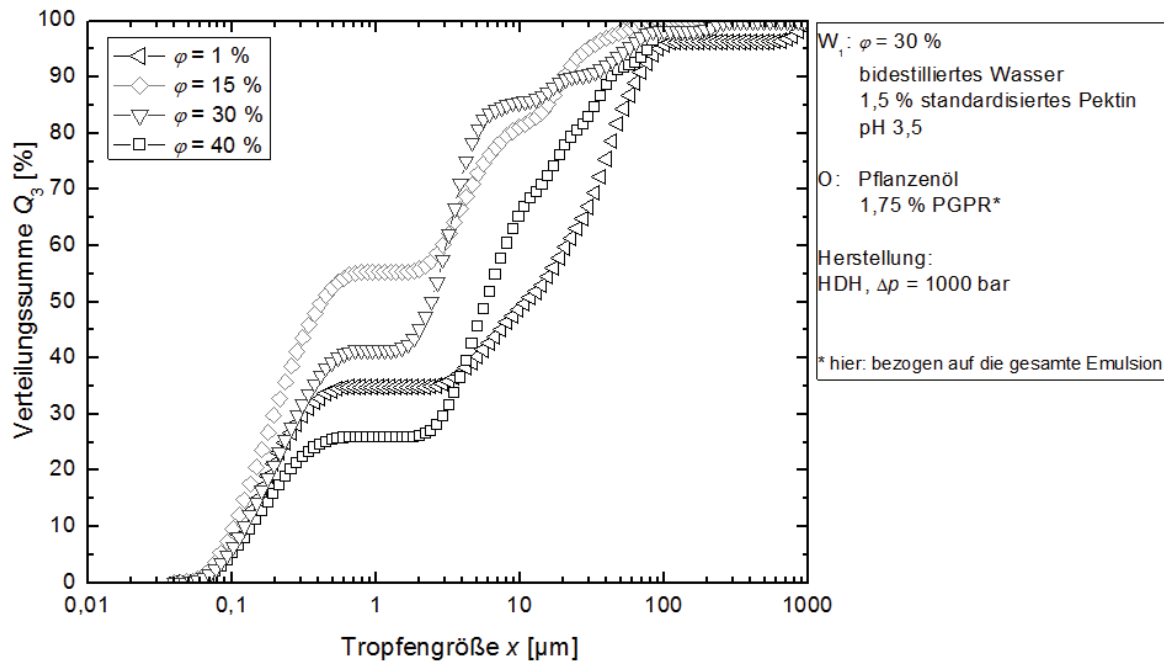


Abb. 11-10: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von pektinhaltigen W_1/O -Emulsionen, hergestellt im Hochdruckhomogenisator bei $\Delta p = 1000$ bar

11.11 Herstellung pektinfreier Emulsionen im Hochdruckhomogenisator

Abb. 11-11 zeigt, dass sich mit zunehmendem Homogenisierdruck und damit steigendem Energieeintrag kleinere Tropfen ergeben. Das bedeutet, dass die pektinfreien W_1 -Tropfen der hergestellten Emulsion im Hochdruckhomogenisator ausreichend schnell stabilisiert werden konnten. Der Prozess ist zerkleinerungsdominiert. Demzufolge ist das Hochdruckhomogenisieren geeignet, um die Mikrostruktur der hier untersuchten pektinfreien Emulsionen gezielt einzustellen.

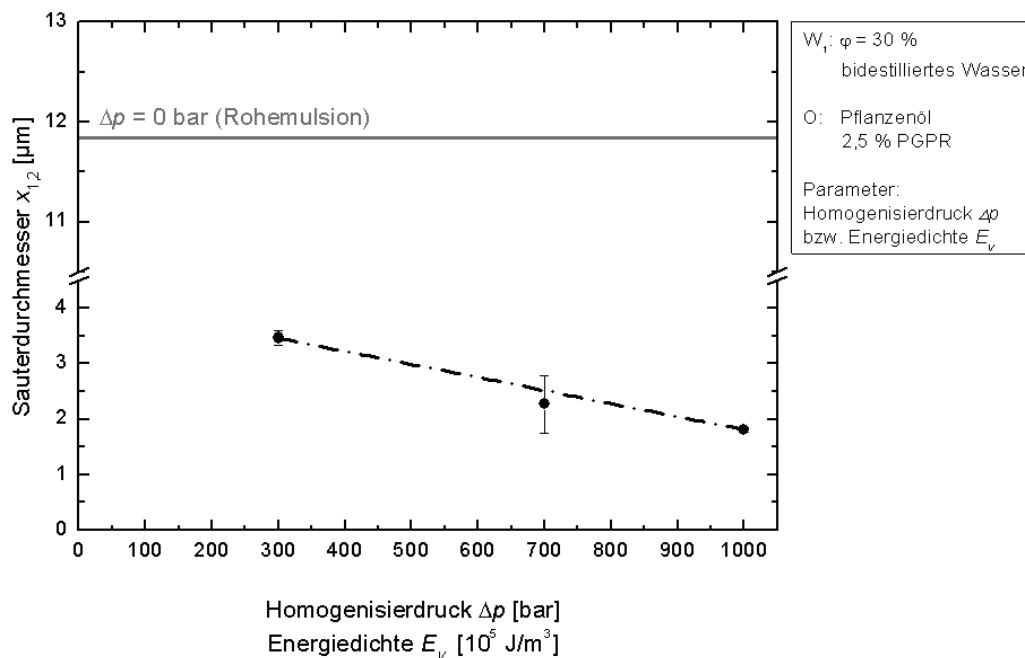


Abb. 11-11: Einfluss der Energiedichte beim Hochdruckhomogenisieren auf den Sauterdurchmesser von W_1/O -Emulsionen.

