

**Vergleich von Labormethoden zur
Messung des antioxidativen Potentials
von Pflanzenteilen**

Master-Thesis

Im Master-Studiengang Lebensmittel- und
Bioprodukttechnologie
der Hochschule Neubrandenburg
- University of Applied Sciences -

zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M.Sc.)

vorgelegt von
Meike Paschke (B. Sc.)

Juni 2012

Gutachter, Gutachterin

Prof. Dr. sc. agr. Gerhard Flick, Hochschule Neubrandenburg, University of Applied Sciences, Brodaer Straße 2, 17033, Neubrandenburg, Deutschland

Dipl.-Agr. biol. Sabine Heeren, Hochschule Neubrandenburg, University of Applied Sciences, Brodaer Straße 2, 17033, Neubrandenburg, Deutschland

Abstract

The beneficial effects of many food products and beverages such as fruits, vegetables, tea, red wine, coffee and cacao on human health originate from the antioxidant activity of certain substances. Since there is an increasing interest in foods with health benefits by consumers, it becomes more and more relevant to manufacturers to allocate a high antioxidant potential to their products. However nowadays there is just a slight knowledge about the antioxidant properties of foodstuff. This is due to the fact that there are currently no standardized analyzing methods to measure antioxidant activity. The present study offers a contribution to understand the complex field of antioxidants. Three methods were chosen and compared for the determination of the antioxidant activity of different plant parts, the DMPD, FRAP and DPPH assay. During this work it was possible to establish two (FRAP and DPPH) of these three methods. Because of the similarity of the results just the FRAP assay was chosen for the analyses of the antioxidant activity of 127 samples acquired from different plants. The results were reviewed for different antioxidant activities of samples from the same plant with different growing areas. There were significant differences detected between the same plants growing in different areas. According to that, it is assumed that the antioxidant potential can be affected more powerful by the growers than by environmental influences. Furthermore a significant correlation between the content of total phenols (measured with the Folin-Ciocalteu assay) and antioxidant activity was determined.

In addition the possibility to analyze the antioxidant potential of different plant parts based on near-infrared spectroscopy was tested. Two papers were found, in which the authors showed that it is possible to establish a method for analyzing the antioxidant activity of green tea by NIR. Based on that it is assumed that it is possible, but however, developing a NIR method is very time consuming, and thus this was not carried out in the present study.

Danksagung

Ohne die Hilfe folgender Personen, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen möchte ich für Ihre tatkräftige Unterstützung danken.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Gerhard Flick für die Möglichkeit meine Master-Thesis an der Hochschule Neubrandenburg durchzuführen und für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Mein besonderer Dank geht an Sabine Heeren, die sich immer Zeit für mich genommen hat und meine Fragen geduldig beantwortete.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dagmar Schutze für die Hilfestellung bei Fragen rund ums Labor und bei Angelika Heinath für die Unterstützung bei der NIR-Spektroskopie.

Inhalt

Abstract	I
Danksagung	II
Inhalt	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Grundlagen der Oxidantien	2
1.1.1 Autoxidation	3
1.1.2 Oxidativer Stress	4
1.2 Allgemeine Grundlagen der Antioxidantien	5
1.2.1 Synthetische Antioxidantien	6
1.2.2 Natürliche Antioxidantien	7
1.3 Phenolische Antioxidantien	7
1.4 Antioxidative Wirkungsweise	9
1.5 Bestimmung des antioxidativen Potentials	10
1.6 Methoden im Vergleich	11
1.7 Wahl des Extraktionsmittels	14
1.8 Grundlagen zur UV/Vis-Spektroskopie	14
1.9 Grundlagen zur Infrarot-Spektroskopie	15
2 Zielsetzung	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Lösungen	19
3.3 Pflanzenmaterial	20
3.4 Geräte/ Materialien	21
3.5 Methoden	21
3.5.1 Extraktionsmethode 1	21
3.5.2 Extraktionsmethode 2	21
3.5.3 Extraktionsmethode 3	22
3.5.4 FRAP Test	22
3.5.5 DPPH Test	23
3.5.6 DMPD Test	24

3.5.7	Gesamtphenolbestimmung (Folin-Ciocalteu)	24
3.5.8	NIR Spektrenaufnahme	25
3.6	Statistische Auswertung.....	25
4	Ergebnisse und Diskussion.....	27
4.1	Etablierung von Labormethoden zur Messung des antioxidativen Potentials von Pflanzenteilen	27
4.1.1	Versuche zum DMPD Test.....	27
4.1.1.1	Unterschiede zwischen den Extraktionsmethoden	27
4.1.1.2	Einfluss von Trolox Standardreihen.....	29
4.1.2	Etablierung des FRAP Test.....	30
4.1.2.1	Festlegung des Endpunktes	30
4.1.2.2	Ermittlung der optimalen Verdünnungen der Probenextrakte	31
4.1.2.3	Erstellung der Trolox Kalibriergeraden	31
4.1.2.4	Der Einfluss von Aktivkohlefiltern auf das antioxidative Potential	32
4.1.2.5	Vergleich von verschiedenen Proben	33
4.1.2.6	Festlegung des Messbereichs.....	35
4.1.3	Etablierung des DPPH Test	36
4.1.3.1	Festlegung des Endpunktes der Reaktion	36
4.1.3.2	Ermittlung der optimalen Verdünnungen der Probenextrakte	37
4.1.3.3	Erstellung der Trolox Kalibriergeraden	38
4.1.3.4	Vergleich von verschiedenen Proben	39
4.1.4	FRAP Test vs. DPPH Test.....	40
4.2	Antioxidatives Potential verschiedener Pflanzenteile	43
4.2.1	Standortbedingte Unterschiede bei Blättern	46
4.2.2	Standortbedingte Unterschiede bei Säften	47
4.2.3	Erntejahrbedingte Unterschiede bei Blättern	48
4.2.4	Erntejahrbedingte Unterschiede bei den Säften	50
4.2.5	Antioxidatives Potential vs. Gesamtphenolgehalt.....	51
4.3	Versuche mit NIR-Spektroskopie	54
5	Zusammenfassung.....	56
6	Literaturverzeichnis.....	59
7	Anhang	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Die drei Schritte der Autoxidation (Shahidi & Wanasundara, 1992, S. 235)	4
Abbildung 1-2: Chemische Struktur von synthetischen Antioxidantien	6
Abbildung 3-1: FRAP Test; Reduktion des Fe(III)(TPTZ) Komplexes.....	22
Abbildung 3-2: Reaktion des DPPH Radikals in Anwesenheit von Antioxidantien.....	23
Abbildung 3-3: Reaktion des DMPD Radikalkations in Anwesenheit von Antioxidantien	24
Abbildung 4-1: Küvette mit DMPD Lösung und Probe nach einer Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur im Dunklen.....	28
Abbildung 4-2: Trolox Standardreihen 0,25 bis 2 mM in verschiedenen Extraktionslösungen für den FRAP Test	32
Abbildung 4-3: FRAP Test der Proben, extrahiert mit Extraktionslösung 1. E1: Probe mit einer Lagerzeit von einem Monat, E1 aktiv: Probe mit einer Lagerzeit von einem Monat mit Aktivkohlefilter filtriert, E1 alt: Probe mit einer Lagerzeit von etwa sechs Monaten, E1 alt aktiv: Probe mit einer Lagerzeit von etwa sechs Monaten mit Aktivkohlefilter filtriert.....	33
Abbildung 4-4: FRAP Test der unterschiedlich extrahierten Proben (normiert auf den höchsten Wert)	34
Abbildung 4-5: FRAP Test der unterschiedlich extrahierten Proben	34
Abbildung 4-6: Kalibriergerade mit Trolox als Standard in Konzentrationen von 0,0125-4 mM	35
Abbildung 4-7: Trolox Standardreihen gelöst in Extraktionslösung 1 und 3.....	38
Abbildung 4-8: Trolox Standardreihe gelöst in Extraktionslösung 2	39
Abbildung 4-9: DPPH Test der unterschiedlich extrahierten Proben (normiert auf den höchsten Wert)	40
Abbildung 4-10: DPPH Test der unterschiedlich extrahierten Proben	40
Abbildung 4-11: Auftragung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des DPPH Tests.....	42
Abbildung 4-12: Antioxidatives Potential von Blättern verschiedener Herkunft (Grenzvariationsbreite nach Tukey)	46

Abbildung 4-13: Herkunftsbezogene Unterschiede im antioxidativen Potential bei den Säften verschiedener Weinbeersorten (Grenzvariationsbreite nach Tukey).....	48
Abbildung 4-14: Gegenüberstellung des antioxidativen Potentials verschiedener Blattproben aus den Jahren 2010 und 2011	49
Abbildung 4-15: Gegenüberstellung des antioxidativen Potentials von Säften verschiedener Weinbeersorten aus den Jahren 2010 und 2011 vom Standort Klagshamn/Schweden	51
Abbildung 4-16: Darstellung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des Folin-Ciocalteu Tests der Blattproben	52
Abbildung 4-17: Darstellung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des Folin-Ciocalteu Tests der Saftproben	52
Abbildung 4-18: Auftragung der NIR Spektren der 10 verschiedenen Proben.....	54
Abbildung 4-19: NIR Spektren von Grünteeblättern aufgenommen von Zhang et al. (2004)	55
Abbildung 7-1: Auftragung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des DPPH Tests (Kapitel 4.1.4).....	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Reaktive Sauerstoffspezies und verwandte Substanzen (Papas, 1999, S. 4).....	2
Tabelle 1-2:	Endogene und exogene Antioxidantien (Papas, 1999, S. 22)	5
Tabelle 1-3:	Gängige Methoden zur Bestimmung des Antioxidativen Potentials (Rösch, 2004, S. 38).....	11
Tabelle 1-4:	Unterschiede zwischen den Tests ORAC, ABTS, FRAP, DPPH und DMPD	13
Tabelle 1-5:	Wellenlängen und Wellenzahlen der Spektralbereiche von Ultraviolett bis Fernes Infrarot (Gey, 2008, S. 215).....	15
Tabelle 1-6:	Absorptionsbanden funktioneller Gruppen und chemischer Bindungen (Gey, 2008, S. 234)	16
Tabelle 3-1:	Liste der Chemikalien und Standards	19
Tabelle 3-2:	Verwendete Geräte.....	21
Tabelle 4-1:	Absorption der Nullwerte und der Extrakte aus dem DMPD Test	28
Tabelle 4-2:	Absorptionen der Extrakte nach DMPD Test. Aktiv bedeutet mit Aktivkohlefiltern filtriert	29
Tabelle 4-3:	Absorptionen der Standards gelöst in den entsprechenden Extraktionslösungen	29
Tabelle 4-4:	Absorption FRAP Versuch 1 ohne Standards	30
Tabelle 4-5:	FRAP Test der Proben extrahiert mit Extraktionslösung 1, 2 oder 3..	31
Tabelle 4-6:	Standardabweichungen in % der gemessenen Absorptionen bei den gegebenen Trolox Konzentrationen in mmol.....	36
Tabelle 4-7:	Veränderung der Absorption mit der Zeit. Küvetten mit Parafilm verschlossen.....	37
Tabelle 4-8:	Korrelation nach Pearson zwischen FRAP und DPPH.....	41
Tabelle 4-9:	Einteilung des antioxidativen Potentials [mmol TE/ g TG] der Blattproben nach Tukey	44
Tabelle 4-10:	Einteilung des antioxidativen Potentials [mmol TE/ L] der Saftproben nach Tukey	45

Tabelle 4-11:	Korrelation nach Pearson zwischen dem antioxidativen Potential und dem Gesamtphenolgehalt.....	52
Tabelle 4-12:	Korrelationen zwischen dem antioxidativen Potential und Gesamtphenolen (Roginsky und Lissi, 2005).....	53
Tabelle 5-1:	Zusammenfassung der Ergebnisse der drei Tests zur Bestimmung des antioxidativen Potentials	56
Tabelle 7-1:	Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZzulV) Anlage 5 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Teil D Antioxidationsmittel für bestimmte Lebensmittel (Teil 1)	64
Tabelle 7-2:	Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZzulV) Anlage 5 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Teil D Antioxidationsmittel für bestimmte Lebensmittel (Teil 2)	65
Tabelle 7-3:	Verwendetes Pflanzenmaterial (Teil 1). Die Blattproben wurden Gefriergetrocknet und mit der Pulvermühle gemahlen (0,5 µm)	66
Tabelle 7-4:	Verwendetes Pflanzenmaterial (Teil 2). Die Blattproben wurden Gefriergetrocknet und mit der Pulvermühle gemahlen (0,5 µm)	67
Tabelle 7-5:	Verwendetes Pflanzenmaterial (Teil 3). Die Blattproben wurden Gefriergetrocknet und mit der Pulvermühle gemahlen (0,5 µm)	68
Tabelle 7-6:	DPPH Test der verschiedenen Proben extrahiert mit Extraktionsmethode 1, 2 oder 3 (Kapitel 4.1.3.4)	69
Tabelle 7-7:	FRAP Test der verschiedenen Proben extrahiert mit Extraktionsmethode 1, 2 oder 3 (Kapitel 4.1.2.5)	70
Tabelle 7-8:	Q Werte für die Berechnung der Grenzvariationsbreite nach Tukey ($\alpha=0,05$) (http://www.stat.wisc.edu/courses/st571-ane/tables/tableQ.pdf [15.05.2012])	71
Tabelle 7-9:	Antioxidatives Potential gemessen mit dem FRAP Test für Blattproben (Kapitel 4.2)	73
Tabelle 7-10:	Antioxidatives Potential gemessen mit dem FRAP Test für Saftproben (Kapitel 4.2)	74
Tabelle 7-11:	Gesamtphenolgehalt für Blattproben berechnet als Chlorogensäureäquivalente (Kapitel 4.2.5)	75
Tabelle 7-12:	Gesamtphenolgehalt für Saftproben berechnet als Chlorogensäureäquivalente (Kapitel 4.2.5)	76

Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben	77
Tabelle 7-14: Berechnung des antioxidativen Potentials der Saftproben	84

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ANOVA	„Analysis of variance“ Varianzanalyse
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
DMPD	N,N-Dimethyl-1,4-phenyl-endiamin
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ET	Elektronentransfer
FRAP	„ <i>Ferric Ion Reducing Antioxidant Power</i> “
FTIR	Fourier-Transform-Technik
GC	Gaschromatograph
GV	Grenzvariationsbreite nach Tukey
HAT	Wasserstoffatom-übertragung
MAP	Verpackung in modifizierter Atmosphäre
NIR	Nahes Infrarot
ORAC	„ <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> “
p Wert	„ <i>p value = probability value</i> “ Signifikanzwert
PG	Propyl Gallat
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TBHQ	tert-Butylhydroquinone
TEAC	„ <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> “
TRAP	„ <i>Total reactive antioxidant potential</i> “

1 Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit (WHO, 2011). Insbesondere durch den Konsum von Zigaretten, Alkohol, fettigem und salzigem Essen und durch körperliche Inaktivität wird die Wahrscheinlichkeit von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhöht. Diese Einflüsse rufen Stoffe im Körper hervor, welche das Aufkommen von potentiell schädlichen Oxidantien im menschlichen Körper begünstigen, sogenannte Prooxidantien (Wang et al., 2011). Das Aufkommen von Oxidantien im menschlichen Organismus steht, neben Herz-Kreislaufkrankungen, in enger Verbindung mit der Beschleunigung des Alterungsprozesses und der Entstehung verschiedener weiterer Krankheiten, wie beispielsweise Arteriosklerose und Krebs. (Halliwell und Gutteridge, 1999)

Da der menschliche Organismus oft selbst nicht in der Lage ist, diese schädlichen Substanzen komplett abzubauen, müssen antioxidativ wirksame Substanzen mit der Nahrung aufgenommen werden (Halliwell und Gutteridge, 1999). Laut Wu et al. (2004) stellen Früchte die reichhaltigste Quelle von Antioxidantien in der täglichen Ernährung dar. Dies führen die Autoren vor allem auf deren hohen Gehalt an Vitaminen, Phenolen und Carotinoiden zurück.

Zum jetzigen Zeitpunkt liegen aus wissenschaftlicher Sicht keine ausreichenden Informationen über die Zusammensetzung der Nahrungsmittel im Hinblick auf ihre antioxidative Wirkung vor. Zwar existieren bereits verschiedene Methoden um das antioxidative Potential zu messen, allerdings lassen sich die Ergebnisse dieser Methoden meist nicht direkt miteinander vergleichen (Frankel und Meyer, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wird sich mit der Entwicklung von Labormethoden zur Bestimmung des antioxidativen Potentials beschäftigt. Mit den etablierten Methoden sollen anschließend verschiedener Pflanzenteile analysiert werden.

1.1 Allgemeine Grundlagen der Oxidantien

Da Sauerstoff gesundheitsschädliche wie auch gesundheitsfördernde Eigenschaften aufweist, wird er auch als Janus Gas bezeichnet. Der Name Janus stammt von dem römischen Gott Janus, der mit zwei Köpfen dargestellt wird, welche in entgegengesetzte Richtungen blicken (Burton, 2009).

Im menschlichen Organismus werden potentiell schädliche Oxidantien durch den eingeatmeten Sauerstoff gebildet. Die Erzeugnisse werden als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet (Rösch, 2004). In der Regel handelt es sich dabei um freie Radikale. Freie Radikale sind chemische Substanzen mit ungepaarten Elektronen. Da es sich dabei um einen energetisch ungünstigen Zustand handelt, greifen diese Substanzen andere Stoffe an (Papap, 1999). Freie Radikale können aus vielen Elementen gebildet werden, die Oxidantien, die in biologischen Systemen eine Rolle spielen, beinhalten jedoch in der Regel Sauerstoff oder Stickstoff (Burton et al., 2011). Potentiell schädliche Oxidantien, die Stickstoffatome beinhalten, werden auch als reaktive Stickstoffspezies (RNS) bezeichnet (Wang et al., 2011).

Nicht nur freie Radikale sondern auch ihre nicht-radikalen Formen zählen zu den ROS und RNS. In den meisten Fällen werden nicht-radikale Oxidantien allerdings zu Radikalen generiert. In Tabelle 1-1 sind wichtige Oxidantien aufgelistet.

Tabelle 1-1: Reaktive Sauerstoffspezies und verwandte Substanzen (Papap, 1999, S. 4)

Radikale		Nicht-Radikale	
$O_2^{\cdot -}$	<i>Superoxide</i>	H_2O_2	<i>Wasserstoffperoxide</i>
HO^{\cdot}	<i>Hydroxyl Radikale</i>	1O_2	<i>Singlet-Sauerstoffe</i>
HO_2^{\cdot}	<i>Hydroperoxyl Radikale</i>	$LOOH$	<i>Lipid Hydroperoxide</i>
L^{\cdot}	<i>Lipid Radikale</i>	$Fe=O$	<i>Eisen-Sauerstoff Komplexe</i>
LO_2^{\cdot}	<i>Lipid Peroxyl Radikale</i>	$HOCl$	<i>Hypochloride</i>
LO^{\cdot}	<i>Lipid Alkoxyl Radikale</i>		
NO_2^{\cdot}	<i>Stickstoffdioxide</i>		
$^{\cdot}NO$	<i>Stickstoffmonooxide</i>		
RS^{\cdot}	<i>Thiyl Radikale</i>		
P^{\cdot}	<i>Protein Radikale</i>		

Oxidation und Entstehung freier Radikale, sowie ROS/RNS spielen eine bedeutende Rolle im Kreislauf des Lebens und des menschlichen Metabolismus. Oxidantien werden von unserem Körper bewusst produziert um wichtige biologische Funktionen zu unterstützen, zum Beispiel um sich gegen eindringende Bakterien oder Pilze zu

wehren. Zudem sind Peroxide am Zellwachstum und der interzellulären Kommunikation beteiligt. Solange freie Radikale und ROS in der notwendigen Menge, am richtigen Ort und zu der richtigen Zeit produziert werden, stellen sie also einen Nutzen für den menschlichen Körper dar.

Auf der anderen Seite handelt es sich um sehr reaktive Substanzen, die Moleküle in ihrer Umgebung augenblicklich angreifen, was sie zu schädlichen Substanzen macht (Papas, 1999). Durch eine gesunde Lebensweise kann man die Bildung von Oxidantien hemmen, da diese durch verschiedene Einflüsse vermehrt im Körper gebildet werden. Die Entstehung freier Radikale im menschlichen Körper kann durch verschiedene äußere oder biologische Einflüsse hervorgerufen werden. Zu den äußeren Einflüssen gehören ultraviolette Sonnenstrahlen, radioaktive Strahlungen, Zigarettenrauch, Smog, Ozonstrahlung, Medikamente, Chemikalien und Pestizide. Die biologische Erzeugung von ROS resultiert aus metabolischen Reaktionen, wobei es sich um einen natürlichen Prozess handelt, der erst gesundheitsschädlich wird, wenn der Abwehrmechanismus nicht mehr in der Lage ist die gebildeten Radikale zu neutralisieren (Wang et al., 2011). Können die gebildeten Radikale vom betroffenen Organismus nicht mehr neutralisiert werden, wird eine Kettenreaktion (Autoxidation) gestartet. Die chemischen Abläufe während der Autoxidation werden im folgenden Abschnitt erläutert.

1.1.1 Autoxidation

Die Bildung der freien Radikale wird auch als Initiation bezeichnet. Werden diese freien Radikale nicht neutralisiert, startet die Initiation eine Autoxidation. Im zweiten Schritt der Autoxidation, der sogenannten Propagation, läuft eine Kettenreaktion ab, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Durch die Termination, dem dritten Schritt, kann die Kettenreaktion unterbrochen werden, wobei nicht-radikale Produkte entstehen (Abbildung 1-1).

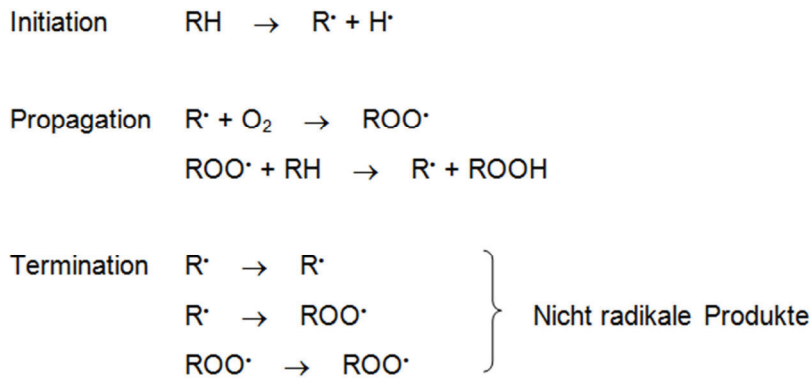


Abbildung 1-1: Die drei Schritte der Autoxidation (Shahidi & Wanasundara, 1992, S. 235)

Die nach der Initiation entstandenen freien Radikale sind an der Oxidation von Pigmenten, Aromen und Vitaminen beteiligt und tragen zudem zur Veränderung der Funktionalität und Textur von Proteinen bei. Die aus der Propagation hervorgegangenen Wasserstoffperoxide beschädigen Stoffe wie Ketone, Aldehyde, Alkohole, Kohlenhydrate, Säuren und Epoxide. Außerdem sind sie an der Polymerisation einiger Produkte beteiligt, wodurch es zu Verfärbungen oder eventuellen Vergiftungen von Lebensmitteln kommen kann. An der Veränderung der Funktionalität und Textur von Proteinen sind sie ebenfalls beteiligt (Shahidi und Wanasundara, 1992). Durch die Auswirkungen der Autoxidation wird oxidativer Stress im Körper hervorgerufen.

1.1.2 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress tritt auf, wenn die Produktion an Oxidantien die internen antioxidativen Abwehrmechanismen übersteigt. Dadurch besteht eine erhöhte Gefahr an Krebs oder Arthritis zu erkranken. Zudem führt der oxidative Stress zu einer degenerativen Verschlechterung des Sehvermögens und zu neurologischen Schäden. Zudem werden generelle Alterungsprozesse begünstigt. Die am häufigsten erforschten Krankheiten, die durch oxidativen Stress begünstigt werden, sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Damit in Verbindung stehen Krankheiten wie Arteriosklerose, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Typ 2 Diabetes und Herzinfarkt (Wang et al., 2011).

Die Aufnahme von Obst und Gemüse kann die Wahrscheinlichkeit an Krebs oder Herz-Kreislauf-Schwächen zu erkranken reduzieren. Dies ist unter anderem bedingt durch den Anteil an Antioxidantien in pflanzlichen Erzeugnissen (Gaziano und Hennikens, 1996).

1.2 Allgemeine Grundlagen der Antioxidantien

Antioxidantien sind Substanzen, welche in der Lage sind, die Oxidation anderer Moleküle zu unterdrücken, indem sie die Oxidationsketten unterbrechen (Larson, 1988). Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Oxidationsketten zu unterbrechen. Einige Antioxidantien agieren dabei als Terminatoren, die die Kettenreaktion durch Reaktion mit den freien Radikalen stoppen (siehe Kapitel 1.1.1 Autoxidation). Andere bilden Chelatkomplexe mit Metallionen oder sie agieren als Sauerstoffradikalfänger. Bei allen Vorgehensweisen werden Radikale in stabile Produkte überführt. Man spricht hier auch von primären Antioxidantien. Sekundäre Antioxidantien hingegen hemmen die Initiation von freien Radikalen durch das Aufspalten von Hydroperoxiden (Shahidi, 2000).

Antioxidantien werden mit der Nahrung aufgenommen um den Körper vor freien Radikalen und ROS/RNS zu schützen (exogene Antioxidantien). Zusätzlich verfügt der menschliche Organismus über ein komplexes antioxidatives Abwehrsystem, bestehend aus verschiedenen Substanzen (Tabelle 1-2) die vor oxidativen Schäden schützen (endogene Antioxidantien). Ihre Wirkungsweise besteht hauptsächlich darin Substanzen, die freie Radikale produzieren, unschädlich zu machen.

Tabelle 1-2: Endogene und exogene Antioxidantien (Papas, 1999, S. 22)

Endogene Antioxidantien	Exogene Antioxidantien
<i>Glutathion und Se-Glutathion</i>	<i>Tocopherole und Tocotrienole (Vitamin E)</i>
<i>Eisen-Katalase</i>	<i>Ascorbat (Vitamin C)</i>
<i>NADPH</i>	<i>Vitamin A und Carotenoide</i>
<i>Ubichinol (reduzierte Form des Q₁₀)</i>	<i>Se und andere Metalle (Notwendig für die Funktion von Antioxidative Enzymen)</i>
<i>Mn-, Cu-, Zn-Superoxiddismutase</i>	<i>Pflanzenwirkstoffe mit Antioxidativen Wirkungen</i>
<i>Harnsäure</i>	<i>Synthetische Antioxidantien</i>
<i>Liponsäure</i>	
<i>Hormone mit antioxidativen Wirkungen (Melatonin, DHEA uw.)</i>	
<i>Metall bindende Proteine (z.B. Albumin)</i>	

Antioxidantien spielen auch als Konservierungsstoffe für Lebensmittel eine wichtige Rolle. Antioxidativ wirkende Lebensmittelzusatzstoffe werden laut FAO/WHO (2011) folgendermaßen definiert: „A food additive, which prolongs the shelf-life of foods by protecting against deterioration caused by oxidation“.

Der Prozess der Autoxidation verschiedener Substanzen und die daraus resultierende Ranzigkeit von Lebensmitteln werden durch freie Radikale ausgelöst. Durch die Anwendung von Antioxidantien in Lebensmitteln soll die Oxidation verlangsamt werden. Aus physiologischer Sicht sind Antioxidantien zudem durch ihre Fähigkeit den Körper bei der Verteidigung gegen ROS zu unterstützen von Interesse.

Neben dem Einsatz von Antioxidationsmitteln gibt es weitere Möglichkeiten Lebensmittel vor der Autoxidation zu schützen. Beispielsweise werden Vakuum-Verpackungen oder die Verpackung in modifizierter Atmosphäre (MAP) sowie Kühl- oder Gefrierlagerung angewandt. Oft werden diese Methoden in Kombination mit Antioxidantien angewendet, da nur ein geringer Anteil an Sauerstoff notwendig ist um den Oxidationsprozess zu starten. Zudem ist es oft nicht möglich oder sinnvoll, den kompletten Sauerstoff von einem Lebensmittel zu entziehen. Der Schutz von Lebensmitteln vor der Autoxidation ist notwendig um die Lagerfähigkeit dieser zu verlängern und dadurch die Verschwendung von Lebensmitteln zu reduzieren.