11.12 Geliertemperatur der verwendeten Pektine

Die Geliertemperatur des standardisierten Pektins wurde nach der in Kapitel 3.2.9 beschriebenen Methode bestimmt. Die Geliertemperatur kann am Schnittpunkt von G' und G'' abgelesen werden.

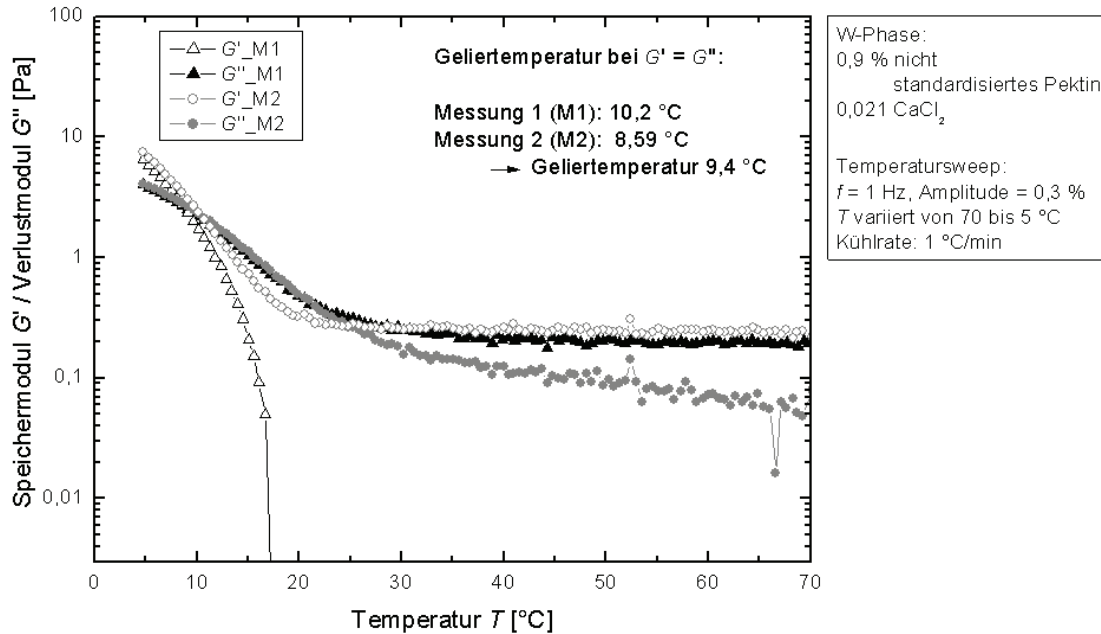


Abb. 11-12: Bestimmung der Geliertemperatur von 0,9 % nicht standardisiertem Pektin in bidestilliertem Wasser mit Calciumchlorid.

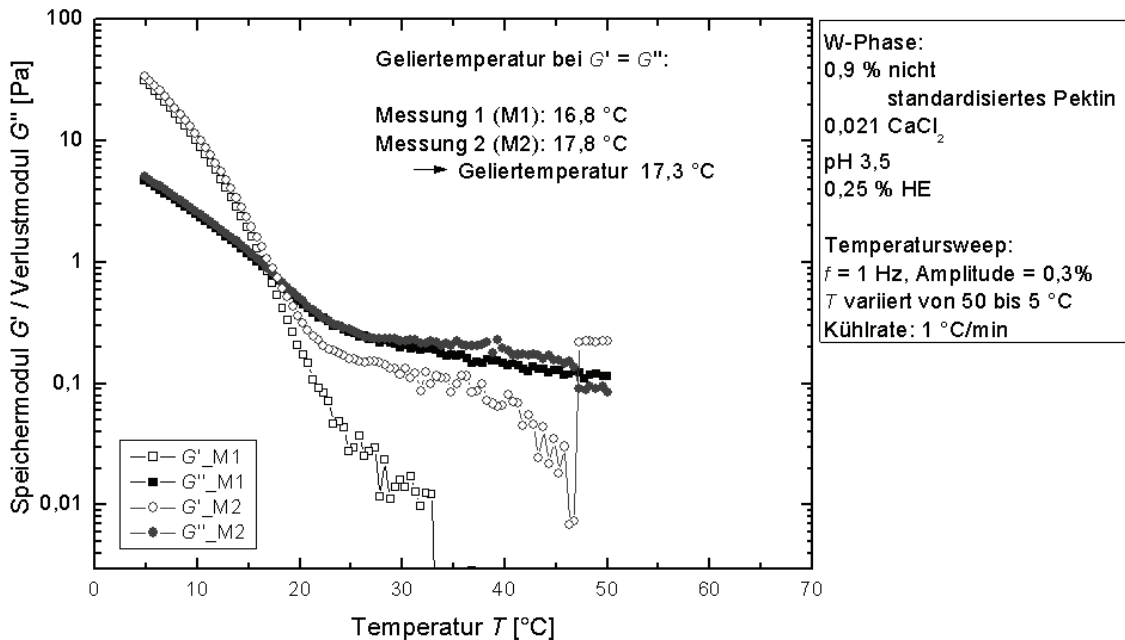


Abb. 11-13: Bestimmung der Geliertemperatur von 0,9 % nicht standardisiertem Pektin in bidestilliertem Wasser mit Calciumchlorid und 0,25 % Heidelbeerextrakt bei pH 3,5.

11.13 Zusammensetzung der Pektin-Salz-Mischungen bei Verwendung des nicht standardisierten Pektins

Bei Verwendung des nicht standardisierten Pektins wurden die in Tab. 11-1 bzw. Tab. 11-2 zusammengefassten Zusatzstoffe in der angegebenen Konzentration verwendet. Dextrose wurde zugegeben, um stets den gleichen Trockenmasseanteil der Salz-Pektin-Mischung einzustellen. Dinatriumdisphosphat diente als Puffersalz.