Von Lebensmittel-Antioxidantien sollte keine Gesundheitsgefährdung ausgehen, sie sollten farb- und geschmacklos sein, in geringen Konzentrationen wirken, leicht zu dosieren sein, ihre Struktur während des Prozesses nicht verändern, in dem fertigen Produkt stabil sein und zu geringen Kosten erhältlich sein (Shahidi, 2000). Es gibt synthetische und natürliche Antioxidantien (Larson, 1988).

1.2.1 Synthetische Antioxidantien

Durch die Entdeckung der antioxidativen Eigenschaften von Butylhydroxyanisol (BHA) in den 40er Jahren wurden seitdem synthetische Antioxidantien zum Schutz der Qualität verwendet (Shahidi, 2000). Synthetische Antioxidantien weisen in der Regel ein phenolisches Grundgerüst auf, welches in verschiedenen Graden alkyliert sein kann (Larson et al., 1988). Die meist verbreiteten synthetischen Antioxidationsmittel sind Butylhydroxyanisol (BHA), Butylhydroxytoluol (BHT), Propyl Gallat (PG) und tert-Butylhydroquinone (TBHQ) (Shahidi, 2000) (Abbildung 1-2).

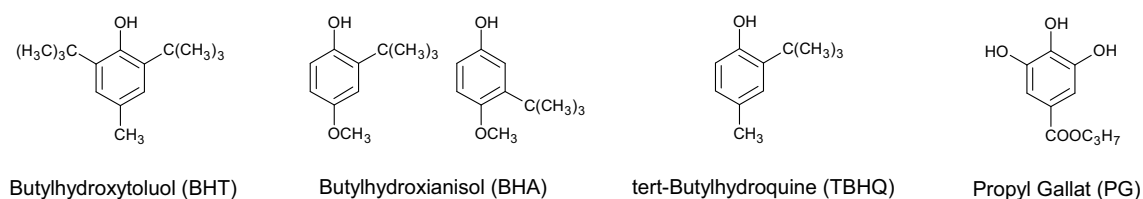


Abbildung 1-2: Chemische Struktur von synthetischen Antioxidantien

Ein Auszug der Zusatzstoffzulassungsverordnung bezüglich der Höchstmengen und Anwendungsgebiete von Antioxidantien befindet sich im Anhang (Tabelle 7-1). Durch die Annahme, dass synthetische Antioxidantien krebserregend sein könnten, wachsen das Interesse und die Anzahl an Untersuchungen an natürlichen Alternativen.

1.2.2 Natürliche Antioxidantien

Natürliche Antioxidantien sind Phenole (Tocopherole, Flavonoide, und phenolische Säuren), stickstoffhaltige Substanzen (Alkaloide, Chlorophyll-Derivate, Aminosäuren und Amine) oder Carotinoide, sowie auch Ascorbinsäure (Larson, 1988).

Laut Wu et al. (2004) stellen Früchte die größte Quelle von Antioxidantien in der täglichen Ernährung dar. Vor allem durch den hohen Gehalt an Vitaminen, Phenolen und Carotinoiden. Auch in Milch und Milchprodukten konnten antioxidativ wirkende Substanzen nachgewiesen werden (Chen et al., 2003). Dem Milchpeptid (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ser-Asp-Ile) konnte sogar ein stärkeres antioxidatives Potential als dem synthetischen Antioxidationsmittel BHA nachgewiesen werden (Hernández et al., 2005). Polyphenole sind allerdings die bedeutendste Stoffklasse wenn es um natürliche Antioxidantien geht. Sie sind nicht nur quantitativ die am Häufigsten durch die Nahrung aufgenommen Antioxidantien (O'Neill et al., 2001), sie weisen auch ein höheres antioxidatives Potential als viele andere Antioxidantien, wie beispielsweise Vitamin C und E auf (Rice-Evans, 1997).

1.3 Phenolische Antioxidantien

Phenolische Verbindungen sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die in allen Früchten und Gemüse vorkommen (Wang et al., 1996). Neben Ihren gesundheitsfördernden Wirkungen, tragen sie zur Färbung und zu den sensorischen Eigenschaften von Früchten und Gemüse bei (Alasalvar et al., 2001). In der Lebensmittelindustrie werden sie als natürliche Farbstoffe und als Konservierungsmittel eingesetzt (Pinelo et al., 2005).

Aus dem Namen geht bereits hervor, dass es sich um chemische Verbindungen handelt, die aus einem oder mehreren aromatischen Ringen bestehen, welche mit mindestens einer Hydroxylgruppe substituiert sind (Rösch, 2004). Es wird angenommen, dass der Grad der Hydroxylierung der Polyphenole einen Einfluss auf die antioxidative Wirksamkeit (Rice-Evans, 1997) und auf die Bioverfügbarkeit hat

(Hollman und Arts, 2000). Die Moleküle reichen von einfachen Phenolsäuren oder phenolischen Alkoholen zu komplexen, hochmolekularen Polymeren. Sie werden entsprechend der Anzahl ihrer aromatischen Ringe und den Strukturelementen, welche an diese Ringe gebunden sind, in verschiedene Klassen eingeteilt. Die vier wichtigsten Klassen sind Flavonoide, Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren, Tannine, Stilbene und Lignane (D'Achivio et al., 2007). Für weiterführende Informationen wird auf einschlägige Literatur verwiesen (siehe Ebermann und Elmadfa, 2008; Ignat et al., 2011; Paschke, 2011; Robbins, 2003; Serrano et al., 2009).

Polyphenole haben folgende gesundheitlich wirkende Eigenschaften:

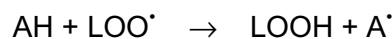
- Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies
- Schutz der Blutgefäße
- Hemmung der LDL-Oxidation
- Antikarzinogene und Antimutagene Wirkung
- Endzündungshemmende Eigenschaften
- Schutz vor UV- und ionisierender Strahlung
- Antibakterielle Eigenschaften
- Anti-Histamin-Wirkung
- Antiallergene Wirkung
- Regeneration anderer Antioxidantien.

Die meisten positiven Effekte sind dabei auf ihre Funktion als Antioxidantien zurückzuführen. Obwohl phenolische Antioxidantien sehr effektiv im Schutz vor Autoxidation sind, gibt es nur wenige, die als Lebensmittel-Antioxidans zugelassen sind. Dies ist bedingt durch die konzentrationsabhängige mögliche Toxizität phenolischer Substanzen und deren Derivate (Shahidi und Naczk, 1995).

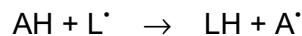
Als eine indirekte Wirkung phenolischer Substanzen gegen die Bildung von ROS, ist die Komplexbildung von Metallionen zu nennen, da diese durch ihre katalysierende Wirkung zur verstärkten Wirkung von ROS beitragen können. Zudem wurden ihnen inhibierende und induzierende Wirkungen auf Enzyme nachgewiesen (Rösch, 2004). Die antioxidative Wirksamkeit der Polyphenole beruht auf den außenstehenden Hydroxylgruppen. Dieser Wirkungsmechanismus gilt auch für viele andere Antioxidantien, wie beispielsweise die Ascorbinsäure.

1.4 Antioxidative Wirkungsweise

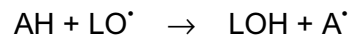
Phenolische Antioxidantien (AH) weisen verschiedene antioxidative Eigenschaften auf. Ihre Eigenschaft radikal-induzierte Kettenreaktionen zu unterbrechen, wird häufig für die Bestimmung des antioxidativen Potentials verwendet. Je nach vorliegenden atmosphärischen Konditionen, arbeiten sie dabei als Elektronen Donor oder Akzeptor. Liegt ausreichend Sauerstoff vor, unterbrechen sie die Kettenreaktion, indem sie ein Elektron an die Peroxylradikale (LOO^\bullet), welche während der Autoxidation entstehen, abgeben.



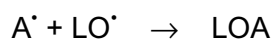
Bei einem Mangel an Sauerstoff hingegen, nehmen sie ein Elektron der lipiden Radikale (L^\bullet) auf.



Wasserstoffperoxide zerfallen zu Alkoxyradikalen, welche neben weiteren Abbauprodukten Aldehyde formen. Diese sind ebenfalls an dem Oxidationsprozess von Lipiden beteiligt. Antioxidantien können den Abbau von Wasserstoffperoxiden zu Alkoxyradikalen verhindern. Zum Einen reagieren sie mit den bereits gebildeten Alkoxyradikalen (LO^\bullet), wodurch stabile Wasserstoffkomponenten entstehen,



zum anderen können sie mit den Alkoxyradikalen eine Terminationsreaktion eingehen, wobei nicht-radikale Produkte entstehen.



Das antioxidative Potential wird in der Regel an der Eigenschaft die Wasserstoffperoxidbildung zu hemmen gemessen. Ihre Eigenschaft, die Bildung von Aldehyden zu hemmen ist allerdings von gleicher Bedeutung und sollte ebenso ermittelt werden (Frankel und Meyer, 2000).

Um die totale antioxidative Kapazität (TAC) von Lebensmitteln oder Pflanzenteilen zu ermitteln, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Allerdings gibt es derzeit keine standardisierten Methoden, weshalb jede Methode mit verschiedenen Oxidationsbedingungen und unterschiedlichen Messmethoden arbeitet (Frankel und Meyer, 2000).

1.5 Bestimmung des antioxidativen Potentials

Die antioxidative Wirksamkeit ist von großer Bedeutung für lebensmitteltechnologische Studien, da sie einen Mehrwert für verschiedene Lebensmittel mit sich bringt. Polyphenole sind quantitativ die am Häufigsten durch die Nahrung aufgenommen Antioxidantien (O'Neill et al., 2001). Nach der Ernte durchlaufen sie allerdings verschiedene Reaktionen (unter anderem Welke- und Seneszenzprozesse), welche einen negativen Einfluss auf ihr antioxidatives Potential haben können (Srivastava et al., 2007). Gerade der Seneszenzvorgang bei der Fruchtreifung kann einen Einfluss haben, da hier ein Farbwechsel zustande kommt, der durch den Abbau des Chlorophylls aber auch durch die Synthese von Carotinoiden oder Anthocyanen hervorgerufen wird (Ziegler, 1998).

Auch die anschließende Lagerung (z.B. Zeit, Temperatur, Umgebungsbedingungen) und Verarbeitung (Zerkleinern, Zeit und Temperatur verschiedener Prozessschritte, Zugabe von synthetischen Antioxidantien) von Lebensmitteln haben einen Einfluss auf ihr antioxidatives Potential (Srivastava et al., 2007).

Um Angaben über die antioxidative Wirksamkeit eines Lebensmittels machen zu können, müssen standardisierte Methoden verwendet werden. Bei den in der Literatur verwendeten Methoden gibt es bedeutende Unterschiede in der Probenaufbereitung, Probenextraktion, der Wahl von Endpunkten und der Wiedergabe der Ergebnisse, sogar innerhalb gleicher Methoden. Darum ist es derzeit beinahe unmöglich, die Ergebnisse verschiedener Laboratorien miteinander zu vergleichen (Frankel und Meyer, 2000).

Tabelle 1-3: Gängige Methoden zur Bestimmung des Antioxidativen Potentials (Rösch, 2004, S. 38)

Bestimmungsmethode	Freies Radikal als Reagent	Oxidationssubstrat	Antioxidantien für die diese Methode entwickelt wurde
Wasserstoffatomtransfer (HAT)			
ORAC-Test „Oxygen radical absorbance capacity“		β -Phycoerythrin, Fluoreszein	Universell
TRAP-Test „total reactive antioxidant potential“		ABAP	Blut Plasma
β -Carotin-Bleichungstest		Linolensäure	Phenole
LDL Oxidationstest		Linolensäure, LDL	Phenole
Elektrontransfer (ET)			
DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	DPPH [•]		Phenole, Wein
FRAP „Ferric Ion Reducing Antioxidant Power“		Fe ³⁺ -TPTZ	Universell, Fruchtsäfte
TEAC „Trolox equivalent antioxidant capacity“	ABTS ^{•+} 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)		Universell, Pflanzen Extrakte, Säfte, Wein
DMPD ^{•+} N,N-Dimethyl-1,4-phenyl-endiamin	DMPD ^{•+}		

Grundsätzlich gibt es zwei Ansätze das antioxidativen Potentials zu messen; durch Wasserstoffatomübertragung (HAT) oder durch Elektronentransfer (ET) (Huang et al., 2005). Zu den meist verwendeten HAT und ET Methoden zählen die ORAC und die TEAC Methode (Frankel und Meyer, 2000). Tabelle 1-3 zeigt eine Übersicht einiger Methoden die für die Bestimmung des antioxidativen Potentials eingesetzt werden.

Bei den Methoden ORAC, ABTS, DPPH und FRAP handelt es sich um häufig angewandte Methoden, um die antioxidative Kapazität verschiedener pflanzlicher Extrakte zu bestimmen. Darum sind diese Methoden für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse und werden im folgenden Kapitel miteinander verglichen. Der DMPD Test wird nicht so häufig angewandt wie die oben erwähnten Methoden, ist aber für die vorliegende Arbeit ebenfalls von Interesse und wird darum ebenfalls mit den genannten Methoden verglichen.

1.6 Methoden im Vergleich

Da es sich bei Lebensmitteln um Stoffgemische mit verschiedenen Antioxidantien handelt, die in verschiedener Art und Weise wirken und zwischen denen es auch zu

Wechselwirkungen kommen kann, ist es notwendig das antioxidative Potential durch Kombination verschiedener Testmethoden zu bestimmen (Frankel und Meyer, 2000).

Der FRAP, ABTS, DPPH, DMPD und ORAC Test unterscheiden sich im Wesentlichen in dem zu reduzierenden Substrat, dem Reaktionsmechanismus (HAT, ET), der Farbmessung und der Berechnung der Ergebnisse.

Im FRAP Test wird die Fähigkeit der Probe Metall zu reduzieren gemessen, während bei dem ABTS, DPPH, ORAC und DMPD Test freie Radikale reduziert werden.

FRAP und ABTS unterliegen dem Reaktionsmechanismus ET, ORAC dem HAT und DPPH kombiniert beide (Foti et al., 2004; Prior et al., 2005).

Die Messung erfolgt bei FRAP, ABTS, DMPD und DPPH mit einem Spektralphotometer für die Messung des Reaktionsverlaufs, beim ORAC Test wird ein Fluorometer benötigt.

Es gibt verschiedene Methoden die Ergebnisse der Antioxidationstests anzugeben, selbst innerhalb einer Methode. Meistens werden die Ergebnisse als Trolox (hydrolysierbares Analog von Vitamin C) Äquivalente angegeben. Dies entspricht den μmol Trolox die notwendig sind, um dieselbe antioxidative Kapazität in einem Gramm der Probe, zu gewährleisten. FRAP, ABTS, ORAC und DMPD werden in Trolox Äquivalenten angegeben (Ouet al., 2001; Re et al., 1999). Der Abbau des DPPH Radikals wird hingegen spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 515 nm gemessen, bis die Absorption konstant bleibt. Die Ergebnisse werden als EC_{50} angegeben. Dies entspricht der Menge an Probe die benötigt wird um 50% der ursprünglichen Menge des DPPH Radikals einzufangen (Sánchez-Moreno et al., 1999). Es existieren allerdings auch Veröffentlichungen zur DPPH Methode bei der das Ergebnis ebenfalls als Trolox Äquivalent angegeben wurde (Thaipong et al., 2006).

In Tabelle 1-4 sind die Unterschiede zwischen den Methoden zusammengefasst.

Tabelle 1-4: Unterschiede zwischen den Tests ORAC, ABTS, FRAP, DPPH und DMPD

	ORAC	ABTS	FRAP	DPPH	DMPD
Chemikalien	Fluoreszein Phosphat Puffer AAPH Trolox	ABTS Kaliumperoxidsulfat Ethanol oder Phosphat Puffer Trolox	TPTZ Chlorwasserstoff Essigsäure Natriumacetat Eisen(III)-Chlorid Hexahydrat Trolox	DPPH Methanol	DMPD FeCl ₃ • 6H ₂ O Trolox Acetat Puffer
Kostenaufwand für Chemikalien pro 100 Proben	0,60 €	7,48 €	3,24 €	10,99€	0,02 €
Geräte	Fluorometer	Spektralphotometer	Spektralphotometer	Spektralphotometer	Spektralphotometer
Herstellung Radikal	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja
Arbeitsaufwand	Gering	Gering	Mittel	Sehr gering	Gering
Art	HAT	ET	ET	ET	ET
Angabe Ergebnisse	Trolox Äquivalent	Trolox Äquivalent	Trolox Äquivalent	EC ₅₀	Trolox Äquivalent
Veröffentlichte Artikel insgesamt^{a)}	337	769	633	2530	24
In den letzten 3 Jahren^{a)}	60,5 %	56,3 %	62,7 %	54,5 %	62,5 %

^{a)}Bei Eingabe der Methode und Antioxidant für Titel, Abstract und Stichwörter als Suchbegriff auf www.ScienceDirect.com [21.10.2011].

1.7 Wahl des Extraktionsmittels

Die Effektivität eines Antioxidans wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Vor allem der Extraktionsschritt spielt dabei eine wichtige Rolle (Frankel und Meyer, 2000).

In der Regel wird die antioxidative Wirksamkeit von Lebensmittelextrakten, welche aus wässrigen-organischen Lösemitteln gewonnen wurden, gemessen. Lösemittel sind in der Regel Methanol, Ethanol, Aceton oder Chloroform. Allerdings gibt es kein Lösemittel, das in der Lage ist alle Antioxidantien eines Lebensmittels zu extrahieren (Bravo et al., 1994). Daraus folgt, dass eine erhebliche Menge an Antioxidantien in den Extraktionsrückständen verbleibt.

Die meisten Antioxidantien lösen sich in polaren Lösemitteln wie Methanol. Lipophile Antioxidantien lösen sich hingegen in Essigsäureethylester oder Chloroform. Das Ansäuern der Lösemittel trägt ebenfalls zu einer höheren Extraktionsausbeute bei (Gorinstein et al., 2007).

Die Extraktion von Antioxidantien aus pflanzlichen Lebensmitteln sollte mindestens zwei Extraktionsschritte mit wässrigen-organischen Lösungsmitteln verschiedener Polarität beinhalten, um Antioxidantien mit unterschiedlichen chemischen Strukturen zu extrahieren (Pérez-Jiménez und Saura-Calixto, 2005).

Die Rückstände dieser Extrakte sind immer noch reich an Antioxidantien, darunter hauptsächlich hydrolysierbare Phenole und Carotinoide, welche an Cellulose oder Proteine gebunden sind. Durch das Abspalten der Lebensmittelmatrix können diese Substanzen im menschlichen Verdauungstrakt bioaktiv werden (Jenner et al., 2005).

1.8 Grundlagen zur UV/Vis-Spektroskopie

Die wohl am häufigsten angewandte Strategie zur Messung des antioxidativen Potentials liegt in der Verwendung eines chromophoren Radikals als Reaktionspartner für eventuell vorhandene antioxidativ wirkende Substanzen. Wobei der Verlust der Farbe des Reaktionsmediums proportional zur Konzentration antioxidativer Substanzen ist (Wood et al., 2006). Zu diesen Radikalen zählen u.a. ABTS^{•+}, DPPH[•] und DMPD^{•+}. Der Farbverlust wird dann in der Regel mittels UV/Vis-Spektralphotometrie verfolgt.

Bei der UV/Vis-Spektralphotometrie wird ein monochromatischer Lichtstrahl durch eine flüssige Probe geleitet. Die selektierte Wellenlänge, wird beim Passieren der Probe durch Absorption und durch Reflektion und Streuung geschwächt. Durch die Ermittlung der Differenz zwischen der Strahlung am Eingang der Probe und nach Durchlaufen der

Probe kann eine Aussage über das Absorptionsverhalten der Probe getroffen werden. Da dieses von bestimmten Faktoren abhängig ist, können Unterschiede zwischen den Proben ermittelt werden. Hervorgerufen wird die Lichtabsorption durch Chromophore. Dies sind Farbstoffe, in denen anregbare Elektronen verfügbar sind. Die Aufnahme bestimmter Lichtmengen verursachen Elektronenübergänge wodurch ein Elektron von seinem Grundzustand in den angeregten Zustand überführt wird.

Für die Lichtstrahlen im UV-Bereich dient eine Deuterium Lampe, im Vis-Bereich werden Halogen- oder Wolframlampen eingesetzt (Gey, 2008).

Tabelle 1-5: Wellenlängen und Wellenzahlen der Spektralbereiche von Ultraviolett bis Fernes Infrarot (Gey, 2008, S. 215)

Spektralbereich	Wellenlänge [nm]	Wellenzahl [cm⁻¹]
UV-Bereich	200-400	25.000-50.000
Sichtbarer Bereich (Vis)	400-800	12.500-25.000
Nahes Infrarot (NIR)	800-2.500	4.000-12.500
IR	2.500-50.000	400-4.000
Fernes IR	50.000-500.000	50-400

Eine Analyse mittels UV/Vis-Spektralphotometrie setzt bei festen Proben immer einen Extraktionsschritt voraus. Dadurch stellt die Probenvorbereitung bei der Ermittlung des antioxidativen Potentials mittels UV/Vis-Spektralphotometrie den größten Zeitaufwand dar. Da es von besonderem Interesse ist Methoden zu entwickeln, mit denen es möglich ist, in kürzester Zeit und mit einem geringen Kostenaufwand Proben mit hoher Reproduzierbarkeit für die anschließende Analyse vorzubereiten, wird nach Alternativen zur UV/Vis-Spektralphotometrie gesucht. Eine Möglichkeit den Extraktionsschritt einzusparen, liefert die Analyse von Proben mittels der Nahen-Infrarot-Spektroskopie (NIR-Spektroskopie)

1.9 Grundlagen zur Infrarot-Spektroskopie

Infrarote Strahlen sind langwelliger als Lichtstrahlen im UV/Vis-Bereich. Da die von der Strahlung ausgehende Energie umgekehrt proportional zur Wellenlänge ist, ist die infrarote Strahlung energieärmer als die Strahlung im UV/Vis-Bereich. Das langwellige IR-Licht ist dadurch nicht in der Lage Elektronen in einen energiereicheren Zustand zu überführen.

Das Prinzip der NIR beruht auf Molekülschwingungen und -rotationen, die durch die Infrarotstrahlung ausgelöst werden. Verschiedene funktionelle Gruppen und unterschiedliche Bindungstypen sind dadurch identifizierbar. Den Schwingungen bestimmter funktioneller Gruppen können entsprechende Absorptionsbanden im Infrarotspektrum zugeordnet werden, was zur Identifizierung der Moleküle genutzt wird. (Tabelle 1-6). Die Einheit in der die monochromatischen Lichtstrahlen bei der IR-Spektroskopie in der Regel angegeben werden, sind die Anzahl der Wellen, die auf 1 cm kommen. Man spricht hier von Wellenzahlen. Die Angabe in Wellenlänge kann aber auch verwendet werden.

Tabelle 1-6: Absorptionsbanden funktioneller Gruppen und chemischer Bindungen (Gey, 2008, S. 234)

<i>Funktionelle Gruppe</i>	<i>Wellenzahl [cm⁻¹]</i>
<i>O-H, mit H-Brücken</i>	<i>3.200-3.600</i>
<i>N-H, Amine Amide</i>	<i>3.300-3.500</i>
<i>C-H, Alkine, C≡C-H</i>	<i>3.300</i>
<i>C-H, Aromaten</i>	<i>3.010-3.100</i>
<i>C-H Alkene, C=C-H</i>	<i>3.010-3.095; 675-995</i>
<i>C-H, Alkane</i>	<i>2.850-2.970; 1.340-1.470</i>
<i>C≡N, Nitrile</i>	<i>2.210-2.280</i>
<i>C≡C, Alkine</i>	<i>2.100-2.260</i>
<i>C=O, Aldehyde, Ketone, Säuren, Ester</i>	<i>1.690-1.760</i>
<i>C=C, Alkene</i>	<i>1.610-1.680</i>
<i>C=C, Aromaten</i>	<i>1.500-1.600</i>
<i>NO₂, Nitrogruppe</i>	<i>1.500-1.570; 1.300-1.370</i>
<i>C-H, Amine, Amide</i>	<i>1.180-1.360</i>
<i>C-O, Alkohole, Ether, Säuren, Ester</i>	<i>1.050-1.300</i>

Die Molekülschwingungen und -rotationen können durch die Messung der Absorption im IR-Spektrum oder die Messung der Streuung im Ramanspektrum erfasst werden. Eine Weiterentwicklung der IR-Spektroskopie ist die Fourier-Transform-Technik (FTIR). Die Spektrenaufnahme erfolgt dabei schneller und eignet sich somit auch für Kopplungen zum Beispiel mit einem Gaschromatographen (GC). Im Gegensatz zur UV/Vis-Spektroskopie müssen die Proben nicht im flüssigen Zustand sein, es können auch feste oder gasförmige Proben analysiert werden. Dadurch entfällt eine zeitaufwendige Probenaufbereitung. Die IR ist damit schneller und einfacher in der Durchführung (Gay, 2008).

Obwohl sich viele klassische chemische Analysen auf diese Technik übertragen lassen, gibt es derzeit kaum Veröffentlichungen über die Ermittlung des antioxidativen Potentials mittels IR-Spektroskopie. Die Entwicklung einer IR Methode setzt eine zuverlässige Kalibration voraus. Für die Kalibration muss eine Referenzmethode gewählt werden (Zhang et al., 2004), auf deren Grundlage dann Aussagen über die Zielparameter getroffen werden können. Die Analyse mit der, anhand der Referenzmethode kalibrierten IR-Methode kann immer nur so genau sein, wie die Referenzmethode selbst.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Master-Thesis befasste man sich mit dem Vergleich von Labormethoden zur Messung des antioxidativen Potentials von Pflanzenteilen.

Im ersten Schritt sollten entsprechende Labormethoden etabliert werden, die sich mittels Spektralphotometrie durchführen lassen. Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt bereits viele verschiedene Methoden existieren, um das antioxidative Potential zu bestimmen, wurde untersucht welche dieser Methoden besonders für eine Routineuntersuchung von verschiedenen Pflanzenteilen geeignet sind. Die Kriterien für die Auswahl waren ein geringer Kosten und Zeitaufwand und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, sowie die Durchführung mit den vorhandenen Analysegeräten. Zudem sollten die Methoden für die Untersuchung von verschiedenen Pflanzenteilen und –arten geeignet sein. Eine Auswahl von drei, der für anwendbar empfundenen Methoden (DMPD, FRAP und DPPH) sollten mit Weinblättern als Probenmatrix etabliert werden. Da die Extraktionsmethode einen Einfluss auf das gemessene antioxidative Potential haben kann, wurde zusätzlich der Einfluss von drei verschiedenen Extraktionslösungen auf die Ergebnisse der gewählten Methoden untersucht. Außerdem wurden weitere Parameter für die einzelnen Tests festgelegt, wie die Reaktionszeit, die Verdünnungen der Extrakte und die Konzentration der Standards für die Kalibriergerade.

Auf den Erkenntnissen aus dem ersten Schritt wurde im zweiten Schritt dieser Arbeit das antioxidative Potential von 127 Proben aus verschiedenen Pflanzenteilen/-arten bestimmt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich gleiche Sorten, egal welcher Herkunft, nicht signifikant in ihrem antioxidativen Potential unterscheiden, so dass einzelnen Sorten generell eine hohe oder geringe antioxidative Wirksamkeit zugewiesen werden kann. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die Blätter und Säfte der Rebsorten Phönix, Regent und Solaris darauf hin untersucht. Da es sich bei Polyphenolen um die bedeutendste Stoffklasse handelt, wenn es um natürliche Antioxidantien geht (O'Neill et al., 2001; Rice-Evans 1997), sollte auch der Einfluss des Gesamtphenolgehaltes auf das antioxidative Potential untersucht werden. Für diesen Vergleich wurden alle 127 Proben betrachtet.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich das antioxidative Potential mittels NIR-Spektroskopie bestimmen lässt. Dafür wurden die NIR-Spektren von 10 verschiedenen Blattproben aufgenommen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Tabelle 3-1: Liste der Chemikalien und Standards

Chemikalien	CAS-Nummer	Hersteller	Katalognummer
Acetat Puffer pH 3,6	-	Morphisto GmbH	13330.01000
Acetat Puffer pH 5,25	-	Sigma-Aldrich	S7899-500ML
Ameisensäure	64-18-6	Sigma-Aldrich	56302-1L
Chlorogensäure	327-97-9	Carl Roth	5558.1
Chlorwasserstoff	7647-01-0	Sigma-Aldrich	258148-500ML
DMPD (N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin)	99-98-9	Merck KGaA	612-031-00-2
DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)	1898-66-4	Calbiochem®	300267
Eisen(III)-Chlorid Hexahydrat	10025-77-1	Carl Roth	P742.1
Essigsäure	64-19-7	Sigma-Aldrich	695092-500ML
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	-	Fluka	47641-100ML
Methanol	67-56-1	BDH Prolabo	20864.320
Na₂CO₃	497-19-8	Sigma-Aldrich	S7795-500G
Ottawa Sand	-	Fischer Scientific	S/0365/60
TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine)	3682-35-7	Sigma-Aldrich	T1253-1G
Trolox	53188-07-1	Cayman chemical company	10011659

3.2 Lösungen

Die folgenden Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, in H₂O (reinst) angesetzt.

DMPD Radikalkation

DMPD Lösung (20,9 mg/ml)	1% (v/v)
Acetat Puffer (100 mM, pH 5,25)	98% (v/v)
FeCl ₃ • 6H ₂ O (10 mM)	1% (v/v)

DPPH Arbeitslösung

DPPH Stammlösung	1 Vol
Methanol (HPLC grade)	4,5 Vol

DPPH Stammlösung

DPPH[•] in Methanol (HPLC grade) 240 mg/l

Die Stammlösung wird bei -20°C gelagert.

Extraktionslösung 1

Methanol (HPLC grade) 80% (v/v)

Essigsäure 1% (v/v)

Extraktionslösung 2

Methanol (HPLC grade) 50% (v/v)

Chlorwasserstoff 2,4 mol/l

Extraktionslösung 3

Methanol (HPLC grade) 25 Vol

H₂O reinst 24 Vol

Ameisensäure 3 Vol

Folin-Ciocalteu-Reagenz

Folin-Ciocalteu's phenol reagent 10% (v/v)

FRAP Reagenz

TPTZ Lösung (10mM in 40mM HCl) 1 Vol

Acetat Puffer (300mM; pH 3,6) 10 Vol

FeCl₃·6H₂O (20mM) 1 Vol

Die Lösung wird vor der Verwendung bei 37°C für 4 Minuten inkubiert.

Na₂CO₃-Lösung

Na₂CO₃ 60g/l

3.3 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial wurden getrocknete und gemahlene (0,5 mm Ø) Blätter von *Prunus armeniaca* (Aprikose), *Lonicera kamtschaticia* (Kamtschatka-Heckenkirsche), *Aronia* (Apfelbeere) und *Hippophaë rhamnoides* (Sanddorn) und verschiedenen Rebsorten (*Vitis vinifera*) verwendet. Säfte und Weine wurden aus den Früchten und Beeren von verschiedenen Rebsorten, *Prunus cerasus* (Sauerkirsche), *Malus* (Apfel), *Cornus mas* (Kornelkirsche), *Vaccinium myrtillus* (Blaubeere), *Aronia* (Apfelbeere), *Sambucus* (Holunder), *Lonicera kamtschaticia* (Kamtschatka-Heckenkirsche) und *Hippophaë rhamnoides* (Sanddorn) gewonnen. Im Anhang befindet sich eine Auflistung der verwendeten Pflanzenmaterialien mit den im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten Proben Nummern (Tabelle 7-3 bis 7-5).

3.4 Geräte/ Materialien

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Hersteller Bezeichnung
Spektralphotometer	<i>Pharmacia Biosystems GmbH</i>	<i>Novaspec®II</i>
Zentrifuge	<i>Thermo Scientific</i>	<i>Labfuge 400</i>
Überkopfschüttler	<i>ELMI</i>	<i>Intelli Mixer RM-2L</i>
Ultraschallbad	<i>Brandelin Sonorex</i>	<i>RK100H</i>
NIR-Spektrometer	<i>Foss</i>	<i>Rapid resin Analyzer</i>

3.5 Methoden

3.5.1 Extraktionsmethode 1

Etwa 0,10 g des, wie in 3.3 beschrieben vorbereiteten Probenmaterials und 5 g Ottawa Sand wurden eingewogen und mit 25 ml Extraktionslösung 1 versetzt. Anschließend wurde für 2 h mit einem Überkopfschüttler (40 rpm) extrahiert. Das Extrakt wurde bei 3.500 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Gefäß gesammelt. Die Extraktion wurde ein zweites Mal durchgeführt, diesmal wurde für eine Stunde unter ansonsten gleichen Bedingungen extrahiert. Die Überstände wurden zusammengeführt und bei -20°C gelagert.

3.5.2 Extraktionsmethode 2

Die Extraktionsmethode 2 wurde nach der Methode von Stratil et al. (2006) angewandt. Etwa 0,50 g des, wie in 3.3 beschrieben vorbereiteten, Probenmaterials wurden mit 10 ml Extraktionslösung 2 versetzt, um alle phenolischen Komponenten zu extrahieren. Die Extrakte wurden im Ultraschallbad für 2 min homogenisiert. Anschließend folgte eine Inkubation bei 82-83°C für 150 min wobei die Proben alle 30 min für 20 sec geschüttelt wurden. Nach der Inkubation wurde den abgekühlten Proben 10 ml Methanol hinzugefügt. Die Extrakte wurden gut durchmischt und bei 3.500 rpm für 10 min zentrifugiert. Die sauren Extrakte wurden mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und bei -20°C gelagert.

3.5.3 Extraktionsmethode 3

Die Extraktionsmethode 3 wurde nach der Methode von Llorach et al. (2008) mit einigen Änderungen angewandt. Etwa 0,40 g des, wie in 3.3 beschrieben vorbereiteten, Probenmaterials wurden zweimal mit 8 ml Extraktionslösung 3 für 15 min im Ultraschallbad und anschließend weitere 15 min mit einem Überkopfschüttler (40 rpm) extrahiert. Das Extrakt wurde bei 3.500 rpm für 10 min zentrifugiert, die Überstände in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und nochmals bei 3.500 rpm für 10 min zentrifugiert. Die zentrifugierten Proben wurden durch einen 45 µm Faltenfilter filtriert und anschließend durch einen 0,45 µm Polyethersulfon Filter gepresst. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.5.4 FRAP Test

Der „Ferric Ion Reducing Antioxidant Power“ (FRAP) Test misst die Fähigkeit von Antioxidantien bei niedrigem pH-Wert einen Eisen-Tripyridyltriazin-Komplex (Fe^{3+} -TPTZ) in den Eisen Komplex (Fe^{2+} -TPTZ) zu reduzieren. Die daraus resultierende blaue Farbe kann spektralphotometrisch bei 593 nm gemessen werden, es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Farbzunahme und der Höhe des antioxidativen Potentials (Frankel und Meyer, 2000).

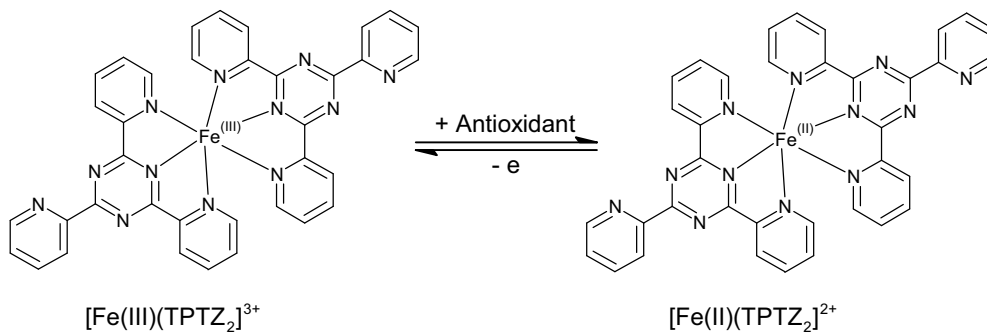


Abbildung 3-1: FRAP Test; Reduktion des Fe(III)(TPTZ) Komplexes

Die Methode ist auf die Bestimmung von wasserlöslichen Antioxidantien beschränkt, da das Testsystem wässrig sein muss. Der Test wurde ursprünglich entwickelt, um Vitamin C in Blutplasma zu quantifizieren. Er wurde aber auch schon für Studien an Obst und Gemüse, Getreide, Bohnen und ätherischen Ölen verwendet (Moon und Shibamoto, 2009).

Der FRAP Test wurde nach der Methode von Stratil et al. (2006) angewandt. 1800 µl FRAP Reagenz wurden zu 40 µl Probe, Standard (0,25-2 mmol Trolox) oder

Extraktionslösung (für den Nullwert) pipettiert und mit entionisiertem Wasser zu 2000 µl aufgefüllt. Anschließend wurden diese mit Hilfe einer Kolbenhubpipette gründlich gemischt und 3 Stunden (ca. 22°C) im Dunkeln inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 593 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden als Trolox-äquivalente angegeben.

3.5.5 DPPH Test

Das 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radikal zählt zu den ersten synthetischen Radikalen das zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von phenolischen Antioxidantien verwendet wurde. Der Vorteil dieses Radikals ist, dass es kommerziell erhältlich ist. Es dient bei der Reaktion gleichzeitig als Oxidationsquelle für die Antioxidantien und als Indikator für die Reaktion. Allerdings handelt es sich im Gegensatz zu den Peroxylradikalen, die bei den meisten anderen Tests verwendet werden um ein Stickstoffradikal. Es könnte sein, dass Antioxidantien unterschiedlich mit diesen Radikalen reagieren (Frankel und Meyer, 2000).

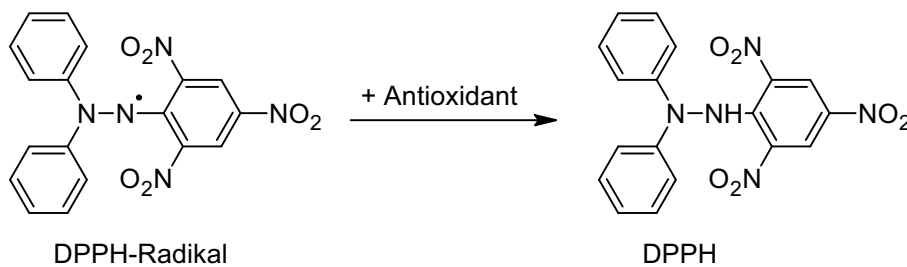


Abbildung 3-2: Reaktion des DPPH Radikals in Anwesenheit von Antioxidantien

Der Abbau des lila DPPH Radikals in die schwach gelbe nicht-radikale Form, in methanolischer Lösung, wird spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 515 nm gemessen (Frankel und Meyer, 2000). In der Regel werden die Ergebnisse als EC_{50} angegeben, Dies entspricht der Menge an Probe, die benötigt wird, um 50% der ursprünglichen Menge des DPPH[•] Radikals einzufangen. Dabei ist die prozentuale antioxidative Wirksamkeit von dem Anfangsgehalt des DPPH Radikals abhängig. Die Verwendung von Ascorbinsäure oder Trolox als Äquivalenzsubstanz führt zu exakteren Ergebnissen (Magalhães et al., 2008).

Das Verfahren wurde ursprünglich entwickelt, um die antioxidative Effizienz von Polyphenolen und verschiedenen Weinen und Traubensäften zu ermitteln (Frankel und Meyer, 2000).

Der DPPH Test wurde nach der Methode von Thaipong et al. (2006) angewandt. 150 µl Probe oder Standard (0,0625-0,75 mmol Trolox) wurden in eine Küvette pipettiert und 2850 µl der DPPH[•] Arbeitslösung zugegeben. Anschließend wurden die Küvetten mit Parafilm luftdicht verschlossen um ein Verdunsten der methanolhaltigen Lösung zu vermeiden. Zum Mischen der Proben wurden die verschlossenen Küvetten vorsichtig umgeschwenkt. Die Proben wurden für 24 Stunden im Dunklen bei Raumtemperatur (ca. 22°C) gelagert. Die Absorption wurde am nächsten Tag bei einer Wellenlänge von 515 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Ergebnisse wurden als Troloxäquivalente angegeben.

3.5.6 DMPD Test

Das Testverfahren basiert auf dem Radikal DMPD^{•+} (N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin), welches durch die Reaktion mit Fe(II) im sauren Medium generiert wird.

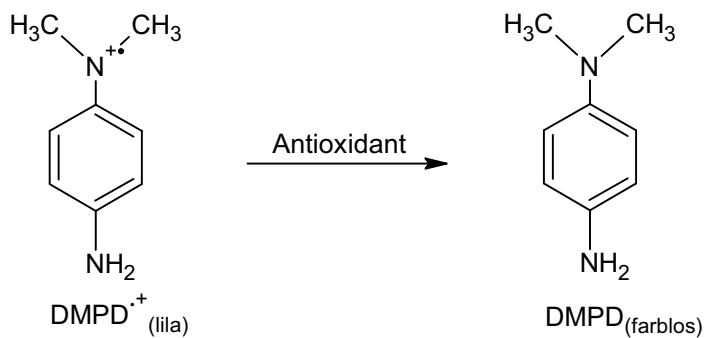


Abbildung 3-3: Reaktion des DMPD Radikalkations in Anwesenheit von Antioxidantien

Durch die Überführung in die nicht-radikale Form durch das Antioxidans entsteht das farblose Molekül DMPD. Die Farbreaktion kann spektralphotometrisch verfolgt werden bei einer Wellenlänge von 505 nm (MacDonald-Wicks et al., 2006).

Der DMPD Test wurde mit einigen Änderungen nach der Methode von Dorman und Hiltunen (2011) durchgeführt. 200 µl Probe, Standard (0,25-2 mmol Trolox) oder Extraktionslösung (Nullwert) und 1800 µl DMPD Radikalkation wurden in eine Küvette pipettiert und gut vermischt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 505 nm spektralphotometrisch gemessen.

3.5.7 Gesamtphenolbestimmung (Folin-Ciocalteu)

Die exakte chemische Zusammensetzung des Folin-Ciocalteu-Reagenz ist nicht bekannt, allerdings wird angenommen, dass es Molybdatophosphorsäure- und

Phosphorwolframsäure-Komplexe enthält. Das Testverfahren basiert auf dem Elektronentransfer im alkalischen Medium durch reduzierende Stoffe, wodurch Molybdän gebildet wird, welches blaue Komplexe bildet, die bei Wellenlängen zwischen 750 und 765 nm spektralphotometrisch detektiert werden können (Magalhães et al., 2008).

Die Gesamtphenole wurden Spektralphotometrisch mit der Folin-Ciocalteu Methode ermittelt. Die Proben wurden dafür mit der Extraktionsmethode 1 extrahiert. 100 µl Extrakt wurden mit 750 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz versetzt und gut gemischt. Nach 5 min bei 22°C wurden 750 µl Na₂CO₃-Lösung zugegeben und wieder gut gemischt. Nach 90 min bei 22°C im Dunkeln wurde die Absorption bei 725 nm spektralphotometrisch gemessen. Als Standard diente Chlorogensäure in den Konzentrationen 200, 100, 50 und 25 µg/ml in Extraktionslösung 1. Die Ergebnisse wurden in mg Chlorogensäureäquivalente je 100 g Probe bei festen Proben und mg Chlorogensäureäquivalente je ml Probe bei flüssigen Proben angegeben.

3.5.8 NIR Spektrenaufnahme

Es sollte ermittelt werden, ob die Möglichkeit besteht, das antioxidative Potential durch die Aufnahme von NIR Spektren zu bestimmen. Dafür wurden die Spektren von 10 Proben mittels der diffusen Reflexions-Methode aufgenommen. Bei dieser Methode können die Proben im festen Zustand analysiert werden, wodurch eine Probenextraktion entfällt. Es handelt sich dabei um die Reflektion von Licht an rauen Oberflächen. Dabei wird ein einfallender Lichtstrahl in viele einzelne Lichtstrahlen zerlegt zurückgeworfen. Das zurückgeworfene Licht wird dann detektiert und gegen einen weißen Standard verglichen.

Bei den Proben handelte es sich um gefriergetrocknete und gemahlene Blätter der Probennummern 14, 17, 35, 73, 74, 83, 84, 87, 88 und 90. Eine genaue Auflistung der Probennummern befindet sich im Anhang (Tabelle 7-3 bis 7-5).

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 15.0 für Microsoft Windows®. Für den Vergleich zwischen zwei Testsystemen wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Zur Bestätigung von Hypothesen wurde eine eindimensionale Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Wurde die Nullhypothese abgelehnt, so wurden in einigen Fällen paarweise Vergleiche nach Tukey durchgeführt.

Die Grenzvariationsbreite (GV) nach Tukey wurde manuell berechnet. Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$GV = q_{\alpha(f,a)} \sqrt{\frac{MQ}{n}}$$

Wobei $q_{\alpha(f,a)}$ vom Freiheitsgrad (f) und von der Stufenzahl (a) abhängig ist und aus Tabelle 7-8, die im Anhang aufgeführt ist, entnommen wurde.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist in drei Teile gegliedert. Im Ersten Teil werden die Versuche zur Etablierung der Methoden zur Bestimmung des antioxidativen Potentials dargestellt. Auf den Erkenntnissen aus dem ersten Teil wurde im zweiten Schritt dieser Arbeit das antioxidative Potential von 127 Proben aus verschiedenen Pflanzenteilen/-arten bestimmt. Diese Ergebnisse werden im zweiten Teil dieses Kapitels erläutert. Im dritten Teil dieses Kapitels wird auf die Verwendbarkeit eines NIR-Spektrometers zur Bestimmung des antioxidativen Potentials eingegangen.

4.1 Etablierung von Labormethoden zur Messung des antioxidativen Potentials von Pflanzenteilen

Im ersten Teil der Arbeit wurden Versuche zur Etablierung einer Labormethode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von verschiedenen Pflanzenteilen durchgeführt. Dabei wurde sich für die beiden sehr häufig angewandten Methoden FRAP und DPPH entschieden. Zudem wurde die kostengünstige Methode DMPD angewandt. Die Versuche zu den drei Tests wurden mit Extrakten der Probe Nummer 73 durchgeführt. Dazu wurde die Probe nach den Extraktionsmethoden 1, 2 und 3 extrahiert. Außerdem wurde eine mit Extraktionsmethode 1 extrahierte Probe (ebenfalls Nummer 73) nach einer Lagerung von etwa sechs Monaten verwendet um den Einfluss der Lagerung bei -20°C zu ermitteln. Die Extrakte werden im folgenden E 1, E 2 und E 3 entsprechend der verwendeten Extraktionsmethode bezeichnet, das bei -20°C gelagerte Extrakt wird als „E 1 Alt“ bezeichnet.

4.1.1 Versuche zum DMPD Test

Die Versuche zum DMPD Test setzen sich aus der Ermittlung einer geeigneten Extraktionsmethode und der Erstellung einer Kalibriergeraden zusammen.

4.1.1.1 Unterschiede zwischen den Extraktionsmethoden

Der DMPD Test wurde nach 3.5.6 mit den Extrakten E 1, E 1 Alt, E 2 und E 3 durchgeführt. Die Proben und Nullwerte wurden gegen Wasser gemessen. Als Nullwerte wurden anstelle des Extraktes, die jeweiligen Extraktionslösungen

verwendet. Alle Extraktionsmethoden führten zu einer Zunahme der Absorption gegenüber dem entsprechenden Nullwert (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Absorption der Nullwerte und der Extrakte aus dem DMPD Test

<i>Extrakt</i>	<i>Absorption Probe</i>	<i>Absorption Nullwert</i>
<i>E 1</i>	0,252	0,213
<i>E 1 Alt</i>	0,284	0,213
<i>E 2</i>	1,235	0,129
<i>E 3</i>	0,560	0,201

Entsprechend der theoretischen Grundlagen sollte bei dem DMPD Test (3.5.6) eine Farbabnahme durch Zugabe der Proben erfolgen und die Absorption gegenüber dem Nullwert sinken. Da hier der gegenteilige Fall eingetreten ist, können die Absorptionswerte nicht für die Auswertung verwendet werden. Die rosa DMPD Testlösung färbte sich durch die Zugabe der Proben leicht grau. Um eventuelle farbige Partikel, die diese Graufärbung verursachen könnten sedimentieren zu lassen, wurden die Proben über Nacht im Dunklen bei Raumtemperatur (ca. 22°C) gelagert. Nach der Lagerung waren die Proben ausgefallen und somit nichtmehr verwendbar (siehe Abbildung 4-1).



Abbildung 4-1: Küvette mit DMPD Lösung und Probe nach einer Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur im Dunklen

Um den färbenden Einfluss der Proben auf die DMPD Lösung zu verringern, wurden die Extrakte E 1 und E 1 Alt mit Aktivkohlefiltern filtriert und der DMPD Test mit den Filtraten und den unfiltrierten Extrakten wiederholt. Die Graufärbung konnte dadurch

geschwächt werden. Allerdings lagen die Absorptionen der Proben trotz der Filtration mit Aktivkohle über denen des Nullwerts (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Absorptionen der Extrakte nach DMPD Test. Aktiv bedeutet mit Aktivkohlefiltern filtriert

Extrakt	Absorption Probe	Absorption Nullwert
E 1	0,306	0,171
E 1 Alt	0,283	
E 1 Aktiv	0,225	
E 1 Alt Aktiv	0,176	

Da antioxidativ wirkende Stoffe oft zur Gruppe der Farbstoffe gehören (beispielsweise Anthocyane oder Carotinoide) wird angenommen, dass durch die Filtration der Proben mit Aktivkohlefiltern auch das antioxidative Potential der Proben gesenkt wird. Die Auswirkungen der Filtration auf das antioxidative Potential wurden mit Hilfe des FRAP Tests weiter untersucht (4.1.2.4).

4.1.1.2 Einfluss von Trolox Standardreihen

Im Gegensatz zu den Extrakten besitzen die Trolox Standardreihen keinen färbenden Einfluss auf den DMPD Test. Für die Standardreihen wurde Trolox (0,25-2,0 mM) in den Extraktionslösungen 1, 2 und 3 gelöst.

Tabelle 4-3: Absorptionen der Standards gelöst in den entsprechenden Extraktionslösungen

Troloxkonzentration [mM]	Extraktionslösung		
	1	2	3
Nullwert	0,217	0,221	0,217
0,25	0,234	0,214	0,204
0,5	0,217	0,207	0,191
1,0	0,193	0,190	0,186
2,0	0,160	0,175	0,165

Die Absorptionen der Standardreihen sind sehr gering. Durch eine Erhöhung der Konzentration des DMPD Radikals in der DMPD Lösung könnten die Absorptionen der Standardreihe eventuell erhöht werden.

Aufgrund der Graufärbung der DMPD Lösung, die durch die hier verwendeten Probenextrakte entstanden ist, wurden die Versuche zum DMPD Test an dieser Stelle nicht weiter geführt.

4.1.2 Etablierung des FRAP Test

Für die Etablierung des FRAP Tests wird zunächst der Endpunkt der Reaktion festgesetzt. Anschließend wird die geeignete Verdünnung der Probenextrakte ermittelt und die Kalibriergerade erstellt. Mit dem etablierten FRAP Test wird anschließend der Einfluss von Aktivkohlefiltern auf das antioxidative Potential ermittelt. Um die Robustheit der Methode zu testen, wird der etablierte FRAP Test mit verschiedenen Proben durchgeführt. Da der FRAP Test als Standardmethode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials gewählt wurde, wird in diesem Kapitel auch der Messbereich dieser Methode festgelegt.

4.1.2.1 Festlegung des Endpunktes

Um den Endpunkt der Reaktion für den FRAP Test festzulegen, wurde der Test zunächst wie unter 3.5.4. beschrieben mit den Extrakten E 1, E 1 Alt, E 2 und E 3 durchgeführt. Allerdings wurden für 1,8 ml FRAP Reagenz nur 20 µl Probenextrakt und 80 µl Wasser verwendet. Nach 15 Minuten konnten noch keine endgültigen Absorptionen gemessen werden, da diese während der Messung stark schwankten. Es wurde vermutet, dass die Reaktion zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen war. Anschließend wurde die Absorption nach 30 min, nach 45 min und schließlich nach 3 Stunden gemessen. Nach 3 Stunden waren die Werte konstant, weshalb für alle weiteren Tests eine Reaktionszeit von 3 Stunden veranschlagt wurde.

Tabelle 4-4: Absorption FRAP Versuch 1 ohne Standards

Extrakt	Absorption bei 593nm nach einer Reaktionszeit von			
	15 Minuten	30 Minuten	45 Minuten	3 Stunden
E 1	0,833	0,940	1,013	1,206
E 1 Alt	0,795	0,902	0,974	1,176
E 2	0,836	0,983	1,101	1,439
E 3	2,907	2,932	2,895	2,868

Laut Schwendt (1995) liegt der optimale Messbereich eines Spektralphotometers, bei dem in der Regel zuverlässige Werte ermittelt werden, bei einer Absorption von 0,2 bis

1,0. Die gemessenen Absorptionen lagen außerhalb dieses Messbereiches. Die Werte des Extraktes mit der Extraktionslösung 3 liegen über 2,8 weshalb angenommen wird, dass sie sehr ungenau sind. Die Extrakte wurden im Folgenden verdünnt eingesetzt.

4.1.2.2 Ermittlung der optimalen Verdünnungen der Probenextrakte

Die Extrakte E 1, E 1 Alt, E 2 und E 3 wurden mit der entsprechenden Extraktionslösung im Verhältnis 1:5 und 1:10 verdünnt. Der FRAP Test wurde wie unter 3.5.4 beschrieben mit den verdünnten und unverdünnten Extrakten durchgeführt.

Tabelle 4-5: FRAP Test der Proben extrahiert mit Extraktionslösung 1, 2 oder 3

<i>Name Probe</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Abs. Probe</i>	<i>mmol TE/g TG</i>
E1	-	2,351	1,76
	1:5	0,477	1,78
	1:10	0,303	2,26
E1 al	-	2,139	1,18
	1:5	0,495	1,37
	1:10	0,246	1,36
E2	-	2,919	0,33
	1:5	0,878	0,49
	1:10	0,414	0,46
E3	-	2,934	0,06
	1:5	2,857	0,27
	1:10	2,405	0,46

Die Tabelle 4-5 zeigt die Absorptionen der Proben mit verschiedenen Verdünnungen und die Troloxäquivalente in mmol/ g getrockneter Probe. Für die weiteren Versuche wurde für die Extrakte E 1 und E 1 Alt die Verdünnung von 1:5 verwendet. Für das Extrakt E 2 lag die Verdünnung 1:10 im mittleren Messbereich der Kalibriergeraden und wurde für die weiteren Versuche verwendet. Das Extrakt E 3 wurde nicht ausreichend verdünnt, auch bei einer Verdünnung von 1:10 lag die Absorption außerhalb des optimalen Messbereiches des verwendeten Spektralphotometers (Schwendt, 1995). Die Verdünnungen wurden auf der Grundlage der im nächsten Kapitel dargestellten Trolox Standardkurven gewählt.

4.1.2.3 Erstellung der Trolox Kalibriergeraden

Um das antioxidative Potential in Troloxäquivalenten anzugeben, wurden Standardreihen in Konzentrationen zwischen 0,25 bis 2 mM hergestellt. Dafür wurde

Trolox in den Extraktionslösungen 1, 2 und 3 gelöst. Die Standards wurden zur gleichen Zeit wie die im vorigen Kapitel diskutierten Probenextrakte mit dem FRAP Test (3.5.4) gemessen.