Tab. 11-1: Zusammensetzung der Pektin-Salz-Mischungen bei der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Mikrostruktur der inneren W₁/O-Emulsionen. Variation der Pektinkonzentration. Alle Angaben beziehen sich auf die innere Wasserphase.

Pektinmenge [g] (-Konzentration [%])	8,0 (0,6)	12,0 (0,9)	14,0 (1,05)	24,0 (1,8)
Ca-Chlorid-Menge [g] (-Konzentration [%])	0,28 (0,021)			
Calciumgehalt [%]	0,0057			
Dinatriumdisphosphat [g] (-Konzentration [%])	4,6 (0,345)			
Dextrose [g]	7,12	3,12	1,12	0

Tab. 11-2: Zusammensetzung der Pektin-Salz-Mischungen bei der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Mikrostruktur der inneren W₁/O-Emulsionen. Variation der Calciumkonzentration. Alle Angaben beziehen sich auf die innere Wasserphase.

Ca-Chlorid-Menge [g] (-Konzentration [%])	0,26 (0,195)	0,28 (0,021)	0,30 (0,0225)	0,70 (0,0525)
Calciumgehalt [%]	0,0053	0,0057	0,0061	0,0143
Pektinmenge [g] (-Konzentration [%])	12 (0,9)			
Dinatriumdisphosphat [g] (-Konzentration [%])	4,6 (0,345)			
Dextrose [g]	7,12	3,12	1,12	0

11.14 Mikroskopische Aufnahmen der nicht sedimentierten Emulsionen mit > 0,5 % Heidelbeerextrakt

Dargestellt ist eine mikroskopische Aufnahme der nicht sedimentierten Emulsion mit > 0,5 % Heidelbeerextrakt. Im Gegensatz zu den großen Tropfen bzw. Aggregaten im Sediment, die im Kapitel 6.1.3 in Abb. 6-11 zu sehen sind, sind die Tropfen in der verbleibenden Emulsion deutlich kleiner.

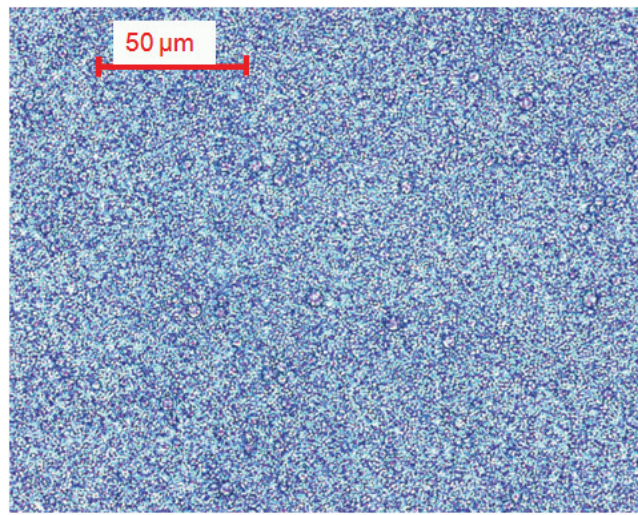


Abb. 11-14: Mikroskopische Aufnahmen der verbleibenden Emulsion. Zeiss Axioskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland), 100 bis 1000-fache Vergrößerung, (TU München).

11.15 Einfluss des Heidelbeerextraktgehalts auf die Viskosität pektinhaltiger Wasserphasen

In Abb. 11-15 ist der Einfluss des Heidelbeerextraktanteils auf die dynamische Viskosität von heidelbeerextrakthaltigen Pektinlösungen dargestellt. Bei hohen Scherraten, wie sie im Emulgierprozess vorliegen, ist anzunehmen, dass η unabhängig vom Heidelbeerextraktanteil ist. Bei einer Scherrate von 1000 1/s nimmt die dynamische Viskosität für Pektinlösungen ohne Heidelbeerextrakt einen Wert von 10 mPa*s an, für 1,5 % Heidelbeerextrakt einen Wert von 19 mPa*s. Für höhere Scherraten werden sich die Werte weiter annähern. Ohne Scherbeanspruchung, z.B. bei der Abkühlung der Proben und bei der Lagerung hat der Anteil an Heidelbeerextrakt allerdings einen signifikanten Einfluss auf die dynamische Viskosität.

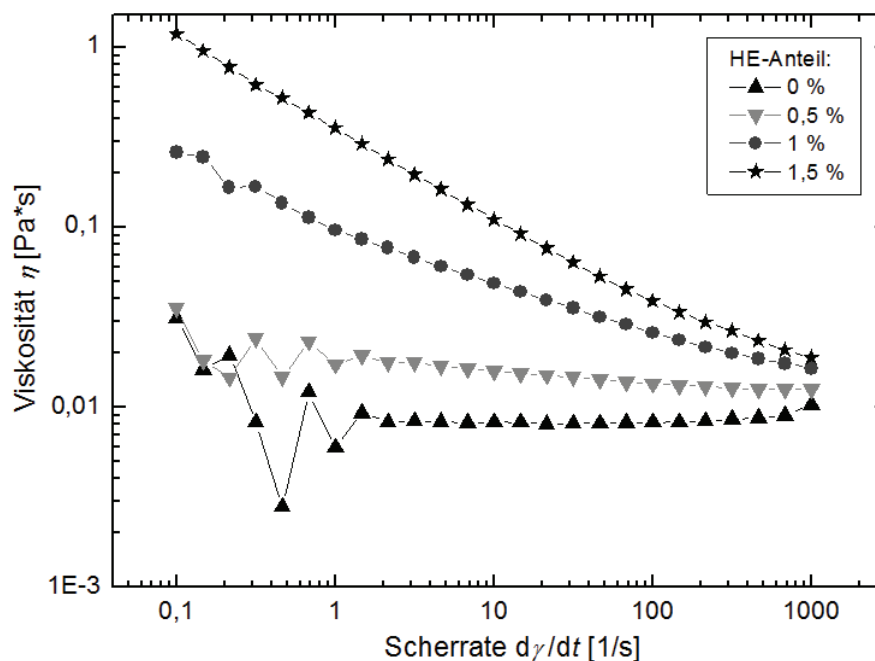


Abb. 11-15: Einfluss des Heidelbeerextraktanteils auf die dynamische Viskosität von wässrigen HE-Pektinlösungen, $c_{\text{Pektin}} = 1,5 \%$.