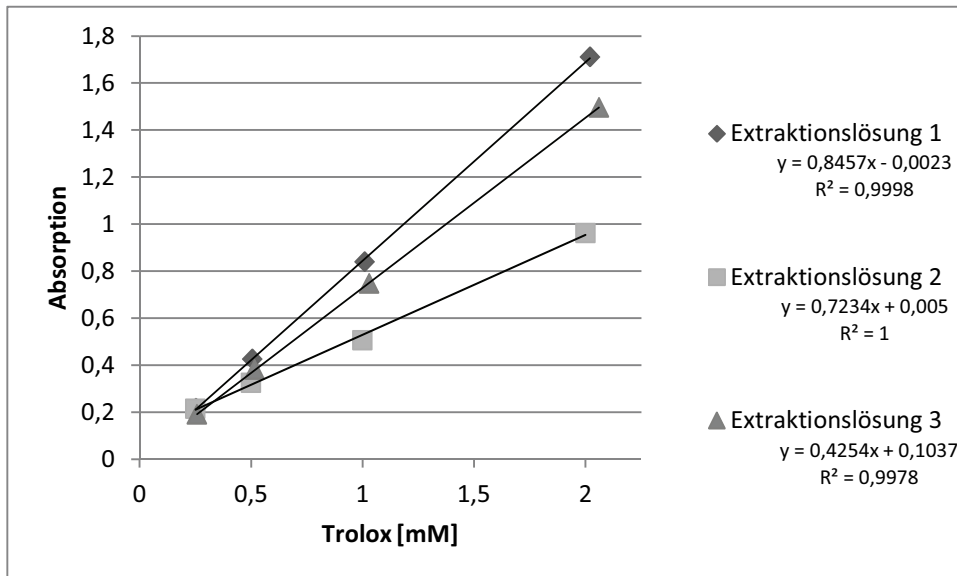


Abbildung 4-2: Trolox Standardreihen 0,25 bis 2 mM in verschiedenen Extraktionslösungen für den FRAP Test

Die Standardreihen der Extraktionslösungen 1, 2 und 3 wiesen ein Bestimmtheitsmaß von über 0,99 auf. Die Standardreihen der Extraktionslösungen 1 und 3 hatten bei einer Trolox Konzentration von 2 mM eine Absorption über 1,5. Da dies außerhalb des optimalen Messbereichs liegt werden für die folgenden Versuche Konzentrationen zwischen 0,25 bis 0,75 mM gewählt.

4.1.2.4 Der Einfluss von Aktivkohlefiltern auf das antioxidative Potential

Die Extrakte E 1 und E 1 Alt wurden im Rahmen der Versuche zum DMPD Test zusätzlich mit Aktivkohlefiltern filtriert um Farbstoffe zurückzuhalten. Von den filtrierten Proben wurden unverdünnte Proben, 1:5 und 1:10 Verdünnungen mit dem FRAP Test gemessen und mit unfiltrierten Probenäquivalenten verglichen, um den Einfluss der Filtration auf das antioxidative Potential zu ermitteln.

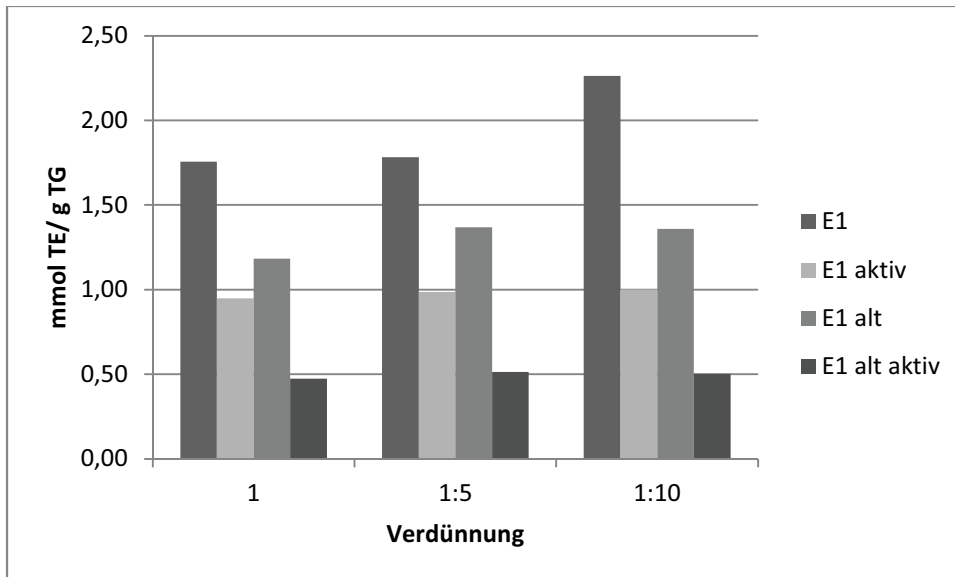


Abbildung 4-3: FRAP Test der Proben, extrahiert mit Extraktionslösung 1. E1: Probe mit einer Lagerzeit von einem Monat, E1 aktiv: Probe mit einer Lagerzeit von einem Monat mit Aktivkohlefilter filtriert, E1 alt: Probe mit einer Lagerzeit von etwa sechs Monaten, E1 alt aktiv: Probe mit einer Lagerzeit von etwa sechs Monaten mit Aktivkohlefilter filtriert.

Das Filtrieren mit Aktivkohle hat bei beiden Proben zu einer Senkung des antioxidativen Potentials zwischen 45 und 63% geführt (Abbildung 4-3). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei einer Filtration mit Aktivkohlefiltern Farbstoffe aus dem Extrakt entfernt werden. Die nicht antioxidativ wirkenden Farbstoffe in der Probe könnten im Allgemeinen die Ergebnisse des photometrischen Tests verfälschen. Auf der anderen Seite handelt es sich bei antioxidativ wirksamen Substanzen häufig auch um Farbstoffe. Darum sinkt durch die Entfernung von Farbstoffen aus dem Extrakt, wie bereits erwartet auch die antioxidative Aktivität des Extraktes.

4.1.2.5 Vergleich von verschiedenen Proben

Im folgenden Versuch wurden Extrakte von sieben verschiedenen Proben angefertigt. Dafür wurden die Extraktionsmethoden 1, 2 und 3 verwendet. Mit den Extrakten und mit einer Trolox Standardreihe (0,25-1,5 mM) wurde der FRAP Test (3.5.4) durchgeführt und die Ergebnisse als mmol TE/g TW berechnet. Für die Standardreihen wurde Trolox in den Extraktionslösungen 1, 2 und 3 gelöst. Als Nullwert wurde anstelle des Extraktes die jeweilige Extraktionslösung verwendet.

Das ermittelte antioxidative Potential der Proben war stark abhängig von der Extraktionsmethode. In Bezug auf das antioxidative Potential der analysierten Proben haben E 1 und E 3 vergleichbare Profile ergeben. Das Profil der mit Extraktions-

methode 2 vorbereiteten Proben weicht von den anderen beiden Extraktionsmethoden ab (Abbildung 4-4).

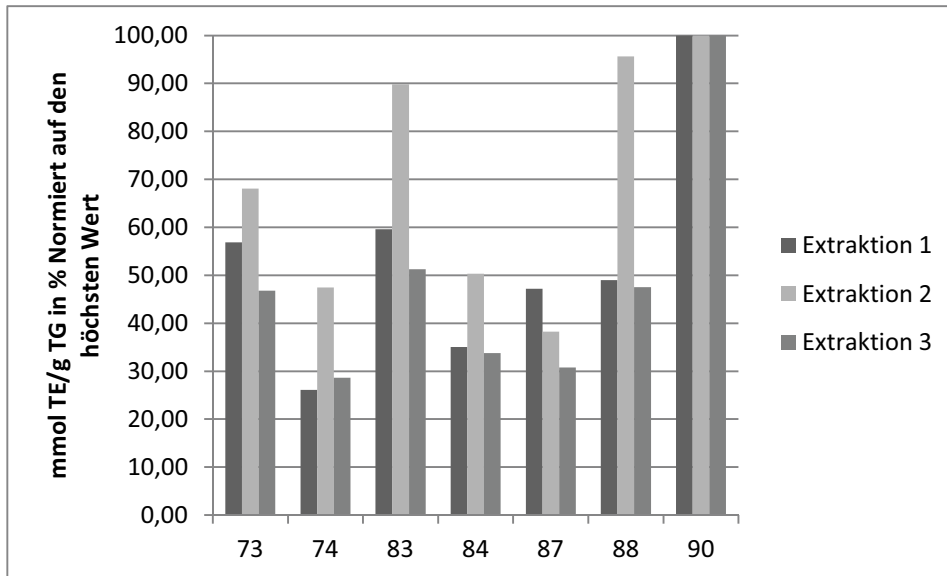


Abbildung 4-4: FRAP Test der unterschiedlich extrahierten Proben (normiert auf den höchsten Wert)

Das in Troloxäquivalenten ausgedrückte antioxidative Potential von E 1 war bei beinahe allen Proben am höchsten (Abbildung 4-5). Deshalb und wegen der Lagerstabilität dieses Extraktes bei -20°C, wurde in allen folgenden Versuchen zum FRAP Test die Extraktionsmethode 1 gewählt.

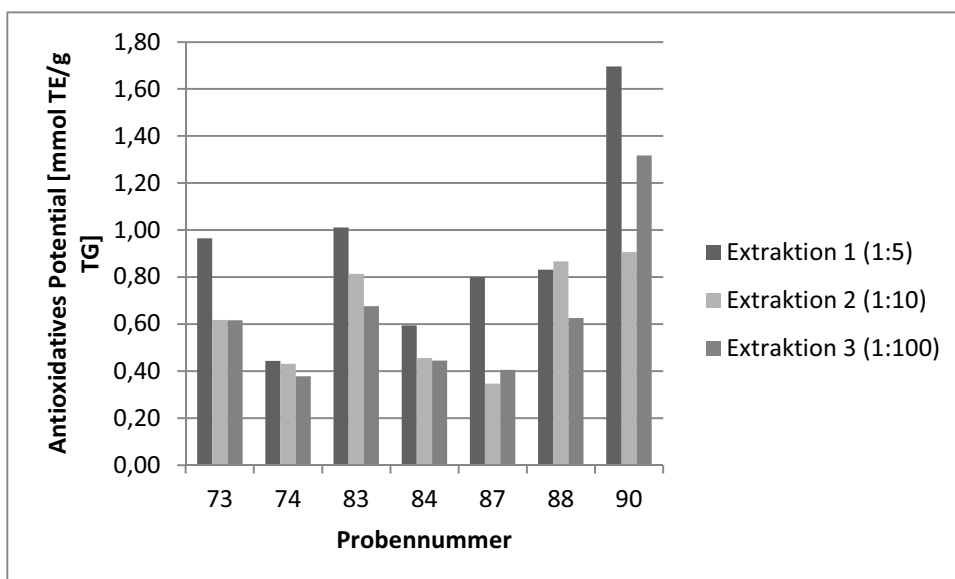


Abbildung 4-5: FRAP Test der unterschiedlich extrahierten Proben

4.1.2.6 Festlegung des Messbereichs

Bevor der FRAP Test für die Probenanalyse angewandt wurde, wurde untersucht, welcher der optimale Messbereich für diese Methode ist. Dafür wurde eine Trolox Standardreihe (0,0125-4 mM) mit Extraktionslösung 1 hergestellt und in Vierfachbestimmung mit dem FRAP Test gemessen. Die Werte sind in Abbildung 4-6 aufgetragen.

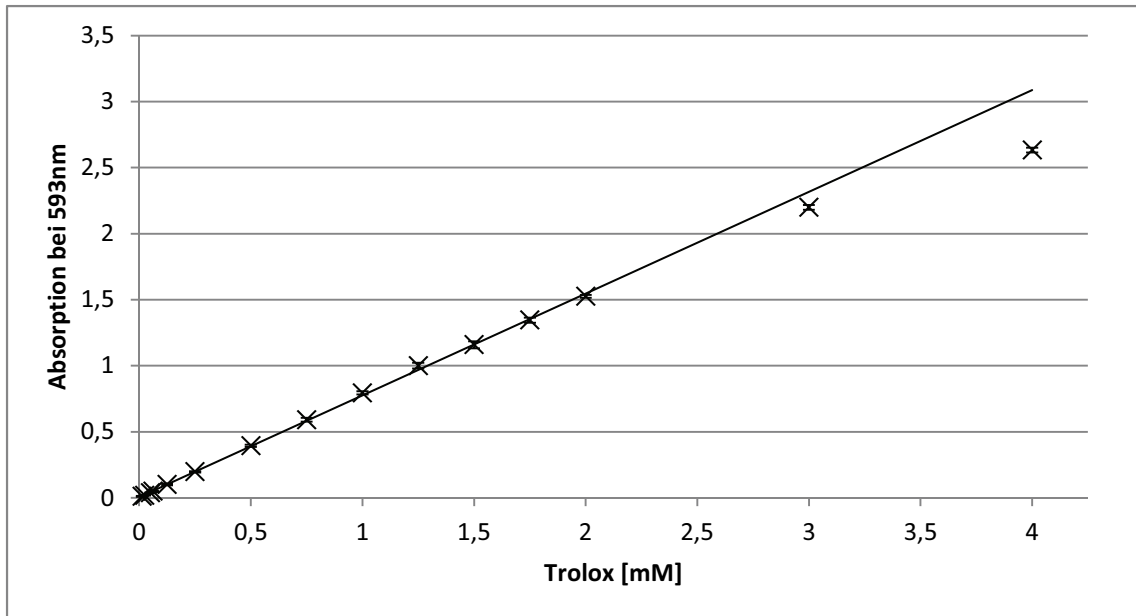


Abbildung 4-6: Kalibriergerade mit Trolox als Standard in Konzentrationen von 0,0125-4 mM

Zieht man eine Trendlinie durch die Mittelwerte der ermittelten Standardgeraden und ignoriert dabei die Werte für die Trolox Konzentrationen 3 und 4 mM, ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,999$. Die Linearität der Kalibriergeraden ist also bis zu einer Absorption von 1,500 gegeben.

Um die Genauigkeit im unteren Messbereich der Kalibriergeraden zu bestimmen, wurden die Standardabweichungen der gemessenen Absorptionen bei den gegebenen Trolox Konzentrationen in Prozent berechnet (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Standardabweichungen in % der gemessenen Absorptionen bei den gegebenen Trolox Konzentrationen in mmol

<i>Trolox Konzentration [mM]</i>	<i>Mittelwerte der Absorption</i>	<i>Standardabweichung</i>	<i>Standardabweichung [%]</i>
4	2,632	0,017	0,66
3	2,199	0,009	0,40
2	1,526	0,011	0,72
1,75	1,345	0,020	1,49
1,5	1,158	0,026	2,27
1,25	1,000	0,022	2,22
1	0,795	0,013	1,64
0,75	0,591	0,014	2,34
0,5	0,394	0,009	2,22
0,25	0,197	0,005	2,60
0,125	0,102	0,007	6,46
0,06125	0,049	0,004	8,66
0,05	0,038	0,004	9,86
0,025	0,019	0,002	12,89
0,0125	0,010	0,004	36,83

Die Abweichungen zwischen den jeweils durch Vierfachbestimmung ermittelten Werten sind bei höheren Konzentrationen an Trolox geringer. Ab einer Trolox Konzentration von 0,125 mM und geringer, liegt die Standardabweichung über 5%.

Der optimale Messbereich des FRAP Tests wird aufgrund dieser Ergebnisse auf Absorptionen zwischen 0,200 und 1,500 festgelegt.

4.1.3 Etablierung des DPPH Test

Für die Etablierung des DPPH Tests wird zunächst der Endpunkt der Reaktion festgesetzt. Anschließend wird die geeignete Verdünnung der Probenextrakte ermittelt und die Kalibriergerade erstellt. Um die Robustheit der Methode zu testen, wird der etablierte DPPH Test, wie schon zuvor der FRAP Test, mit verschiedenen Proben durchgeführt.

4.1.3.1 Festlegung des Endpunktes der Reaktion

Die Extrakte E 1, E 1 Alt, E 2 und E 3 wurden mit der entsprechenden Extraktionslösung im Verhältnis 1:5 und 1:10 verdünnt. Der DPPH Test wurde, wie unter 3.5.5 beschrieben, mit den verdünnten und unverdünnten Extrakten durchgeführt.

Die Proben wurden nach 1,5 h, 3 h, 4,5 h, 21,5 h und 24 h Reaktionszeit spektralphotometrisch gemessen, um den Endpunkt der Reaktion für den DPPH Test festzulegen. Nach einer Lagerung von 24 h waren die methanolhaltigen Lösungen allerdings zu einem großen Teil aus den Küvetten verdampft. Dies führte zu einer Erhöhung der Absorption gegenüber den nach 1,5 h aufgenommenen Werten. Um die Verdunstung der Proben zu vermeiden, wurde der Versuch mit luftdicht verschlossenen Küvetten wiederholt (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Veränderung der Absorption mit der Zeit. Küvetten mit Parafilm verschlossen

		<i>Absorption bei 505 nm nach</i>				
<i>Extrakt</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>1,5 h</i>	<i>3 h</i>	<i>4,5 h</i>	<i>21,5 h</i>	<i>24 h</i>
E 1	-	0,091	0,079	0,077	0,060	0,057
	1:5	0,674	0,630	0,592	0,470	0,461
	1:10	0,861	0,843	0,821	0,740	0,733
E 2	-	1,193	0,679	0,652	0,599	0,590
	1:5	0,088	0,087	0,086	0,084	0,084
	1:10	0,063	0,065	0,064	0,062	0,062
E 3	-	0,181	0,180	0,179	0,164	0,162
	1:100	0,847	0,823	0,793	0,650	0,636
	1:1000	1,027	1,020	0,968	0,791	0,773

Obwohl die Absorption nach 24 h noch immer nicht konstant war, wurde der Endpunkt des DPPH Tests auf 24 h festgelegt. Da dieser Zeitraum eine einfache Zeiteinteilung bei einer Routineanalyse ermöglicht. Neben dem Endpunkt der Reaktion sollte bei diesem Versuch ebenfalls die optimale Verdünnung der jeweiligen Extrakte bestimmt werden.

4.1.3.2 Ermittlung der optimalen Verdünnungen der Probenextrakte

Für die Ermittlung der optimalen Verdünnung der Probenextrakte wurden die nach 24 h gemessenen Absorptionen aus dem Versuch zur Festlegung des Endpunktes für den DPPH Test verwendet (Tabelle 4-7).

Für E 1 wurde für zukünftige Messungen eine Verdünnung von 1:5 gewählt und für E 3 die Verdünnung 1:50. Das unverdünnte E 2 färbte die lila DPPH Lösung braun. Die Verdünnungen von E 2 färbten die DPPH Lösung von Lila nach Gelb. Die Absorption war deshalb zu gering, um ausgewertet zu werden. Der DPPH Test ist sehr stark pH-Wert abhängig (Magalhães et al., 2008). Da die Extraktionslösung 2 einen sehr

geringen pH-Wert hat, ist es möglich, dass diese einen negativen Einfluss auf den DPPH Test hat. Darum wurde die Extraktionslösung 2 vor der Verwendung zur Verdünnung der Proben, wie schon die Probenextrakte, mit Natronlauge neutralisiert und 1:100 verdünnt. Die Verdünnungen wurden auf der Grundlage der im nächsten Kapitel dargestellten Trolox Standardkurven gewählt.

4.1.3.3 Erstellung der Trolox Kalibriergeraden

Um das antioxidative Potential in Troloxäquivalenten anzugeben wurden Standardreihen in Konzentrationen zwischen 0,125 und 1 mM hergestellt. Dafür wurde Trolox jeweils in den Extraktionslösungen 1, 2 und 3 gelöst.

Die Standardreihen der Extraktionslösungen 1 und 2 verliefen zwischen den Konzentrationen 0,125 bis 0,5 mM Trolox linear. Ab einer Konzentration von 1 mM Trolox färbte sich die DPPH Lösung gelb, wodurch die Absorption unter 0,100 lag. Werte in diesem Messbereich sind sehr ungenau. Zudem wurde beobachtet, dass nach dem Farbumschlag von Lila in Gelb keine weitere Entfärbung mehr erfolgt, da sich die gelben Lösungen auch bei Zunahme der Konzentration an Trolox nicht in den Absorptionen unterscheiden. Die gelbe DPPH Lösung hat immer eine Absorption zwischen 0,070 und 0,035. Differenzen in diesem Bereich werden eher durch die Ungenauigkeit der Untersuchungsmethode als durch Unterschiede zwischen den Proben verursacht.

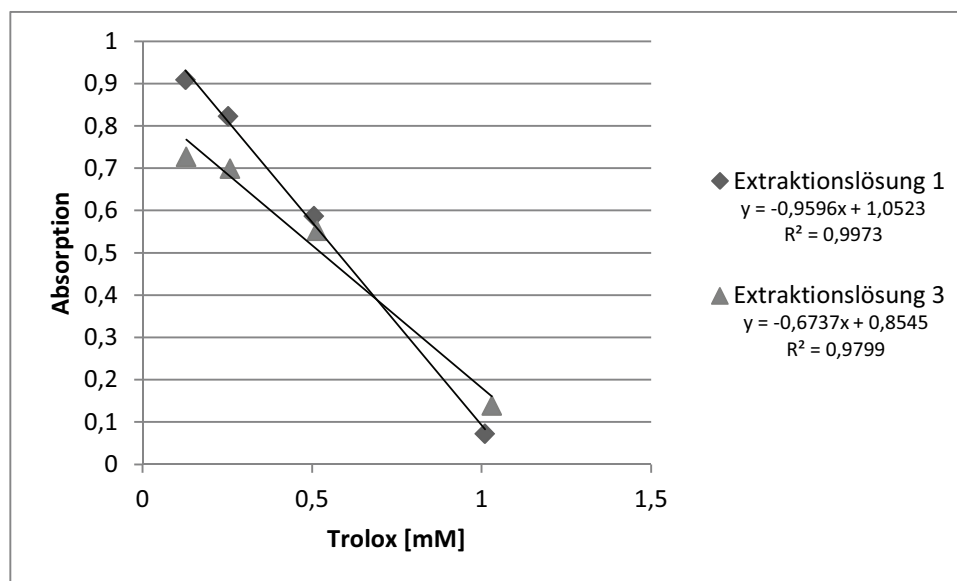


Abbildung 4-7: Trolox Standardreihen gelöst in Extraktionslösung 1 und 3

Da die Kalibriergerade der Trolox Standardreihen, gelöst in Extraktionslösung 1 und 2, annähernd die gleiche Geradengleichung haben und deswegen in der Grafik übereinander liegen würden, wurde die Kalibriergerade der Extraktionslösung 2 in einem gesonderten Diagramm dargestellt.

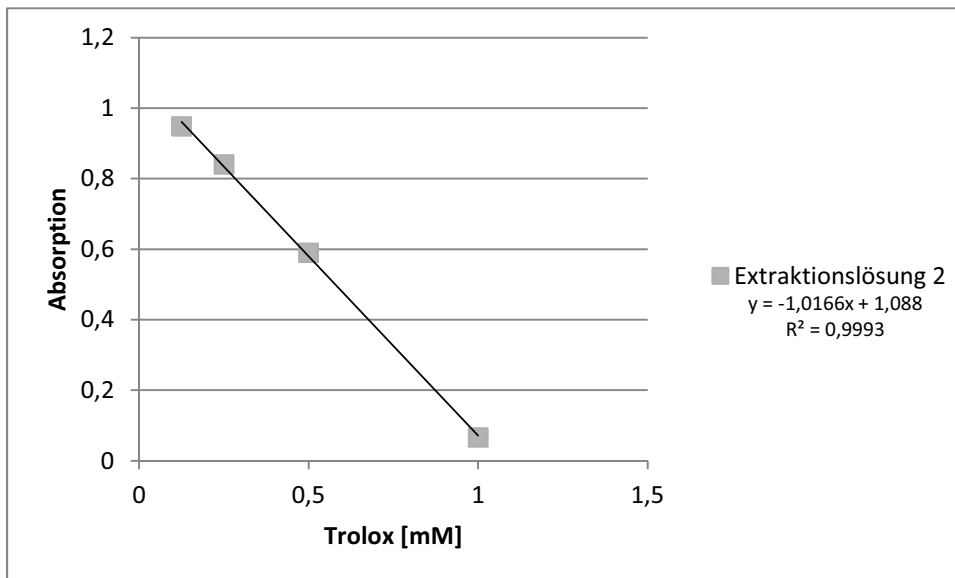


Abbildung 4-8: Trolox Standardreihe gelöst in Extraktionslösung 2

Bei der Extraktionslösung 3 behielt die DPPH Lösung auch bei der 1 mM Trolox Standardlösung die lila Farbe. Da die Absorption dieser Konzentration an Trolox aber auch bei der Extraktionslösung 3 sehr gering war (0,139), wurde für die folgenden Versuche zum DPPH Test eine Trolox Standardreihe mit Konzentrationen von 0,0625 bis 0,5 mM gewählt.

4.1.3.4 Vergleich von verschiedenen Proben

Im folgenden Versuch wurden, wie schon mit dem FRAP Test, Extrakte von sieben verschiedenen Proben angefertigt. Dafür wurden die Extraktionsmethoden 1, 2 und 3 verwendet. Mit allen Extrakten wurde der DPPH Test (3.5.5) durchgeführt und die Ergebnisse als mmol TE/ g TG berechnet.

Das mit dem DPPH Test ermittelte antioxidative Potential war für alle Proben und Extraktionslösungen mit dem antioxidativen Potential des FRAP Tests vergleichbar.

Somit war auch das antioxidative Profil der Proben beider Testverfahren in gleicher Weise zu betrachten (Abbildung 4-9). Auch bei dem DPPH Test waren, wie schon

zuvor beim FRAP Test, die in Troloxäquivalenten ausgedrückten antioxidativen Potentiale von den E 1 Extrakten bei allen Proben am höchsten (Abbildung 4-10).

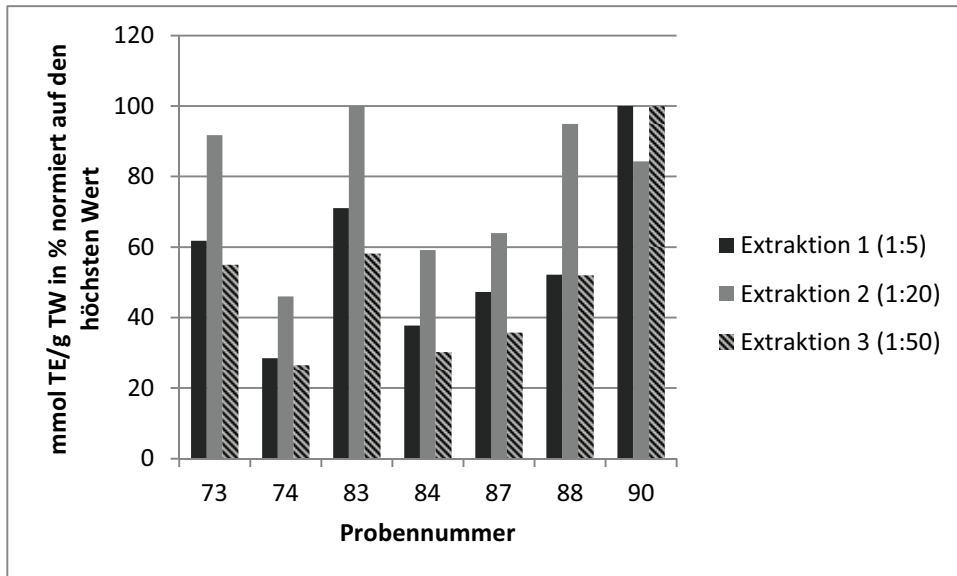


Abbildung 4-9: DPPH Test der unterschiedlich extrahierten Proben (normiert auf den höchsten Wert)

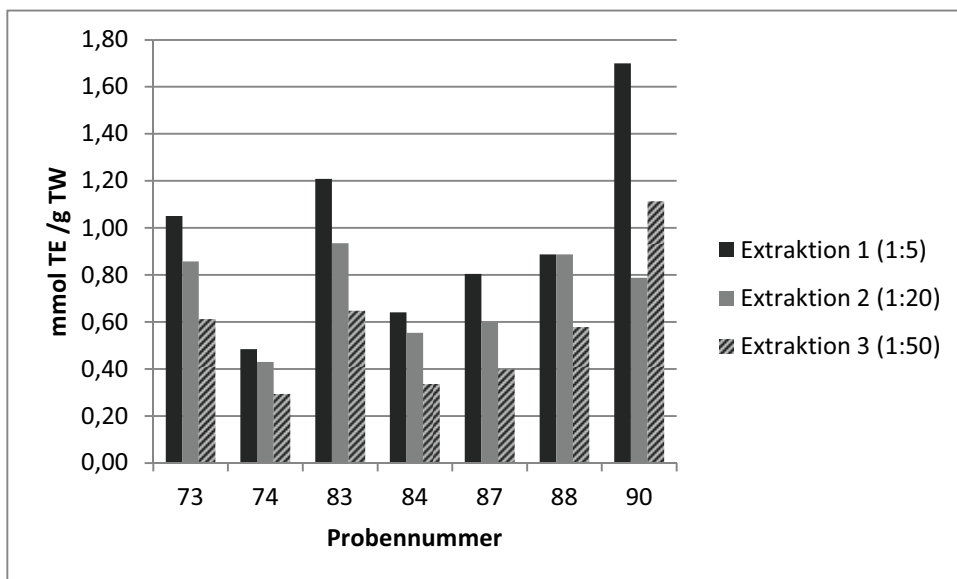


Abbildung 4-10: DPPH Test der unterschiedlich extrahierten Proben

4.1.4 FRAP Test vs. DPPH Test

Die vorangegangenen Versuche befassten sich mit der Etablierung der Methoden zur Bestimmung des antioxidativen Potentials. Da der FRAP Test sowie auch der DPPH

Test erfolgreich etabliert werden konnten, soll durch den Vergleich beider Tests anhand eines größeren Versuches (mit mehr als 40 verschiedenen Proben) ermittelt werden, welcher der beiden Tests besser für die Analyse des antioxidativen Potentials verschiedener Pflanzenteile geeignet ist. Für beide Tests wurden ausschließlich Probenextrakte der Extraktionsmethode 1 verwendet, da diese bei der Etablierung beider Tests die höchsten Werte für das antioxidative Potential lieferten und außerdem auch für die weiterführende Polyphenolanalytik verwendet werden kann. Die Extrakte wurden für beide Tests gleichermaßen 1:2 oder 1:5 verdünnt. Beide Tests wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Ergebnisse in Troloxäquivalenten beider Tests wurden gegeneinander in einem Histogramm aufgetragen, (Abbildung 7-1) um eventuelle Unterschiede zwischen den Methoden zu verdeutlichen. Dabei hat sich gezeigt, dass mit dem FRAP Test für einen Großteil der analysierten Proben eine höhere antioxidative Wirkung als mit dem DPPH Test nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Ergebnisse des FRAP Tests und des DPPH Tests vergleichbar sind. Dafür wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson mit den Ergebnissen der beiden Tests durchgeführt.

Tabelle 4-8: Korrelation nach Pearson zwischen FRAP und DPPH

		<i>FRAP</i>	<i>DPPH</i>
<i>FRAP</i>	<i>Korrelation nach Pearson</i>	1	0,913**
	<i>Signifikanz (2-seitig)</i>		<0,000
	<i>N</i>	92	92
<i>DPPH</i>	<i>Korrelation nach Pearson</i>	0,913**	1
	<i>Signifikanz (2-seitig)</i>	<0,000	
	<i>N</i>	92	92

** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Bei einer positiven Korrelation kann der Korrelationskoeffizient einen maximalen Wert von 1 annehmen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Ergebnissen des FRAP Tests und denen des DPPH Tests lag bei 0,913. Damit ist eine signifikante Korrelation der beiden Tests gegeben. Dies bedeutet, dass die Ergebnisse der beiden Tests miteinander vergleichbar sind.

Um den Zusammenhang zwischen den beiden Tests bildlich zu verdeutlichen, wurden die Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des DPPH Tests in einem Streudiagramm dargestellt (Abbildung 4-11).

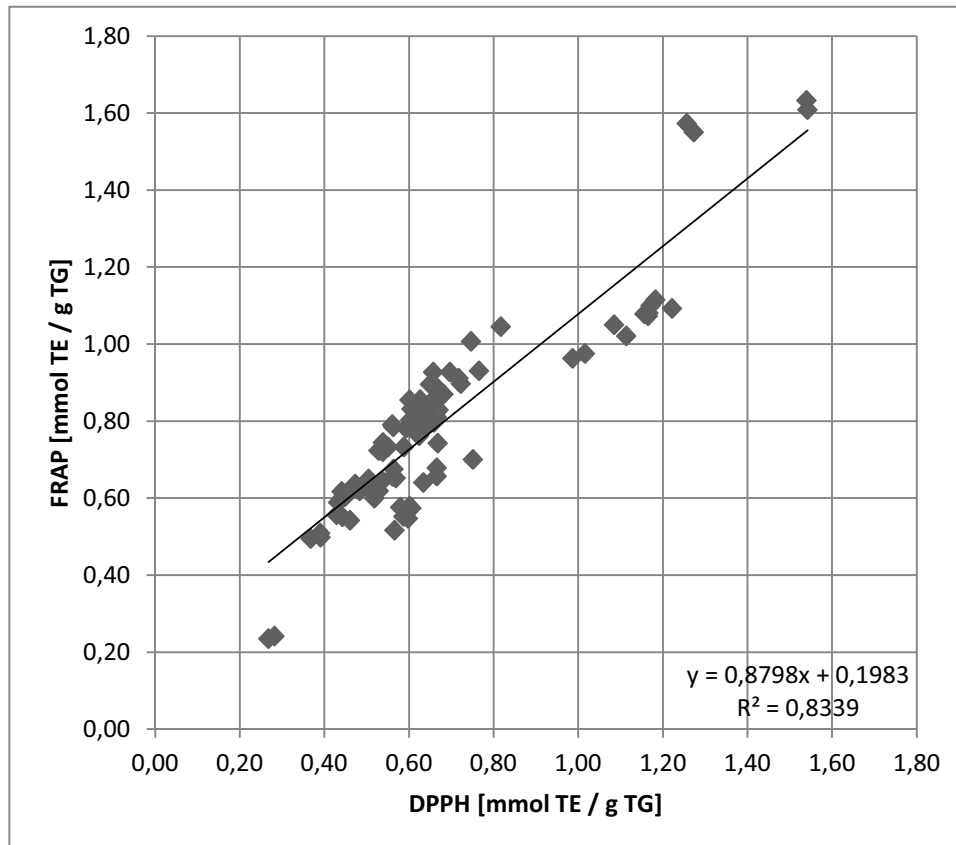


Abbildung 4-11: Auftragung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des DPPH Tests

Das Bestimmtheitsmaß der Ausgleichsgeraden stellt dabei das Quadrat des Korrelationskoeffizienten dar. Es lässt sich damit eine statistische Aussage über die Vergleichbarkeit der beiden Tests treffen. In diesem Fall entsprechen die Ergebnisse des FRAP Tests zu 83,3% denen des DPPH Tests. Frankel und Meyer (2000) raten dazu, das antioxidative Potential durch Kombination verschiedener Testverfahren zu bestimmen. Da die Ergebnisse nach den hier durchgeführten Untersuchungen miteinander vergleichbar sind, kann auf die kombinierte Verwendung beider Tests zur Bestimmung des antioxidativen Potentials verzichtet werden. Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile, im Folgenden sollen diese diskutiert werden.

Ein wichtiger Faktor für die Reaktion mit dem DPPH Molekül ist die erschwerte Zugänglichkeit größerer Antioxidantien. Dies ist bedingt durch die räumliche Anordnung des DPPH Radikals. Kleinere Moleküle haben somit eine höhere

antioxidative Wirksamkeit. Auf der anderen Seite reagieren viele größere Moleküle, die normalerweise schnell mit Peroxylradikalen reagieren, langsam oder werden in diesem Test nicht nachgewiesen. Ein weiterer Nachteil des DPPH Test ist, dass das DPPH Radikal nicht in biologischen Systemen vorkommt und somit nicht direkt die antioxidative Wirkungsweise der analysierten Proben im menschlichen Organismus widerspiegelt (Magalhães et al., 2008). Auch wenn der Arbeitsaufwand dieses Tests gering ist, ist der Kostenaufwand durch die Chemikalienkosten verglichen mit den anderen Tests sehr hoch.

Ein bedeutender Nachteil des FRAP Tests ist, dass alle Substanzen, die in der Lage sind Fe(III) in Fe(II) zu reduzieren, mit diesem Test ermittelt werden, auch wenn sie keine antioxidative Wirksamkeit aufweisen. Dadurch können die Werte des FRAP Tests höher ausfallen. Auf der anderen Seite reduzieren nicht alle Antioxidantien Fe(III) schnell genug um in der gegebenen Zeit nachgewiesen zu werden (Magalhães et al., 2008). Pulido et al. (2000) fanden heraus, dass vor allem Polyphenole mehr Zeit für die Reaktion benötigen (mindestens 30 min). Das durch die Reaktion gebildete Fe(II) ist ein oxidativ wirkendes Molekül und könnte die Bildung neuer Radikale im Medium fördern.

Der DPPH und auch der FRAP Test ließen sich leicht durchführen und lieferten jeweils reproduzierbare Ergebnisse. Der Vergleich der beiden Methoden ergab, dass die Ergebnisse zu 83,3% übereinstimmen. Somit soll für weitere Untersuchungen nur einer der beiden Tests angewandt werden. Da der FRAP Test ein höheres antioxidatives Potential liefert als der DPPH Test und auch kostengünstiger durchführbar ist, wurde dieser als Standard-Test zur Bestimmung des antioxidativen Potentials gewählt.

4.2 Antioxidatives Potential verschiedener Pflanzenteile

Auf den Grundlagen der vorangegangenen Versuche wurde der FRAP Test zur Bestimmung des antioxidativen Potentials verschiedener Pflanzenteile gewählt. Im Anhang befindet sich eine Auflistung der verwendeten Pflanzenmaterialien mit den verwendeten Probennummern (Tabelle 7-3 bis 7-5). Alle 127 Proben wurden mit dem FRAP Test (3.5.4) in vierfach Bestimmung analysiert. Außerdem wurde der Gesamtphenolgehalt mit der Folin-Ciocalteu Methode (3.5.7) bestimmt. Die Werte sind im Anhang in den Tabellen 7-9 bis 7-12 angegeben.

Anhand der Ergebnisse des FRAP Tests soll zunächst untersucht werden, ob das antioxidative Potential von der Pflanzensorte abhängig ist. Damit soll gezeigt werden, welchen Sorten ein besonders hohes oder besonders geringes antioxidatives Potential

zugeteilt werden kann. Dafür wird im Folgenden ein Signifikanztest nach Tukey mit den einzelnen Pflanzensorten durchgeführt. Da das antioxidative Potential der analysierten Saft- und Blattproben in unterschiedlichen Einheiten berechnet wurde und es sich um sehr unterschiedliche Matrizes handelt, wurde bei der Auswertung zwischen ihnen unterschieden.

Für die Auswertung wurde die Gesamtanzahl der Analysen verwendet. Bei einer Anzahl von $N = 8$ lagen somit zwei Proben vor, welche jeweils in Vierfachbestimmung analysiert wurden. Bei Proben mit einer geringen Stichprobenmenge unter 12 sind somit die Mittelwerte des antioxidativen Potentials vorsichtig zu betrachten. Zudem ist die von der SPSS Software für statistische Auswertung verwendete Grenzvariationsbreite (GV) durch die geringe Stichprobenmenge insgesamt hoch angesetzt, so dass einige Proben gemeinsam in einer Gruppe eingruppiert wurden, die bei einer größeren Stichprobenmenge eventuell einzeln eingruppiert würden. In den Tabellen 4-9 und 4-10 sind die Ergebnisse des Signifikanztests nach Tukey für die Blatt- und Saftproben dargestellt.

Für die Blattproben hat sich gezeigt, dass sich die Proben aufgrund ihrer Pflanzenart im antioxidativen Potential unterscheiden. Für die Blätter des Kamtschatka Strauches wurde die geringste antioxidative Wirksamkeit bestimmt und den Sanddornblättern, mit einer etwa dreimal so hohen Wirksamkeit, wurde statistisch das höchste antioxidative Potential zugewiesen. Die Blattproben von Aronia, Aprikose und der verschiedenen Rebsorten wurden statistisch nicht in ihrem antioxidativen Potential unterschieden (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Einteilung des antioxidativen Potentials [mmol TE/ g TG] der Blattproben nach Tukey

Pflanzenart	N	Untergruppe für Alpha = 0,05		
		3	2	1
Kamtschatka	8	0,584		
Aronia	8	0,827	0,827	
Aprikose	136	0,834	0,834	
Versch. Rebsorten	80		0,931	
Sanddorn	36			1,867
Signifikanz		0,255	0,917	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 16,799.

b Die Gruppengrößen sind nicht identisch. Es wird das harmonische Mittel der Gruppengrößen verwendet. Fehlerniveaus des Typs I sind nicht garantiert.

Bei den Saftproben gibt es eine deutlich höhere Differenz zwischen den Proben denen eine besonders geringe antioxidative Wirksamkeit zugewiesen wurde und denen mit einer besonders hohen Wirksamkeit. Zwischen dem mittleren antioxidativen Potential der verschiedenen Rebsorten (4,808 mmol TE/ L) und den Holundersäften (49,138 mmol TE/ L) liegt ein Unterschied von etwa 10%. Allerdings bei einer sehr geringen Stichprobenmenge der Holundersäfte (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-10: Einteilung des antioxidativen Potentials [mmol TE/ L] der Saftproben nach Tukey

Pflanzenart	N	Untergruppe für Alpha = 0,05			
		4	3	2	1
Versch. Rebsorten	76	4,808			
Apfel	20	5,852			
Kirsche	12	8,512	8,512		
Sauerkirsche	4	9,412	9,412		
Sanddorn	4		18,148	18,148	
Kornelkirsche	4		18,995	18,995	
Kamtschatka	8			23,262	
Blaubeere	16			23,407	
Aronia	16				47,171
Holunder	8				49,138
Signifikanz		0,941	0,074	0,874	1,000

Die Mittelwerte für die in homogenen Untergruppen befindlichen Gruppen werden angezeigt.

a Verwendet ein harmonisches Mittel für Stichprobengröße = 7,865.

b Die Gruppengrößen sind nicht identisch. Es wird das harmonische Mittel der Gruppengrößen verwendet. Fehlerniveaus des Typs I sind nicht garantiert.

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist einzelnen Sorten generell eine hohe oder geringe antioxidative Wirksamkeit zuzuweisen. Dabei wurden eventuelle Schwankungen im antioxidativen Potential innerhalb einer Sorte nicht berücksichtigt. Diese Schwankungen könnten durch den Einfluss verschiedener Anbauorte verursacht werden. Darum wurden die Einflüsse des Standortes und des Erntejahres auf das antioxidative Potential der Pflanzenteile statistisch ermittelt. Dafür wurde eine Auswahl an Rebsorten getroffen, die sich in der Herkunft unterscheiden und von denen Proben vorliegen, die im Jahr 2010 und 2011 geerntet wurden. Dabei handelte es sich um die Weinsorten Phönix, Regent und Solaris. Diese Proben lagen als Blattmaterial und als Säfte vor. Bei der Auswertung wurde auch hier zwischen diesen unterschieden.

4.2.1 Standortbedingte Unterschiede bei Blättern

Zunächst wird untersucht, ob sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Herkunft der Proben nachweisen lässt. Dafür sollen die Wahrscheinlichkeiten einer signifikanten Unterscheidung des antioxidativen Potentials zwischen den Herkunftsorten mittels einer eindimensionalen ANOVA ermittelt werden.

Die Ergebnisse der eindimensionalen ANOVA zeigen, dass bei allen Rebsorten signifikante Unterschiede (p -Wert $\ll 0,001$) im antioxidativen Potential zwischen den Herkunftsorten der einzelnen Blattproben vorliegen. Darum soll im Folgenden ermittelt werden, welche Standorte einen positiven oder negativen Einfluss auf das antioxidative Potential in den Blättern der analysierten Proben haben. Dafür wurde die Grenzvariationsbreite (GV) nach Tukey berechnet und für die Gegenüberstellung des antioxidativen Potentials im Histogramm (Abbildung 4-12) verwendet.

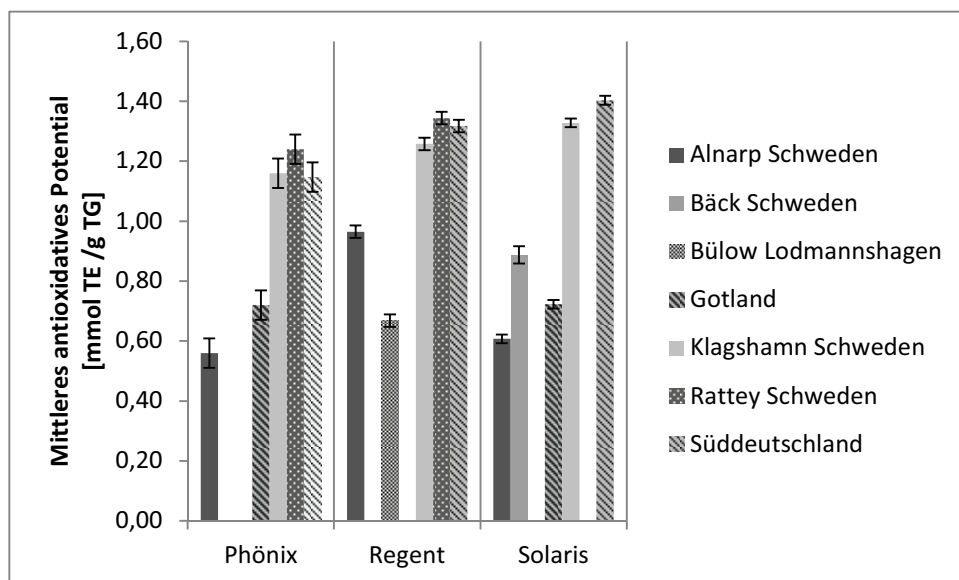


Abbildung 4-12: Antioxidatives Potential von Blättern verschiedener Herkunft
(Grenzvariationsbreite nach Tukey)

Bei der Rebsorte Phönix konnten statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben aus Klagshamn, Rattey und Süddeutschland/Rhein Hessen ermittelt werden, die Proben aus Alnarp und Gotland stimmen mit keiner der anderen analysierten Proben statistisch überein.

Auch bei der Sorte Regent konnte keine statistisch relevante Abweichung zwischen dem antioxidativen Potential der Proben aus Rattey und Süddeutschland/Rhein Hessen analysiert werden. Anders als bei den Proben der Rebsorte Phönix stimmt das antioxidative Potential der Probe aus Klagshamn mit keiner weiteren Probe der

Rebsorte Regent überein. Dies gilt auch für die Proben aus Alnarp und Lodmannshagen/Mecklenburg-Vorpommern.

Bei der Sorte Solaris konnten keine Zusammenhänge zwischen den Standorten festgestellt werden; zwischen allen Standorten liegt ein signifikanter Unterschied im antioxidativen Potential vor.

Es wurde erwartet, dass die Proben einer Rebsorte in ihrem antioxidativen Potential übereinstimmen. Diese Annahme wurde allerdings für alle Rebsorten anhand der Ergebnisse der eindimensionalen ANOVA abgelehnt. Des Weiteren wurde angenommen, dass sich das antioxidative Potential innerhalb einer Region nicht signifikant unterscheidet. Danach sollten die Proben aus Schweden (alle Standorte liegen in Südschweden/Schonen) vergleichbar sein, so wie auch die Proben aus Rattey und Lodmannshagen (beide Mecklenburg-Vorpommern) vergleichbare Werte annehmen sollten. Auch diese Annahme konnte nicht bestätigt werden. Lediglich die Proben aus Süddeutschland/Rheinhessen gehören bei allen Rebsorten in die Gruppe mit dem höchsten antioxidativen Potential. Demnach wird angenommen, dass das antioxidative Potential stärker durch regulierbare Faktoren, wie beispielsweise der Düngung, dem Erntezeitpunkt oder den Lagerbedingungen beeinflusst wird, als von standortbedingten Umwelteinflüssen oder der Rebsorte.

4.2.2 Standortbedingte Unterschiede bei Säften

Für dieselben Rebsorten wie schon im vorherigen Abschnitt werden im Folgenden die standortbedingten Unterschiede für die Säfte der jeweiligen Weinbeeren untersucht. Dafür werden ebenfalls die Wahrscheinlichkeiten einer signifikanten Unterscheidung des antioxidativen Potentials zwischen den Herkunftsorten mittels einer eindimensionalen ANOVA ermittelt.

Wie schon bei den Blattproben konnten mit der eindimensionalen ANOVA signifikante Unterschiede (p-Wert $<0,001$) zwischen den Standorten bei allen Rebsorten für die Weinbeeren festgestellt werden. Darum soll auch hier untersucht werden, welche Standorte einen positiven oder negativen Einfluss auf das antioxidative Potential in den Weinbeeren der analysierten Proben haben. Dafür wurde die Grenzvariationsbreite (GV) nach Tukey berechnet und für die Gegenüberstellung des antioxidativen Potentials im Histogramm (Abbildung 4-13) verwendet.

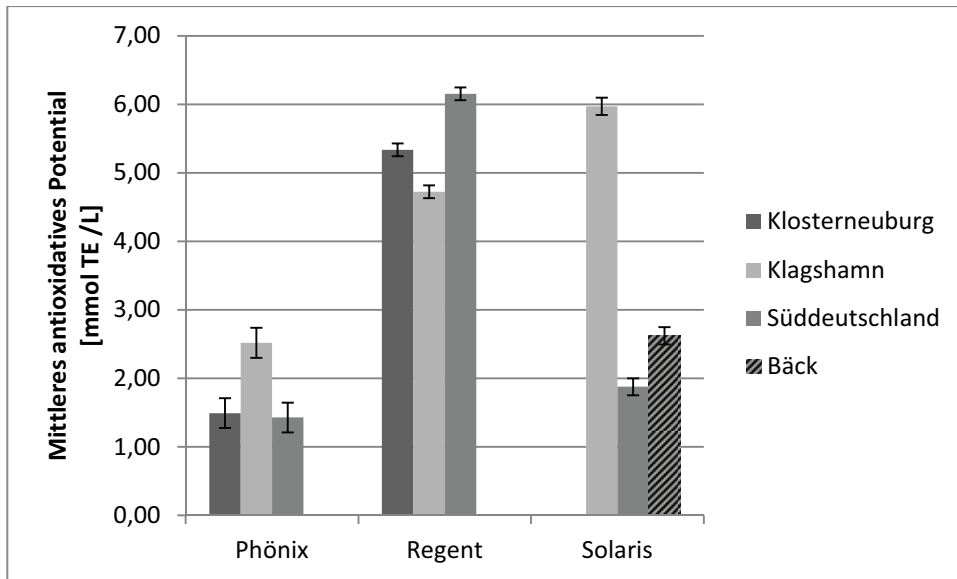


Abbildung 4-13: Herkunftsbezogene Unterschiede im antioxidativen Potential bei den Säften verschiedener Weinbeersorten (Grenzvariationsbreite nach Tukey)

Bei der Rebsorte Phönix wurde für die Standorte Süddeutschland/Rheinhausen und Klosterneuburg/Österreich ein statistisch vergleichbares antioxidatives Potential ermittelt. Die Phönix Probe aus Klagshamn/Schweden hatte dagegen ein statistisch signifikant höheres antioxidatives Potential gegenüber den anderen beiden Phönixproben.

Bei den Säften von Regent und Solaris konnten keine statistischen Zusammenhänge zwischen den Standorten festgestellt werden, bei ihnen wurde zwischen allen Standorten ein signifikanter Unterschied im antioxidativen Potential nachgewiesen.

Wie schon bei den Blattproben, konnte keine sortenbezogene Abhängigkeit des antioxidativen Potentials bei den einzelnen Saftproben ermittelt werden. Auch die Annahme, dass sich das antioxidative Potential innerhalb einer Region nicht signifikant unterscheidet wurde für die Saftproben, wie schon zuvor für die Blattproben, abgelehnt. Im Gegensatz zu den Blattproben variieren die Werte aller untersuchten Beerensorten auch innerhalb der Standorte sehr stark.

4.2.3 Erntejahrbedingte Unterschiede bei Blättern

Da ein umweltbedingter Einfluss auf das antioxidative Potential als vernachlässigbar angenommen wurde, soll im Folgenden ermittelt werden, ob das antioxidative Potential der Blätter von den untersuchten Rebsorten in einem Zeitraum von zwei Jahren konstant blieb. Dafür dienen Proben aus den Jahren 2010 und 2011 von den Standorten Klagshamn/Schweden und Rattey/Mecklenburg-Vorpommern. Für die

Auswertung wird angenommen, dass steuerbare Faktoren in beiden Jahren konstant gehandhabt wurden. Die Wahrscheinlichkeiten einer signifikanten Unterscheidung des antioxidativen Potentials zwischen den Erntejahren wurden mittels einer eindimensionalen ANOVA ermittelt.

Die Ergebnisse der eindimensionalen ANOVA zeigten, dass bei allen Weinsorten signifikante Unterschiede im antioxidativen Potential zwischen den Erntejahren der einzelnen Blattproben vorliegen. Die Proben weisen dabei einen Signifikanzwert von $<<0,001$ auf, bis auf die Phönixprobe aus Klagshamn/Schweden, die einen immer noch signifikanten Unterschied mit einem Signifikanzwert von 0,002 aufwies.

Dadurch wurde gezeigt, dass Umwelteinflüsse einen Einfluss auf das antioxidative Potential in den Blättern der untersuchten Rebsorten haben können. Da es sich lediglich um einen Vergleich zwischen Proben aus zwei Jahrgängen handelt und der genaue Erntezeitpunkt und die Erntebedingungen unbekannt sind, handelt es sich bei diesen Ergebnissen keinesfalls um eine repräsentative Aussage.

Die Abbildung 4-14 zeigt das antioxidative Potential der untersuchten Proben aus den Erntejahren 2010 und 2011.

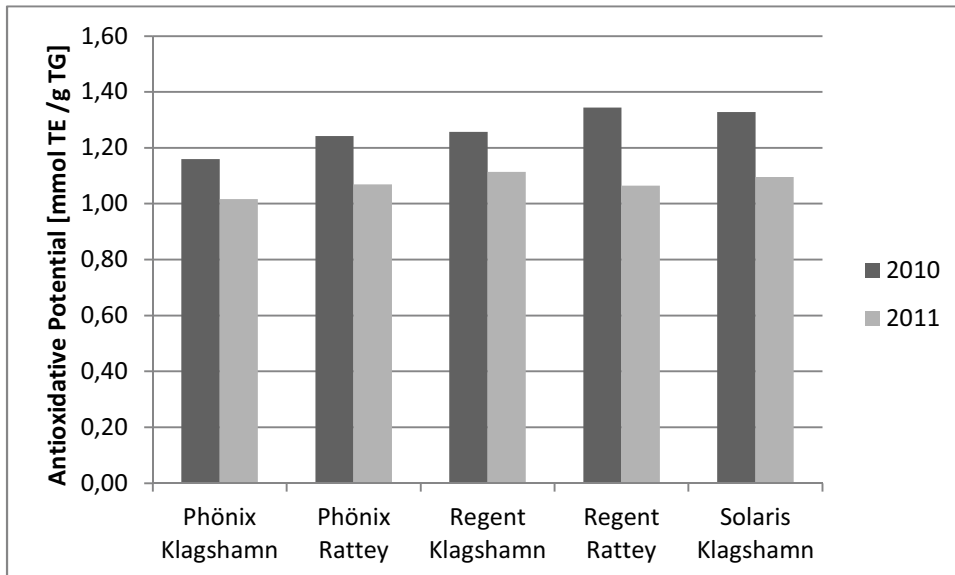


Abbildung 4-14: Gegenüberstellung des antioxidativen Potentials verschiedener Blattproben aus den Jahren 2010 und 2011

4.2.4 Erntejahrbedingte Unterschiede bei den Säften

Wie schon bei den Untersuchungen zum Einfluss des Standortes der Pflanzen auf das antioxidative Potential, wurden auch bei den erntejahrbedingten Unterschieden zwischen den Blatt und Saftproben unterschieden. Als Saftproben lagen Proben der Weinbeeren von Phönix, Regent und Solaris vom Standort Klagshamn/Schweden der Erntejahre 2010 und 2011 vor. Auch diese wurden mittels einer eindimensionalen ANOVA auf die Wahrscheinlichkeiten einer signifikanten Unterscheidung des antioxidativen Potentials zwischen den Erntejahren untersucht.

Die Ergebnisse der eindimensionalen ANOVA zeigten, dass im Gegensatz zu den Blattproben bei den Weinbeersorten Phönix und Regent keine signifikanten Unterschiede im antioxidativen Potential zwischen den Erntejahren vorliegen. Was die in Kapitel 4.2.1 getroffene Annahme bestätigt, dass der umweltbedingte Einfluss auf das antioxidative Potential vernachlässigbar ist. Für den Saft aus den Weinbeeren von Solaris konnte jedoch ein signifikanter Unterschied (p Wert <0,001) im antioxidativen Potential zwischen den Erntejahren 2010 und 2011 festgestellt werden.