11.16 CMC-Messungen der verwendeten hydrophilen Emulgatoren

Um sicherzustellen, dass bei der Herstellung der Doppemulsionen stets ausreichend Emulgator zur Stabilisierung der W_1/O -Tropfen vorhanden ist, wurde die kritische Mizellbildungskonzentration der eingesetzten hydrophilen Emulgatoren mittels Pendant Drop Tensiometrie ermittelt.

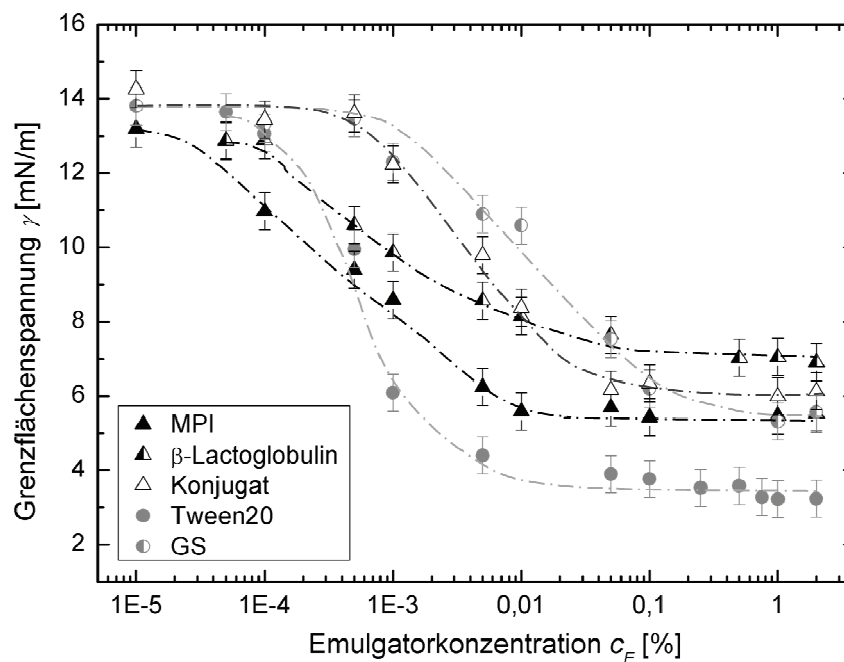


Abb. 11-16: Bestimmung der CMC der verwendeten hydrophilen Emulgatoren in bidestilliertem Wasser zu Pflanzenöl, tropfenfreies System, $T = 20\text{ °C}$. Messung: Pendant Drop Tensiometrie, TU Dortmund.

Abb. 11-16 zeigt, dass die Grenzflächenspannung im tropfenfreien System für alle untersuchten hydrophilen Emulgatoren für $c_E \leq 1\%$ einen konstanten Wert annimmt, d.h. die CMC ist für alle hier untersuchten hydrophilen Emulgatoren $\leq 1\%$. Bei den weiteren Untersuchungen wurden daher stets 2% hydrophiler Emulgator eingesetzt.

11.17 Dynamische Viskosität einer W_1/O -Emulsion mit 30 % Dispersphasenanteil

Abb. 11-17 zeigt die dynamische Viskosität einer W_1/O -Emulsion mit 30 % Dispersphasenanteil, 0,25 % Heidelbeerextrakt und 1,5 % standardisiertem Pektin in der W_1 -Phase. Die Viskosität im Prozess kann als 0,06 Pa*s abgeschätzt werden.

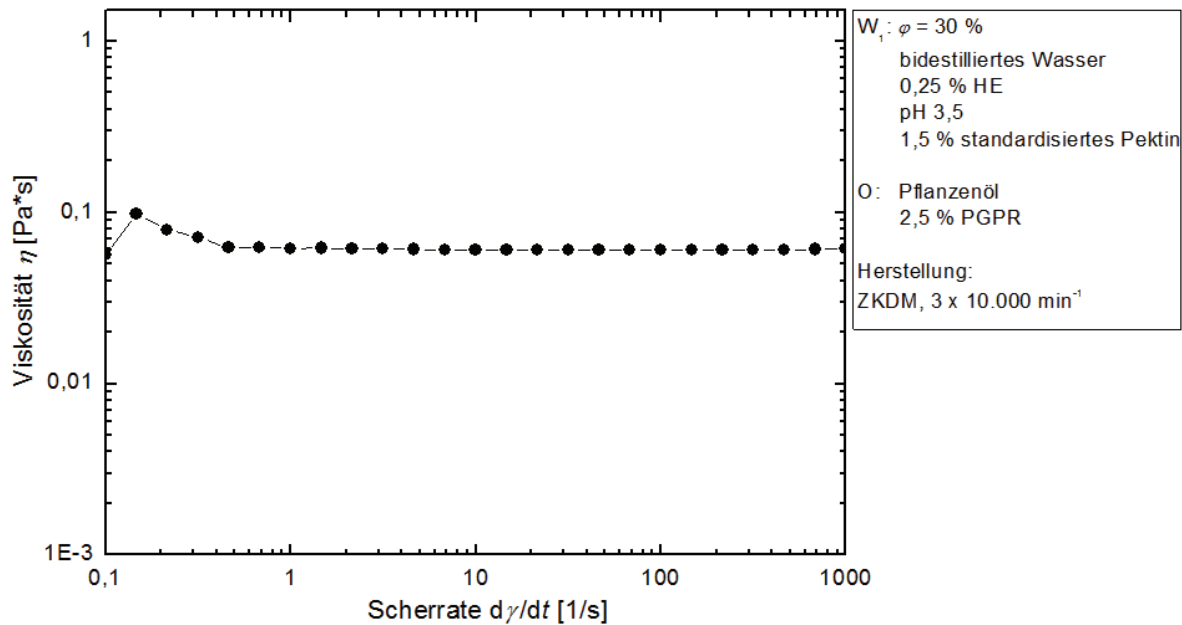


Abb. 11-17: Viskositätskurve einer W_1/O -Emulsion mit $\varphi = 30\%$. Messung: Zylindergeometrie. $T = 50\text{ °C}$.