Das antioxidative Potential von Weinbeersäften lässt sich demnach durch die angewandte Behandlungsmethode beeinflussen. Wie schon bei den Untersuchungen zum Einfluss des Erntejahres auf das antioxidative Potential der verschiedenen Blattproben sind auch die Ergebnisse der Saftproben nicht repräsentativ. Auch hier wurden nur die Proben aus zwei Jahrgängen miteinander verglichen. Zusätzlich liegen keine Informationen zu den Ernte-, Lager- und Verarbeitungsbedingungen vor.

Die Abbildung 4-15 zeigt das antioxidative Potential der untersuchten Proben aus den Erntejahren 2010 und 2011.

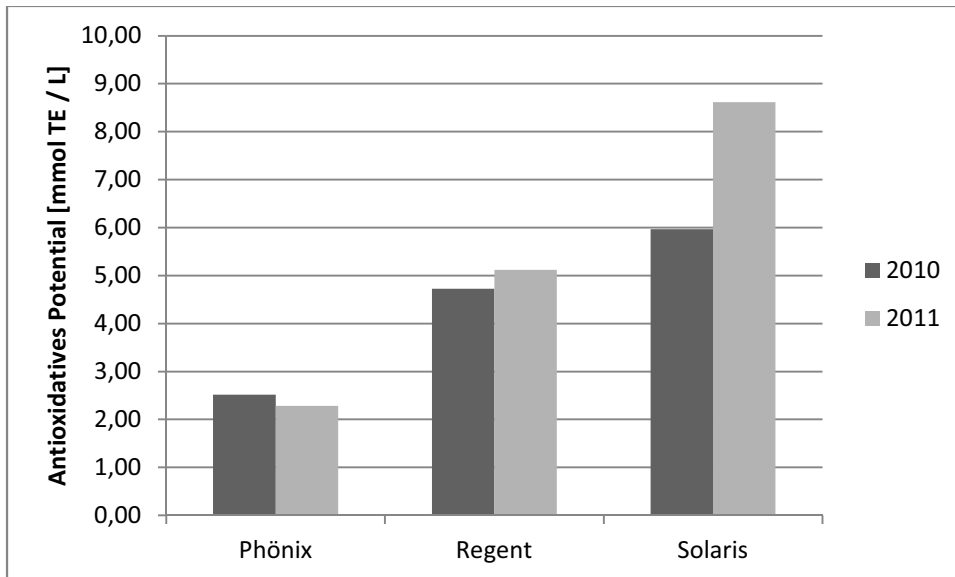


Abbildung 4-15: Gegenüberstellung des antioxidativen Potentials von Säften verschiedener Weinbeersorten aus den Jahren 2010 und 2011 vom Standort Klagshamn/Schweden

4.2.5 Antioxidatives Potential vs. Gesamtphenolgehalt

Laut O'Neill et al. (2001) und Rice-Evans (1997) sind Polyphenole die bedeutendste Stoffklasse wenn es um natürliche Antioxidantien geht. Dies führen die Autoren auf die Häufigkeit des Vorkommens in der Nahrung und auf ihre hohe antioxidative Wirksamkeit zurück. Um den Einfluss des Gesamtphenolgehaltes auf das antioxidative Potential zu überprüfen wurde von den 127 Proben, von denen bereits das antioxidative Potential mittels FRAP Test bestimmt wurde, der Gesamtphenolgehalt mit der Folin-Ciocalteu Methode (3.5.7) bestimmt und die Ergebnisse mittels einer Korrelationsanalyse nach Pearson gegeneinander verglichen. Wie schon zuvor bei den Analysen zu standort- und erntejahrbedingten Unterschieden im antioxidativen Potential wurde auch hier zwischen den Blatt- und den Saftproben unterschieden.

Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Gesamtphenolgehalt und dem antioxidativen Potential für die Blattproben lag bei 0,732 und für die Saftproben bei 0,689 (Tabelle 4-11). Damit sind für die Blatt und die Saftproben signifikante Korrelationen zwischen den beiden Parametern gegeben. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das antioxidative Potential von dem Gehalt an Gesamtphenolen beeinflusst wird. Um den Zusammenhang zwischen den beiden Tests bildlich zu verdeutlichen, wurde das antioxidative Potential gegen den Gesamtphenolgehalt in einem Streudiagramm dargestellt (Abbildung 4-16 und 4-17).

Tabelle 4-11: Korrelation nach Pearson zwischen dem antioxidativen Potential und dem Gesamtphenolgehalt

Blattproben	Korrelation nach Pearson	0,732**
	Signifikanz (1-seitig)	<0,001
	N	70
Saftproben	Korrelation nach Pearson	0,689**
	Signifikanz (1-seitig)	<0,001
	N	52

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (1-seitig) signifikant.

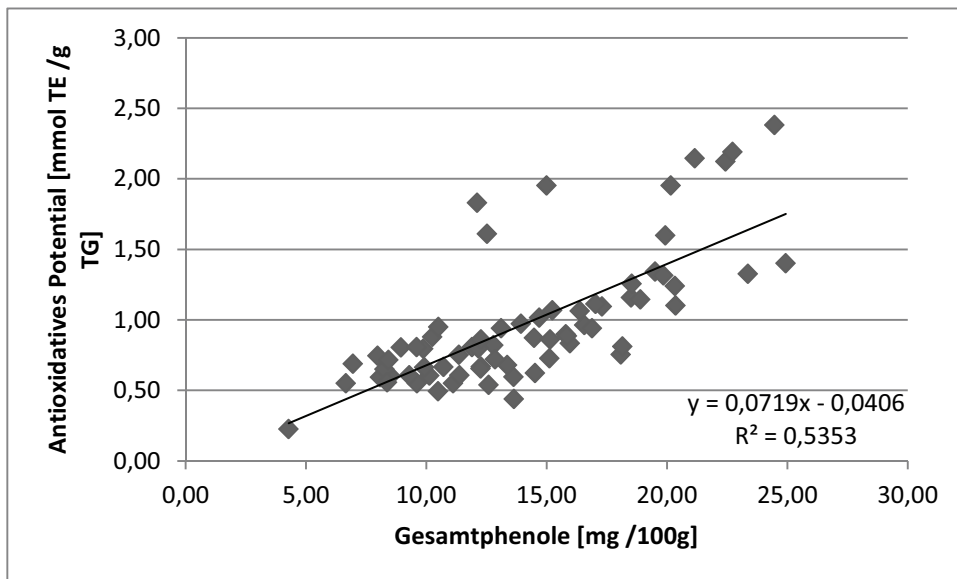


Abbildung 4-16: Darstellung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des Folin-Ciocalteu Tests der Blattproben

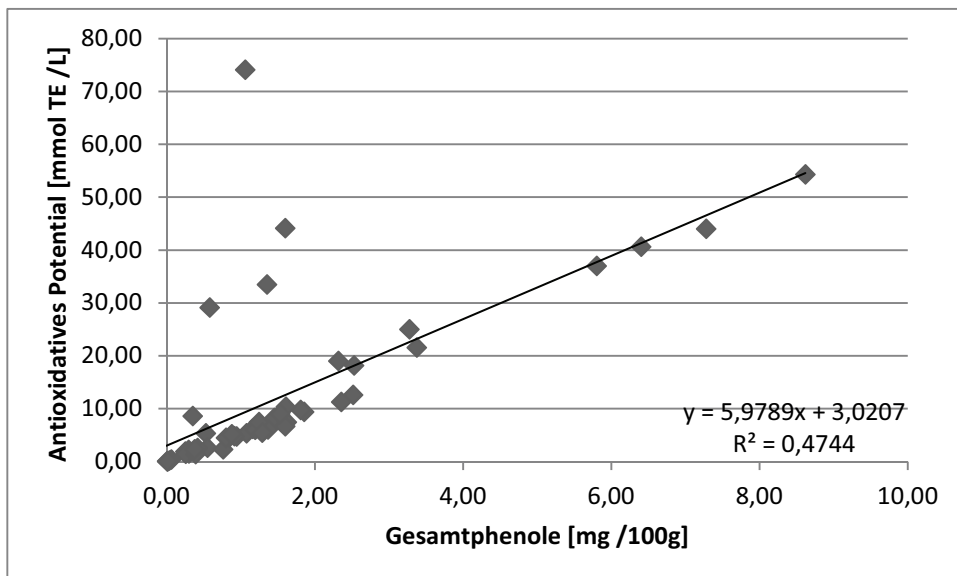


Abbildung 4-17: Darstellung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des Folin-Ciocalteu Tests der Saftproben

Die Folin-Ciocalteu Methode ist nicht spezifisch für Polyphenole, da die Reaktion auch mit vielen nicht-phenolischen Substanzen ablaufen kann, wie beispielsweise mit aromatischen Aminen, Schwefeldioxid, Ascorbinsäure, Cu(I) oder Fe(II) (Magalhães et al., 2008). Roginsky und Lissi (2005) stellen in ihrer Arbeit ebenfalls Korrelationen zwischen dem antioxidativen Potential und dem Gesamtphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu dar. Verglichen wurden vor allem Weinproben. Die in ihrer Arbeit abgebildeten Vergleiche wurden zwischen Ergebnissen des ABTS, DPPH und DMPD Test durchgeführt. In allen Fällen korrelieren dabei die Ergebnisse miteinander. In Tabelle 4-12 sind die Vergleiche zwischen dem antioxidativen Potential und Gesamtphenolgehalt aus der Arbeit von Roginsky und Lissi dargestellt.

Tabelle 4-12: Korrelationen zwischen dem antioxidativen Potential und Gesamtphenolen (Roginsky und Lissi, 2005)

Produkt	Methode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials	Korrelationskoeffizient
<i>Rot- und Weißweine</i>	<i>ABTS Test</i>	<i>0,990</i>
<i>Rot- und Weißweine</i>	<i>ABTS Test</i>	<i>0,959</i>
<i>Rotweine</i>	<i>ABTS Test</i>	<i>0,746</i>
<i>Tees und Säfte</i>	<i>ABTS Test</i>	<i>0,859</i>
	<i>DPPH Test</i>	<i>0,752</i>
	<i>DMPD Test</i>	<i>0,592</i>
<i>Rotweine</i>	<i>ABTS Test</i>	<i>0,935</i>
<i>Weißweine</i>	<i>ABTS Test</i>	<i>0,907</i>
<i>Rot- und Weißweine</i>	<i>ABTS Test</i>	<i>0,997</i>

Diese Korrelationen zeigen, auch wenn die Folin-Ciocalteu Methode nicht zur Bestimmung des antioxidativen Potentials entwickelt wurde, ist sie dafür geeignet (Roginsky und Lissi, 2005).

Da es sich nach der Aussage von Roginsky und Lissi (2005) bei der Folin-Ciocalteu Methode ebenfalls um eine geeignete Methode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials handelt, kann man in der vorliegenden Arbeit nicht genau sagen, ob der Gesamtphenolgehalt einen Einfluss auf das antioxidative Potential hat. Um diese Aussage treffen zu können müsste der Gesamtphenolgehalt mit einer genaueren Analyse-methode, wie beispielsweise der HPLC ermittelt werden.

4.3 Versuche mit NIR-Spektroskopie

Im Folgenden wurde untersucht, ob es möglich ist, das antioxidative Potential mittels NIR-Spektroskopie zu bestimmen. Dafür wurden die Spektren 10 verschiedener Blattproben mittels NIR, wie in 3.5.8 beschrieben, aufgenommen.

Obwohl es sich bei den verwendeten Proben nicht um dieselben Pflanzenarten handelte, ergaben sich für die verschiedenen Blattproben vergleichbare NIR-Spektren. Dadurch besteht die Möglichkeit einen sortenunabhängigen Test für das antioxidative Potential von Blattproben mittels NIR zu etablieren.

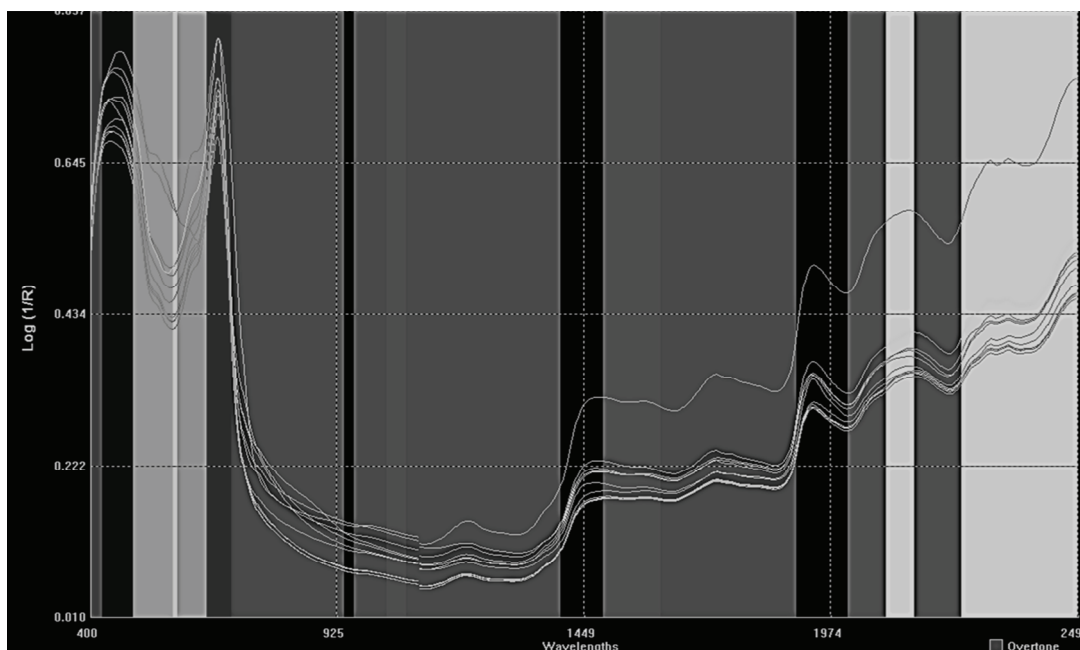


Abbildung 4-18: Auftragung der NIR Spektren der 10 verschiedenen Proben

Die Entwicklung einer neuen NIR-Methode kann sehr zeitaufwendig sein, da die Ergebnisse zuverlässiger sind, je mehr Proben für die Kalibration vermessen werden. Zhang et al. (2004) und auch Chen et al. (2012) zeigen in ihren Artikeln, dass es möglich ist, das antioxidative Potential von Blattproben (in beiden Fällen grüner Tee) mittels NIR-Spektroskopie zu ermitteln.

Zhang et al. (2004) benutzten als Referenzmethode den TEAC Test. Anhand dieser Methode bestimmten sie die antioxidative Kapazität für 123 Proben. Jede Probe wurde dreifachbestimmt. Anschließend nahmen sie die NIR-Spektren dieser 123 Proben auf. Insgesamt wurde jede Probe 27-mal mittels NIR gemessen. Aus den Messungen wurde eine „*principal component regression*“ (PCR) gebildet, um die antioxidative Kapazität von grünem Tee zu bestimmen.

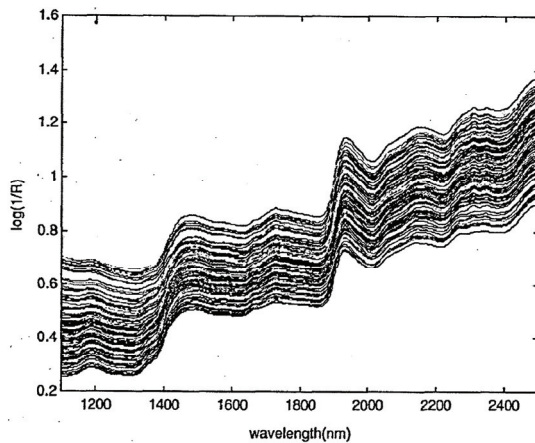


Abbildung 4-19: NIR Spektren von Grünteeblättern aufgenommen von Zhang et al. (2004)

Das Profil der von Zhang et al. (2004) aufgenommenen NIR Spektren (Abbildung 4-19) ähnelt den aufgenommenen Spektren in der vorliegenden Arbeit (Abbildung 4-18) im rein visuellen Abgleich. Auch bei den Proben von Zhang et al. (2004) handelt es sich um Blätter, allerdings ist die Resonanz bei den Proben höher als bei den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Blattproben.

Da bereits Veröffentlichungen zur Messung des antioxidativen Potentials mittels NIR vorliegen, wird davon ausgegangen, dass die Etablierung einer Methode möglich ist. Der zeitliche Aufwand würde allerdings den Rahmen der vorliegenden Arbeit übersteigen. Darum sollen die Ergebnisse der Untersuchungen mittels NIR lediglich eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des antioxidativen Potentials darstellen.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten das Vorkommen von Antioxidantien in verschiedenen Pflanzenteilen genauer beurteilen zu können. Dafür wurden im ersten Schritt Methoden Etabliert um das antioxidative Potential von verschiedenen Pflanzenteilen zu messen. Im zweiten Schritt wurde mit Hilfe der Kenntnisse aus dem ersten Schritt das antioxidative Potential verschiedener Pflanzenarten/teile ermittelt und ausgewertet. Zudem wurde Untersucht, ob es sich bei der NIR-Spektroskopie um eine geeignete Methode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials handelt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die drei Tests DMPD, FRAP und DPPH auf ihre Eignung zur Bestimmung des antioxidativen Potentials verschiedener Pflanzenteile hin untersucht. Es stellte sich heraus, dass der DMPD Test nach der vorliegenden Methode und mit den vorliegenden Proben nicht durchführbar war. Da die beiden anderen Tests keinerlei Probleme bezüglich ihrer Durchführbarkeit zeigten, wurden keine weiteren Versuche zum DMPD Test durchgeführt. Die Durchführungsparameter der drei Tests sind in Tabelle 5-1 angegeben.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung der Ergebnisse der drei Tests zur Bestimmung des antioxidativen Potentials

Test	Reaktionszeit	Verdünnungen der Extrakte	Trolox Standardreihe	Optimaler Messbereich	Anwendbarkeit
DMPD	10 min	Die Extrakte wurden unverdünnt analysiert.	0,25-2,0 mM	Nicht analysiert	Nicht durchführbar, die Versuche wurden abgebrochen.
FRAP	3 h	E 1 1:5 E 2 1:10 E 3 1:100	0,25-1,5 mM	Abs. 0,2-1,5	Liefert die höchsten Ergebnisse. Ist reproduzierbar.
DPPH	24 h	E 1 1:5 E 2 1:20 E 3 1:50	0,0625-0,5 mM	Nicht analysiert	Liefert reproduzierbare Ergebnisse, jedoch geringere Werte als der FRAP Test.

Da sich die Tests FRAP und DPPH beide etablieren ließen, wurden sie in einem Versuch mit mehreren Blattproben gegeneinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse der beiden Tests miteinander korrelieren. Da der FRAP Test höhere

Werte als der DPPH Test lieferte und dieser auch noch kostengünstiger ist, wurde er als Standardmethode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials verschiedener Pflanzenteile gewählt.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde im zweiten Teil der Arbeit der FRAP Test zur Bestimmung des antioxidativen Potentials verschiedener Pflanzenteile gewählt. Das antioxidative Potential aller 127 Proben aus Tabelle 7-3 bis 7-5 wurde bestimmt und es wurde untersucht, welchen Proben ein besonders geringes beziehungsweise ein besonders hohes antioxidatives Potential zugewiesen werden kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich das antioxidative Potential von verschiedenen Pflanzenteilen beeinflussen lässt.

Darum wurden standort- und erntejahrbedingte Einflüsse auf das antioxidative Potential untersucht. Die Rebsorten Phönix, Regent und Solaris lagen sowohl als Blattmaterial als auch als Säfte vor, weshalb die Ergebnisse des antioxidativen Potentials dieser Proben für diese Untersuchungen verwendet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass sich das antioxidative Potential gleicher Rebsorten an unterschiedlichen Standorten signifikant unterscheidet. Auch scheinen regionale Umwelteinflüsse keine Rolle für die Höhe des antioxidativen Potentials in der Probe zu spielen. Demnach wird angenommen, dass das antioxidative Potential stärker durch regulierbare Faktoren, wie beispielsweise Düngung, Erntezeitpunkt oder Lagerbedingungen, beeinflusst wird, als von standortbedingten Umwelteinflüssen.

Um den Einfluss des Gesamtphenolgehaltes auf das antioxidative Potential zu überprüfen, wurden die 127 Proben, von denen bereits das antioxidative Potential mittels FRAP Test bestimmt wurde, der Gesamtphenolgehalt mit der Folin-Ciocalteu Methode bestimmt und die Ergebnisse mittels einer Korrelationsanalyse nach Pearson gegeneinander verglichen. Es konnten signifikante Korrelationen zwischen den beiden Parametern festgestellt werden. Da es sich bei der Folin-Ciocalteu Methode allerdings ebenfalls um eine geeignete Methode zur Bestimmung des antioxidativen Potentials handelt (Magalhães et al., 2008), kann man in der vorliegenden Arbeit nicht genau bestimmen, ob der Gesamtphenolgehalt einen direkten Einfluss auf das antioxidative Potential hat.

Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht ob sich das antioxidative Potential mittels NIR-Spektroskopie bestimmen lässt. Dafür wurden die NIR-Spektren von 10 verschiedenen Blattproben aufgenommen. Alle Spektren hatten ein ähnliches

Profil. Somit würde die Möglichkeit bestehen, eine sortenübergreifende Analysenmethode mittels NIR zu etablieren. Dass es möglich ist, das antioxidative Potential mittels NIR-Spektroskopie zu bestimmen, geht aus den Veröffentlichungen von Zhang et al. (2004) und auch Chen et al. (2012) hervor, in denen die Autoren Methodenentwicklungen zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von grünem Tee mittels NIR darstellen.

Da eine Analyse mittels NIR-Spektroskopie im Vergleich mit der Spektralphotometrie einen geringeren Arbeits- und Kostenaufwand darstellt, sollten sich weitere Studien mit der Etablierung einer Analysenmethode mittels NIR befassen.

6 Literaturverzeichnis

- Alasalvar, C., Grigor, J., M., Zhang, D., Quantick, P., C., Shahidi, F. (2001).** Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 49(3), 1410–1416.
- Bravo, L., Abia, R., Saura-Calixto, F. (1994).** Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *J. Agric. Food Chem.* 42(7), 1481–1487.
- Burton, G., J. (2009).** Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J. Anat.*, 215(1), 27–35.
- Chen, J., Lindmark-Mansson, H., Gorton, L., & Akesson, B. (2003).** Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal.* 13(12), 927–935.
- Chen, Q., Guo, Z., Zhao, J., Ouyang, Q. (2012).** Comparisons of different regressions tools in measurement of antioxidant activity in green tea using near infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 60, 92-97.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348–361.
- Dorman, D., H., J., Hiltunen, R. (2011).** Antioxidant and pro-oxidant in vitro evaluation of water-soluble food-related botanical extracts. *Food Chem.*, 129(4), 1612-1618.
- Ebermann, R., Elmadfa, I. (2008).** Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. Springer-Verlag, Wien.
- FAO/WHO, Codex Alimentarius Commission (2011).** Class names and the international numbering system for food additives; CAC/GL 36-1989. [online] Abrufbar unter: www.codexalimentarius.net/download/standards/7/CXG_036e.pdf [06.10.2011]

- Foti, M., C., Dasquino, C., Geraci, C. (2004).** Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcohol solutions. *J. Org. Chem.*, 69(7), 2309–2314.
- Frankel, E., N., Meyer, A., S. (2000).** The problems of using one dimensional methods to evaluated multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80(13), 1925-1941.
- Gay, M., H. (2008).** Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, *Springer Verlag*
- Gaziano, J., M., Hennikens, C., H. (1996).** Update on dietary antioxidants and cancer. *Pathol. Biol.* 44, 42-45.
- Gorinstein, S., Vargas, O., J., M., Jaramillo, N., O., Salas, I., A., Ayala, A., L., M., Arincibia-Ávila, P., et al. (2007).** The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *Europ. Food Res. Techn.*, 225(3–4), 321–328.
- Halliwel, B., Gutteridge, J., M., C., (1999).** Eds. Oxygen is a toxic gas- an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. *In Free Radical in Biology and Medicine; Oxford University Press: United Kingdom.*
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L. (2005).** Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(6), 1841–1856.
- Hollman, P., C., H., Arts, I., C., W. (2000).** Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 80(7), 1081-1093.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(6), 1841–1856.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V., I. (2011).** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.*, 126(4), 1821-1835.
- Jenner, A., M., Rafter, B., Halliwel, B. (2005).** Human fecal water content of phenolics: The extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic. Biol. Med.*, 38(6), 763–772.

- Larson R., A. (1988).** The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27(4), 969-978.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006).** Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(13), 2046–2056.
- Magalhães, L., M., Segundo, M., A., Reis, S., Lima, J., L., F., C. (2008).** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytical Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Moon, J.-K., Shibamoto, T. (2009).** Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* 57(5), 1655-1666.
- O'Neill, M., E., Carroll, Y., Couridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., et al. (2001).** A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *Br. J. of Nutri.*, 85, 499–507.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R., L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(10), 4619–4626.
- Papas, A., M. (1999).** Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. CRC Press: Boca Raton.
- Paschke, M. (2011).** HPLC-DA/MS analyses of polyphenols during fermentation of blackcurrants. *Internship Report*
- Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2005).** Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 53(12), 5036–5040.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Nunez, M., J. (2004).** Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem.*, 85(2), 267–273.
- Prior, R., L., Wu, X., Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53(10), 4290–4302.

- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 48(8), 3396-3402.
- Re, R., Pellegrini, N., Preoteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26(9/10), 121–137.
- Rice-Evans, C., A., Miller, N., J., Paganga, G. (1997).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20(7), 933-956.
- Robbins, R., J. (2003).** Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51(10), 2866-2887.
- Roginsky, V., Lissi, E., A. (2005).** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92(2), 235-254.
- Rösch, D. (2004).** Isolierung, Strukturaufklärung und antioxidative Kapazität phenolischer Verbindungen aus Sanddorn und Quitte – ein Beitrag zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen phenolischer Antioxidantien. Logos Verlag Berlin, Berlin.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J., A., Saura-Calixto, F. (1999).** Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *J. Sci. Food Agric.*, 79(10), 1301–1304.
- Schwendt, G., (1995).** Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Serrano, J., Puupponen-Piniä, R., Dauer, A., Aura, A.,M., Saura-Calixto, F. (2009).** Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53(2), 310-329.
- Shahidi, F. (2000).** Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*. 44(3), 158-163.
- Shahidi, F., Naczk, M. (1995).** Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Technomic Publishing AG, Schwitzerland.
- Shahidi, F., Wanasundara, P., K. (1992).** Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science and nutrition*, 32(1), 67-103.

- Srivastava, A., Akoh, C., C., Yi, W., Fischer, J., Krewer, G. (2007).** Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *J. Agric. Food Chem.*, 55(7), 2705–2713.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006).** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 669-675.
- Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken** (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung – ZzulV)
Anlage 5 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Zusatzstoffe, die für Lebensmittel zur Konservierung oder als Antioxidationsmittel zugelassen sind; Teil D
- Wang, H., Cao, G., Prior, R., L. (1996).** Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 44(3), 701–705.
- Wang, S., Melnyk, J., P., Tsao, R., Marcone, M., F. (2011).** How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International*. 44(1), 14-22.
- WHO (2011).** CAUSES OF DEATH 2008 SUMMARY TABLES May 2011 Health statistics and informatics Department, World Health Organization, Geneva, Switzerland. [online] Abrufbar unter: <http://apps.who.int/ghodata/?vid=10012> [06.10.2011]
- Wood, L. G., Gibson, P. G., Garg, M. L. (2006).** A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(13), 2057–2066.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. (2004).** Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(12), 4026–4037.
- Zhang, M., H., Luypaert, J., Fernández Pierna, J., A., Xu, Q., S., Massart, D., L. (2004).** Determination of total antioxidant capacity in green tea by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Talanta*, 62(1), 25-35.
- Ziegler, H. (1998).** Strasburger Lehrbuch der Botanik. [Hrsg.] Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A., 34. Auflage, *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart S. 217-455.

7 Anhang

Tabelle 7-1: Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZzuIV) Anlage 5 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Teil D Antioxidationsmittel für bestimmte Lebensmittel (Teil 1)

<i>E-Nummer</i>	<i>Zusatzstoff</i>	<i>Lebensmittel</i>	<i>Höchstmenge (mg/kg)</i>
<i>E 310</i>	<i>Propylgallat</i>	<i>Fette und Öle für die gewerbliche Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln</i>	<i>200¹⁾ (Gallate, TBHQ und BHA, einzeln oder in Kombination)</i>
<i>E 311</i>	<i>Octylgallat</i>		<i>100¹⁾ (BHT)</i>
<i>E 312</i>	<i>Dodecylgallat</i>	<i>Bratöl und -fett, außer Oliventresteröl</i>	
<i>E 319</i>	<i>Tert.-Butylhydrochinon (TBHQ)</i>	<i>Schmalz; Fischöl; Rinder-, Geflügel- und Schaffett</i>	<i>jeweils auf den Fettgehalt bezogen</i>
<i>E 320</i>	<i>Butylhydroxyanisol (BHA)</i>	<i>Kuchenmischungen Knabbererzeugnisse auf Getreidebasis Milchpulver für Verkaufsautomaten</i>	<i>200 (Gallate, TBHQ und BHA, einzeln oder in Kombination)</i>
<i>E 321</i>	<i>Butylhydroxytoluol (BHT)</i>	<i>Trockensuppen und -brühen Saucen Trockenfleisch Verarbeitete Nüsse Vorgekochte Getreidekost Würzmittel Trockenkartoffeln Kaugummi Nahrungsergänzungsmittel Etherische Öle Andere Aromen als etherische Öle</i>	<i>jeweils auf den Fettgehalt bezogen 200 (Gallate und BHA, einzeln oder in Kombination) auf den Fettgehalt bezogen 25 (Gallate, TBHQ und BHA, einzeln oder in Kombination) 400 (Gallate, TBHQ, BHT und BHA, einzeln oder in Kombination) 1 000 (Gallate, TBHQ und BHA, einzeln oder in Kombination) 100²⁾ (Gallate, einzeln oder in Kombination) 200³⁾ (TBHQ, BHA, einzeln oder in Kombination)</i>
<i>E 315</i>	<i>Isoascorbinsäure</i>	<i>Gepökelte Fleischerzeugnisse oder haltbar gemachte Fleischerzeugnisse</i>	<i>500</i>
<i>E 316</i>	<i>Natriumisoascorbat</i>	<i>Haltbar gemachte oder teilweise haltbar gemachte Fischerzeugnisse</i>	<i>1 500</i>
		<i>Fisch mit roter Haut, gefroren oder tiefgefroren</i>	<i>1 500 jeweils berechnet als Isoascorbinsäure</i>

Tabelle 7-2: Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZzuIV) Anlage 5 (zu § 5 Abs. 1 und § 7) Teil D Antioxidationsmittel für bestimmte Lebensmittel (Teil 2)

E-Nummer	Zusatzstoff	Lebensmittel	Höchstmenge (mg/kg)
E 392	Extrakt aus Rosmarin	Pflanzenöle (ausgenommen natives Öl und Olivenöl) und Fett, sofern der Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mehr als 15 % (Massenanteil) des Gesamtfettsäuregehalts beträgt, zur Verwendung in nicht wärmebehandelten Lebensmitteln	30 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure) auf den Fettgehalt bezogen
		Fischöle und Algenöl	50 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure) auf den Fettgehalt bezogen
		Schmalz, Rinder-, Geflügel-, Schaf- und Schweinefett Fette und Öle für die gewerbliche Herstellung von wärmebehandelten Lebensmitteln Bratöl und -fett, außer Olivenöl und Oliventresteröl Knabbererzeugnisse (Snacks auf Getreide-, Kartoffel- oder Stärkebasis)	
		Saucen	100 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure) auf den Fettgehalt bezogen
		Feine Backwaren	200 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure) auf den Fettgehalt bezogen
		Nahrungsergänzungsmittel	400 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure)
		Trockenkartoffeln Eierzeugnisse Kaugummi	200 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure)
		Milchpulver für Verkaufsautomaten Würzmittel Verarbeitete Nüsse	200 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure) auf den Fettgehalt bezogen
		Trockensuppen und -brühen	50 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure)
		Trockenfleisch	150 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure)
		Fleisch- und Fischerzeugnisse, außer Trockenfleisch und getrockneter Wurst	150 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure) auf den Fettgehalt bezogen
		Getrocknete Wurst	100 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure)
		Aromen	1 000 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure)
		Trockenmilch zur Herstellung von Speiseeis	30 mg/kg (ausgedrückt als Summe aus Carnosol und Carnosolsäure)
E 586	4-Hexylresorcin	Frische, gefrorene und tiefgefrorene Krebstiere	2 als Rückstand in Krebstierfleisch

*) Bei gemeinsamer Verwendung von Gallaten, TBHQ, BHA und BHT sind die Einzelmengen prozentual zu reduzieren.

Tabelle 7-3: Verwendetes Pflanzenmaterial (Teil 1). Die Blattproben wurden Gefriergetrocknet und mit der Pulvermühle gemahlen (0,5 µm)

Nr.	Art der Probe	Pflanzenart	Herkunft	Erntezeitpunkt
4	Blätter Trial 5, getrocknet	Aprikose	Polen	28.07.2010
5	Blätter Trial 3, 6 h fermentiert, ungetrocknet	Aprikose	Polen	20.07.2010
6	Blätter Trial 7	Aprikose	Polen	30.07.2010
7	Blätter Trial 5, ungetrocknet	Aprikose	Polen	28.07.2010
8	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Solaris	Gotland	21.10.2010
9	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Rathey	25.06.2010
10	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Rathey	25.06.2010
11	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Aprikose	Polen	25.06.2010
12	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Aronia	Polen	25.06.2010
13	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Gotland	21.10.2010
14	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow	25.06.2010
15	Blätter Trial 1, 3% Restfeuchte, getrocknet	Aprikose	Polen	
16	Blätter Trial 1, 24h fermentiert	Aprikose	Polen	20./21.07.2010
17	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Kamtschatka	Polen	25.06.2010
18	Blätter nach Bandseparator	Aprikose	Polen	
19	Blätter Trial 1 Wdh. 3% Restfeuchte, getrocknet	Aprikose	Polen	
20	Blätter Trial 1, Wdh. 24h fermentiert	Aprikose	Polen	20./21.07.2010
21	Blätter Trial 2	Aprikose	Polen	22.07.2010
22	Blätter Trial 2, Wdh.	Aprikose	Polen	
23	Blätter Trial 3, 3-4% Restfeuchte	Aprikose	Polen	
24	Blätter Trial 8, getrocknet	Aprikose	Polen	24.07.2010
25	Blätter Trial 11, ungetrocknet	Aprikose	Polen	
26	Blätter Trial 10, ungetrocknet	Aprikose	Polen	
27	Blätter Trial 12, ungetrocknet	Aprikose	Polen	
28	Blätter Trial 6, getrocknet	Aprikose	Polen	
29	Blätter Trial 4, ungetrocknet	Aprikose	Polen	22.07.2010
30	Blätter Trial 7, ungetrocknet	Aprikose	Polen	30.07.2010
31	Blätter Trial 14, ungetrocknet	Aprikose	Polen	23.07.2010
32	Blätter Trial 9, nach Fermentation	Aprikose	Polen	21.07.2010
33	Blätter Trial 13, ungetrocknet	Aprikose	Polen	2010
34	Blätter Trial 12, getrocknet	Aprikose	Polen	27.07.2010
35	Blätter Trial 15, getrocknet	Aprikose	Polen	29.07.2010
36	Blätter Trial 4, getrocknet	Aprikose	Polen	22.07.2010
37	Blätter Trial 6, ungetrocknet	Aprikose	Polen	27.07.2010
38	Blätter Trial 14, getrocknet	Aprikose	Polen	23.07.2010
39	Blätter Trial 15, ungetrocknet	Aprikose	Polen	29.07.2010
40	Blätter Trial 13, getrocknet	Aprikose	Polen	26.07.2010
41	Blätter Trial 10, getrocknet	Aprikose	Polen	27.07.2010
42	Blätter Trial 9, getrocknet	Aprikose	Polen	21.07.2010
43	Blätter Trial 8, ungetrocknet	Aprikose	Polen	24.07.2010
44	Blätter Trial 11, getrocknet	Aprikose	Polen	28.07.2010
45	Saft	Regent	Rheinhessen	2010
46	Saft	Regent	Klagshamn	2010
47	Saft	Regent	Klosterneuburg	2010
48	Wein		Lodmannshagen	2010
49	Saft	Rösler	Klosterneuburg	2010
50	Saft	Räthay	Klosterneuburg	2010
51	Saft	Phönix	Klosterneuburg	2010

Tabelle 7-4: Verwendetes Pflanzenmaterial (Teil 2). Die Blattproben wurden Gefriergetrocknet und mit der Pulvermühle gemahlen (0,5 µm)

<i>Nr.</i>	<i>Art der Probe</i>	<i>Pflanzenart</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Erntezeitpunkt</i>
52	Saft	Solaris	Rheinhausen	2010
53	Saft	Solaris	Klagshamn	2010
54	Saft	Solaris	Bäck	2010
55	Saft	Phönix	Klagshamn	2010
56	Saft	Phönix	Rheinhausen	2010
57	Saft Classic	Traube	Kaufland	2011
58	Saft Classic	Sauerkirsche	Kaufland	2011
59	Saft naturtrüb	Apfel	Elmenhorster	2011
60	Saft A+B	Apfel		2010
61	Saft	Apfel		2010
62	Saft A+Q	Apfel		2010
63	Saft	Kornelkirsche	Gülzow	2010
64	Saft	Blaubeere	Gülzow	2009
65	Saft Nero	Aroniabeere	Gülzow	2009
66	Saft Samyl	Holunder	Gülzow	2010
67	Saft Haidegg	Holunder	Gülzow	2010
68	Saft	Kamtschatka	Wojtek Polen	2010
69	Saft	Kamtschatka	Zielona Polen	2010
70	Saft	Sanddornmischung	Gülzow	2010
71	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Müller-Thurgau	Lodmannshagen	2010
72	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Klagshamn	29.09.2010
73	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Rathey	15.06.2010
74	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Alnarp Schweden	10.05.2010
75	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Gotland	21.10.2010
76	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Rheinhausen	11.10.2010
77	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Solaris		29.09.2010
78	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Solaris	Alnarp Schweden	10.05.2010
79	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Solaris	Gotland	21.10.2010
80	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Solaris	Bäck Schweden	26.09.2010
81	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Solaris	Rheinhausen	11.10.2010
82	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Alnarp Schweden	10.05.201
83	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Rathey	15.06.2010
84	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Lodmannshagen	2010
85	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Klagshamn	29.09.2010
86	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Rheinhausen	11.10.2010
87	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Kamtschatka	Polen	14.06.2010
88	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Aronia	Polen	14.06.2010
89	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Sirola	10.09.2009
90	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Trofimanskoje	R3/1 2009
91	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Leikora	R6/2 29.09.2009
92	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Askola	31.08.2009
93	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Cibrit Pertsiks	28.08.2009
94	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Herjo	R2/4 21.08.2009
95	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Mabejo R5/3	07.09.2009
96	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Sanddorn	Gülzow Frujama R3/2	25.08.2009

Tabelle 7-5: Verwendetes Pflanzenmaterial (Teil 3). Die Blattproben wurden Gefriergetrocknet und mit der Pulvermühle gemahlen (0,5 µm)

<i>Nr.</i>	<i>Art der Probe</i>	<i>Pflanzenart</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Erntezeitpunkt</i>
97	Saft	Bio-Blaubeeren		06/2011
98	Saft	Bio-Kirsche		06/2011
99	Saft	Bio-Aronia		06/2011
100	Saft naturtrüb vergoren	Apfel	Elmenhorster	2011
101	Saft vergoren	Bio-Aronia		06/2011
102	Saft vergoren	Bio-Kirschen		06/2011
103	Saft vergoren	Trauben	Classic Kaufland	2011
104	Saft vergoren	Bio-Blaubeeren		06/2011
105	Aroma vergoren	Apfel		2011
106	Aroma frisch	Apfel		2011
107	Aroma vergoren	Blaubeere		2011
108	Aroma frisch	Blaubeere		2011
109	Aroma vergoren	Kirsche		2011
110	Aroma frisch	Kirsche		2011
111	Aroma vergoren	Trauben		2011
112	Aroma frisch	Trauben		2011
113	Pulver	Preiselbeere	ZLT	
114	Pulver	Schwarze Johannisbeere	ZLT	
115	Saft	Trauben hell		
116	Saft	Trauben		
117	Saft	Phönix	Klagshamn	9/2011
118	Saft	Solaris	Klagshamn	9/2011
119	Saft	Regent	Klagshamn	9/2011
120	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Solaris	Klagshamn	09.2011
121	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Klagshamn	09.2011
122	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Klagshamn	09.2011
123	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Regent	Rathey	27.09.2011
124	Gefriergetrocknete und gemahlene Blätter	Phönix	Rathey	27.09.2011
125	Saft	Kirsche	Polen	8.6.2011
126	Saft	Blaubeere	Polen	8.6.2011
127	Saft	Aronia	Polen	8.6.2011

Tabelle 7-6: DPPH Test der verschiedenen Proben extrahiert mit Extraktionsmethode 1, 2 oder 3 (Kapitel 4.1.3.4)

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Probennummer</i>	<i>Abs. Probe</i>	<i>mmol TE/g TW</i>
E 1	73	0,513	1,05
	74	0,809	0,48
	83	0,506	1,21
	84	0,781	0,64
	87	0,698	0,80
	88	0,625	0,89
	90	0,375	1,70
E 2	73	0,135	0,86
	74	0,663	0,43
	83	0,132	0,94
	84	0,479	0,55
	87	0,427	0,60
	88	0,14	0,89
	90	0,242	0,79
E 3	73	0,412	0,61
	74	0,641	0,30
	83	0,437	0,65
	84	0,595	0,34
	87	0,545	0,40
	88	0,448	0,58
	90	0,062	1,11

Tabelle 7-7: FRAP Test der verschiedenen Proben extrahiert mit Extraktionsmethode 1, 2 oder 3 (Kapitel 4.1.2.5)

<i>Extraktionsmethode</i>	<i>Probennummer</i>	<i>Abs. Probe</i>	<i>mmol TE/g TW</i>
E 1	73	0.402	0.96
	74	0.173	0.44
	83	0.371	1.01
	84	0.197	0.59
	87	0.281	0.80
	88	0.322	0.83
	90	0.552	1.70
	E 2	73	0.974
74		0.656	0.43
83		1.182	0.81
84		0.741	0.46
87		0.561	0.35
88		1.316	0.87
90		1.394	0.91
E 3		73	0.239
	74	0.137	0.38
	83	0.233	0.68
	84	0.176	0.44
	87	0.165	0.41
	88	0.235	0.63
	90	0.518	1.32

Tabelle 7-8: Q Werte für die Berechnung der Grenzvariationsbreite nach Tukey ($\alpha=0,05$)
 (<http://www.stat.wisc.edu/courses/st571-ane/tables/tableQ.pdf> [15.05.2012])

		$\alpha = 0.05$								
k	df	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	18.0	27.0	32.8	37.1	40.4	43.1	45.4	47.4	49.1
2	2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.73	12.43	13.03	13.54	13.99
3	3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46
4	4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83
5	5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99
6	6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49
7	7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16
8	8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92
9	9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74
10	10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60
11	11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49
12	12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.39
13	13	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32
14	14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25
15	15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20
16	16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15
17	17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11
18	18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07
19	19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04
20	20	2.95	3.58	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01
24	24	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92
30	30	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82
40	40	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73
60	60	2.83	3.40	3.74	3.98	4.16	4.31	4.44	4.55	4.65
120	120	2.80	3.36	3.68	3.92	4.10	4.24	4.36	4.47	4.56
∞		2.77	3.31	3.63	3.86	4.03	4.17	4.29	4.39	4.47

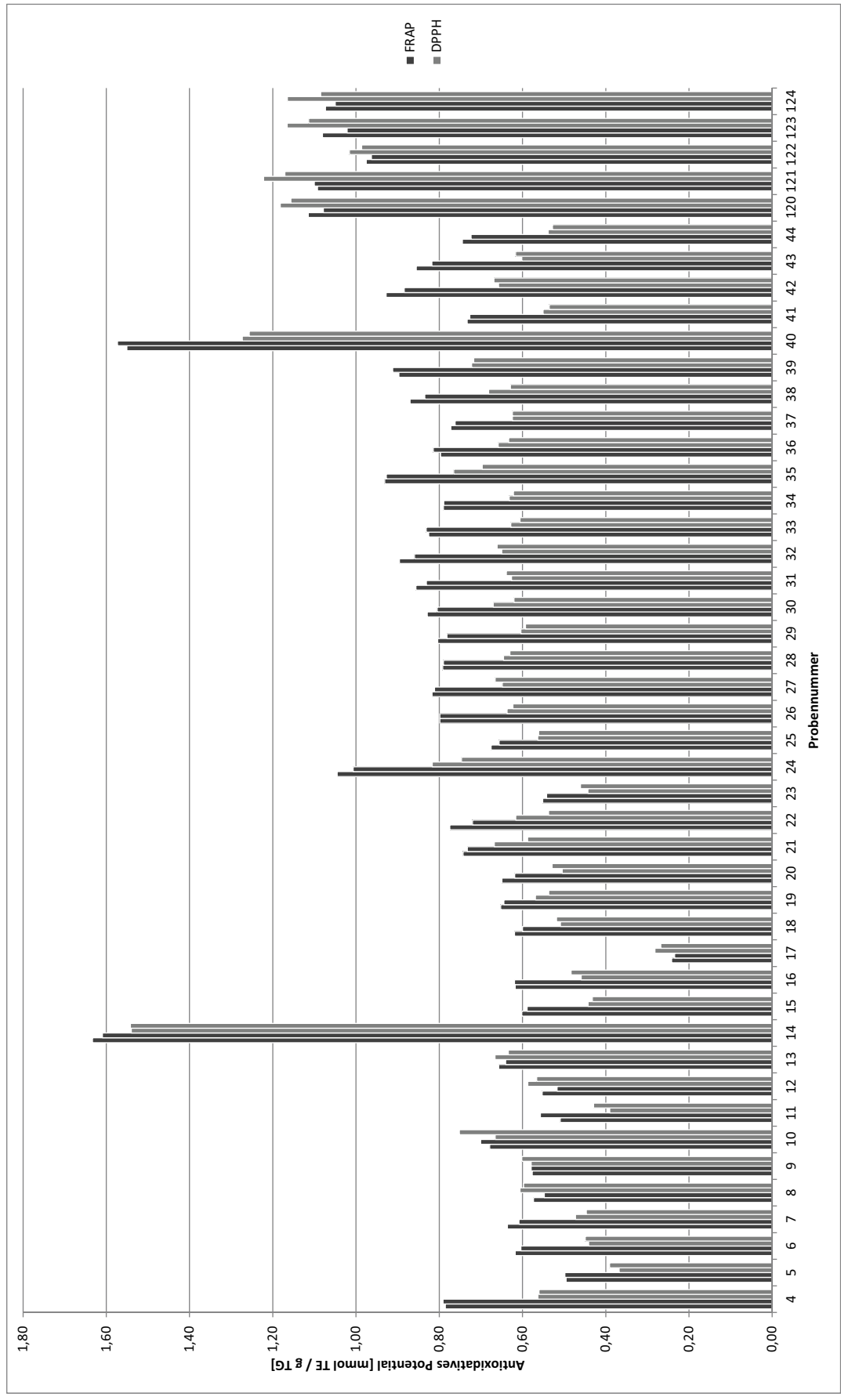


Abbildung 7-1: Auftragung der Ergebnisse des FRAP Tests gegen die Ergebnisse des DPPH Tests (Kapitel 4.1.4)

Tabelle 7-9: Antioxidatives Potential gemessen mit dem FRAP Test für Blattproben (Kapitel 4.2)

Proben- nummer	mmol TE/ g TG	Standard- abweichung [%]	Proben- nummer	mmol TE/ g TG	Standard- abweichung [%]
4	0,76	0,89	71	0,86	1,10
5	0,44	2,96	72	1,16	2,21
6	0,60	1,87	73	1,24	2,24
7	0,61	3,50	74	0,56	16,82
8	0,55	2,78	75	0,72	1,95
9	0,55	0,46	76	1,15	1,92
10	0,67	4,19	77	1,33	0,72
11	0,54	5,50	78	0,61	2,09
12	0,55	1,36	79	0,72	1,00
13	0,66	2,24	80	0,89	1,68
14	1,60	1,82	81	1,40	1,28
15	0,59	2,16	82	0,96	1,30
16	0,61	1,04	83	1,34	0,84
17	0,23	2,94	84	0,67	4,29
18	0,60	3,16	85	1,26	1,90
19	0,67	1,57	86	1,32	1,42
20	0,62	4,51	87	0,94	0,75
21	0,73	3,17	88	1,10	1,31
22	0,68	3,37	89	1,95	1,87
23	0,49	0,75	90	2,15	2,44
24	0,97	2,44	91	0,69	1,05
25	1,61	2,77	92	2,12	1,25
26	1,83	3,93	93	2,38	0,93
27	1,95	4,17	94	2,19	0,80
28	0,80	2,45	95	1,41	1,63
29	0,81	1,54	96	2,30	0,97
30	0,82	2,07	120	1,10	0,75
31	0,83	1,46	121	1,11	0,81
32	0,88	1,05	122	1,02	4,46
33	0,81	1,08	123	1,07	1,04
34	0,81	3,81	124	1,07	0,82
35	0,95	3,14			
36	0,81	2,12			
37	0,80	1,95			
38	0,87	3,71			
39	0,90	2,91			
40	0,65	2,41			
41	0,75	2,17			
42	0,94	0,50			
43	0,86	1,41			
44	0,75	0,54			

Tabelle 7-10: Antioxidatives Potential gemessen mit dem FRAP Test für Saftproben (Kapitel 4.2)

Proben- nummer	mmol TE/ L	Standard- abweichung [%]	Proben- nummer	mmol TE/ L	Standard- abweichung [%]
45	6,15	0,96	97	40,62	0,59
46	4,72	1,25	98	9,74	3,10
47	5,33	2,73	99	44,13	1,33
48	2,17	7,49	100	4,77	3,20
49	6,56	2,03	101	33,47	2,97
50	5,32	1,60	102	10,33	16,86
51	1,49	20,96	103	7,47	0,60
52	1,88	0,90	104	29,11	0,81
53	5,97	2,52	105	0,01	141,45
54	2,62	6,18	106	-0,01	-6,06
55	2,52	6,74	107	0,09	4,33
56	1,43	10,20	108	-0,01	-4,88
57	8,23	1,20	109	0,34	0,81
58	9,41	2,45	110	0,17	0,57
59	4,34	6,48	111	0,09	10,58
60	7,44	1,81	112	-0,01	-5,71
61	6,68	1,27	115	4,48	5,90
62	6,03	2,16	116	8,99	2,02
63	19,00	1,31	117	2,28	5,39
64	12,61	1,81	118	8,62	2,76
65	37,00	1,79	119	5,12	16,44
66	43,99	0,56	125	5,47	2,16
67	54,29	1,05	126	11,2	1,70
68	21,55	1,38	127	74,0	0,63
69	24,98	0,76			
70	18,15	1,22			

Tabelle 7-11: Gesamtphenolgehalt für Blattproben berechnet als Chlorogensäureäquivalente (Kapitel 4.2.5)

Proben- nummer	mg/ 100g TG	Standard- abweichung [%]	Proben- nummer	mg/ 100g TG	Standard- abweichung [%]
4	18,08	2,36	71	15,13	1,17
5	13,63	1,82	72	18,50	0,38
6	8,51	0,27	73	20,33	1,13
7	10,12	2,34	74	8,37	2,16
8	6,65	2,57	75	8,42	1,23
9	11,10	3,17	76	18,88	1,03
10	12,27	1,94	77	23,36	0,93
11	12,58	1,81	78	11,37	1,03
12	9,60	2,14	79	12,85	0,84
13	12,24	1,22	80	15,84	0,98
14	19,91	2,23	81	24,92	1,61
15	8,08	1,68	82	16,55	2,45
16	9,29	4,45	83	19,50	0,46
17	4,28	3,12	84	10,71	0,22
18	13,62	2,69	85	18,52	0,80
19	9,91	3,98	86	19,84	0,72
20	14,51	2,63	87	16,88	0,31
21	15,11	1,99	88	20,34	0,15
22	13,35	0,72	89	20,14	0,52
23	10,48	1,27	90	21,15	0,11
24	13,93	0,88	91	6,95	0,75
25	12,51	0,21	92	22,42	0,26
26	12,10	0,22	93	24,46	0,37
27	14,99	1,41	94	22,71	0,31
28	9,87	1,00	120	17,28	0,12
29	8,94	0,24	121	17,02	0,09
30	12,78	1,46	122	14,68	0,34
31	15,96	2,15	123	16,38	0,51
32	10,24	1,17	124	15,22	0,31
33	18,14	0,39			
34	11,90	1,80			
35	10,49	3,63			
36	9,59	1,58			
37	12,15	1,51			
38	14,47	0,07			
39	15,79	0,06			
40	8,26	0,87			
41	7,97	0,37			
42	13,11	2,08			
43	12,26	1,35			
44	11,34	0,75			

Tabelle 7-12: Gesamtphenolgehalt für Saftproben berechnet als Chlorogensäureäquivalente (Kapitel 4.2.5)

Proben- nummer	mg/ ml	Standard- abweichung [%]	Proben- nummer	mg/ ml	Standard- abweichung [%]
45	1,16	0,42	95	0,39	1,77
46	0,94	3,51	96	0,76	1,04
47	1,08	5,04	97	6,40	1,42
48	0,30	2,30	98	1,81	3,14
49	1,26	7,19	99	1,60	3,87
50	0,53	2,69	100	0,91	2,58
51	0,30	10,32	101	1,35	1,04
52	0,25	4,97	102	1,61	0,59
53	1,19	5,16	103	1,25	2,17
54	0,55	9,27	104	0,58	2,63
55	0,42	1,89	105	0,01	4,68
56	0,26	1,24	106	0,00	200,27
57	1,45	1,05	107	0,01	5,58
58	1,86	0,69	108	0,00	-28,96
59	0,83	2,22	109	0,06	0,38
60	1,62	1,30	110	0,03	0,46
61	1,60	1,30	111	0,02	5,67
62	1,37	2,43	112	0,00	-48,75
63	2,32	1,59	115	0,80	4,15
64	2,51	1,03	116	1,53	0,17
65	5,80	0,35	117	0,38	7,64
66	7,28	1,42	118	0,35	1,03
67	8,62	1,18	119	0,88	16,02
68	3,37	0,77	125	1,29	0,77
69	3,28	1,09	126	2,36	0,30
70	2,53	0,30	127	1,06	0,23

Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000)*V)/m*VF$	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnung- faktor (VF)
$y = 0,809x + 0,022$	4	0,290	0,33	0,76	0,10	46,76	5,00
		0,289	0,33	0,76	0,10	46,76	5,00
		0,285	0,33	0,75	0,10	46,76	5,00
		0,290	0,33	0,76	0,10	46,76	5,00
	5	0,171	0,18	0,45	0,09	44,79	5,00
		0,161	0,17	0,42	0,09	44,79	5,00
		0,168	0,18	0,45	0,09	44,79	5,00
		0,165	0,18	0,44	0,09	44,79	5,00
	6	0,375	0,44	0,61	0,17	47,33	5,00
		0,374	0,44	0,61	0,17	47,33	5,00
		0,363	0,42	0,59	0,17	47,33	5,00
		0,378	0,44	0,61	0,17	47,33	5,00
	7	0,360	0,42	0,63	0,15	44,06	5,00
		0,352	0,41	0,61	0,15	44,06	5,00
		0,342	0,40	0,60	0,15	44,06	5,00
		0,334	0,39	0,58	0,15	44,06	5,00
8	0,333	0,38	0,55	0,17	49,35	5,00	
	0,346	0,40	0,57	0,17	49,35	5,00	
	0,330	0,38	0,55	0,17	49,35	5,00	
	0,326	0,38	0,54	0,17	49,35	5,00	
9	0,229	0,26	0,55	0,11	46,65	5,00	
	0,230	0,26	0,55	0,11	46,65	5,00	
	0,229	0,26	0,55	0,11	46,65	5,00	
	0,231	0,26	0,56	0,11	46,65	5,00	
$y = 0,833x + 0,004$	10	0,249	0,29	0,66	0,11	49,17	5,00
		0,246	0,29	0,65	0,11	49,17	5,00
		0,247	0,29	0,66	0,11	49,17	5,00
		0,268	0,32	0,71	0,11	49,17	5,00
	11	0,210	0,25	0,52	0,11	46,78	5,00
		0,210	0,25	0,52	0,11	46,78	5,00
		0,232	0,27	0,57	0,11	46,78	5,00
		0,229	0,27	0,56	0,11	46,78	5,00
	12	0,255	0,30	0,56	0,13	49,44	5,00
		0,247	0,29	0,54	0,13	49,44	5,00
		0,252	0,30	0,55	0,13	49,44	5,00
		0,250	0,30	0,55	0,13	49,44	5,00
	13	0,246	0,29	0,66	0,10	47,49	5,00
		0,246	0,29	0,66	0,10	47,49	5,00
		0,235	0,28	0,63	0,10	47,49	5,00
		0,245	0,29	0,66	0,10	47,49	5,00