11.18 Dynamische Viskosität der W_2 -Phase

In Abb. 11-18 ist die dynamische Viskosität von W_2 -Phasen mit 2 % Gallensäure und 2 % Molkenproteinisolat als hydrophilem Emulgator dargestellt. Darüber hinaus ist der Einfluss von Pektin auf die Viskosität der W_2 -Phasen abgebildet. Die Ergebnisse zeigen, dass der hydrophile Emulgator keinen signifikanten Einfluss auf die Viskosität der kontinuierlichen W_2 -Phasen hat.

Die Viskosität der pektinhaltigen W_2 -Phasen beträgt 14 mPa*s. Die Viskosität der pektinfreien Wasserphasen ist nicht exakt bestimmbar. Die Schwankungen bei niedrigen Scherraten sind darauf zurückzuführen, dass das Moment bei der Messung zu gering war. Der Anstieg der Viskositäten bei hohen Scherraten kann möglicherweise auf Taylor-Wirbel zurückgeführt werden.

Dennoch kann die Viskosität der pektinhaltigen Wasserphasen als deutlich höher eingeschätzt werden als die Viskosität der pektinfreien Wasserphasen.

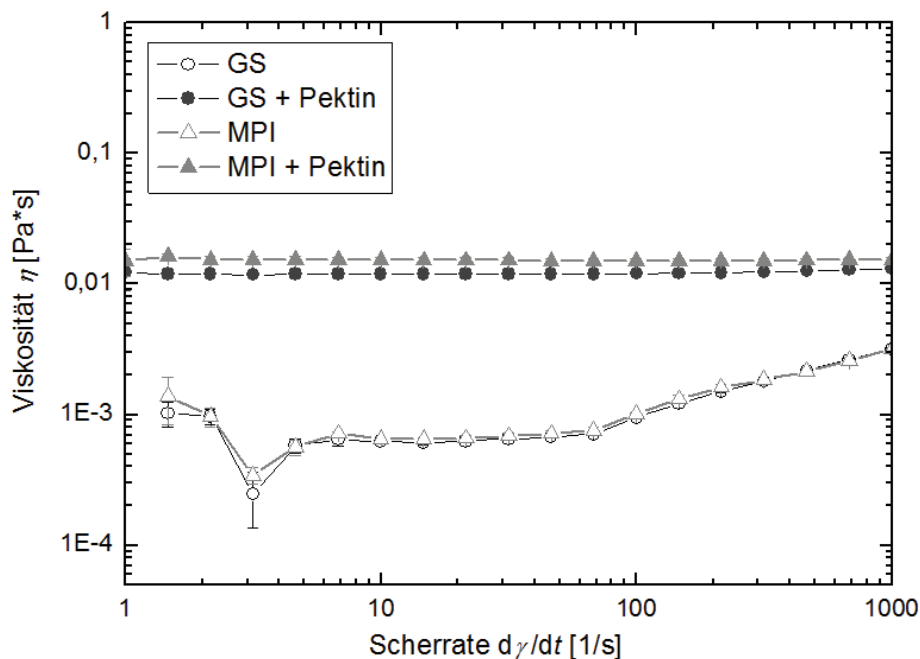


Abb. 11-18: Viskositätskurve wässriger Phasen mit 2 % hydrophilem Emulgator bzw. 2 % Emulgator + 1,5 % standardisiertem Pektin. Messung: Zylindergeometrie. $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$.

11.19 Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Tropfengrößenverteilung von $W_1/O/W_2$ -Emulsionen

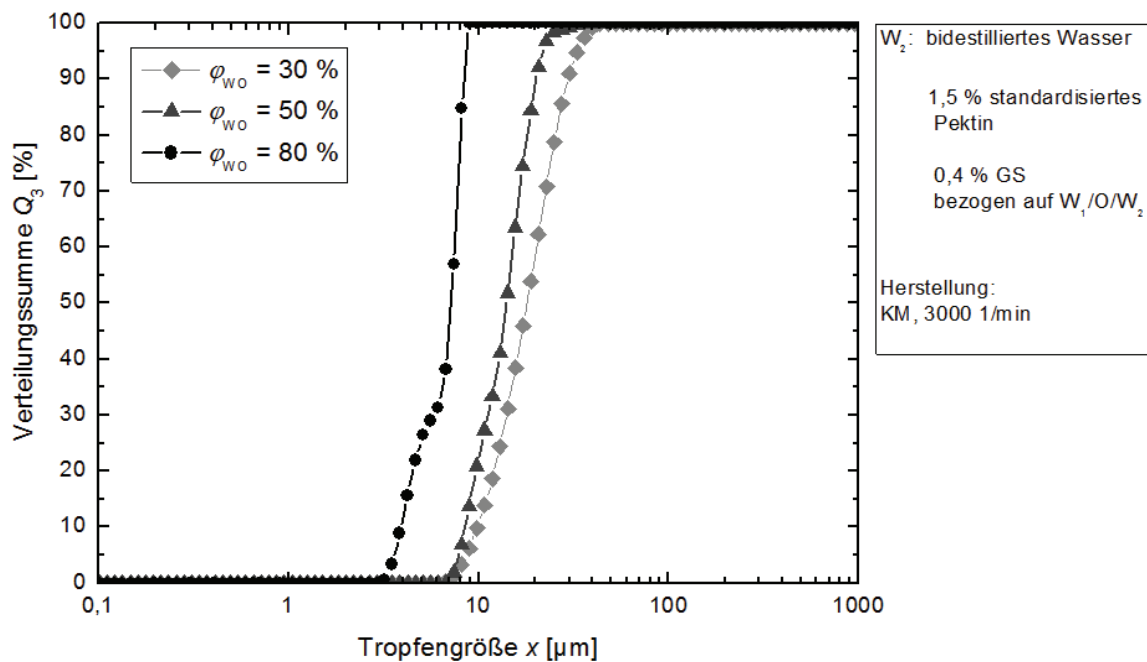


Abb. 11-19: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von GS-stabilisierten Emulsionen.

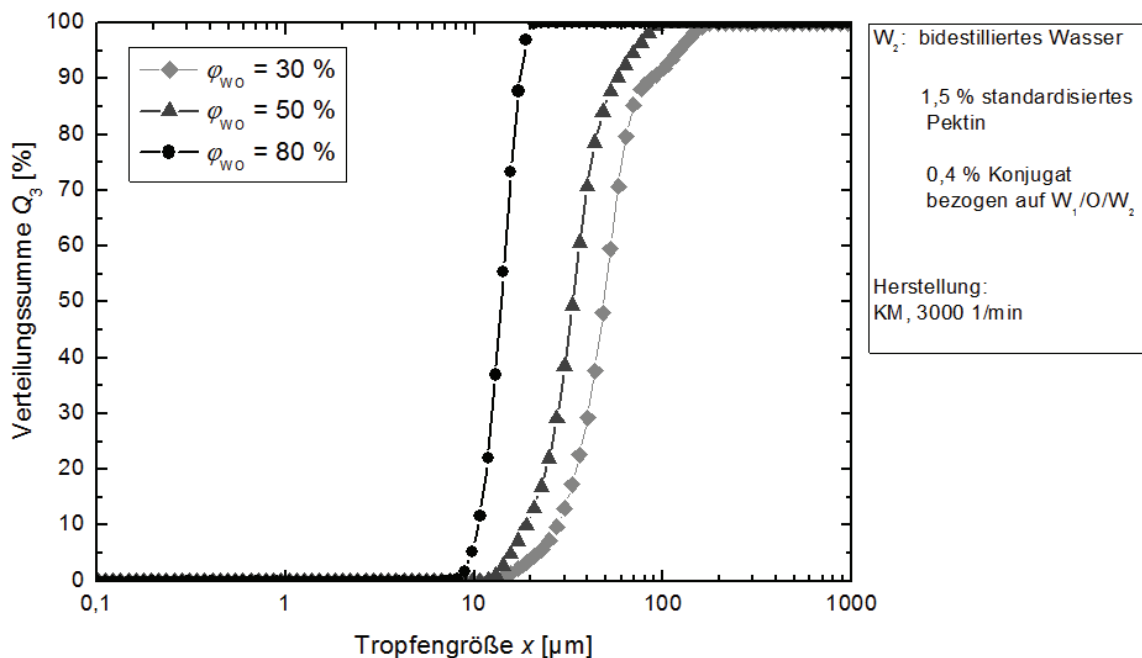


Abb. 11-20: Einfluss des Dispersphasenanteils auf die Mikrostruktur von konjugatstabilisierten Emulsionen.

Abb. 11-19 und Abb. 11-20 zeigen, dass die Tropfengrößen der Emulsionen, unabhängig vom Emulgator, mit steigendem äußerem Dispersphasenanteil φ_{WO} abnehmen. Dies wird in Kapitel 7.3 näher diskutiert.

11.20 Lagerstabilität von gallensäure- und konjugat stabilisierten Dopplemulsionen mit Dispersphasenanteilen von 30 bis 80 %

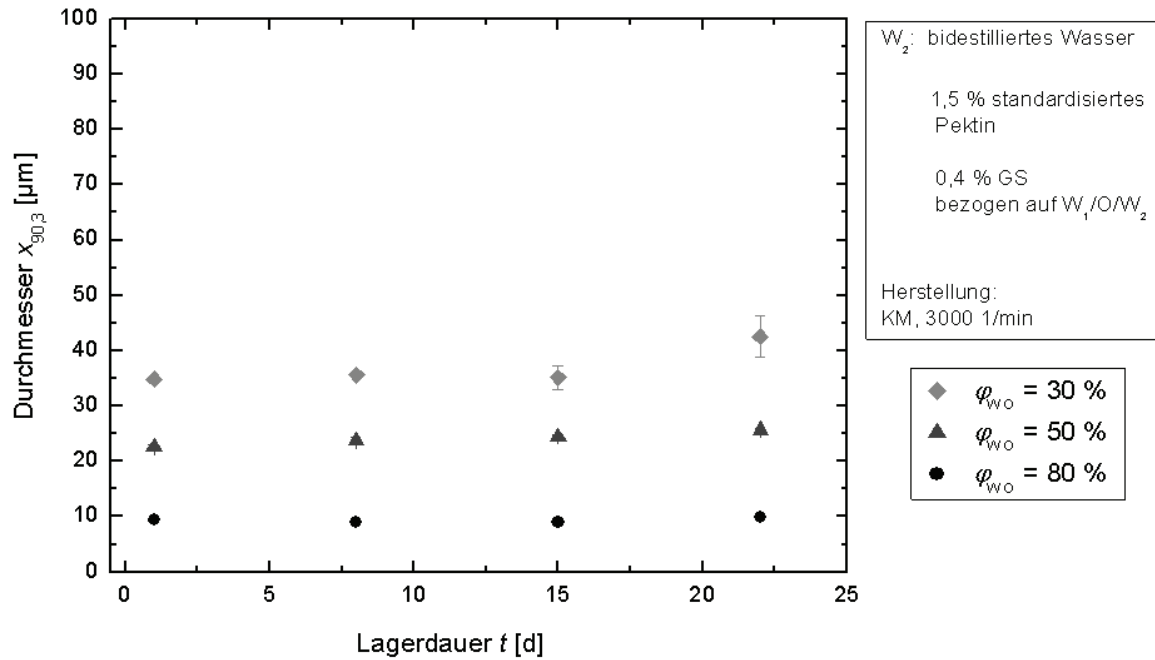


Abb. 11-21: Lagerstabilität der W₁/O-Tropfen, stabilisiert mit GS. Lagerung unter Lichtausschluss bei T = 4 °C. HE-Anteil in W₁: 0,25 %.

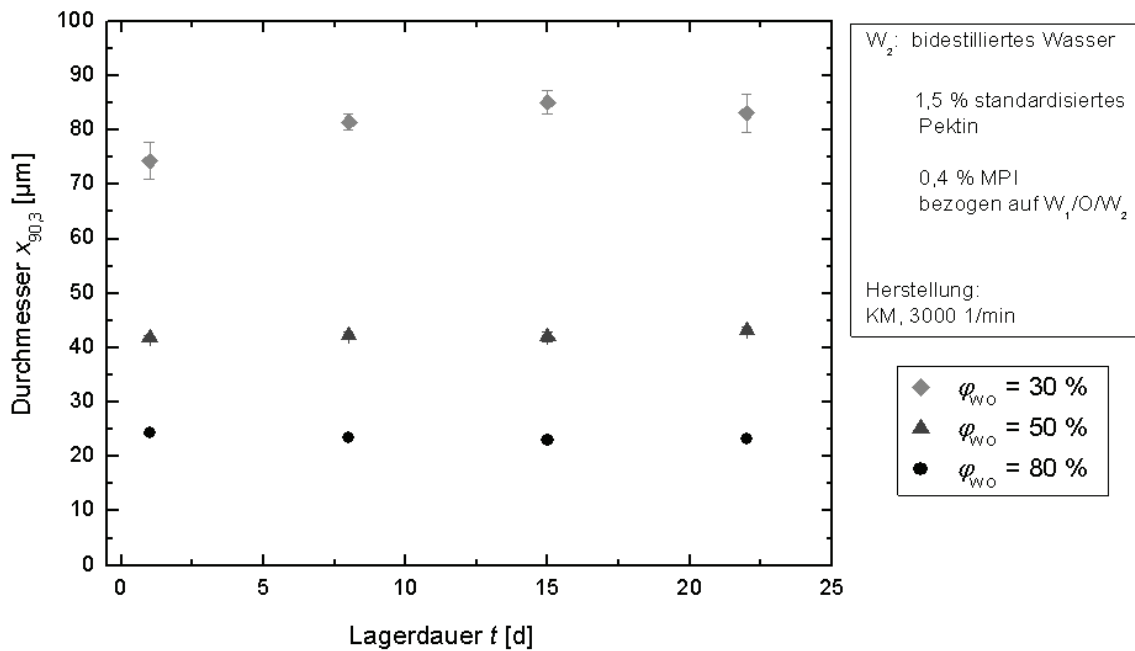


Abb. 11-22: Lagerstabilität der W₁/O-Tropfen, stabilisiert mit Konjugat. Lagerung unter Lichtausschluss bei T = 4 °C. HE-Anteil in W₁: 0,25 %.

11.21 Adsorptionsverhalten der hydrophilen Spritzenfilter

Obwohl die zur Abtrennung der W_2 -Phase verwendeten hydrophilen Filter auch als Vorfilter bei der HPLC-Analytik von Anthocyanen eingesetzt werden, wurde bei der Durchführung dieser Versuche beobachtet, dass ein Teil der entfernten Anthocyane immer am hydrophilen Filtermedium adsorbierte (siehe Abb. 11-23). Durch Verwendung von hydrophoben Filtern anstelle von hydrophilen konnte eine Adsorption der Anthocyane zwar verhindert werden, dafür war aber keine Abtrennung des Freisetzungsmediums von der inneren W_1/O -Emulsion mehr möglich. In diesem Fall konnte die Ölphase den Filter benetzen, wodurch die kompletten W_1/O -Tropfen und nicht das Freisetzungsmedium mit der enthaltenen W_2 -Phase abgezogen wurde. Aus diesem Grunde wurden die Versuche trotzdem mit den beschriebenen hydrophilen PVDF-Filtern durchgeführt. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist daher zu berücksichtigen, dass die gemessenen Werte keine Absolutwerte darstellen. Bei identischer Versuchsdurchführung können sie aber dennoch zum Vergleich der Freisetzung aus unterschiedlichen Doppelemulsionssystemen herangezogen werden.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass auch hydrophile Emulgatormoleküle, die nicht an der O/W_2 -Grenzfläche adsorbiert sind, die Filtermembran belegen könnten. Zum Beispiel wäre es möglich, dass Gallensäure aufgrund der zuvor beschriebenen schnelleren Belegungskinetik die Filtermembran schneller belegt als Molkenproteinisolat oder Polysaccharid-Protein-Konjugat. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass während des Filtrierens von gallensäurestabilisierten Doppelemulsionen weniger Anthocyane an der Membran adsorbieren als beim Filtrieren von molkenproteinisolat- oder konjugatstabilisierten Emulsionen. Dies würde bei gallensäurestabilisierten Doppelemulsionen zu einer höheren Anthocyankonzentration im Filtrat führen als bei molkenproteinisolat- oder konjugatstabilisierten Emulsionen. Somit könnte das die Ursache für die in Kapitel 8.2 beschriebene, schlechtere Einschlusseffizienz gallensäurehaltiger Emulsionen im Vergleich zu proteinhaltigen Emulsionen sein.

Um zu untersuchen, inwieweit sich die eingesetzten Emulgatormoleküle tatsächlich auf die Anthocyankonzentration c_A im Filtrat auswirken, wurde c_A von reinen Heidelbeerextraktlösungen sowie von Heidelbeerextraktlösungen mit Gallensäure, Molkenproteinisolat und Konjugat vor und nach der Passage der hydrophilen Filtermembran bestimmt.

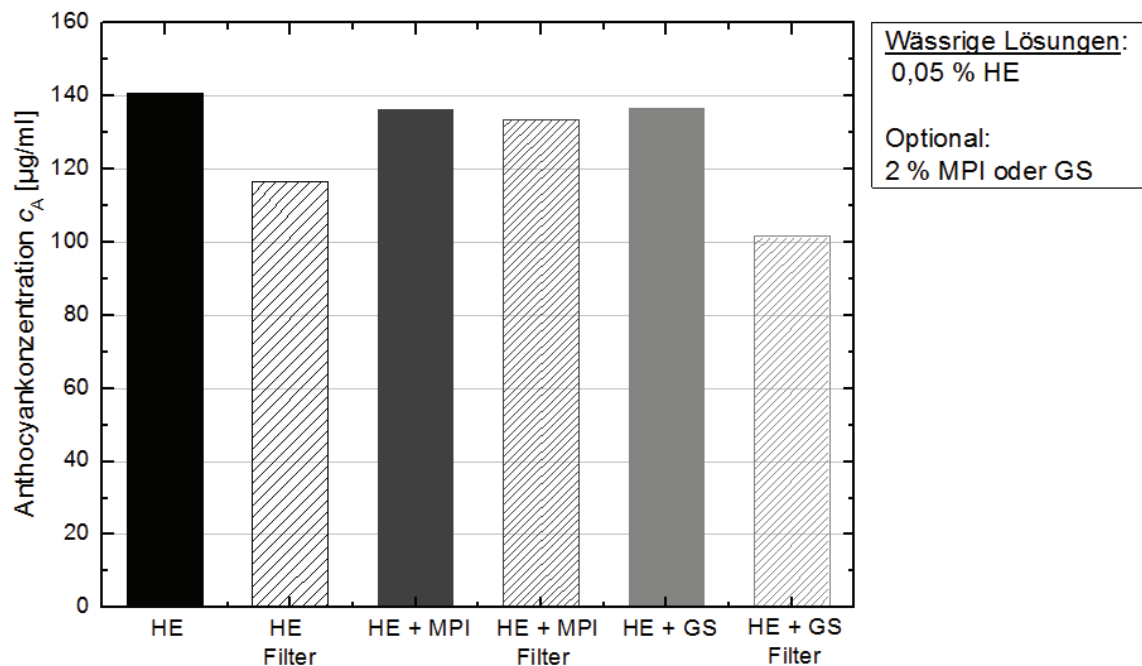


Abb. 11-23: Gemessene Anthocyankonzentrationen einer reinen Heidelbeerextraktlösung sowie Heidelbeerextraktlösungen mit MPI und GS vor (ausgefüllt) und nach (schraffiert) der Filterpassage.

Abb. 11-23 zeigt, dass die gemessenen Anthocyankonzentrationen der verschiedenen Ausgangslösungen vor der Filtration nahezu identisch sind. Demzufolge hat der Emulgator keinen Einfluss auf die photometrische Anthocyananalytik. Die Konzentrationen c_A in den Filtraten sind allerdings bei allen untersuchten Systemen niedriger als die Anthocyankonzentrationen in den Ausgangslösungen. Das bedeutet, dass es stets zu einer Adsorption von Anthocyanmolekülen an der Filtermembran kam und dadurch zu einer Verschiebung der Messergebnisse hin zu niedrigeren Anthocyankonzentrationen bzw. Freisetzungsfaktoren. Im Falle der gallensäurehaltigen Heidelbeerextraktlösung ist c_A im Filtrat allerdings geringer als bei molkenproteinisolatehaltigen Lösungen. Demnach kam es hier zu einer stärkeren Adsorption von Anthocyanmolekülen am Filter als bei molkenproteinisolatehaltigen Lösungen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Molkenproteinisolate-Moleküle die Filtermembran schneller bzw. vollständiger belegt haben als die Gallensäuremoleküle. Alternativ ist es denkbar, dass Gallensäure im Vergleich zu Molkenproteinisolate stärker mit Anthocyanen interagiert oder diese in Mizellen einschließt. Die Gallensäure-Anthocyan-Komplexe könnten dann am Filter adsorbieren, was die geringeren c_A -Werte unter Anwesenheit von Gallensäure erklären würde.

Für die in Kapitel 8.2 dargestellten Freisetzungsversuche bedeutet das, dass die Ergebnisse bzgl. der Absolutwerte nicht vergleichbar sind. Da die Abweichung

der Messwerte bei gallensäurehaltigen Emulsionen aber größer ist als bei molkenproteinisolithaltigen, sind die getroffenen Schlussfolgerungen für die Freisetzung dennoch richtig. Das heißt, dass der Unterschied zwischen der hier gemessenen Freisetzungsrage und der tatsächlichen Freisetzungsrage bei gallensäurehaltigen Emulsionen größer ist als bei molkenproteinhaltigen Emulsionen. Daher ist davon auszugehen, dass die Einschlusseffizienz von Gallensäure, im Vergleich zu Molkenproteinisolat, schlechter ist als in den in Kapitel 8.2 dargestellten Versuchen gezeigt werden konnte.