Fortsetzung Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000) \cdot V/m) \cdot VF$	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnung- sfaktor (VF)
$y = 0,833x + 0,004$	14	0,670	0,80	1,60	0,12	48,07	5,00
		0,665	0,79	1,58	0,12	48,07	5,00
		0,662	0,79	1,58	0,12	48,07	5,00
		0,689	0,82	1,64	0,12	48,07	5,00
$y = 0,859x + 0,003$	15	0,357	0,41	0,61	0,17	49,06	5,00
		0,349	0,40	0,59	0,17	49,06	5,00
		0,339	0,39	0,58	0,17	49,06	5,00
		0,351	0,41	0,60	0,17	49,06	5,00
	16	0,324	0,37	0,60	0,15	47,80	5,00
		0,327	0,38	0,61	0,15	47,80	5,00
		0,329	0,38	0,61	0,15	47,80	5,00
		0,332	0,38	0,61	0,15	47,80	5,00
	17	0,104	0,12	0,24	0,12	48,48	5,00
		0,101	0,11	0,23	0,12	48,48	5,00
		0,097	0,11	0,22	0,12	48,48	5,00
		0,101	0,11	0,23	0,12	48,48	5,00
	18	0,202	0,23	0,62	0,09	49,68	5,00
		0,198	0,23	0,61	0,09	49,68	5,00
		0,188	0,22	0,58	0,09	49,68	5,00
		0,193	0,22	0,59	0,09	49,68	5,00
19	0,349	0,40	0,65	0,15	48,49	5,00	
	0,351	0,41	0,66	0,15	48,49	5,00	
	0,361	0,42	0,68	0,15	48,49	5,00	
	0,357	0,41	0,67	0,15	48,49	5,00	
20	0,238	0,27	0,64	0,10	48,43	5,00	
	0,237	0,27	0,64	0,10	48,43	5,00	
	0,217	0,25	0,58	0,10	48,43	5,00	
	0,238	0,27	0,64	0,10	48,43	5,00	
21	0,300	0,35	0,75	0,11	48,81	5,00	
	0,293	0,34	0,73	0,11	48,81	5,00	
	0,280	0,32	0,70	0,11	48,81	5,00	
	0,299	0,34	0,74	0,11	48,81	5,00	
$y = 0,888x - 0,019$	22	0,358	0,38	0,70	0,13	48,21	5,00
		0,352	0,38	0,69	0,13	48,21	5,00
		0,334	0,35	0,65	0,13	48,21	5,00
		0,357	0,38	0,70	0,13	48,21	5,00
	23	0,248	0,26	0,50	0,12	47,35	5,00
		0,249	0,26	0,50	0,12	47,35	5,00
		0,245	0,25	0,49	0,12	47,35	5,00
		0,247	0,26	0,49	0,12	47,35	5,00

Fortsetzung Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000)*V)/m)*VF$	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnung- faktor (VF)
$y = 0,888x - 0,019$	24	0,538	0,58	0,98	0,14	47,85	5,00
		0,543	0,59	0,99	0,14	47,85	5,00
		0,515	0,56	0,94	0,14	47,85	5,00
		0,538	0,58	0,98	0,14	47,85	5,00
	25	0,741	0,81	1,55	0,12	45,73	5,00
		0,784	0,86	1,64	0,12	45,73	5,00
		0,786	0,86	1,65	0,12	45,73	5,00
		0,767	0,84	1,60	0,12	45,73	5,00
	26	0,963	1,06	1,84	0,13	45,46	5,00
		0,926	1,02	1,77	0,13	45,46	5,00
		0,937	1,03	1,79	0,13	45,46	5,00
		1,009	1,11	1,93	0,13	45,46	5,00
	27	0,700	0,77	1,88	0,10	49,16	5,00
		0,751	0,82	2,02	0,10	49,16	5,00
		0,701	0,77	1,88	0,10	49,16	5,00
		0,752	0,83	2,03	0,10	49,16	5,00
$y = 0,841x - 0,002$	28	0,987	1,17	0,77	0,15	48,81	2,00
		1,021	1,21	0,80	0,15	48,81	2,00
		1,020	1,21	0,80	0,15	48,81	2,00
		1,048	1,24	0,82	0,15	48,81	2,00
	29	0,532	0,63	0,82	0,18	47,64	5,00
		0,517	0,61	0,80	0,18	47,64	5,00
		0,514	0,61	0,79	0,18	47,64	5,00
		0,524	0,62	0,81	0,18	47,64	5,00
	30	0,930	1,10	0,82	0,13	48,69	2,00
		0,931	1,10	0,82	0,13	48,69	2,00
		0,905	1,07	0,80	0,13	48,69	2,00
		0,952	1,13	0,84	0,13	48,69	2,00
	31	0,836	0,99	0,82	0,11	46,71	2,00
		0,845	1,00	0,83	0,11	46,71	2,00
		0,860	1,02	0,84	0,11	46,71	2,00
		0,862	1,02	0,85	0,11	46,71	2,00
	32	0,514	0,61	0,88	0,17	48,90	5,00
		0,513	0,61	0,88	0,17	48,90	5,00
		0,508	0,60	0,87	0,17	48,90	5,00
		0,521	0,62	0,89	0,17	48,90	5,00
33	0,653	0,77	0,80	0,09	48,74	2,00	
	0,657	0,78	0,81	0,09	48,74	2,00	
	0,667	0,79	0,82	0,09	48,74	2,00	
	0,667	0,79	0,82	0,09	48,74	2,00	

Fortsetzung Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000)*V/m)*VF$	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnungs- faktor (VF)
$y = 0,836x - 0,006$	34	0,710	0,84	0,79	0,12	54,72	2,00
		0,703	0,83	0,78	0,12	54,72	2,00
		0,752	0,89	0,83	0,12	54,72	2,00
		0,756	0,90	0,84	0,12	54,72	2,00
	35	0,546	0,65	0,96	0,17	49,23	5,00
		0,556	0,66	0,98	0,17	49,23	5,00
		0,518	0,61	0,91	0,17	49,23	5,00
		0,550	0,65	0,96	0,17	49,23	5,00
	36	0,478	0,56	0,82	0,17	48,69	5,00
		0,475	0,56	0,82	0,17	48,69	5,00
		0,456	0,54	0,79	0,17	48,69	5,00
		0,467	0,55	0,80	0,17	48,69	5,00
	37	0,875	1,04	0,78	0,13	49,70	2,00
		0,878	1,04	0,79	0,13	49,70	2,00
		0,912	1,08	0,82	0,13	49,70	2,00
		0,896	1,06	0,80	0,13	49,70	2,00
38	0,854	1,01	0,84	0,12	48,84	2,00	
	0,934	1,11	0,92	0,12	48,84	2,00	
	0,890	1,06	0,87	0,12	48,84	2,00	
	0,887	1,05	0,87	0,12	48,84	2,00	
39	0,797	0,95	0,89	0,11	52,39	2,00	
	0,778	0,92	0,87	0,11	52,39	2,00	
	0,795	0,94	0,89	0,11	52,39	2,00	
	0,833	0,99	0,94	0,11	52,39	2,00	
$y = 0,826x + 0,010$	40	0,785	0,94	0,65	0,15	50,91	2,00
		0,763	0,91	0,63	0,15	50,91	2,00
		0,808	0,97	0,67	0,15	50,91	2,00
		0,793	0,95	0,66	0,15	50,91	2,00
	41	0,452	0,54	0,74	0,18	49,34	5,00
		0,454	0,54	0,74	0,18	49,34	5,00
		0,470	0,56	0,77	0,18	49,34	5,00
		0,448	0,53	0,73	0,18	49,34	5,00
	42	0,458	0,54	0,95	0,14	49,41	5,00
		0,453	0,54	0,94	0,14	49,41	5,00
		0,457	0,54	0,94	0,14	49,41	5,00
		0,455	0,54	0,94	0,14	49,41	5,00
	43	0,424	0,50	0,88	0,14	49,54	5,00
		0,415	0,49	0,86	0,14	49,54	5,00
		0,411	0,49	0,85	0,14	49,54	5,00
		0,413	0,49	0,86	0,14	49,54	5,00

Fortsetzung Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000)*V)/m)*VF$	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnungs- faktor (VF)
$y = 0,826x + 0,010$	44	0,330	0,39	0,75	0,13	49,21	5,00
		0,333	0,39	0,76	0,13	49,21	5,00
		0,330	0,39	0,75	0,13	49,21	5,00
		0,329	0,39	0,75	0,13	49,21	5,00
$y = 0,843x - 0,000$	71	0,288	0,34	0,86	0,10	49,51	5,00
		0,293	0,35	0,87	0,10	49,51	5,00
		0,288	0,34	0,86	0,10	49,51	5,00
		0,294	0,35	0,87	0,10	49,51	5,00
	72	0,462	0,55	1,13	0,13	52,92	5,00
		0,470	0,56	1,15	0,13	52,92	5,00
		0,479	0,57	1,17	0,13	52,92	5,00
		0,486	0,58	1,19	0,13	52,92	5,00
	73	0,466	0,55	1,22	0,11	50,00	5,00
		0,472	0,56	1,23	0,11	50,00	5,00
		0,477	0,57	1,24	0,11	50,00	5,00
		0,491	0,58	1,28	0,11	50,00	5,00
	74	0,204	0,24	0,50	0,12	49,28	5,00
		0,285	0,34	0,70	0,12	49,28	5,00
		0,212	0,25	0,52	0,12	49,28	5,00
		0,210	0,25	0,52	0,12	49,28	5,00
75	0,430	0,51	0,72	0,18	49,54	5,00	
	0,417	0,49	0,70	0,18	49,54	5,00	
	0,426	0,51	0,72	0,18	49,54	5,00	
	0,437	0,52	0,73	0,18	49,54	5,00	
76	0,536	0,64	1,13	0,15	51,55	5,00	
	0,539	0,64	1,13	0,15	51,55	5,00	
	0,558	0,66	1,17	0,15	51,55	5,00	
	0,552	0,65	1,16	0,15	51,55	5,00	
$y = 0,830x + 0,003$	77	0,528	0,63	1,33	0,12	51,19	5,00
		0,525	0,63	1,32	0,12	51,19	5,00
		0,528	0,63	1,33	0,12	51,19	5,00
		0,534	0,64	1,34	0,12	51,19	5,00
	78	0,324	0,39	0,60	0,16	49,60	5,00
		0,336	0,40	0,62	0,16	49,60	5,00
		0,321	0,38	0,59	0,16	49,60	5,00
		0,331	0,40	0,61	0,16	49,60	5,00
	79	0,335	0,40	0,72	0,14	50,80	5,00
		0,339	0,40	0,73	0,14	50,80	5,00
		0,331	0,40	0,71	0,14	50,80	5,00
		0,334	0,40	0,72	0,14	50,80	5,00

Fortsetzung Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000) \cdot V/m) \cdot VF$	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnungs- faktor (VF)	
$y = 0,830x + 0,003$	80	0,305	0,36	0,91	0,10	49,92	5,00	
		0,300	0,36	0,89	0,10	49,92	5,00	
		0,298	0,36	0,88	0,10	49,92	5,00	
		0,293	0,35	0,87	0,10	49,92	5,00	
	81	0,564	0,68	1,42	0,12	49,56	5,00	
		0,563	0,67	1,42	0,12	49,56	5,00	
		0,549	0,66	1,38	0,12	49,56	5,00	
		0,555	0,67	1,40	0,12	49,56	5,00	
	82	0,414	0,50	0,96	0,13	49,64	5,00	
		0,412	0,49	0,95	0,13	49,64	5,00	
		0,419	0,50	0,97	0,13	49,64	5,00	
		0,424	0,51	0,98	0,13	49,64	5,00	
	$y = 0,773x + 0,006$	83	0,404	0,51	1,34	0,10	49,70	5,00
			0,404	0,51	1,34	0,10	49,70	5,00
			0,405	0,52	1,34	0,10	49,70	5,00
			0,411	0,52	1,36	0,10	49,70	5,00
84		0,241	0,30	0,68	0,12	52,15	5,00	
		0,238	0,30	0,67	0,12	52,15	5,00	
		0,223	0,28	0,63	0,12	52,15	5,00	
		0,246	0,31	0,69	0,12	52,15	5,00	
85		0,413	0,53	1,24	0,11	50,86	5,00	
		0,414	0,53	1,24	0,11	50,86	5,00	
		0,417	0,53	1,25	0,11	50,86	5,00	
		0,430	0,55	1,29	0,11	50,86	5,00	
86		0,605	0,77	1,31	0,15	49,36	5,00	
		0,595	0,76	1,29	0,15	49,36	5,00	
		0,615	0,79	1,34	0,15	49,36	5,00	
		0,610	0,78	1,33	0,15	49,36	5,00	
87	0,343	0,44	0,95	0,11	49,58	5,00		
	0,339	0,43	0,94	0,11	49,58	5,00		
	0,337	0,43	0,93	0,11	49,58	5,00		
	0,340	0,43	0,94	0,11	49,58	5,00		
88	0,476	0,61	1,12	0,14	50,19	5,00		
	0,473	0,60	1,11	0,14	50,19	5,00		
	0,472	0,60	1,11	0,14	50,19	5,00		
	0,462	0,59	1,08	0,14	50,19	5,00		
$y = 0,779x + 0,001$	89	0,681	0,87	2,01	0,11	50,73	5,00	
		0,664	0,85	1,96	0,11	50,73	5,00	
		0,657	0,84	1,93	0,11	50,73	5,00	
		0,653	0,84	1,92	0,11	50,73	5,00	

Fortsetzung Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000)*V)/m$ *VF	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnungs- faktor (VF)
$y = 0,779x + 0,001$	90	0,697	0,89	2,12	0,10	48,87	5,00
		0,685	0,88	2,09	0,10	48,87	5,00
		0,718	0,92	2,19	0,10	48,87	5,00
		0,721	0,92	2,19	0,10	48,87	5,00
	91	0,413	0,53	0,70	0,19	49,54	5,00
		0,404	0,52	0,69	0,19	49,54	5,00
		0,404	0,52	0,69	0,19	49,54	5,00
		0,408	0,52	0,69	0,19	49,54	5,00
	92	0,658	0,84	2,10	0,10	50,42	5,00
		0,662	0,85	2,11	0,10	50,42	5,00
		0,677	0,87	2,16	0,10	50,42	5,00
		0,669	0,86	2,13	0,10	50,42	5,00
	93	0,834	1,07	2,39	0,11	49,72	5,00
		0,823	1,06	2,36	0,11	49,72	5,00
		0,826	1,06	2,37	0,11	49,72	5,00
		0,840	1,08	2,41	0,11	49,72	5,00
94	0,904	1,16	2,21	0,13	49,48	5,00	
	0,902	1,16	2,20	0,13	49,48	5,00	
	0,896	1,15	2,19	0,13	49,48	5,00	
	0,888	1,14	2,17	0,13	49,48	5,00	
95	0,598	0,74	1,41	0,13	48,70	5,00	
	0,592	0,73	1,39	0,13	48,70	5,00	
	0,614	0,76	1,45	0,13	48,70	5,00	
	0,595	0,73	1,40	0,13	48,70	5,00	
96	1,135	1,40	2,32	0,15	50,02	5,00	
	1,125	1,38	2,30	0,15	50,02	5,00	
	1,109	1,36	2,27	0,15	50,02	5,00	
	1,127	1,39	2,30	0,15	50,02	5,00	
$y = 0,826x + 0,010$	120	0,391	0,46	1,10	0,10	49,41	5,00
		0,386	0,46	1,08	0,10	49,41	5,00
		0,392	0,46	1,10	0,10	49,41	5,00
		0,392	0,46	1,10	0,10	49,41	5,00
	121	0,411	0,49	1,10	0,11	48,17	5,00
		0,419	0,50	1,12	0,11	48,17	5,00
		0,416	0,49	1,11	0,11	48,17	5,00
		0,416	0,49	1,11	0,11	48,17	5,00
	122	0,406	0,48	1,01	0,12	48,57	5,00
		0,395	0,47	0,99	0,12	48,57	5,00
		0,395	0,47	0,99	0,12	48,57	5,00
		0,433	0,51	1,08	0,12	48,57	5,00

Fortsetzung Tabelle 7-13: Berechnung des antioxidativen Potentials der Blattproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben- nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L Extrakt $x=(y-b)/m$	mmol TE/g TG $z=((x/1000)*V)/m)*VF$	Proben- gewicht (m) [g]	Proben- volumen (V) [ml]	Verdünnungs- faktor (VF)
$y = 0,826x + 0,010$	123	0,378	0,45	1,07	0,10	49,47	5,00
		0,373	0,44	1,06	0,10	49,47	5,00
		0,380	0,45	1,08	0,10	49,47	5,00
		0,372	0,44	1,05	0,10	49,47	5,00
	124	0,362	0,43	1,06	0,10	48,99	5,00
		0,368	0,44	1,08	0,10	48,99	5,00
		0,363	0,43	1,06	0,10	48,99	5,00
		0,367	0,43	1,07	0,10	48,99	5,00

Tabelle 7-14: Berechnung des antioxidativen Potentials der Saftproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben-nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L verd. Probe $x=(y-b)/m$	mmol TE/ L $z=x*VF$	Verdünnungsfaktor (VF)
$y = 0,844x - 0,003$	45	0,519	0,61	6,11	10,00
		0,529	0,62	6,23	10,00
		0,523	0,62	6,16	10,00
		0,518	0,61	6,10	10,00
	46	0,407	0,48	4,79	10,00
		0,405	0,48	4,76	10,00
		0,397	0,47	4,67	10,00
		0,398	0,47	4,68	10,00
	47	0,463	0,55	5,45	10,00
		0,464	0,55	5,46	10,00
		0,447	0,53	5,26	10,00
		0,439	0,52	5,17	10,00
	48	0,198	0,23	2,31	10,00
		0,198	0,23	2,31	10,00
		0,172	0,20	2,00	10,00
		0,177	0,21	2,06	10,00
	49	0,565	0,67	6,66	10,00
		0,568	0,67	6,69	10,00
		0,550	0,65	6,48	10,00
		0,545	0,64	6,42	10,00
50	0,451	0,53	5,31	10,00	
	0,445	0,52	5,24	10,00	
	0,450	0,53	5,30	10,00	
	0,462	0,54	5,44	10,00	
$y = 0,834x + 0,006$	51	0,295	0,35	1,73	5,00
		0,305	0,36	1,79	5,00
		0,207	0,24	1,21	5,00
		0,213	0,25	1,24	5,00

Fortsetzung Tabelle 7-14: Berechnung des antioxidativen Potentials der Saftproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben-nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L verd. Probe $x=(y-b)/m$	mmol TE/ L $z=x*VF$	Verdünnungsfaktor (VF)
$y = 0,834x + 0,006$	52	0,323	0,38	1,90	5,00
		0,317	0,37	1,86	5,00
		0,319	0,38	1,88	5,00
		0,317	0,37	1,86	5,00
	53	1,030	1,23	6,14	5,00
		1,015	1,21	6,05	5,00
		0,986	1,18	5,88	5,00
		0,976	1,16	5,82	5,00
	54	0,457	0,54	2,70	5,00
		0,468	0,55	2,77	5,00
		0,406	0,48	2,40	5,00
		0,442	0,52	2,61	5,00
	55	0,394	0,47	2,33	5,00
		0,424	0,50	2,51	5,00
		0,423	0,50	2,50	5,00
		0,463	0,55	2,74	5,00
56	0,213	0,25	1,24	5,00	
	0,249	0,29	1,46	5,00	
	0,243	0,28	1,42	5,00	
	0,272	0,32	1,59	5,00	
$y = 0,820x + 0,005$	57	0,674	0,82	8,16	10,00
		0,684	0,83	8,28	10,00
		0,672	0,81	8,13	10,00
		0,689	0,83	8,34	10,00
	58	0,772	0,94	9,35	10,00
		0,752	0,91	9,11	10,00
		0,790	0,96	9,57	10,00
		0,793	0,96	9,61	10,00
	59	0,764	0,93	4,63	5,00
		0,748	0,91	4,53	5,00
		0,666	0,81	4,03	5,00
		0,692	0,84	4,19	5,00
$y = 0,821x + 0,000$	60	0,602	0,73	7,33	10,00
		0,600	0,73	7,31	10,00
		0,619	0,75	7,54	10,00
		0,621	0,76	7,56	10,00
	61	1,101	1,34	6,68	5,00
		1,094	1,33	6,64	5,00
		1,088	1,32	6,60	5,00
		1,120	1,36	6,80	5,00
	62	1,008	1,22	6,12	5,00
		1,014	1,23	6,15	5,00
		0,968	1,17	5,87	5,00
		0,984	1,19	5,97	5,00

Fortsetzung Tabelle 7-14: Berechnung des antioxidativen Potentials der Saftproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben-nummer	Abs. Probe y	mmol TE/L verd. Probe $x=(y-b)/m$	mmol TE/L $z=x \cdot VF$	Verdünnungsfaktor (VF)
$y = 0,821x + 0,000$	63	0,792	0,96	19,29	20,00
		0,767	0,93	18,68	20,00
		0,780	0,95	19,00	20,00
		0,780	0,95	19,00	20,00
$y = 0,830x + 0,008$	64	1,052	1,26	12,58	10,00
		1,062	1,27	12,70	10,00
		1,030	1,23	12,31	10,00
		1,075	1,29	12,86	10,00
$y = 0,821x + 0,000$	65	0,999	1,22	36,50	30,00
		0,995	1,21	36,36	30,00
		1,031	1,26	37,67	30,00
		1,025	1,25	37,45	30,00
$y = 0,821x + 0,000$	66	1,209	1,47	44,18	30,00
		1,210	1,47	44,21	30,00
		1,199	1,46	43,81	30,00
		1,197	1,46	43,74	30,00
$y = 0,821x + 0,000$	67	1,477	1,80	53,97	30,00
		1,473	1,79	53,82	30,00
		1,508	1,84	55,10	30,00
		1,485	1,81	54,26	30,00
$y = 0,821x + 0,000$	68	0,894	1,09	21,78	20,00
		0,875	1,07	21,32	20,00
		0,873	1,06	21,27	20,00
		0,896	1,09	21,83	20,00
$y = 0,837x - 0,006$	69	1,043	1,24	24,78	20,00
		1,046	1,24	24,85	20,00
		1,057	1,26	25,11	20,00
		1,059	1,26	25,16	20,00
	70	0,779	0,92	18,47	20,00
		0,760	0,90	18,02	20,00
		0,764	0,91	18,11	20,00
		0,759	0,90	17,99	20,00
97	1,138	1,35	40,57	30,00	
	1,149	1,37	40,97	30,00	
	1,135	1,35	40,47	30,00	
	1,135	1,35	40,47	30,00	
$y = 0,833x + 0,003$	98	0,840	1,00	10,05	10,00
		0,832	1,00	9,95	10,00
		0,796	0,95	9,52	10,00
		0,790	0,94	9,45	10,00
$y = 0,837x - 0,006$	99	1,252	1,49	44,66	30,00
		1,216	1,45	43,37	30,00
		1,248	1,48	44,52	30,00
		1,233	1,47	43,98	30,00

Fortsetzung Tabelle 7-14: Berechnung des antioxidativen Potentials der Saftproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben-nummer	Abs. Probe y	mmol TE/ L verd. Probe $x=(y-b)/m$	mmol TE/ L $z=x*VF$	Verdünnungsfaktor (VF)
$y = 0,846x + 0,000$	100	0,391	0,46	4,62	10,00
		0,394	0,47	4,66	10,00
		0,412	0,49	4,87	10,00
		0,417	0,49	4,93	10,00
$y = 0,815x - 0,003$	101	0,653	0,80	34,41	100,00
		0,656	0,81	34,26	100,00
		0,663	0,82	32,65	100,00
		0,671	0,83	32,59	100,00
$y = 0,839x + 0,006$	102	1,000	1,18	11,85	10,00
		0,998	1,18	11,82	10,00
		0,747	0,88	8,83	10,00
		0,745	0,88	8,81	10,00
	103	0,630	0,74	7,44	10,00
		0,629	0,74	7,43	10,00
		0,636	0,75	7,51	10,00
		0,636	0,75	7,51	10,00
$y = 0,815x - 0,003$	104	0,336	0,42	29,46	100,00
		0,336	0,42	28,99	100,00
		0,335	0,41	28,97	100,00
		0,331	0,41	29,02	100,00
$y = 0,839x + 0,006$	105	0,006	0,00	0,00	5,00
		0,005	0,00	-0,01	5,00
		0,030	0,03	0,03	1,00
		0,036	0,04	0,04	1,00
	106	-0,003	-0,01	-0,01	1,00
		-0,002	-0,01	-0,01	1,00
		-0,002	-0,01	-0,01	1,00
		-0,002	-0,01	-0,01	1,00
$y = 0,846x + 0,005$	107	0,076	0,08	0,08	1,00
		0,079	0,09	0,09	1,00
		0,075	0,08	0,08	1,00
		0,082	0,09	0,09	1,00
	108	-0,005	-0,01	-0,01	1,00
		-0,005	-0,01	-0,01	1,00
		-0,005	-0,01	-0,01	1,00
		-0,006	-0,01	-0,01	1,00
	109	0,289	0,34	0,34	1,00
		0,289	0,34	0,34	1,00
		0,293	0,34	0,34	1,00
		0,293	0,34	0,34	1,00
110	0,149	0,17	0,17	1,00	
	0,148	0,17	0,17	1,00	
	0,149	0,17	0,17	1,00	
	0,150	0,17	0,17	1,00	

Fortsetzung Tabelle 7-14: Berechnung des antioxidativen Potentials der Saftproben

Formel Kalibriergerade $y=mx+b$	Proben-nummer	Abs. Probe y	mmol TE/L verd. Probe $x=(y-b)/m$	mmol TE/L $z=x \cdot VF$	Verdünnungsfaktor (VF)
$y = 0,846x + 0,005$	111	0,072	0,08	0,08	1,00
		0,083	0,09	0,09	1,00
		0,069	0,08	0,08	1,00
		0,084	0,09	0,09	1,00
	112	-0,003	-0,01	-0,01	1,00
		-0,004	-0,01	-0,01	1,00
		-0,004	-0,01	-0,01	1,00
		-0,004	-0,01	-0,01	1,00
$y = 0,833x + 0,005$	115	0,723	0,86	4,32	5,00
		0,704	0,84	4,20	5,00
		0,782	0,93	4,67	5,00
		0,793	0,95	4,74	5,00
$y = 0,833x + 0,005$	116	0,767	0,91	9,15	10,00
		0,764	0,91	9,11	10,00
		0,734	0,88	8,75	10,00
		0,750	0,89	8,94	10,00
$y = 0,846x + 0,000$	117	0,356	0,42	2,10	5,00
		0,389	0,46	2,30	5,00
		0,396	0,47	2,34	5,00
		0,403	0,48	2,38	5,00
	118	1,498	1,77	8,85	5,00
		1,486	1,76	8,78	5,00
		1,417	1,67	8,37	5,00
		1,430	1,69	8,45	5,00
	119	0,367	0,43	4,34	10,00
		0,376	0,44	4,44	10,00
		0,498	0,59	5,89	10,00
		0,491	0,58	5,80	10,00
$y = 0,837x - 0,006$	125	0,461	0,54	5,44	10,00
		0,478	0,56	5,64	10,00
		0,456	0,54	5,38	10,00
		0,459	0,54	5,41	10,00
$y = 0,846x + 0,000$	126	0,966	1,14	11,42	10,00
		0,964	1,14	11,39	10,00
		0,931	1,10	11,00	10,00
		0,958	1,13	11,32	10,00
$y = 0,815x - 0,003$	127	0,198	0,25	73,99	300,00
		0,200	0,25	74,72	300,00
		0,197	0,25	73,62	300,00
		0,198	0,25	73,99	300,00

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift