

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Biologisch-Pharmazeutische Fakultät
Institut für Ernährungswissenschaften
Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe



seit 1558

Optimierung von Methoden
zur Ermittlung der lipophilen antioxidativen Aktivität
und deren Anwendung
auf Lykopin-Isomere und Lykopin-Abbauprodukte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
doctor rerum naturalium
- *Dr. rer. nat.* -

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Lebensmittelchem.

Lars Müller

geboren am 20. Mai 1981 in Altenburg/Thür.

Gutachter:

1. **PD Dr. habil. Volker Böhm**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe
Dornburger Str. 25
07743 Jena
2. **Prof. Dr. Stefan Lorkowski**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Lehrbereich Biochemie der Ernährung
Dornburger Str. 25
07743 Jena
3. **Prof. Dr. Sascha Rohn**
Universität Hamburg
Institut für Lebensmittelchemie
Grindelallee 117
20146 Hamburg

Tag der Disputation: 17.10.2011

“Living organisms are exposed to much more severe oxidative stress than is food in a refrigerator.
Nevertheless, they do not become rancid until they, in their turn, become food.”

G. W. Burton und K. U. Ingold (1986)

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Oxidativer Stress.....	2
1.2 Antioxidantien	4
1.2.1 Vitamin E	5
1.2.2 Carotinoide	5
1.2.2.1 Lycopin.....	11
<i>Isomere</i>	12
<i>Abbauprodukte</i>	14
1.2.3 Weitere fettlösliche Antioxidantien	15
1.2.4 Interaktionen zwischen Antioxidantien.....	16
1.3 Bestimmung der antioxidativen Aktivität/Kapazität	16
1.3.1 Methoden basierend auf ET-Mechanismus.....	18
1.3.2 Methoden basierend auf HAT-Mechanismus oder Adduktbildung	18
2 Fragestellung/Zielsetzung	20
3 Übersicht zu den Manuskripten.....	21
4 Diskussion.....	25
4.1 Antioxidative Aktivität lipophiler Antioxidantien – basierend auf ET	25
4.1.1 DPPH-Test	25
4.1.2 α TEAC-Test	29
4.1.3 FRAP-Test.....	38
4.2 Antioxidative Aktivität lipophiler Antioxidantien – basierend auf HAT und Adduktbildung	46
4.2.1 ORAC mit β -Cyclodextrin	47

4.2.3 LPSC-Test	51
4.3 Vergleich der antioxidativen Aktivität aller lipophilen Antioxidantien in den verschiedenen Methoden	61
4.4 Schlussfolgerungen	65
4.5 Physiologische Relevanz der Testsysteme	68
4.6 Ausblick	72
5 Zusammenfassung	74
Summary	78
6 Literaturverzeichnis	81
Anhang	IX
Erklärungen	XIX

Abkürzungsverzeichnis

α -TE	α -Tocopheroläquivalente (<i>engl.</i> α -tocopherol equivalents)
α TEAC	α -Tocopherol äquivalente antioxidative Kapazität (<i>engl.</i> α -tocopherol equivalent antioxidant capacity)
AAPH	2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
ABTS ^{•+}	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Radikalkation
AIBN	2,2'-Azobisisobutyronitril
AMVN	2,2'-Azobis-(2,4-dimethylvaleronitril)
AOA	Antioxidative Aktivität (<i>engl.</i> antioxidant activity)
AOC	Antioxidative Kapazität (<i>engl.</i> antioxidant capacity)
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>engl.</i> Area Under the Curve)
BCO1	β,β -Carotin-15,15'-Monooxygenase, spaltet Carotinoide symmetrisch
BCO2	β,β -Carotin-9',10'-Oxygenase, spaltet Carotinoide asymmetrisch
BHA	2- bzw. 3- <i>tert</i> -Butyl-4-hydroxyanisol
BHT	3,5- <i>Di-tert</i> -butyl-4-hydroxytoluol
bspw.	beispielsweise
C	Kohlenstoff
CD	Cyclodextrin
CDB	konjugierte Doppelbindung (<i>engl.</i> conjugated double bond)
CL	Chemilumineszenz
CUPRAC	Kupfer(I)-reduzierende antioxidative Kapazität (<i>engl.</i> CUPric Reducing Antioxidant Capacity)
DHLA	Dihydroliponsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH [•]	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikal
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E</i>	<i>trans</i> (<i>lat.</i> „weit entfernt bzw. gegenüber“) - geometrische Konfiguration
EA	Ellagsäure
E_{HOMO}	Energie des höchstbesetzten Molekülorbitals (<i>engl.</i> energy of the highest occupied molecular orbital)
ET bzw. SET	Ein-Elektronen-Übergang (<i>engl.</i> single electron transfer)
<i>et al.</i>	und andere (<i>lat.</i> et alii)
FM	Frischmasse
FRAP	Eisen(III)-reduzierende antioxidative Stärke (<i>engl.</i> Ferric Reducing Antioxidant Power)
GIT	Gastrointestinal-Trakt
HAT	Wasserstoffatom-Übergang (<i>engl.</i> hydrogen atom transfer)
HKE	Herz-Kreislauf-Erkrankungen

hpts.	hauptsächlich
<i>I</i> -Effekt	induktiver Effekt
IP	Ionisierungspotential
IUPAC	Internationale Vereinigung für reine und angewandte Chemie (<i>engl.</i> International Union of Pure and Applied Chemistry)
LA	Liponsäure
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (<i>engl.</i> Low-Density Lipoprotein)
log <i>P</i>	Verteilungskoeffizient zwischen <i>n</i> -Octanol und Wasser
LPO	Lipidperoxidation
LPSC	Luminol-Chemilumineszenz basierte peroxyradikalabfangende Kapazität (<i>engl.</i> luminol-chemiluminescence peroxy radical scavenging capacity)
<i>M</i> -Effekt	Mesomerie-Effekt
mglw.	möglicherweise
MW	Mittelwert
<i>n</i>	Anzahl
<i>p</i>	Signifikanzniveau bzw. Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	<i>lat.</i> pondus hydrogenii
ROO [•]	Peroxyradikal
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>engl.</i> reactive nitrogen species)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>engl.</i> reactive oxygen species)
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
Stabw	Standardabweichung
T	Temperatur in °C
Trolox [®]	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TPTZ	2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazin
UV	Ultraviolett (Licht im Wellenlängenbereich von ~200-400 nm)
vis	visuell (Licht im Wellenlängenbereich von ~400-800 nm)
Z	<i>cis</i> (<i>lat.</i> „zusammen bzw. nah beieinander“) - geometrische Konfiguration

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Strukturen von Carotinoiden und deren Biosynthese in höheren Pflanzen, Teil 1.....	6
Abbildung 2	Strukturen von Carotinoiden und deren Biosynthese in höheren Pflanzen, Teil 2.....	7
Abbildung 3	Carotinoidprofil von Tomatenprodukten.....	12
Abbildung 4	Stereochemische Formen bei der <i>E/Z</i> -Isomerisierung von Lycopin	13
Abbildung 5	Reaktion von α -Tocopherol im DPPH-Test	27
Abbildung 6	Reaktionsmechanismus des α TEAC-Tests am Beispiel von Lycopin	30
Abbildung 7	Beitrag von Carotinoiden und Vitamin E zur antioxidativen Kapazität von Tomatensaft, gemessen mittels α TEAC-Test.....	36
Abbildung 8	Reaktionsmechanismus des FRAP-Tests am Beispiel von Lycopin.....	39
Abbildung 9	Beitrag von Carotinoiden und Vitamin E zur antioxidativen Kapazität von Tomatensaft, gemessen mittels FRAP-Test	45
Abbildung 10	Cyclodextrine als Lösungsvermittler.....	48
Abbildung 11	Möglicher Reaktionsmechanismus des LPSC-Tests	52
Abbildung 12	Beitrag von Carotinoiden und Vitamin E zur antioxidativen Kapazität von Tomatensaft, gemessen mittels LPSC-Test.....	59
Abbildung A.1	Chemische Strukturen natürlicher & synthetischer fettlöslicher Antioxidantien.....	IX
Abbildung A.2	Chemische Strukturen einiger wasserlöslicher Antioxidantien	IX
Abbildung A.3	α TEAC-Reaktionskinetik am Beispiel von Lycopin.....	X
Abbildung A.4	FRAP-Reaktionskinetik am Beispiel von Lycopin.....	X
Abbildung A.5	Korrelation von Redoxpotential und antioxidativer Aktivität im α TEAC-Test	X
Abbildung A.6	Korrelation von Ionisierungspotential bzw. E_{HOMO} und antioxidativer Aktivität im α TEAC-Test.....	X
Abbildung A.7	Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im α TEAC-Test	XI
Abbildung A.8	Antioxidative Aktivität einiger hydrophiler Substanzen im α TEAC-Test....	XI
Abbildung A.9	Zusammensetzung der Carotinoidstandards vor und nach Inkubation mit Fe^{3+} -freiem FRAP-Reagenz.....	XI
Abbildung A.10	Korrelation von Redoxpotential und antioxidativer Aktivität im FRAP-Test.....	XII
Abbildung A.11	Korrelation von IP bzw. E_{HOMO} und antioxidativer Aktivität im FRAP-Test.....	XII

Abbildung A.12	Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im FRAP-Test.....	XII
Abbildung A.13	Antioxidative Aktivität einiger hydrophiler Substanzen im FRAP-Test.....	XII
Abbildung A.14	Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im ORAC-Test.....	XIII
Abbildung A.15	Korrelation von IP bzw. E_{HOMO} und antioxidativer Aktivität im LPSC-Test.....	XIII
Abbildung A.16	Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im LPSC-Test.....	XIII
Abbildung A.17	Antioxidative Aktivität einiger hydrophiler Substanzen im LPSC-Test.....	XIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle A.1	Anteil einzelner Antioxidantien an der lipophilen AOC verschiedener Säfte im α TEAC-Test.....	XIV
Tabelle A.2	Anteil einzelner Antioxidantien an der lipophilen AOC verschiedener Säfte im FRAP-Test.....	XIV
Tabelle A.3	Polarität von Tocopherolen und Tocotrienolen.....	XIV
Tabelle A.4	Absorptionsmaxima von Lycopin und apo-Lycopinoiden.....	XV
Tabelle A.5	Anteil einzelner Antioxidantien an der lipophilen AOC verschiedener Säfte im LPSC-Test.....	XV
Tabelle A.6	Antioxidative Aktivität von Tocopherolen und Tocotrienolen.....	XV
Tabelle A.7	Antioxidative Aktivität von Carotinoiden mit α -Tocopherol als Referenz.....	XVI
Tabelle A.8	Antioxidative Aktivität lipophiler Antioxidantien.....	XVII
Tabelle A.9	Antioxidative Aktivität von Lycopinverbindungen.....	XVIII

1 Einleitung

Das wissenschaftliche Interesse, neuartige Strategien zur Prävention von Erkrankungen des Menschen zu entwickeln, basiert auf der Untersuchung der mechanistischen Natur dieser Krankheiten. Als ein Initiationsschritt beim Auftreten verschiedener Erkrankungen wird die Oxidation wichtiger zellulärer Bestandteile durch reaktive Verbindungen postuliert („oxidativer Stress“). Zur Verdeutlichung dieser Hypothese ist bspw. die gesteigerte Oxidation von LDL und ein damit verbundenes erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (HKE) zu nennen [1]. Die Oxidation von DNA gilt als ein Initiationsschritt bei der Entstehung von Krebs. Ebenso beeinflusst die Oxidation von Proteinen, und somit auch stoffwechselaktiver Enzyme, die Ausbildung von Krankheiten [2]. Daher ist eine Kenntnis über den antioxidativen Status im Organismus wichtig. Der Verzehr von antioxidantienreichem Obst und Gemüse sowie Vollkornprodukten scheint aus epidemiologischer Sicht der effektivste Weg zur Vermeidung von übermäßigen Oxidationsprozessen zu sein [3]. Eine Erforschung der antioxidativen Kapazität von Lebensmitteln im Allgemeinen, als auch der antioxidativen Aktivität einzelner Inhaltsstoffe im Besonderen und deren Wirkung im Organismus, ist daher unerlässlich. Neben den antioxidativ wirksamen Vitaminen C und E standen in den letzten Jahrzehnten besonders sekundäre Pflanzenstoffe wie die wasserlöslichen Flavonoide und die fettlöslichen Carotinoide im Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

Zu den wichtigsten fettlöslichen Antioxidantien zählen die Vitamere des Vitamin E (Tocopherole, Tocotrienole), die große Gruppe der Carotinoide, spezielle Inhaltsstoffe des Olivenöls sowie die α -Liponsäure [4]. Zur Beurteilung ihres antioxidativen Potentials sind Methoden notwendig, welche die Aktivität gegenüber verschiedenen Oxidantien einfach, schnell und reproduzierbar erfassen. Insbesondere bei der Erfassung der antioxidativen Aktivität stark apolarer Substanzen wie Lycopin fehlten bisher geeignete Methoden.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Lycopin bei der Ausbildung vieler Humanerkrankungen im Frühstadium präventiv wirksam ist [5]. Einige Autoren vermuten, dass nicht die antioxidative Wirkung des Lycopins selbst, sondern die seiner Isomere oder oxidativen Abbauprodukte diese Wirkung erzielen [6]. Die Untersuchung der antioxidativen Aktivität von Lycopin-Abbauprodukten ist daher notwendig.

1.1 Oxidativer Stress

Abgesehen von anaerob agierenden Organismen ist Sauerstoff lebensnotwendig für alle lebenden Systeme. Das Paradoxon des aeroben Lebens ist jedoch der damit einhergehende oxidative Schaden durch Veränderung von Strukturen und Funktionen biologischer Moleküle an Schlüsselstellen des Stoffwechsels. [7] Im Normalfall liegen die Erzeugung verschiedenster reaktiver Spezies (Oxidantien) im Organismus und die Kapazität natürlicher Abfangmechanismen (Antioxidantien) im Gleichgewicht. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite der Oxidantien wird als „oxidativer Stress“ definiert [3,8].

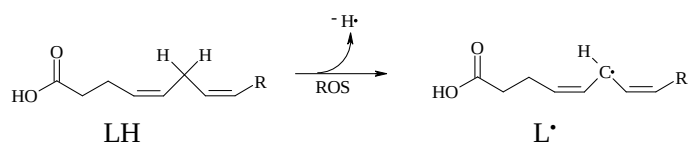
Die reaktiven Spezies, die oxidativen Stress auslösen können, sind hpts. reaktive Sauerstoffspezies (*engl.* reactive oxygen species, ROS) und reaktive Stickstoffspezies (*engl.* reactive nitrogen species, RNS). Beide Gruppen enthalten sowohl radikalische als auch nicht-radikalische Substanzen. Die wichtigsten radikalischen ROS sind das Superoxid-Radikalanion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal ($^{\bullet}OH$) und das Peroxylradikal ($ROO^{\bullet}$). Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff (1O_2) sind die wichtigsten nicht-radikalischen ROS. In der Gruppe der RNS spielt v. a. Stickstoffmonoxid ($NO^{\bullet}$) eine bedeutende Rolle [9].

ROS und RNS entstehen permanent im Stoffwechsel des Menschen. Hauptproduzent von ROS sind die Enzyme der Atmungskette in den Mitochondrien [7]. Aus Superoxid kann, durch Reaktion mit Stickstoffmonoxid, einem wichtigen radikalischen Botenstoff in der Blutdruckregulation, Peroxynitrit ($OONO^{\bullet}$) entstehen [10]. Haber-Weiß- und anschließende Fenton-Reaktion können zur Bildung von $^{\bullet}OH$ aus H_2O_2 führen [7]. Entzündungsreaktionen, Umweltgifte, Chemotherapeutika, UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Ultraschall und chemische Scherkräfte führen ebenfalls zur Radikalproduktion. Auch Zigarettenrauch und Abgase enthalten radikalische Spezies.

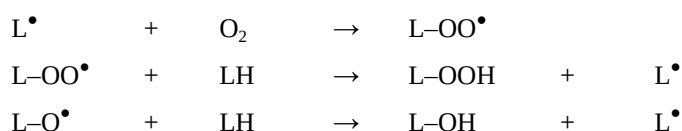
Viele freie Radikale besitzen das Potential biologische Makromoleküle wie DNA, Membranlipide, Proteine und Enzyme sowie Kohlenhydrate in Zellen und Geweben durch Oxidation zu schädigen. DNA, Enzyme und Strukturproteine können in der Folge fragmentieren oder zufällige Quervernetzungen ausbilden. Lipide spielen eine fundamentale Rolle in zellulären Kompartimenten, deren Schädigung für den Organismus schwerwiegende Folgen hat. Insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*engl.* polyunsaturated fatty acids, PUFA) wie Linolsäure oder Arachidonsäure unterliegen einer Lipidperoxidation (LPO), auch Fettautoxidation genannt. Die LPO ist eine Ketten-

reaktion, und wird in drei Teilschritte untergliedert: Kettenstart (*Initiation*), Kettenwachstum/-fortpflanzung (*Propagation*) und Kettenabbruch (*Termination*) [11].

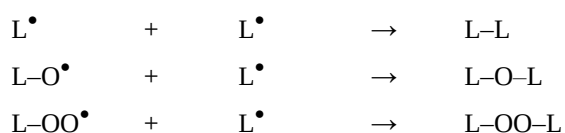
Initiation



Propagation



Termination



Im Lebensmittel oder Kosmetika spielt die LPO eine wichtige Rolle z. B. beim Verderb von Fetten und Ölen („Ranzigwerden“), aber auch bei der Aromastoffbildung [12,13].

Die LPO kann potentiell zytotoxische, genotoxische und mutagene Reaktionsprodukte freisetzen, bspw. reaktive α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen, wie 4-Hydroxynonenal (HNE) oder Acrolein [14,15]. Diese sekundären Produkte der LPO können biologisch essentielle Moleküle wie Proteine und DNA-Basen modifizieren [16]. LPO an Lipiddoppelschichten von Membranen und darauffolgende Sekundärreaktionen können schließlich im Zelltod enden [17].

Die Veränderungen durch freie Radikale und Sekundärprodukte der LPO stellen die molekulare Basis für die Entwicklung vielerlei Krankheiten dar, wie u. a. Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Arteriosklerose [3], Osteoporose [5], Diabetes und neurodegenerative Erkrankungen [7]. Die Ergebnisse einiger Studien lassen vermuten, dass auch die Alzheimer Krankheit, Parkinson, die Duchenne Muskeldystrophie, die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) sowie rheumatische Arthritis und Progerie im Zusammenhang mit der Oxidation von Proteinen stehen [3,14,18-20].

Zur Erforschung von unerwünschten Oxidationsvorgängen im lebenden Organismus und ihrer Folgeerkrankungen ist daher die Bestimmung des antioxidativen Potentials von Humanplasma und -gewebe wichtig. Eine Bestimmung der antioxidativen Kapazi-

tät von Lebensmitteln bzw. einzelner Verbindungen im Lebensmittel, ihrer möglichen Synergismen und Wirkungen *in vivo*, ist ebenso von großem Interesse.

Auch aus Sicht der Lebensmittelchemie und -technologie ist eine Kenntnis über die antioxidativen Eigenschaften einzelner Lebensmittelinhaltsstoffe essentiell, um die Vorgänge des oxidativen Verderbs von frischen und verarbeiteten Lebensmitteln sowie Kosmetika verstehen zu können. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse können die Lebensmittelwissenschaften der Lebensmittelindustrie Empfehlungen zu Lagerung, Verpackung und einem möglichen Einsatz von Antioxidantien als Zusatzstoffe geben.

Abschließend muss betont werden, dass im Gegensatz zu den vielen beschriebenen negativen Wirkungen, ROS *in vivo* aber auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose von Zellen und der Reifung von T-Lymphozyten in der Schilddrüse spielen. Ein überhöhter antioxidativer Schutz kann daher die Inzidenz von Infektionen, Neoplasien und Autoimmunerkrankungen bei älteren Menschen durch die Abschwächung der Immunantwort erhöhen [21].

1.2 Antioxidantien

Der aerob lebende Organismus hat ein sehr effizientes Abwehrsystem entwickelt, um sich vor oxidativem Stress zu schützen. Dabei spielt in der Abwehr des oxidativen Stresses *in vivo* eine Vielzahl von Antioxidantien mit verschiedensten Aufgaben eine Rolle. Im Allgemeinen werden Antioxidantien als Substanzen definiert, die „...in niedrigen Konzentrationen im Vergleich zum oxidierbaren Substrat, eine Oxidation des Substrates verzögern, verlangsamen oder verhindern“ [22]. Zum einen wirken Enzyme wie Katalasen (CAT) oder Superoxiddismutasen (SOD) sowie Metallchelatbildende Proteine (wie Transferrin und Ceruloplasmin) als präventive Antioxidantien [3]. Zum anderen sind kleine niedermolekulare Verbindungen bspw. die Vitamine C und E sowie Harnsäure in der Lage, Radikale abzufangen [23]. Im dritten Schritt der Stressabwehr kommen verschiedene Enzyme zum Einsatz, die entstandene Schäden bspw. an DNA und Proteinen reparieren und die Funktionen der Makromoleküle wiederherstellen oder sie als „Zellmüll“ entsorgen. Als vierte und letzte Möglichkeit bleibt *in vivo* nur die Adaption an den auftretenden Stress [23].

Antioxidantien im humanen Organismus lassen sich nach ihrer Herkunft (endogen, exogen) klassifizieren. Zum endogenen Schutzsystem gehören neben einer Reihe verschiedener antioxidativ wirksamer Enzyme (CAT, SOD u. a.) auch niedermolekulare Ver-

bindungen wie Harnsäure oder Glutathion. Zu den exogenen Antioxidantien zählen u. a. die Vitamine C und E, Carotinoide und Flavonoide. Anhand ihrer Wirkungsweise werden Antioxidantien auch in enzymatische und nicht-enzymatische eingeteilt. Die nicht-enzymatischen Antioxidantien werden häufig aufgrund ihrer Löslichkeitsunterschiede weiter untergliedert in hydrophile Substanzen (Vitamin C, Harnsäure, Flavonoide) und lipophile Verbindungen wie Vitamin E und Carotinoide. Als Schutz vor LPO sind in humanem LDL fettlösliche Antioxidantien wie Vitamin E oder Carotinoide sowie oxidierte Carotinoide und deren Abbauprodukte zu finden.

1.2.1 Vitamin E

Die Struktur und Eigenschaften von Vitamin E sind in der Einleitung von Manuskript 1 zu finden.

1.2.2 Carotinoide

Carotinoide stellen eine weit verbreitete Gruppe von „natürlichen“ Farbstoffen in gelbem, orangem und rotem Obst und Gemüse dar. Mehr als 750 Carotinoide wurden bisher aus natürlichen Quellen isoliert und strukturell identifiziert [24]. Sie alle basieren auf dem gleichen Isoprenoid-Grundgerüst mit 40 Kohlenstoffatomen (*tetra*-Terpen). Diese nahezu bilateral symmetrische Struktur [25] kann durch Zyklisierung, Addition, Elimination oder Umgruppierung verändert sein [26]. Carotinoide werden ausschließlich durch Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert. Carotinoide mit einem reinen Kohlenwasserstoff-Gerüst werden als Carotine bezeichnet. Sie werden v. a. durch das azyklische Lycopin und das bizyklische β -Carotin repräsentiert. Sauerstoffhaltige Carotinoide („Oxocarotinoide“) werden als Xanthophylle bezeichnet. Zu ihnen gehören bspw. Lutein, Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin. Einige Carotinoide, wie α - und β -Carotin sowie β -Cryptoxanthin besitzen Provitamin-A-Aktivität. Die **Strukturen der wichtigsten Carotine und Xanthophylle** in der Nahrung des Menschen sind im Zusammenhang mit ihrer Synthese in höheren Pflanzen in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

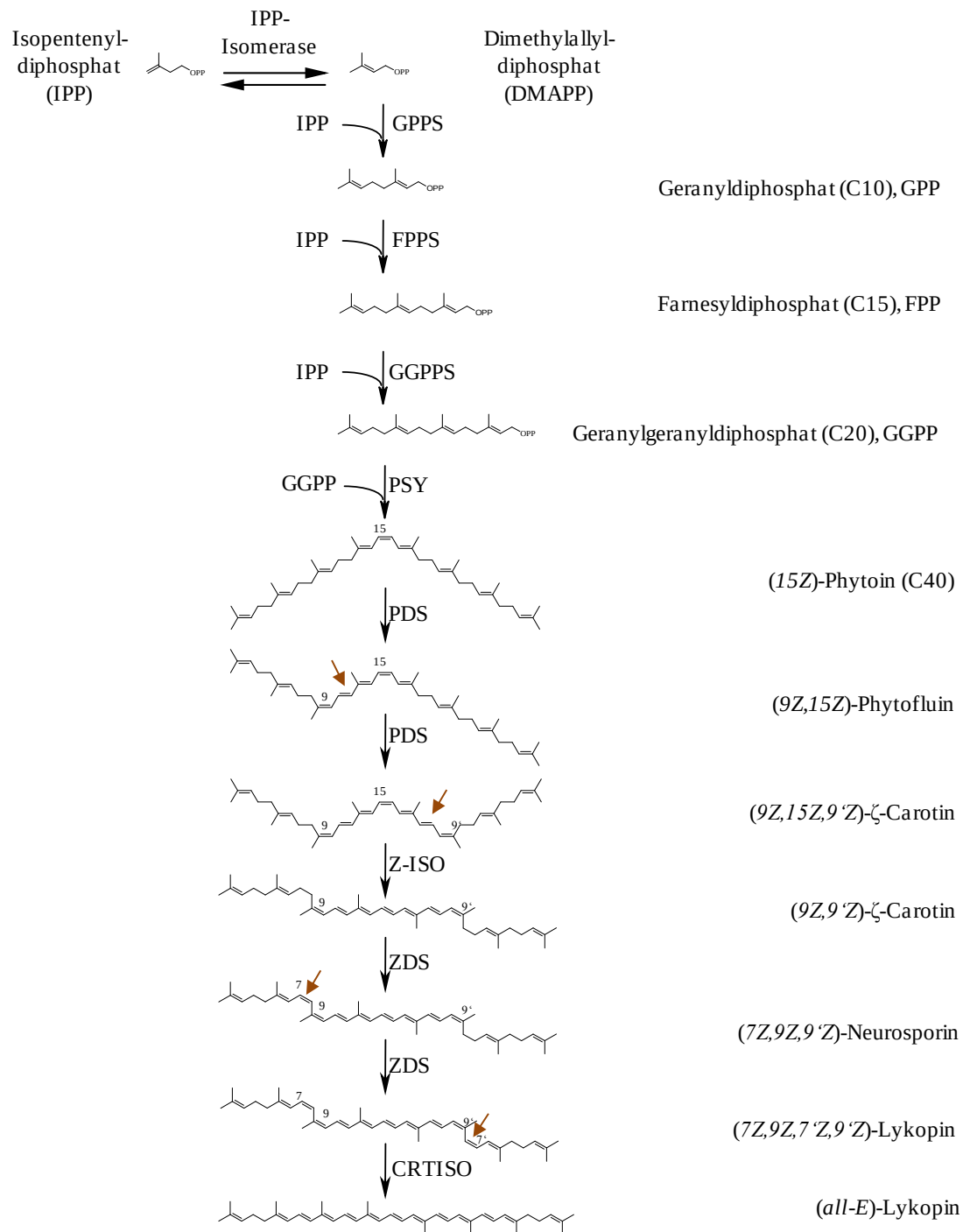


Abbildung 1 Strukturen von Carotinoiden und deren Biosynthese in höheren Pflanzen, Teil 1 (bis zum Lycopin; nach Zhu *et al.*, 2010 [27], modifiziert nach Breitenbach und Sandmann, 2005 [28])
 CRTISO, Carotinoid-Isomerase; FPPS, Farnesyl-diphosphat-Synthase; GGPPS, Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase; GPPS, Geranyldiphosphat-Synthase; PDS, Phytoin-Desaturase; PSY, Phytoin-Synthase; ZDS, ζ-Carotin-Desaturase; Z-ISO, ζ-Carotin-Isomerase

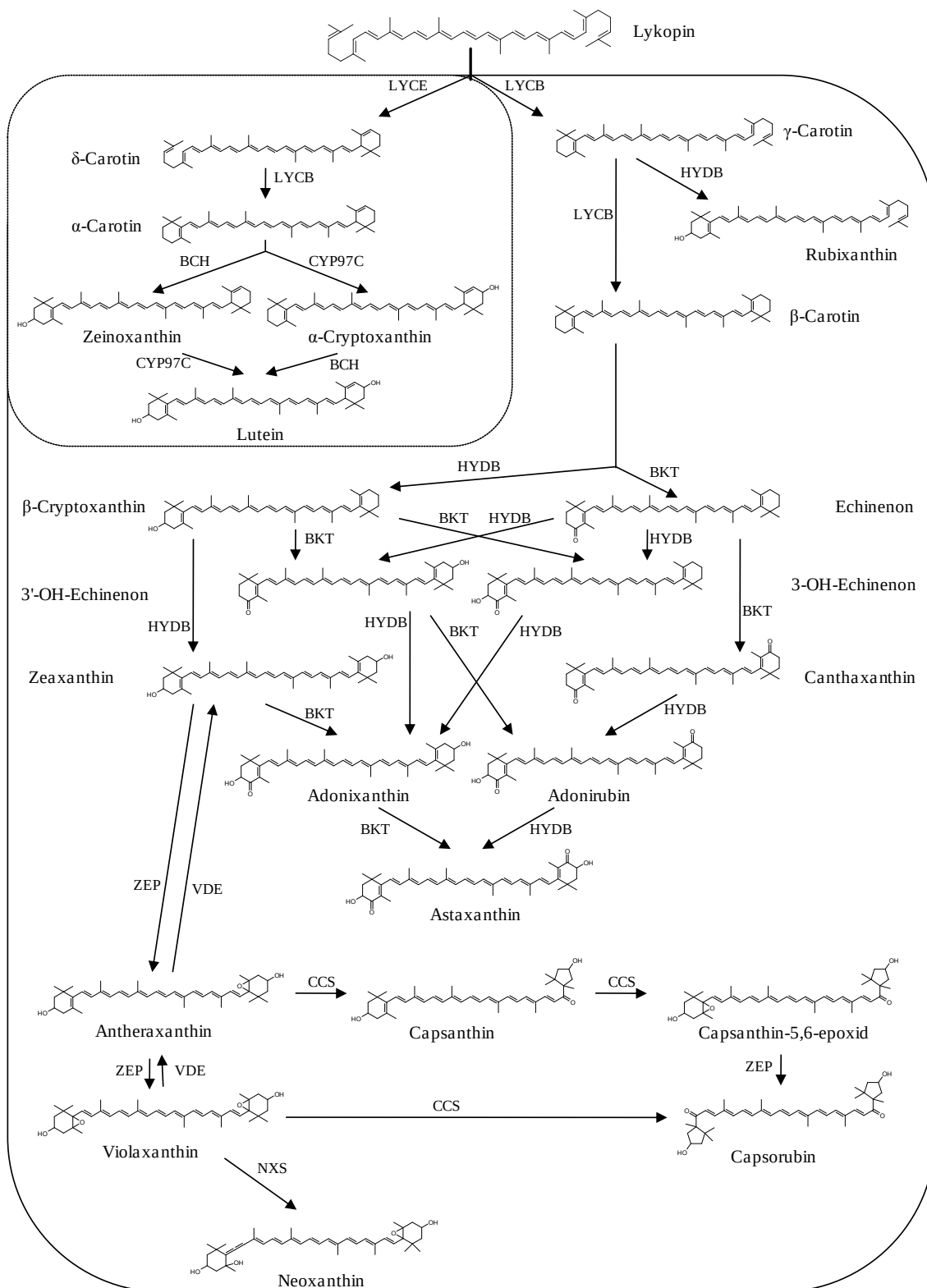


Abbildung 2 Strukturen von Carotinoiden und deren Biosynthese in höheren Pflanzen, Teil 2 (beginnend beim Lykopin) (nach Zhu *et al.*, 2010 [27], Rodriguez-Amaya, 2001 [29])
 BCH, Carotin-β-Ring-Hydrolase; BKT, β-Carotin-Ketolase; CCS, Capsanthin-Capsorubin-Synthase; CYP97C, Carotin-ε-Ring-Hydrolase; HYDB, β-Carotin-Hydrolase (CYP97A, CYP97B, oder CRTZ); LYCB, Lykopin-β-Cyclase; LYCE, Lykopin-ε-Zyklase; NXS, Neoxanthin-Synthase; VDE, Violaxanthin-Deepoxidase; ZEP, Zeaxanthin-Epoxidase

Aufgrund der langen Kohlenstoffketten sind Carotinoide sehr unpolare Verbindungen, die nur schlecht oder gar nicht in Wasser löslich sind. In organischen unpolaren

Lösungsmitteln wie Toluol, kurzkettigen Kohlenwasserstoffen (Hexan, Petrolether) oder Ethern (Tetrahydrofuran, Methyl-*tert*-butylether, Diethylether) zeigen sie jedoch eine gute Löslichkeit. Carotine besitzen dabei eine höhere Lipophilie als Xanthophylle [30]. Aufgrund der Bindung an Proteine können Carotinoide aber auch in wässrigen Medien gelöst sein [31-33].

Die Carotinoide verdanken ihre charakteristischen Färbungen der Absorption von Licht im Bereich von 400 bis 500 nm, ausgelöst durch ein auf konjugierten Doppelbindungen basierendes Chromophor. In einigen Carotinoiden, wie Canthaxanthin oder Astaxanthin, sind zusätzlich zu den C-C-Doppelbindungen auch Carbonylfunktionen vorhanden, die das Polyen-System ausdehnen und den Farbeindruck verstärken [26].

Für Carotinoide ist eine ***trans/cis*-Isomerisierung** (nach IUPAC-Nomenklatur: *E/Z*-Isomerisierung) bekannt. Sie besteht prinzipiell für jede Doppelbindung der Polyen-Kette, so dass für jedes Carotinoid eine enorme Anzahl geometrischer Isomere möglich ist. Tatsächlich existieren aber aufgrund sterischer Gegebenheiten, die sich beim Einfügen von *cis*-Doppelbindungen ergeben, nur wenige Isomere eines Carotinoids [34]. Stabile *cis*-Isomere existieren nur bei minimaler sterischer Hinderung, u. a. in (9*Z*)- β -Carotin. Meist wird die (*all-E*)-Konfiguration bevorzugt. Detaillierte Ausführungen zur *E/Z*-Isomerisierung erfolgt am Beispiel von Lycopin im Kapitel 1.2.2.1.

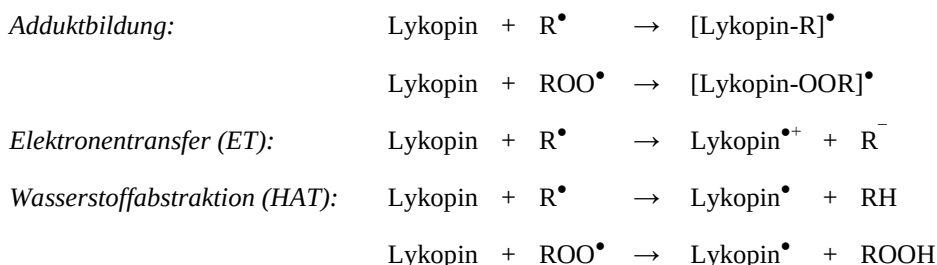
In den westlichen Industrienationen werden 80-90 % der **Carotinoidzufuhr** durch den Verzehr von Obst und Gemüse gedeckt. Die verbleibenden 10-20 % ergeben sich aus dem Verzehr von Eiern, Butter, Käse und Milch [35]. In der menschlichen Ernährung sind ca. 50 verschiedene Carotinoide enthalten [36]. Etwa 20 von ihnen wurden in Humanblut und -gewebe detektiert [5]. Einen nennenswerten Beitrag zur Gesamtaufuhr liefern nur 12 von ihnen [36]. Sechs Carotinoide (Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, α - und β -Carotin sowie Lycopin) repräsentieren dabei mehr als 95 % des Gesamtcarotinoid-Gehaltes im Blut [35]. β -Carotin ist ubiquitär in vielen Obst- und Gemüsesorten vorhanden, insbesondere in Karotten und grünem Blattgemüse [35]. Karotte und Karottenprodukte sind mit bis zu 55 % auch die Hauptquelle für α -Carotin [37]. Lutein und Zeaxanthin kommen meist vergesellschaftet in vielen Obst- und Gemüsearten vor. Hohe Konzentrationen finden sich in grünem Blattgemüse wie Spinat und Blattsalat sowie in Erbsen [38]. Das in Eiern nachweisbare Zeaxanthin ergibt sich aus der Fütterung der Hühner mit Mais [36]. Für β -Cryptoxanthin gibt es dagegen laut *Framingham*

Heart Study nur drei Hauptquellen: Orangensaft mit einem Anteil von 46,8 %, frische Orangen mit 32,4 % und Pfirsiche mit 14,2 % [37].

Die **Absorption der Carotinoide** nach der Freisetzung aus der Lebensmittelmatrix erfolgt analog derer von Nahrungsfetten. Sowohl durch passive Diffusion als auch durch aktiven Transport erfolgt die Aufnahme in die Mukosazellen des GIT [39]. Nach der Aufnahme in die Chylomikronen werden sie in das lymphatische System abgegeben und zur Leber transportiert. In der Leber werden die Carotinoide in Lipoproteine eingebaut, in den Blutstrom abgegeben und zu den Zielgeweben transportiert. Auf diese Weise erreichen die Carotinoide fast unverändert den Blutkreislauf und die Gewebe [40]. Bisher ist jedoch nur wenig über die Absorption in die Gewebe bekannt [5]. Ein Großteil der Carotinoide wird im Fettgewebe gespeichert [41]. Zur Beurteilung des aktuellen Verzehrs von Obst und Gemüse sind die Konzentrationen von Carotinoiden im Plasma ein nützlicher Biomarker [36]. Zur Bewertung des Versorgungstatus sind jedoch die Gehalte im Fettgewebe aussagekräftiger [42].

Die **Wirkung** von Carotinoiden **als Antioxidantien** ist lange bekannt [43,44]. Die elektronenreiche Polyen-Kette der Carotinoide ist anfällig gegenüber Angriffen von Elektrophilen. Oxidationsmittel und freie Radikale reagieren daher schnell mit Carotinoiden *in vitro* [26]. Während polyphenolhaltige Antioxidantien und auch Ascorbinsäure neben dem chemischen Abfangen von Radikalen auch in der Lage sind, prooxidativ wirksame Metallionen (Fe^{3+} , Cu^{2+}) durch Chelatisierung zu binden [3], besitzen Carotinoide diese Eigenschaft zur Chelatkomplexbildung weitestgehend nicht. Nur für wenige Xanthophylle, wie Astaxanthin mit seiner α -Hydroxyketon-Struktur (Abb. 2), wurde eine Bildung von Chelatkomplexen mit zweiwertigen Metallionen (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+}) beschrieben [45]. Carotinoide agieren über zwei verschiedene Hauptwege mit ROS – physikalisches und chemisches Quenchen [46]. Physikalisches Quenchen basiert auf der Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer vom angeregten Sauerstoffmolekül auf das Carotinoid, wodurch das Carotinoid in den Triplettzustand angeregt wird [47,48]. Durch Abbau der Energie in Form von Rotationen und Schwingungen kehrt das Carotinoid-Molekül in den Grundzustand zurück. Das chemische Quenchen durch Reduktion oder Addition macht beim Deaktivieren von Singulett-Sauerstoff nur einen Anteil von 0,05 % aus. Durch das Quenchen von Singulett-Sauerstoff sind Carotinoide in der Lage, die singulett-Sauerstoff-verursachte LPO *in vitro* zu hemmen [48,49]. Neben dieser Quenching-Eigenschaft gegenüber Singulett-

sauerstoff sind Carotinoide auch in der Lage, Peroxylradikale ($\text{ROO}^\bullet$) durch chemische Reaktionen abzufangen [46] und so den Propagationsschritt der LPO zu inhibieren [50]. Dabei reagieren Carotinoide in drei unterschiedlichen Mechanismen mit Alkyl- und Peroxylradikalen ($\text{R}^\bullet$, $\text{ROO}^\bullet$) – Adduktbildung, Elektronentransfer (ET), und Wasserstoffatom-Transfer (HAT) [51-53]:



Das bei der Reaktion von $\text{ROO}^\bullet$ oder $\text{R}^\bullet$ mit Carotinoiden entstehende kohlenstoffzentrierte Carotinoid-Radikal wird über die vorhandenen konjugierten Doppelbindungen (CDB) resonanzstabilisiert. Die Anzahl an CDB und somit die Länge der Polyenkette hat damit entscheidenden Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften [50]. Jedoch können Folgereaktionen zwischen dem Carotinoid-Radikal-Addukt und molekularem Sauerstoff zur Bildung von Peroxylradikalen führen:



Das gebildete $[\text{R-Car-OO}]^\bullet$ als auch $[\text{ROO-Car-OO}]^\bullet$ könnten einen signifikanten kettenbildenden prooxidativen Charakter besitzen [54]. Zwischenprodukte des Radikalabfangs durch Carotinoide können die LPO initiieren, als auch zur Oxidation von Proteinen führen [55]. Jedoch erst bei hohen Sauerstoff-Partialdrücken (> 150 Torr) würde dies zum Tragen kommen [26,56]. Bei niedrigen Sauerstoff-Partialdrücken (≤ 150 Torr) bzw. bei Abwesenheit von Sauerstoff sind kohlenstoffzentrierte Carotinoid-Radikale dagegen relativ unreaktive Verbindungen [26].

Die bevorzugten Reaktionsmechanismen einzelner Carotinoide unterscheiden sich. Während Lykopin mit Superoxid ausschließlich über ET reagiert, bildet β -Carotin Addukte [57]:



Aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften schützen Carotinoide in Pflanzen als ein Teil des Photosynthese-Apparates vor photochemisch ausgelösten Schäden [5,58]. Und

auch die Prävention bestimmter Erkrankungen des Menschen wird assoziiert mit den antioxidativen Wirkungen der Carotinoide [36]. Epidemiologische Studien assoziieren eine hohe Zufuhr sowie hohe Gewebekonzentrationen von Carotinoiden mit einem geringeren Risiko für chronische Erkrankungen [59]. Carotinoide werden jedoch nicht als essentielle Nährstoffe angesehen und eine offizielle Zufuhrempfehlung wurde daher nicht festgelegt [5].

1.2.2.1 Lykopin

Als rotgefärbte Substanz in Tomaten wurde Lykopin erstmals durch Millardet (1876) beschrieben. Schunk (1903) benannte die Substanz später in Anlehnung an den botanischen Namen der Tomate (lat. *Lycopersicon esculentum*) [53]. Das azyklische langgestreckte Lykopinmolekül (IUPAC-Name: ψ,ψ -Carotin) besteht wie das verwandte β -Carotin aus einem sauerstofffreien *tetra*-Terpen-Grundgerüst ($C_{40}H_{56}$). Im Chromophor besitzt Lykopin 11 konjugierte Doppelbindungen und 2 weitere nicht-konjugierte Doppelbindungen und absorbiert folglich Licht im Bereich von ca. 450-500 nm. Lykopin ist ein Schlüsselcarotinoid in der Biosynthese weiterer Carotine v. a. β -Carotin und demnach auch in der Biosynthese einer Vielzahl von Xanthophyllen (siehe Abb. 2).

Im Gegensatz zu anderen Carotinoiden, wie β -Carotin und Lutein, kommt Lykopin nur in wenigen vom Menschen verzehrten Lebensmitteln in nennenswerten Mengen vor. Große Mengen Lykopin finden sich in rotgefärbten Früchten wie Tomaten (bis 12,7 mg/100 g), Papayas (bis 7,5 mg/100 g), Wassermelonen (bis 13,5 mg/100 g), sowie pinken Grapefruits und Guaven [35]. Die Anreicherung von Lykopin in einigen Pflanzen beruht auf der Herabregulierung der Genexpression des CrtL-Gens der Lykopin-Zyklase-Enzyme, welche die Bildung von α - und β -Carotin aus Lykopin durch Ringschlüsse zum β - und ϵ -Iononring katalysieren [60].

Mehr als 80 % der Lykopinaufnahme in Europa und den USA erfolgt durch den Verzehr von Tomaten- und Tomatenprodukten (Ketchup, Saft, Soße) [61,62]. Lykopin ist das Hauptcarotinoid in Tomaten (Abb. 3). Aufgrund des in den westlichen Industrienationen hohen Verzehrs von Tomaten und Tomatenprodukten ist Lykopin auch das dominierende Carotinoid im menschlichen Plasma [63,64]. In Deutschland liegt der jährliche Pro-Kopf-Verbrauch an Tomaten mit 24,6 kg Frisch-Tomaten-Äquivalenten (fTÄ) in 2009/2010 weit vor anderen Gemüsesorten, insbesondere durch den Verzehr von verarbeiteten Tomatenprodukten, die mehr als 66 % des Tomatenkonsums ausmachen [65].

Die **Absorption** erfolgt analog den Mechanismen, die für Carotinoide beschrieben wurden. Aufgrund seiner starken Lipophilie wird Lykopen insbesondere in Zellmembranen und anderen Lipoprotein-Kompartimenten eingelagert. Eine langanhaltende exzessive Zufuhr von Lykopen kann zur Verfärbung von Haut und Leber führen, welche als *Lykopenämie* bezeichnet wird [67].

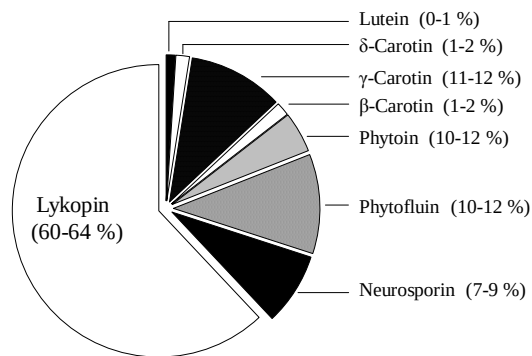


Abbildung 3 Carotinoidprofil von Tomatenprodukten aus Clinton *et al.* (1998) [66]

In zahlreichen *in-vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Lykopen eines der stärksten natürlichen Antioxidantien ist. Wie bei allen Carotinoiden geht die **antioxidative Wirkung** auf das Vorhandensein eines ausgedehnten Polyen-Systems zurück, welches auch nach Elektronenabgabe infolge von Oxidationsprozessen resonanzstabilisiert werden kann. Lykopen zeigte eine sehr hohe Singulett-Sauerstoff-Quenchingrate – doppelt so hoch wie β-Carotin und 10-mal so hoch wie die von α-Tocopherol [48]. Die höhere Aktivität ist mglw. auf die zwei zusätzlichen azyklischen Doppelbindungen an den Enden des Lykopen-Moleküls (Abb. 1) zurückzuführen [64]. Desweiteren ist Lykopen in der Lage, H₂O₂, O₂^{•-}, [•]OH und ROO[•] zu inaktivieren. Auch in membranbasierten Testsystemen (Liposomen, phosphatidylcholinbasierte Membranen) inaktivierte Lykopen synthetisch gebildete ROO[•] [68,69]. Lykopen reduzierte zudem verschiedene synthetische radikalische Chromophore wie ABTS^{•+} und DPPH[•] [70-72]. Auch unter annähernd physiologischen Bedingungen zeigte sich die starke antioxidative Wirkung von Lykopen z. B. bei der Inhibierung der Oxidation von LDL [73]. In einer Humanstudie senkte eine Supplementierung von reinem Lykopen in physiologischen Dosen (15-38 mg/Tag) Parameter des oxidativen Stresses bzw. der Arteriosklerose (SOD-Aktivität, CRP, Adhäsionsproteine, Blutdruck) [74].

Isomere

Auch im Lykopen-Molekül sind, wie bei allen Carotinoiden, prinzipiell an allen Doppelbindungen der Polyenkette durch Rotation um 180 °C *Cis-trans*-Isomerisierungs-

reaktionen möglich. Eine Vielzahl von *mono*-(Z)- und *poly*-(Z)-Isomeren kann entstehen. Jede Doppelbindung kann demnach in zwei Konfigurationen vorliegen – „*trans*“ (nachfolgend *E* genannt) oder „*cis*“ (nachfolgend *Z* genannt). Während Doppelbindungen in Fettsäuren von Natur aus immer in (*Z*)-Konfiguration vorliegen, sind die Polyen-Systeme der meisten Carotinoide (*all-E*) konfiguriert. Bei Substanzen mit 11 konjugierten Doppelbindungen sind nach Zechmeister (1944) theoretisch 2048 (2^{11}) Konfigurationsisomere möglich [75]. In einer Vielzahl von (*Z*)-Lykopen-Isomeren führen die sterischen Hinderungen zwischen einzelnen Wasserstoffatomen und Methylsubstituenten zu einer stärkeren thermodynamischen Instabilität im Vergleich zur (*all-E*)-Form [25]. Abbildung 4 verdeutlicht die räumlichen Gegebenheiten bei der Isomerisierung einzelner Doppelbindungen von der (*E*)- in die (*Z*)-Form.

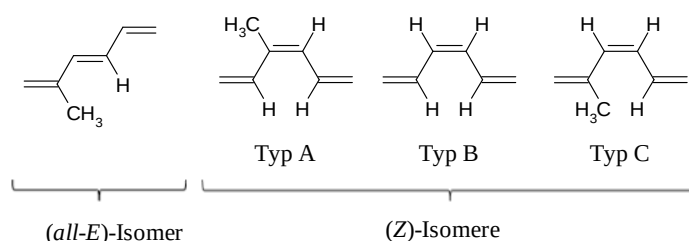


Abbildung 4 Stereochemische Formen bei der *E/Z*-Isomerisierung von Lykopen (nach Chasse *et al.* (2001) [76])

Einige Konfigurationsänderungen führen somit zu „stereochemisch inaktiven“ nicht-planaren Strukturen (Typ C in Abb. 4), so dass nur 7 der 11 Doppelbindungen des Lykopens stereochemisch aktiv sind. Mit der von Zechmeister (1944) [75] aufgestellten Formel für symmetrische Verbindungen mit einer ungeraden Anzahl effektiver Doppelbindungen lässt sich für Lykopen die Anzahl bevorzugt gebildeter Isomere auf 72 eingrenzen. Das (*all-E*)-Isomer des Lykopens dominiert dabei in rohen roten Tomaten und auch in roten Wassermelonen [53,77,78]. Da Lykopen in den Plastiden der Pflanzen kristallin vorliegt [79] und durch weitere sekundäre Pflanzenstoffe vor Oxidation geschützt wird [80] finden Isomerisierungsreaktionen kaum statt. Der (*Z*)-Isomerenanteil liegt in unverarbeiteten Tomaten daher nur bei 2-10 % [81-83]. Durch den Einfluss von Licht, hohen Temperaturen und auf chemischem Wege durch hohe oder niedrige pH-Werte oder die Anwesenheit von Sauerstoff, Übergangsmetallionen oder oxidierenden Chemikalien können im Lykopen-Molekül nicht-enzymatische Isomerisierungsreaktionen initiiert werden [29,84,85]. Die Verarbeitung von rohen Tomaten zu Tomatenprodukten erhöht die Anteile an (*Z*)-Isomeren [86], insbesondere bei Anwesenheit von Pflanzenöl, wie bei der Herstellung von Spaghettisoßen [87]. Die erhöhte Iso-

merisierung ist jedoch nicht auf das Vorhandensein von Fettsäuren zurückzuführen [88]. (5Z)-, (9Z)-, (13Z)- und (15Z)-Lykopen sind aufgrund der Typ-A-Form (Abb. 4) die thermodynamisch stabilsten (*mono-Z*)-Isomere des Lykopins [76] und dominieren daher sowohl im Lebensmittel als auch im humanen Gewebe [89]. Ein stabiles Gleichgewicht wird durch Anteile von ca. 40-50 % (*all-E*)-Lykopen und ca. 50-60 % Lykopen-(Z)-Isomere erreicht [87,90]. Die Ursachen für den hohen (Z)-Isomerenanteil *in vivo* werden kontrovers diskutiert. Neben einer möglichen Isomerisierung des (*all-E*)-Lycopins im GIT durch Enzyme bzw. durch den sauren pH-Wert des Magens [91,92], wird auch eine bevorzugte Absorption von (Z)-Isomeren in Mizellen aufgrund ihrer besseren Löslichkeit im Chymus diskutiert [91,93,94]. Daneben wird auch eine mögliche Isomerisierung im Enterozyt beim Transfer durch die Mukosa und bei der darauffolgenden Aufnahme in die Chylomikronen in Betracht gezogen [95,96]. Auch eine schnellere Metabolisierung des (*all-E*)-Lycopins zu (Z)-Isomeren und die schnellere Einlagerung der (Z)-Isomere ins Gewebe ist möglich [97]. Zwischen einzelnen Lykopen-Isomeren konnten sowohl Böhm *et al.* (2002) als auch Fröhlich (2007) signifikante Unterschiede in der antioxidativen Aktivität *in vitro* beobachten [71,98]. Das in den orangen *Tangerine*-Tomaten und auch in orangen Wassermelonen mit einem Anteil von über 80 % vorkommende *tetra*-(Z)-Isomer (7Z,9Z,7'Z,9'Z)-Lykopen (auch Prolykopen genannt) ist ein enzymatisch gebildetes Isomer und wichtiges Intermediat bei der Synthese von (*all-E*)-Lykopen (Abb. 1) [99,100]. Prolykopen ist ein Isomer des C-Typs (Abb. 4) und wird nicht durch chemische Isomerisierung gebildet. Seine antioxidative Wirkung wurde bisher nicht untersucht.

Abbauprodukte

Eine chemisch- oder enzymatisch-induzierte oxidative Spaltung der Kohlenstoffkette ist theoretisch an jeder der 11 konjugierten Doppelbindungen des Lycopins möglich, so dass eine Vielzahl von kurzkettigen Lykopen-Abbauprodukten mit ein oder zwei endständigen funktionellen Gruppen entstehen kann [101]. Die so entstehenden Verbindungen werden dann als *apo-Lycopinoide* bezeichnet. Eine große Anzahl strukturell unterschiedlicher apo-Lycopinoide wurde *in vitro* mit Hilfe verschiedenster Oxidationsmittel (O₃, KMnO₄, *meta*-Chlorbenzoesäure, Sauerstoff in Kombination mit Metallporphyrin-Komplexen uvm.) erzeugt [102-104]. Erstmals wurden apo-Lycopinoide in Tomaten durch Ben-Aziz (1973) beschrieben und als apo-6'- und apo-8'-Lykopinal identifiziert [105]. Eine große Anzahl apo-Lycopinale wurde erst kürzlich mittels LC-MS in Tomaten, Tomatenprodukten und anderen lykopenreichen Obst und Gemüse quantifi-

ziert ($c \sim 10\text{-}100 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, Kopec *et al.*, 2010) [106]. Auch im Plasma wurden apo-Lycopinale unterschiedlicher Kettenlängen detektiert ($c \sim 1 \text{ nM}$, Kopec *et al.*, 2010), woraus geschlussfolgert werden kann, dass diese Verbindungen Abbauprodukte des Lycopins *in vivo* darstellen könnten, also Lycopin-Metabolite [106]. Ob die *in vivo* gefundenen Gehalte an apo-Lycopinoiden auf den Verzehr von apo-lykopinoidhaltigen Tomatenprodukten zurückgeht, auf die Oxidation von Lycopin *in vivo* oder beides, ist derzeit ungeklärt [107]. Eine biologische Aktivität dieser Verbindungen wurde bereits einige Jahre zuvor vermutet [101,108]. Direkte antioxidative Wirkungen von apo-Lycopinoiden werden aufgrund der gegenüber dem Lycopin deutlich kürzeren Länge der Polyen-Systeme ausgeschlossen [6]. Dies wurde jedoch bisher nicht untersucht.

1.2.3 Weitere fettlösliche Antioxidantien

Carotinoide und Vitamin E gelten aufgrund ihres Vorkommen in vielen pflanzlichen Produkten als die wichtigsten **natürlichen lipophilen Antioxidantien**. Daneben gibt es spezielle lipophile antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe, deren chemische Strukturen im Anhang (Abb. A.1) dargestellt sind. In Olivenöl wurden bspw. Tyrosol und Hydroxytyrosol neben einer Vielzahl weiterer phenolischer Komponenten identifiziert [109]. Vom tierischen und humanen Organismus wird α -Liponsäure (α -LA) bzw. Dihydroliponsäure (DHLA) synthetisiert [110]. Sie spielt eine wichtige Rolle in mitochondrialen Dehydrogenase-Reaktionen. Die reduzierte Form (DHLA) reagiert mit verschiedenen ROS wie $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}\text{OH}$, HOCl , $\text{ROO}^{\bullet}$ und $^1\text{O}_2$ [111]. Ihre Bisulfid-Struktur erlaubt daneben eine Chelatisierung von Übergangsmetallionen [112]. Ellagsäure (EA), ein C-C-gebundenes fettlösliches Tannin, ist neben den Vitaminen C und E eines der wichtigsten natürlich vorkommenden Antioxidantien [7]. Sie kommt in vielen Beerenfrüchten (Erdbeeren, Himbeeren), ebenso in deren Blättern und Samen, sowie in Granatäpfeln und verschiedenen Nüssen vor [113]. EA ist in der Lage, in ähnlicher Stärke wie Vitamin C oder E verschiedenste ROS und RNS abzufangen [114].

Neben natürlichen fettlöslichen Antioxidantien spielen auch **synthetische Verbindungen** im Lebensmittelsektor eine bedeutsame Rolle (für chemische Strukturen siehe Anhang: Abb. A.1). Diese enthalten in der Regel phenolische Strukturen, welche die AOA ausmachen, kombiniert mit verschiedenen Alkylierungsgraden zur Erhöhung der Lipophilie [115]. Gallate, die Ester der Gallussäure mit einem primären Alkohol, werden als Antioxidantien zum Abfangen von H_2O_2 und anderen ROS in Lebensmitteln, Kosmetik, in technischen Schmierstoffen und Klebstoffen eingesetzt. Je nach Lipophilie

des Produktes kommen Ester mit unterschiedlichen Kettenlängen zum Einsatz. Als Zusatzstoffe zugelassen sind *n*-Propyl-, *n*-Octyl- und *n*-Dodecyl (=Lauryl) -gallat mit den E-Nummern E310, E311 und E312 [116], deren Strukturen in Abbildung A.1 dargestellt sind. 3,5-*Di-tert*-butyl-4-hydroxytoluol (BHT, E321) und 2- bzw. 3-*tert*-Butylhydroxy-4-anisol (BHA, E320) finden als Antioxidantien vielfachen Einsatz in fettreichen Lebensmitteln [116]. Die Verwendung der vorgestellten synthetischen Antioxidantien wurde in den letzten Jahren aufgrund möglicher allergischer, toxischer oder kanzerogener Potentiale [117-119] in einigen Ländern stark eingeschränkt. Dies und die Bevorzugung natürlicher Lebensmittelzusatzstoffe durch die Bevölkerung führte zu einem sprunghaften Ansteigen des Interesses, die antioxidativen Eigenschaften natürlich vorkommender fettlöslicher Substanzen stärker zu erforschen und einzusetzen [120].

Neben den fettlöslichen Antioxidantien existieren eine Reihe wasserlöslicher Antioxidantien wie Ascorbinsäure (Vitamin C), Harnsäure sowie Vertreter der Flavonoide (Quercetin, Cyanidin, Catechine) und Phenolcarbonsäuren (Kaffeensäure, Ferulasäure), deren chemische Strukturen in Abbildung A.2 dargestellt sind.

1.2.4 Interaktionen zwischen Antioxidantien

Die bekannteste und effizienteste Wechselwirkung ist der Synergismus zwischen den antioxidativen Vitaminen C und E. Ein Vorhandensein dieses Synergismus *in vivo* wird von einigen Autoren unterstützt [23]. Neben Vitamin C regenerieren auch Ubichinol-10 (Coenzym Q₁₀) und Glutathion das durch Oxidation aus Vitamin E entstandene Tocopheroxylradikal [121]. Die entstehenden Ascorbat-Radikale können durch Dismutation, chemische Reduktion durch Glutathion oder enzymatische Reduktion durch Thioredoxin-Reduktase reduziert werden [122]. DHLA ist dann wiederum in der Lage, oxidiertes Glutathion und oxidiertes Coenzym Q₁₀ zu regenerieren [123]. Eine Reduktion des Tocopheroxylradikals durch Harnsäure ist dagegen nicht möglich [124]. Auch Carotinoide wie Lycopin sind in der Lage, durch Elektronen-Übergang Vitamin E zu regenerieren [125]. Lycopin kann im Gegensatz zu β -Carotin die Radikalkationen von Lutein und Zeaxanthin reduzieren und so mglw. indirekt Einfluss nehmen auf die Entwicklung von Altersbezogener Makuladegeneration (AMD) [125].

1.3 Bestimmung der antioxidativen Aktivität/Kapazität

Bis heute konnte keine einfache, universell anwendbare, standardisierte Methode entwickelt werden, welche die gesamte antioxidative Kapazität (*engl.* Total antioxidant

capacity, TAC) von Lebensmittel- und biologischen Proben exakt und quantitativ erfasst [126-128]. Da eine Vielzahl verschiedenster Radikalspezies existiert und Substanzen auf vielfältige Art und Weise mit diesen Spezies reagieren können, wurden für die Bestimmung der antioxidativen Wirkung in den letzten 15 bis 20 Jahren viele *in vitro* „Schnelltests“ publiziert. Diese beruhen auf unterschiedlichen Mechanismen und nutzen unterschiedliche Oxidationsmittel. Methoden, die auf dem Abfangen von stabilen Radikalen, wie bspw. DPPH[•] oder ABTS^{•+}, durch ein Antioxidans beruhen, finden weltweit breite Anwendung, insbesondere in der Routineanalytik aufgrund ihrer Eignung zum Screening potentieller AOC [115]. Für eine quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung (*engl.* QSAR, quantitative structure activity relationship) ist hpts. die chemische Struktur der untersuchten Verbindung entscheidend.

Eine Einteilung der Testsysteme erfolgt häufig nach dem Reaktionsmechanismus in (I) Ein-Elektronen-Übergang (*engl.* single electron transfer, SET bzw. ET) und (II) Wasserstoffatom-Übergang (*engl.* hydrogen atom transfer, HAT) [129]. Daneben werden antioxidative Tests in *in vivo* und *in vitro*, sowie in nicht-enzymatisch und enzymatisch, aber auch in direkt und indirekt eingeteilt [128]. Aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten im Testmedium wurden Methoden zur Bestimmung der AOA hydrophiler Substanzen (Ascorbinsäure, Polyphenole uvm.) und lipophiler Substanzen (Vitamin E, Carotinoide uvm.) bzw. der AOC hydrophiler und lipophiler Extrakte von Lebensmitteln oder biologischen Proben entwickelt. Insbesondere zur Beurteilung der antioxidativen Aktivität von wasserlöslichen Verbindungen wurden zahlreiche Methoden entwickelt. Eine große Anzahl von Methoden steht heute zur Messung der hydrophilen AOC zur Verfügung z. B. FRAP-, TEAC-, DPPH-, ORAC-Test uvm. [23,129-131]. Die Messung der tatsächlichen lipophilen AOC stellt jedoch bis heute ein großes Problem dar. Bisherige lipophile Extrakte von Lebensmitteln oder biologischen Proben enthalten häufig aufgrund der Extraktion mit Aceton, Methanol oder Chloroform auch einen Anteil wasserlöslicher Antioxidantien. Zudem ist mit diesen Lösungsmitteln eine vollständige Extraktion von Vitamin E und Carotinoiden (v. a. β -Carotin, Lycopin) nur schwer möglich. Ein zusätzliches Problem stellt die Wahl des Lösungsmittelsystems für die Messung der AOA bzw. AOC dar. Meist beruhen die Methoden auf der Anwendung wässriger Medien, so dass der Einsatz von Lösungsvermittlern wie Liposomen, Mizellen, Tween oder Cyclodextrinen notwendig ist, um die apolaren Substanzen in Lösung zu halten [132-136]. Apolare Testsysteme basierend auf der Verwendung von lipophilen Radikalinitiatoren, wie 2,2'-Azobis-(2,4-dimethylvaleronitril) (AMVN), in apolaren

organischen Lösungsmittelgemischen, bspw. aus DMSO und Butyronitril, und lipophiler oxidierbarer Substrate wie dem Fluoreszenz-Farbstoff BODIPY, wurden dagegen in der Literatur nur selten beschrieben [137,138].

Im Folgenden wird die AOA als die antioxidative Aktivität einer Einzelsubstanz definiert und AOC als die antioxidative Kapazität eines Stoffgemisches z. B. eines Lebensmittels oder Lebensmittelextraktes oder von biologischen Proben wie Humanplasma. Häufig wird die AOA definiert als die Reaktionskinetik zwischen einem Antioxidans und einem Radikal, während die AOC eine Verbindung zur Thermodynamik z. B. zur Stöchiometrie der Reaktion zwischen Antioxidans und Radikal schafft [135].

1.3.1 Methoden basierend auf ET-Mechanismus

Methoden, bei denen ein Übergang eines Elektrons zwischen dem Antioxidans und dem Oxidans stattfindet (*engl.* electron-transfer based assays, ET), beruhen auf einer einfachen Redoxreaktion. Daher kann die bestimmte AOA des Antioxidans oder die AOC des eingesetzten antioxidativ wirksamen Extraktes auch als Reduktionsaktivität bzw. -kapazität bezeichnet werden. Die Reduktion des Oxidans' verursacht eine Farbveränderung, die dann mittels UV-vis-Spektrometer gemessen werden kann, wobei sich die Farbveränderung proportional zur eingesetzten Konzentration an Antioxidans verhält [129]. Als Beispiele sind der *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC)-Test, der 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)-Test und der *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)-Test zu nennen. Sowohl der DPPH-Test als auch der TEAC-Test beruhen auf der Reduktion synthetischer farbiger Radikale durch Antioxidantien. Im FRAP-Test wird ein Fe^{3+} -haltiger Komplex genutzt, dessen Absorption sich nach Reduktion zu Fe^{2+} durch Antioxidantien zu höheren Wellenlängen verschiebt. Zudem ist der Gesamtphenoltest nach Folin-Ciocalteu zu nennen, bei dem Mo^{6+} (gelb) zu Mo^{5+} (blau) reduziert wird [139,140]. Mechanistische Parallelen zum FRAP-Test bestehen beim CUPRAC-Test, bei dem eine Reduktion von Neocuproin-komplexiertem Cu^{2+} zu einem gelborangen Komplex stattfindet [141].

1.3.2 Methoden basierend auf HAT-Mechanismus oder Adduktbildung

HAT-basierende Methoden nutzen kompetitive Reaktionsmechanismen, wobei eine Referenzsubstanz (z. B. Luminol, Fluoreszein, Pyrogallolrot, *cis*-Parinarinsäure, 2',7'-Dichlorofluoreszin, Linolsäure, LDL) als oxidierbares Substrat mit dem Antioxidans um die vorhandenen Radikale (z. B. $\text{ROO}^\bullet$) konkurriert [23,129]. Als Beispiele sind der Crocin-Bleichtest, der *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)-Test und die

Oxidation von Linolsäure oder LDL zu nennen. In all diesen Methoden werden thermolabile Radikalinitiatoren genutzt, um dem Testmedium stetig Peroxylradikale zu liefern [129]. Die radikalfangende Aktivität der Antioxidantien wird anhand der Veränderung des oxidierbaren Substrates nach dem Verbrauch des Antioxidans‘ mittels UV-, Fluoreszenz- oder Lumineszenz-Messung quantifiziert. Im ORAC-Test bspw. wird der Abbau der Fluoreszenz von Fluorescein durch Peroxylradikale in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Antioxidantien verfolgt. Die notwendigen Peroxylradikale werden beim Zerfall von 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochloride (AAPH) freigesetzt [129,142]. Bei Bestimmung der AOC mittels Lumineszenz unterscheidet man neben den klassischen Chemilumineszenz-(CL)- auch Photochemilumineszenz-(PCL)-Verfahren, bei denen die Energie für die Anhebung von Elektronen in den angeregten Zustand aus einer photoelektrisch induzierten Oxidation gewonnen wird [143]. Als oxidierbares Substrat werden in Abhängigkeit von der angestrebten Empfindlichkeit des Testsystems bspw. Methylenblau, Luminol, Riboflavin, Lucigenin oder Pholasin verwendet [144]. Bei vielen CL-Verfahren sind die Reaktionsmechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Bei den klassischen CL-Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Antioxidantien gegenüber Peroxylradikalen oder Singulett-Sauerstoff unter Nutzung von Luminol wird in Abhängigkeit vom Antioxidans ein HAT-Mechanismus oder Adduktbildung vermutet [145].

2 Fragestellung/Zielsetzung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierte zwar eine große Anzahl Testsysteme zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität bzw. Kapazität, jedoch v. a. für wasser- und alkohollösliche Antioxidantien wie Ascorbinsäure (Vitamin C), Polyphenole und α -Tocopherol (Vitamin E). Für stark apolare Substanzen wie Carotinoide und dabei insbesondere für den reinen Kohlenwasserstoff Lykopen gab es keine einfachen, schnellen, kostengünstigen, und reproduzierbar arbeitenden Testsysteme. Erstes Ziel war demnach, die für wasserlösliche Antioxidantien bestehenden Testsysteme für eine Anwendung mit Lykopen zu verändern und/oder neue Testsysteme zu entwickeln, die den oben genannten Ansprüchen genügen. Dabei sollte α -Tocopherol (Vitamin E), das als wichtigstes lipophiles Antioxidans gilt, als Referenz dienen. Die erstellten Methoden sollten anschließend für verschiedene Vitamin-E-Derivate und Carotinoide angewandt werden, sowie die ermittelte antioxidative Aktivität mit denen anderer lipophiler und auch hydrophiler Antioxidantien verglichen werden. Die Anwendbarkeit der Methoden für Lebensmittel sollte nachfolgend an verschiedenen Ölproben und lipophilen Extrakten verschiedener Obst- und Gemüsesäfte erprobt werden.

Aufgrund der Bildung von (Z)-Isomeren des Lykopins bei der Verarbeitung von lykopenreichem Obst und Gemüse zu ihren Produkten und dem hohen Anteil (Z)-Isomere in humanem Gewebe (bis über 50 %), sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die antioxidativen Eigenschaften von Lykopen durch die E/Z-Isomerisierung verändert werden. Dabei wurden neben dem in roten Tomaten dominierenden (*all-E*)-Isomer, die drei wichtigsten (Z)-Isomere, die in Humanplasma detektiert wurden ((5Z)-, (9Z)- (13Z)-Lykopen), untersucht. Zusätzlich wurde das als sehr gut resorbierbar geltende (7Z,9Z,7'Z,9'Z)-Isomer (Prolykopen) aus orangen *Tangerine*-Tomaten isoliert und seine antioxidative Aktivität untersucht.

Aufgrund der kontroversen Diskussion, ob nun Lykopen selbst oder seine polaren kurzkettigen Abbauprodukte, die apo-Lykopenoide, die biologisch aktive Form von Lykopen im Körper sind, sollten die antioxidativen Eigenschaften einer großen Anzahl von apo-Lykopenoiden unterschiedlicher Kettenlänge und endständiger funktioneller Gruppen *in vitro* untersucht werden, und mit Lykopen verglichen werden.

3 Übersicht zu den Manuskripten

Manuskript I

***In vitro* antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma**

L. Müller, K. Theile, V. Böhm

Molecular Nutrition and Food Research (2010), 54, 731-742

DOI 10.1002/mnfr.200900399

Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29,
07743 Jena, Germany; ✉ volker.boehm@uni-jena.de

Article history: Received 14 August 2009
Revised 25 January 2010
Accepted 03 February 2010

Keywords: Antioxidant capacity
Radical-scavenging activity
Reductive activity
Tocopherol
Tocotrienol

Abstract:

A comparative study investigated four tocopherols, four tocotrienols, and α -tocopheryl acetate on their antioxidative activities in five different popular assays, which were adapted to non-polar antioxidants. α -Tocopherol, used as calibration standard, showed the highest ferric reducing antioxidant power. Greater ring methyl substitution not only led to an increase of scavenging activity against the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, but also to a decrease in oxygen radical absorbance capacity. Regarding α -tocopherol equivalent antioxidant capacity no significant differences in the antioxidant activity of all vitamin E isoforms were found. In contrast, a significantly lower peroxy radical-scavenging activity of α -tocochromanols was determined in a chemiluminescence assay. Except oxygen radical absorbance capacity, no significant differences of the antioxidant activity related to the side chain could be detected. The data show that the reducing ability and radical chain-breaking activity of the several vitamin E forms depends on the circumstances under which the assays are performed. In our opinion, the used lipophilic methods can be useful for estimating the antioxidant activity of strong non-polar antioxidants, e.g. carotenoids, too. Furthermore, we could show a significant correlation between the total tocopherol content in human plasma and the lipophilic antioxidant capacity measured by α -tocopherol equivalent antioxidant capacity and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay

L. Müller, K. Fröhlich, V. Böhm

Food Chemistry (2011), 129, 139-148

DOI 10.1016/j.foodchem.2011.04.045

Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29,
07743 Jena, Germany; ✉ volker.boehm@uni-jena.de

Article history: Received 1 September 2010
Revised 17 February 2011
Accepted 18 April 2011

Keywords: Lipophilic antioxidant activity
Lycopene
Carotenes
Xanthophylls

Abstract:

The purpose of this study was to assess the antioxidant activity of carotenes and xanthophylls measured by various methods, compared to α -tocopherol, BHA and BHT. Four assays were selected to achieve a wide range of technical principles. Besides α TEAC, which uses ABTS^{•+} radical cation, ferric reducing activity (measured by using FRAP assay), and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) scavenging assay were used. In addition, a luminol-chemiluminescence based peroxy radical scavenging capacity (LPSC) assay, was used. Most of the compounds showed significant differences in their activity of scavenging radicals depending on the assay used. Of the 22 compounds tested, only a few such as lutein, zeaxanthin and capsanthin gave comparable results in the various assays. Surprisingly, in contrast to α -tocopherol, BHA and BHT, carotenoids did not show any DPPH[•] scavenging activity. To standardise the relative contribution of the assays used, weighted means of the values obtained in α TEAC, FRAP, DPPH and LPSC assay were calculated.

This strategy was used to assess the antioxidant capacity of several juices and oil samples. The highest lipophilic antioxidant capacity in all assays was observed for sea buckthorn berry juice, followed by tomato juice, carrot juice and orange juice. Within the oil samples, the order of antioxidant capacity depended on the assay used.

Comparative study on antioxidant activity of lycopene (Z)-isomers in different assays

L. Müller[†], P. Goupy[‡], K. Fröhlich[†], O. Dangles^{‡,§}, C. Caris-Veyrat[‡], V. Böhm[†]

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2011), 59, 4504-4511

DOI 10.1021/jf1045969

[†] Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29, 07743 Jena, Germany; ✉ volker.boehm@uni-jena.de

[‡] UMR 408 Safety and Quality of Plant Products, INRA, F-84000 Avignon, France

[§] UMR 408, University of Avignon, F-84000 Avignon, France

Article history: Received 30 November 2010
Revised 26 March 2011
Accepted 28 March 2011

Keywords: FRAP
ABTS
Peroxyl radical scavenging
Lipid peroxidation
Lycopene (Z)-isomers
Structure-activity relationship

Abstract:

Several studies have implicated the potent antioxidant properties of lycopene. However, most of the studies used only the (*all-E*)-isomer. (*Z*)-Isomers of lycopene were found in substantial amounts in processed foods and in human tissues. In the present study, we investigated in vitro the antioxidant activity of (5*Z*)-, (9*Z*)-, and (13*Z*)-lycopene compared to the (*all-E*)-isomer. Additionally, prolycopene, the (7*Z*,9*Z*,7'*Z*,9'*Z*)-isomer found in tangerine tomatoes, was analyzed. No significant differences were found between the isomers in ferric reducing antioxidant power assay and in bleaching the radical cation of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), both based on ET mechanisms. In contrast, scavenging activity against peroxyl radicals generated by thermal degradation of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH) was higher in the (*Z*)-isomers. (5*Z*)-Lycopene was most antioxidant in scavenging lipid peroxyl radicals, evaluated by analyzing the inhibition of MbFeIII lipid peroxidation of linoleic acid in mildly acidic conditions (pH 5.8) in a micellar environment, modeling a possible antioxidant action in the gastric compartment.

Do apo-lycopenoids have antioxidant activities *in vitro*?

L. Müller[†], P. Goupy^{§,‡}, E. Reynaud^{§,‡}, C. Caris-Veyrat^{§,‡}, V. Böhm[†]

Journal of the American Oil Chemists' Society, akzeptiert

DOI 10.1007/s11746-011-1972-z

[†] Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29,
07743 Jena, Germany; ✉ volker.boehm@uni-jena.de

[‡] INRA, UMR 408 Safety and Quality of Plant Products, 84000 Avignon, France

[§] University of Avignon, UMR 408, 84000 Avignon, France

Article history: Received 7 June 2011
Revised 10 September 2011
Accepted 14 October 2011

Keywords: ABTS
Antioxidant
Apo-lycopenal
FRAP
Lycopene
Chemiluminescence

Abstract:

Lycopene is a predominant carotenoid in human plasma and may prevent degenerative diseases by antioxidant mechanisms. Moreover, not only lycopene itself, also its derived breakdown products, the apo-lycopenoids, could be responsible. Therefore, we analyzed the *in vitro* antioxidant activities of apo-6'-, apo-8'- and apo-12'-lycopenals, as well as of apo-10'-, apo-14'- and apo-11-series of lycopene (with terminal functions as alcohol, aldehyde, carboxylic acid, and ester) in various assays. We observed that the antioxidant activities, determined by measuring the ferric reducing antioxidant power (FRAP assay), the activities of bleaching 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) and the activities to scavenge peroxy radicals (LPSC assay), were often much lower compared to lycopene itself, as recently proposed by some authors. The antioxidant activities were strongly influenced by the length of the polyene chain and the type of terminal function as well. Considering our results and the low amounts of apo-lycopenals found in plasma as well as in lycopene-rich food products compared to (*all-E*)-lycopene we speculate that the effects of apolycopenoids as direct antioxidants in food samples as well as in blood and/or target tissues can be stated as negligible. Apo-lycopenoids may act as indirect antioxidants by activation of gene expression of antioxidant-derived enzymes.

4 Diskussion

Bisher existiert noch keine Universalmethode mit der man die antioxidative Kapazität exakt und quantitativ ermitteln kann [23,129,140]. All die bis heute entwickelten Methoden sind für eine umfassende quantitative Auswertung der antioxidativen Eigenschaften nicht optimal [115]. Keine der heutigen Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität (AOA) bzw. antioxidativen Kapazität (AOC) reflektiert die „wahre“ Gesamtkapazität einer Probe aufgrund der Unterscheidung in hydrophile und lipophile antioxidative Kapazität. Zur Erfassung der „gesamten“ AOA bzw. AOC einer Probe müssen die antioxidativen Effekte der Substanz oder des Substanzgemisches gegenüber allen Arten von ROS als auch RNS und mögliche additive, synergistische oder antagonistische Effekte untersucht werden. Dies ist bis heute jedoch nur unvollständig gelungen [140].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten *in-vitro*-Methoden zur Bestimmung der AOA von fettlöslichen Antioxidantien wie Vitamin E und Carotinoiden sowie deren Abbauprodukten liefern einen Beitrag zum Verständnis der Vielfältigkeit der Reaktionswege dieser Verbindungen mit unterschiedlichen radikalischen Spezies. In den folgenden Abschnitten werden die AOA einzelner lipophiler Substanzen in verschiedenen Testsystemen diskutiert.

4.1 Antioxidative Aktivität lipophiler Antioxidantien – basierend auf ET

4.1.1 DPPH-Test

Der DPPH-Test nutzt das 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikal (DPPH[•]), ein kommerziell erhältliches, stabiles Stickstoffradikal, welches schnell und einfach in der Handhabung ist. Die Anwendungen des DPPH-Tests zur Bestimmung der AOA bzw. AOC sind seit der erstmaligen Nutzung durch Brand-Williams *et al.* (1995) [146] stark gestiegen. Insbesondere bei der Bestimmung der AOA von phenolischen Substanzen wurde der DPPH-Test vielfach verwendet [146-150]. Viele Antioxidantien reagieren mit dem DPPH[•] über einen ET-Mechanismus mit nachfolgendem Protonentransfer [129,149,151]. Aber auch ein HAT-Mechanismus wird diskutiert v. a. bei phenolischen Antioxidantien [150,152]. Dieses fettlösliche Radikal zeigt eine starke Absorption im sichtbaren Bereich mit einem hohen Absorptionskoeffizienten ($\lambda_{\text{max}} \sim 515 \text{ nm}$, $\epsilon = 11\,240 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, in Methanol [152]), so dass Reaktionen von Antioxidantien mit diesem Radikal leicht mit konventionellen UV-vis-Spektrometern verfolgt werden können

[146]. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Anwendung für stark apolare Antioxidantien optimiert werden.

Das DPPH[•] ist in alkoholischen Medien gut löslich. Und *n*-Hexan ist gut geeignet, sowohl Vitamin E als auch Carotinoide insbesondere Lycopin zu lösen. Daher wurden Ethanol und *n*-Hexan 1:1 (v/v) als Lösungsmittelgemisch im DPPH-Test genutzt. α -Tocopherol, welches als fettlösliches Antioxidans lange bekannt ist, wurde als Kalibrierstandard festgelegt. Die Reaktionsbedingungen wurden auf 15 min bei 25 °C im Dunkeln festgelegt.

Zunächst wurde die Methode genutzt, um die AOA erstmals aller 8 **Vitamin-E**-aktiven Verbindungen im DPPH-Test zu untersuchen (Manuskript 1). Die Art der Seitenkette (gesättigt wie in Tocopherolen, ungesättigt wie in Tocotrienolen, Carboxylgruppe im Falle des wasserlöslichen α -Tocopherol-Analogons Trolox[®]) hatte bei den Messungen keinen Einfluss auf die Reaktivität der Substanz gegenüber dem DPPH[•]. Selbst bei der Nutzung von DPPH-Testsystemen mit Membranen oder Mizellen beeinflusste die Kettenstruktur die AOA nicht [153]. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da die isoprenoide Seitenkette auch *in vivo* nur als „Anker“ zur Einlagerung von Vitamin E in Lipid-Doppelmembranen dient [154]. Dieses für Vitamin E gezeigte Ergebnis konnte auch für die strukturverwandten Ubichinole gezeigt werden [155]. Die Stellungen und insbesondere auch die Anzahl von Methylgruppen am Chromanolring übten dagegen signifikanten Einfluss auf die AOA im DPPH-Test aus. Die trimethylierten Tocochromanole (α -Tocopherol, α -Tocotrienol, Trolox[®]) zeigten die höchste Aktivität. Schlüsselstelle für die AOA von Vitamin E im DPPH-Test ist die Hydroxylgruppe über die der ET unter Bildung des resonanzstabilisierten Tocopheroxylradikals abläuft. Eine Veresterung führt demnach zum Verlust der AOA von Vitamin E.

Das für Vitamin E zuverlässig arbeitende DPPH-Testsystem sollte anschließend genutzt werden, um die AOA von Lycopin mit einigen nahrungsrelevanten **Carotinoiden** zu vergleichen (Manuskript 2). Die Datenlage zur Reaktion von Carotinoiden im DPPH-Test war zu Beginn der Dissertation nicht eindeutig. Jimenez-Esrig *et al.* (2000) [156] sowie Liu *et al.* (2008) [72] untersuchten Carotinoide sowie verschiedene Isomere des Astaxanthins mittels DPPH[•] und stellten dabei sowohl zwischen verschiedenen Carotinoiden als auch zwischen den Isomeren des Astaxanthins signifikante Unterschiede in der AOA fest. Nomura *et al.* (1997) dagegen beobachteten keine signifikante Absorptionsabnahme für die nahrungsrelevanten Carotinoide β -Carotin, Lycopin, β -

Cryptoxanthin und Lutein im DPPH-Test [157]. Auch in der vorliegenden Arbeit sank nach Zugabe strukturell verschiedener Carotinoide (Lykopen, β -Carotin, Lutein, Astaxanthin), im Gegensatz zur beobachteten Entfärbungsreaktion des DPPH $^{\bullet}$ nach Zugabe von α -Tocopherol, die Absorption des Reaktionsgemisches bei 515 nm nicht, sondern stieg dagegen unerwartet an. Die Absorption des DPPH $^{\bullet}$ -Carotinoid-Reaktionsgemisches stieg parallel mit der Eigenabsorption des Carotinoids an, so dass davon auszugehen ist, dass keine Reaktion zwischen dem DPPH $^{\bullet}$ und dem jeweiligen Carotinoid stattfand. Die Reaktivität einzelner Antioxidantien im DPPH-Test wird stark vom verwendeten Lösungsmittel beeinflusst [158]. Aus diesem Grund wurden neben einem Gemisch aus Ethanol und *n*-Hexan (1+1, v/v) weitere Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische aus Wasser, Phosphatpuffer, Methanol oder THF genutzt, wie sie bereits von verschiedenen Autoren für den DPPH-Test beschrieben wurden [72,156,159]. Da aber unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel keine Reaktion zwischen dem Oxidans DPPH $^{\bullet}$ und dem jeweiligen Carotinoid stattfand, ist der DPPH-Test nicht geeignet für die Bestimmung der AOA von Carotinoiden. Laut Foti *et al.* (2004) beruht die Reaktion des DPPH $^{\bullet}$ mit phenolischen Substanzen (Zimtsäurederivate) in alkoholischen Lösungen auf einem ET-Mechanismus [151]. Das Redoxpaar DPPH $^{\bullet}$ /DPPH-H besitzt ein Redoxpotential in Alkoholen von $\Delta E_1^0(SHE) = 0,742$ V [160]. Das phenolische Redoxpaar α -TOH/ α -TO $^{\bullet}$ besitzt mit $\Delta E_1^0(SHE) = 0,273$ V [161] ein Redoxpotential, welches eine Reaktion mit DPPH $^{\bullet}$ erlaubt. Diese ist in Abbildung 5 dargestellt.

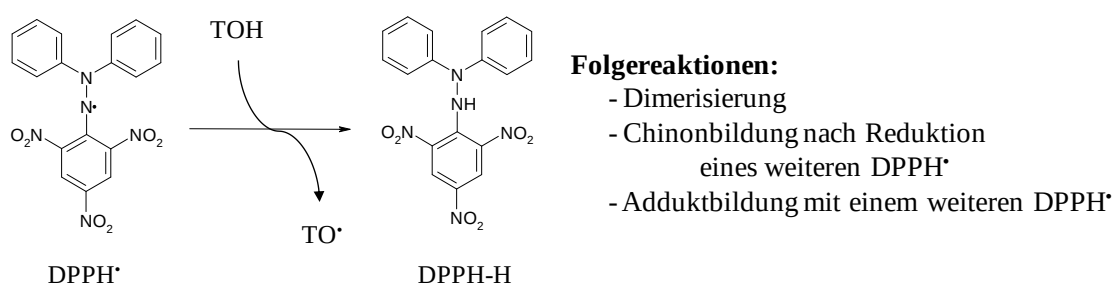


Abbildung 5 Reaktion von α -Tocopherol im DPPH-Test
TOH, α -Tocopherol; TO $^{\bullet}$, Tocopheryloxylradikal

Auch für die Reaktion von Carotinoiden wird ein ET-Mechanismus angenommen [157]. Die für eine Reaktion notwendigen Unterschiede in den Redoxpotentialen besitzt bspw. das Redoxpaar Lykopen/Lykopen $^{\bullet+}$ ($\Delta E_1^0(SHE) = 0,265$ - $0,298$ V) [162]. Die geometrischen Gegebenheiten des Oxidans DPPH $^{\bullet}$ und des Carotinoids als Antioxidans könnten jedoch eine Reaktion verhindert haben. Carotinoide sind sterisch anspruchsvolle Mole-

küle, deren Schlüsselstellen für eine Reaktion mit einem Oxidans im Gegensatz zu α -Tocopherol nicht die Hydroxylgruppe am Rand des Moleküls, sondern die Enden des Chromophors sind [26]. Das Vorhandensein von Iononringen und etwaige Substitutionen wie in vielen Xanthophyllen erschweren die Zugänglichkeit. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die AOC verschiedener Lykopen-Isomere und Lykopen-Abbauprodukte mit jener des (*all-E*)-Lykopens verglichen werden sollte, Lykopen jedoch keine Reaktion gegenüber DPPH[•] zeigte, wurden diese Verbindungen im DPPH-Test nicht weiter untersucht.

In **Pflanzenölen und marinen Ölen** ist Vitamin E das dominierende Antioxidans. Die meisten Pflanzenöle enthalten kaum Carotinoide, daher ist der DPPH-Test gut geeignet, um die AOC von Ölen zu bestimmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher einige handelsübliche Öle in ihrer Kapazität beim Abfangen von DPPH[•] verglichen (Manuskript 2). Vitamin E kann als das Hauptantioxidans in diesen Ölen angesehen werden, da sich zwischen dem Vitamin-E-Gehalt der Öle und ihrer AOC im DPPH-Test eine sehr gute Korrelation ($R=0,999$) zeigte. Auch die AOC verschiedener **carotinoidreicher Säfte** (Tomate, Karotte, Sanddorn, Orange) wurde mittels DPPH-Test untersucht, trotz des Umstandes, dass Carotinoide im DPPH-Test keine Reaktion zeigen. Auch hier zeigte sich wieder eine sehr gute Korrelation zwischen der AOC im DPPH-Test und dem Vitamin-E-Gehalt ($R=0,945$) bzw. der AOC und der Summe aus den Vitamin-E- und Carotinoidgehalten ($R=0,999$). Tocopherole und Tocotrienole sind somit die Antioxidantien dieser Säfte, welche die AOC der Säfte im DPPH-Test ausmachen, da Carotinoide aufgrund mangelnder Reaktivität in diesem Test keinen Beitrag zur lipophilen AOC leisten. Bei der Anwendung des DPPH-Tests für carotinoidreiche Lebensmittel muss jedoch bedacht werden, dass Carotinoide eine hohe Eigenabsorption im Bereich des Absorptionsmaximums des DPPH[•] ($\lambda=500-600$ nm) haben. Daher ist eine Messung der Eigenabsorption des verdünnten Saftes und dessen Subtraktion von der DPPH-Messung notwendig, ähnlich wie es bei der Bestimmung der AOC von anthocyanreichen Säften und Rotwein im DPPH-Test [23,150] beschrieben wurde.

Vitamin E ist mit Gehalten von 20-25 μ M auch in humanem **Plasma** ein wichtiges lipophiles Antioxidans. Aufgrund der guten Korrelationen von Vitamin-E-Gehalt und der lipophilen AOC im DPPH-Test in Lebensmittelproben, wurde der DPPH-Test auch zur Untersuchung der lipophilen AOC von Plasma angewandt [163]. Dabei zeigte sich unter Nutzung des Plasmas einer Humanstudie mit 10 Probandinnen eine gute Korrelation

von Vitamin-E-Gehalt und DPPH-Wert ($R=0,48$) (Manuskript 1), so dass folglich die lipophile AOC von Plasma im DPPH-Test hpts. durch den Vitamin-E-Gehalt bestimmt wird.

Abschließend lässt sich postulieren, dass der DPPH-Test nicht zur Bestimmung des antioxidativen Potentials von Carotinoiden, von Lycopin, seinen Isomeren und Abbauprodukten geeignet ist. Dies unterstützt die Erkenntnisse von Packer *et al.*, die bereits 1993 Daten zu β -Carotin und dessen Abbauprodukten, den Retinoiden z. B. *all-trans*-Retinsäure (ATRA) publizierten und keine Reaktion mit DPPH $\bullet$ beobachteten [164]. Carotinoide scheinen im Gegensatz zu vielen phenolischen Antioxidantien inert gegenüber dieser Art von RNS zu sein. Daher lässt sich folglich auch keine Aussage über die AOA von Carotinoiden im Vergleich zu anderen lipophilen Antioxidantien wie bspw. Tocopherolen treffen. Der DPPH-Test ist dennoch anwendbar für carotinoidreiche Lebensmittel wie Obst und Gemüse und deren Produkte (Säfte uvm.), da diese Lebensmittel häufig auch große Mengen Vitamin E enthalten. Die tatsächliche lipophile AOC des Lebensmittels im DPPH-Test würde zwar aufgrund mangelnder Reaktivität der Carotinoide unterschätzt werden und müsste bspw. mittels α TEAC-Test ermittelt werden, da aber Tocopherole und Tocotrienole mit DPPH $\bullet$ reagieren, ließe sich durch die Messung des DPPH-Wertes des Lebensmittels der Beitrag von Vitamin E zur lipophilen AOC des Lebensmittels bestimmen. Gleiches könnte für humane Gewebe wie Plasma gelten, denn auch hier spielen Carotinoide neben Vitamin E eine wichtige Rolle als lipophile Antioxidantien.

Für ein tiefgreifendes Verständnis der fehlenden Reaktion zwischen DPPH $\bullet$ und Carotinoiden sind weitere Studien erforderlich.

4.1.2 α TEAC-Test

Das von Miller *et al.* (1996) zur Messung von Carotinoiden entwickelte Trolox $^{\text{®}}$ Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)-Testsystem basiert auf der Reduktion des farbigen 2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Radikalkations (ABTS $\bullet^{+}$) durch Antioxidantien [70]. Daher wird der Test häufig auch als ABTS $\bullet^{+}$ -Bleichung bezeichnet. Das ABTS $\bullet^{+}$ besitzt ein breites Absorptionsmaximum um 730 nm ($\lambda_{\text{max}}=734$ nm, $\epsilon=15\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, in Wasser [165]). Die Reaktion ist in Abbildung 6 am Beispiel der reduzierenden Wirkung von Lycopin dargestellt. Miller *et al.* (1996) setzten Trolox $^{\text{®}}$ als Referenz ein [70]. Dieses Testsystem wurde in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt, um Tocopherole, Tocotrienole und Carotinoide, und im spezi

ellen Lykopen, seine Konfigurationsisomere und apo-Lykopenoide auf ihre Aktivität in ET-Reaktionen zu untersuchen. Miller und seine Mitarbeiter [70] nutzten je nach Polarität der verwendeten Substanzen verschiedene Lösungsmittel. Während Carotine (β -Carotin, Lykopen) in *n*-Hexan, und Xanthophylle (β -Cryptoxanthin, Lutein, Astaxanthin) in Aceton oder Gemischen aus Aceton und *n*-Hexan gelöst wurden, wurde das als Kalibrierstandard genutzte hydrophile Vitamin-E-Analogon Trolox[®] in Wasser gelöst. Der farbige Redoxindikator ABTS^{•+} wurde in PBS gelöst, so dass je nach zugesetzter Einzelsubstanz (im entsprechenden Lösungsmittel gelöst), entweder ein *biphasiges* Testsystem oder ein *monophasiges* Reaktionsgemisch untersucht wurde [70]. In der vorliegenden Arbeit wurde durch den Austausch des wasserlöslichen Trolox[®] gegen sein fettlösliches Analogon α -Tocopherol erreicht, dass *n*-Hexan sowohl für die Kalibriersubstanz als auch für die Carotinoide und ihre Abbauprodukte als Lösungsmittel genutzt werden konnte und damit die Reaktionsbedingungen vereinheitlicht wurden. Der Test wurde daraufhin in *α -Tocopherol Equivalent Antioxidant Capacity* (α TEAC) umbenannt.

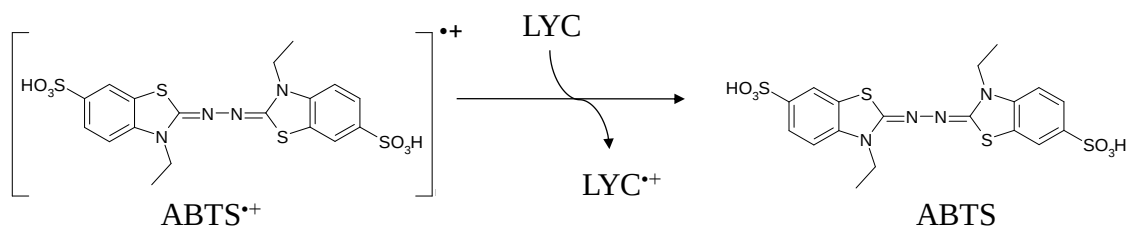


Abbildung 6 Reaktionsmechanismus des α TEAC-Tests am Beispiel von Lykopen (nach Huang *et al.* (2005) [129], modifiziert)

Unterschiedliche Konzentrationen von Vitamin E sowie von verschiedenen Carotinoiden wie Lykopen und Lutein wurden genutzt, um die Reaktionskinetik zwischen den lipophilen Antioxidantien und dem ABTS^{•+} zu untersuchen und die Zeit zu bestimmen, die für eine vollständige Reaktion notwendig ist (siehe Abb. A.3). Die Schüttel- und damit Reaktionszeiten konnten anschließend auf die von Miller *et al.* (1996) und Böhm *et al.* (2002) bereits angewandten 30 s [70,71] bei 14.000 min⁻¹ festgelegt werden. Damit ist die in dieser Arbeit verwendete ABTS^{•+}-Bleichmethode schneller als die von Pellegrini *et al.* (1999) publizierte Methode. Eine vollständige Reaktion verschiedener antioxidativ wirksamer Tomateninhaltsstoffe wie Lykopen, β -Carotin, Ferula- und Chlorogensäure konnte diese Arbeitsgruppe erst nach 1-2 min beobachten [166]. Ursache könnte die Nutzung von K₂S₂O₈ anstelle von MnO₂ zur Herstellung des ABTS^{•+} sein, sowie die Zugabe der lipophilen Substanzen in Etha-

nol (*monophasiges* Reaktionsgemisch). Basierend auf der Entfärbung des $\text{ABTS}^{\bullet+}$ innerhalb eines definierten Zeitraumes, wurde für jede untersuchte Substanz und jeden Lebensmittelextrakt eine α -Tocopheroläquivalente Antioxidative Kapazität (α TEAC-Wert) ermittelt. Die Aktivität von α -Tocopherol hatte hierbei den Wert 1. Jede Substanz mit einem höheren Wert verdeutlicht eine höhere Aktivität in diesem Testsystem.

Die optimierte α TEAC-Methode wurde darauffolgend zur Bestimmung der AOA der verschiedenen **Vitamin-E**-wirksamen Tocochromanole eingesetzt (Manuskript 1). Wie bereits im DPPH-Test beobachtet (Kapitel 4.1.1) zeigte auch im α TEAC-Test die Art der Seitenkette keinen signifikanten Einfluss auf die AOA. Wie bereits von Kranl *et al.* (2005) für die 4 Vitamin-E-aktiven Tocopherole beobachtet [167], veränderte auch bei den Tocotrienolen das Methylierungsmuster die AOA nicht. Schlüsselstelle für die Reduktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ im α TEAC-Test war, wie bereits im DPPH-Test ausgeführt, die Hydroxylgruppe am Chromanring.

Mit der optimierten α TEAC-Methode wurden anschließend die **AOA verschiedener nahrungsrelevanter Carotinoide im Vergleich zu Lycopin** bestimmt (Manuskript 2). Dabei folgten die Aktivitäten der untersuchten Carotinoide den Reaktivitäten gegenüber Ein-Elektronen-Oxidationsmitteln. Innerhalb der vom α - bzw. β -Carotin abgeleiteten Carotinoide sanken die AOA mit steigendem Redoxpotential (aus [162]). Abbildung A.5 verdeutlicht die Korrelation des Redoxpotentials, gemessen gegen die Standard-Wasserstoff-Elektrode ($\Delta E_1^0(\text{SHE})$), und der AOA, gemessen mittels α TEAC-Test. Das Redoxpotential von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ wurde unter gleichen Bedingungen mit $\Delta E_1^0(\text{SHE})=680$ mV bestimmt [168]. Für eine Reaktion des Carotinoids mit dem $\text{ABTS}^{\bullet+}$ und einer Übertragung eines Elektrons muss das Carotinoid ein niedrigeres Redoxpotential besitzen. Für das azyklische Carotin Lycopin wurde aufgrund der hohen Elektronendichte in der Polyen-Kette das niedrigste Redoxpotential aller hier getesteten Carotinoide publiziert ($\Delta E_1^0(\text{SHE})=265\text{-}298$ mV; aus [162]) und gleichzeitig die höchste AOA im α TEAC-Test gemessen. In den carbonylhaltigen Carotinoiden (Echinenon, Canthaxanthin und Astaxanthin) führt die stärkere Delokalisation von Elektronen (+M-Effekt) zur Verringerung der Elektronendichte entlang der Polyenkette. Die folglich höheren Redoxpotentiale (z. B. $\Delta E_1^0(\text{SHE})_{\text{Astaxanthin}}=450$ mV; aus [162]) senken die Reaktivität gegenüber dem $\text{ABTS}^{\bullet+}$ und erschweren die Bildung eines stabilen Astaxanthin $^{\bullet+}$ im Vergleich zu Carotinen, wie von Rice-Evans *et al.* (1997) [26] postuliert. Eine Hydroxylierung des β -Iononringes in den 3- und/oder 3'-

Positionen, wie in β -Cryptoxanthin, Lutein und Zeaxanthin, beeinflusst dagegen die AOA im α TEAC-Test nicht, da die Hydroxylgruppen nicht mit dem Polyen-System konjugiert sind. Die hydroxylierten Carotinoide wiesen ähnliche AOA wie β -Carotin auf. Neben den Redoxpotentialen von Carotinoiden sind auch die Ionisierungspotentiale (IP), also die Dissoziationsenergie zur Abgabe eines Elektrons, bzw. die Energien der höchstbesetzten Molekülorbitale (E_{HOMO}) für eine ET-Reaktion und anschließende Bildung von $\text{Car}^{\bullet+}$ wichtig [23]. Abbildung A.6 zeigt die sehr guten Korrelationen von IP (aus [169]) und dem α TEAC-Wert bzw. E_{HOMO} (aus [170]) und dem α TEAC-Wert. Die reduzierenden Eigenschaften von Carotinoiden hängen folglich von Ionisierungspotentialen, Redoxpotentialen und E_{HOMO} der Substanzen ab, und demnach von der chemischen Struktur des Carotinoids.

Um die AOA von **Lykopin auch im Vergleich zu anderen lipophilen Antioxidantien** einordnen zu können, wurden verschiedene nahrungsrelevante, phenolische Substanzen untersucht, wie die natürlichen Antioxidantien α -Tocopherol, Tyrosol und Ellagsäure sowie verschiedene synthetische Antioxidantien (BHA, BHT, Gallate). Zudem wurde die AOA des schwefelhaltigen, physiologisch wichtigen Antioxidans DHLA bestimmt. Einzig die Ellagsäure, das Dimer der Gallussäure, zeigte aufgrund seiner ausgedehnten konjugierten Polyphenolstruktur eine dem Lykopin vergleichbar hohe AOA im α TEAC-Test (Abb. A.7), wie sie bereits von Ivekovic *et al.* (2005) beobachtet wurde [171]. Aufgrund der „kleinen“ phenolischen Struktur des Tyrosols [172] und sterischer Hinderungen in α -Tocopherol als auch BHT und BHA durch Methyl- oder *tert*-Butylgruppen in *ortho*-Stellung zur phenolischen OH-Gruppe [173] wirkten diese lipophilen Substanzen im α TEAC-Test nur etwa 10-25 % so antioxidativ wie Lykopin. Auch die ebenso geringe AOA von DHLA ist strukturell bedingt. In der Struktur der DHLA fehlen benachbarte funktionelle Gruppen, welche die bei der Reduktion entstehende Disulfidgruppe über Konjugation stabilisieren. Die synthetischen Gallate (PG, OG und LG) zeigten eine von der Kettenlänge unabhängige, etwa 50 % niedrigere AOA als Lykopin. Die ermittelten AOA für die Vergleichssubstanzen, basierend auf der Reduktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$, bestätigen die bereits publizierten Daten verschiedener Autoren [126,167,171,172,174].

Auch **im Vergleich zu typischen Vertretern wasserlöslicher Antioxidantien**, wie Ascorbinsäure, Harnsäure und verschiedenen phenolischen Substanzen, zeigte Lykopin eine hohe AOA (Abb. A.8). Einzig einige Flavonoide wie Epicatechin, Rutin (ein Quercetinglykosid) und Phloridzin (ein Phloretinyglykosid) zeigten vergleichbar hohe

AOA aufgrund ihrer ausgedehnten konjugierten Polyphenolstrukturen. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen publiziert, waren die AOA von Ascorbinsäure, Harnsäure, Kaffee- und Chlorogensäure und des synthetischen wasserlöslichen Vitamin-E-Analogons Trolox[®] untereinander [147,171] und auch mit der AOA von α -Tocopherol vergleichbar, jedoch jeweils 75 % niedriger als die AOA von Lykopen. Trotz einiger Veränderungen in der Methodik des ABTS^{•+}-Testsystems zur Messung lipophiler Antioxidantien (Generierung des ABTS^{•+}, Nutzung eines *biphasigen* Systems) bestätigten sich bei der Anwendung für hydrophile Substanzen die ermittelten AOA im Vergleich zu den publizierten Methoden von Re *et al.* (1999) [165], Benavente-Garcia *et al.* (2000) [174] und Ivekovic *et al.* (2005) [171].

Im Vergleich zu anderen lipophilen und hydrophilen Antioxidantien zeigte sich, dass die reduzierende AOA von Lykopen im α TEAC-Test nur von wenigen anderen Antioxidantien erreicht wird und Lykopen zu den stärksten reduzierenden Antioxidantien *in vitro* zu zählen ist.

Diskutiert wird, ob die geometrische Konfiguration von Carotinoiden Einfluss auf die AOA hat. Bei der Untersuchung von **Lykopen-Isomeren** im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte im α TEAC-Test kein signifikanter Einfluss auf die AOA beobachtet werden (Manuskript 3). Typische *mono*-(Z)-Isomere des Lykopins ((5Z)-, (9Z)-, (13Z)-Lykopen), wie sie bspw. bei der Erhitzung von Tomatenprodukten entstehen [86] und sich auch im Plasma in größeren Mengen finden [97], zeigten die gleiche AOA wie das (*all-E*)-Isomer. Der α TEAC-Test beruht auf der Reduktion eines Chromophors und hängt damit insbesondere vom Redoxpotential der reagierenden Verbindungen und möglichen sterischen Hinderungen ab (siehe Seite 33). Da die Redoxpotentiale aller Lykopen-Isomere aufgrund gleicher Konstitution und Konformation annähernd gleich sein dürften, und die Lykopen-Isomere trotz unterschiedlicher räumlicher Geometrie für das ABTS^{•+}-Radikal gut zugänglich sind, war ein signifikanter Unterschied in der AOA im α TEAC-Test auch nicht zu erwarten. Auch das in *Tangerine*-Tomaten vorkommende *tetra-Z*-Isomer (7Z,9Z,7'Z,9'Z)-Lykopen wirkte trotz seiner, aufgrund von 4 *cis*-Doppelbindungen, mehrfach gewinkelten räumlichen Struktur ähnlich antioxidativ wie die anderen Lykopen-(Z)-Isomere. Damit konnten die von Böhm *et al.* (2002) und Fröhlich (2007) postulierten Aktivitätsunterschiede [71,98] zwischen einzelnen Isomeren des Lykopins widerlegt werden. Die Ähnlichkeiten in den AOA, die bereits für die Isomere einiger Carotinoide (α -Carotin, β -Carotin, Zeaxanthin) bei der Reaktion mit ABTS^{•+} publiziert

wurden [71,175], konnten nun auch für Lycopin nachgewiesen werden. Die von Böhm *et al.* (2002) und Fröhlich (2007) detektierten signifikanten Unterschiede in den AOA zwischen einigen Isomeren des jeweiligen Carotinoids sind mglw. auf analytische Ursachen (Konzentration des Isomers, Reinheit, mögliche Abbaureaktionen) zurückzuführen [71,98]. Aus den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen heraus lässt sich postulieren, dass die Isomerisierung von (*all-E*)-Lycopin zu seinen (*Z*)-Isomeren, die während der Verarbeitung von lycopinreichen Lebensmitteln auftritt, keinen signifikanten Einfluss auf die AOA des Lebensmittels hat.

Die für Lycopin-Isomere erfolgreich angewandte α TEAC-Methode wurde anschließend genutzt, um die AOA verschiedener **Lycopin-Abbauprodukte**, den sog. *apo-Lycopinoiden*, zu untersuchen (Manuskript 4). Fünfzehn sog. *mono*-apo-Lycopinoide mit unterschiedlichen Kettenlängen und verschiedenen endständigen funktionellen Gruppen als Alkohol, Aldehyd, Carbonsäure oder deren Ester wurden auf ihre reduzierenden Aktivitäten im α TEAC-Test analysiert. Innerhalb der Gruppe von apo-Lycopinalen zeigte sich eine starke Abhängigkeit bezüglich der Kettenlänge. Je kürzer die Kohlenwasserstoffkette, desto geringer war die AOA. Ursache war die Abnahme der Anzahl konjugierter Doppelbindungen. Die AOA des apo-6'-Lycopinals war etwa 60 % geringer als die des Lycopins, trotz der gleichen Anzahl konjugierter Doppelbindungen des apo-Lycopinoids ($n=11$) im Vergleich zum Lycopin ($n=11$). Verursacht wurde dies durch den starken -M-Effekt der Carbonylfunktion, welcher die Elektronendichte im Polyen-System verringert und eine Elektronenabgabe an das Oxidans (ABTS^{•+}) erschwert, wie bereits für die carbonylhaltigen Carotinoide Echinenon, Canthaxanthin und Astaxanthin beschrieben werden konnte (Manuskript 2). Die AOA der apo-Lycopinale sank mit steigender E_{HOMO} in der Reihenfolge: apo-6' > apo-8' > apo-10' > apo-12' > apo-14' > apo-11. Die schrittweise Abnahme der AOA mit sinkender Kettenlänge bei gleicher endständiger Funktion bestätigte sich auch für die verwandten apo-Lycopinole, apo-Lycopinsäuren und deren Ester. Ausgehend von einer gleichen Kettenlänge, z. B. apo-10'- oder apo-14'-Lycopinoide, sank die AOA in Abhängigkeit von der funktionellen Gruppe in der Reihenfolge: Alkohol = Säure > Aldehyd > Ester. Keines der in dieser Arbeit auf ihre AOA untersuchten apo-Lycopinoide, von denen einige bereits in Humanplasma oder Tomatenprodukten quantifiziert werden konnten, erreichte die AOA von Lycopin.

Um die **Anwendung** der optimierten α TEAC-Methode **auf Lebensmittel** zu testen, wurde auch die AOC von Lebensmittelproben bestimmt (Manuskript 2). Carotinoide zählen hier neben Vitamin E zu den wichtigsten lipophilen Antioxidantien in Lebensmitteln. Daher wurden die Gehalte dieser Substanzen in verschiedenen Säften und Ölen bestimmt. Die AOC im α TEAC-Test sank in der Reihenfolge: Olivenöl > Fischöl > Sonnenblumenöl = Walnussöl. Das im DPPH-Test 5-fach stärker als Sonnenblumen- oder Walnussöl antioxidativ wirksame Fischöl, war im α TEAC-Test nur etwa doppelt so antioxidativ wie diese Pflanzenöle (Manuskript 2). Zwischen der lipophilen AOC der vier Ölproben und ihren Vitamin-E-Gehalten ergab sich nur eine geringe Korrelation ($R=0,589$). Erst bei Ausschluss des Olivenöls, das anders als im DPPH-Test, trotz geringer Vitamin-E-Gehalte eine hohe AOC im α TEAC-Test aufwies, konnte eine sehr gute Korrelation ($R=0,999$) errechnet werden. Spuren von Lutein und Zeaxanthin, die quantifiziert werden konnten, sowie spezifische, fettlösliche, phenolische Verbindungen des Olivenbaums wie Tyrosol, Hydroxytyrosol und Oleuropein, die als gute Antioxidantien im α TEAC-Test bekannt sind [174], könnten die AOC des Olivenöls stark positiv beeinflusst haben. Hinsichtlich der untersuchten Saftproben ergab sich im α TEAC-Test eine ebenso gute Korrelation ($R=0,981$) von chromatografisch quantifizierten Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalt und der lipophilen AOC, wie sie bereits im DPPH-Test beschrieben wurde (Seite 32). Und auch die Reihenfolge der AOC der Säfte entsprach jener im DPPH-Test. Aufgrund der hohen lipophilen AOA von Carotinoiden im α TEAC-Test im Vergleich zum DPPH-Test, in welchem Carotinoide nicht reagieren, wurden jedoch für die Saftproben mittels α TEAC-Test bis zu 5-fach höhere lipophile AOC ermittelt.

Um die **Beiträge einzelner Carotinoide und von Vitamin E zur lipophilen AOC** der aufgeführten Säfte zu berechnen, wurden die ermittelten α TEAC-Werte einzelner Tocopherole, Tocotrienole und Carotinoide und die chromatografisch quantifizierten Gehalten dieser Substanzen im jeweiligen Saft herangezogen (für Gehalte: siehe Manuskript 2). Für die aufgrund der genutzten HPLC-vis-Methode in den Säften nicht-quantifizierten Carotinoide (Phytoin, Phytofluin, Neurosporin, γ - und δ -Carotin) wurden die Konzentrationen im Saft aus der Literatur herangezogen [66]. Da die AOA von γ - und δ -Carotin in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt wurden, wurde der α TEAC-Wert dieser Carotinoide aus den Ergebnissen für Lycopin, α - und β -Carotin abgeschätzt. Für γ - und auch δ -Carotin wurde ein Wert von je 3,5 mol α -TE pro Mol in den Berechnungen genutzt. Dabei zeigte sich für den untersuchten Tomatensaft, dass ca. 7 % der lipo-

philen AOC auf Vitamin E zurückzuführen ist, dagegen mehr als 92 % auf Carotinoide, wobei Lykopen aufgrund seiner hohen ABTS^{•+}-reduzierenden Aktivität und der hohen Konzentration im Saft mehr als 81 % der durch Carotinoide erbrachten lipophilen AOC ausmacht (Abb. 7). Zusammengefasst bedeutet das, dass etwa $\frac{3}{4}$ der AOC der lipophilen Fraktion des Tomatensaftes allein durch Lykopen erbracht wird. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche ebenfalls mit dem α TEAC-Test arbeiteten, und ebenfalls ca. 81 % der lipophilen AOC der Tomate auf Lykopen zurückführen konnten [176].

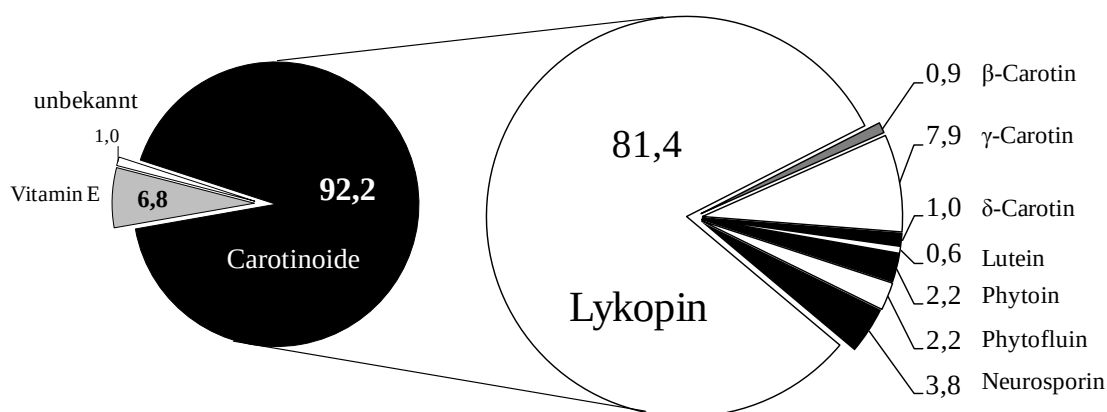


Abbildung 7 Beitrag von Carotinoiden und Vitamin E zur antioxidativen Kapazität von Tomatensaft, gemessen mittels α TEAC-Test
Beitrag (Angaben in %) von Vitamin E und Carotinoiden (links) bzw. einzelner Carotinoide (rechts)

In gleicher Weise wurden auch die Beiträge einzelner Carotinoide und von Vitamin E zur lipophilen AOC von Karottensaft, Sanddornsaft und Orangensaft berechnet. Informationen darüber befinden sich in Tabelle A.1 im Anhang. Etwa ein Drittel der lipophilen AOC des Karotten- und Sanddornsaftes konnte nicht zugeordnet werden. Dies ist mglw. auf die nicht-quantifizierten farblosen azyklischen Carotinoide Phytoin, Phytofluin, Neurospurin und ζ -Carotin sowie die α - und β -Carotin-Vorstufen β -Zeacarotin, γ - und δ -Carotin oder auch andere fettlösliche phenolische Komponenten oder mögliche synergistische Effekte zurückzuführen [57,125]. Diese letztgenannten Carotinoide kommen häufig nur in geringen Mengen in Obst und Gemüse vor und sind daher nur wenig nahrungsrelevant. Ihre AOA wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. In handelsüblichen dunkelorange Karotten trug ζ -Carotin allerdings bis zu 10 % zum Carotingehalt bei; γ -Carotin und β -Zeacarotin nochmals bis zu 6 % [177]. In Abhängigkeit vom Reifegrad wurden in Sanddornbeeren bis zur 5,5 % γ -Carotin und 8,9 % weitere Carotinoide quantifiziert [178]. Diese wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit chromatografisch nicht erfasst. Desweiteren wurden für die Be-

stimmung der lipophilen AOC aller Säfte die unverseiften *n*-Hexan-Extrakte genutzt. Im Gegensatz zum carotinreichen Tomaten- und Karottensaft (v. a. Lycopin, α - und β -Carotin), war für die chromatografische Quantifizierung der Carotinoide sowohl für den Sanddornsaft als auch für den Orangensaft (xanthophyllreich), eine Verseifung des *n*-Hexanextraktes mit KOH notwendig, da Xanthophylle in diesen Pflanzen als *mono*- oder *di*-Ester von verschiedensten Fettsäuren vorliegen [179]. Eine unvollständige Verseifung der Xanthophyllester ist trotz der Optimierung der Verseifungszeiten und der eingesetzten KOH-Konzentrationen möglich. Zudem ist ein Abbau von Carotinoiden durch das Vorhandensein des basischen pH-Wertes möglich. Beides hätte die Unterschätzung der Carotinoidgehalte in den Säften zur Folge. Um einen Abbau von Carotinoiden durch die Verseifung zu vermeiden ist eine *direkte* Quantifizierung der Xanthophyllester zu empfehlen, bspw. mittels LC-MS wie sie bereits von Breithaupt (2004) für Astaxanthinester in Algenextrakten angewandt wurde [180]. Im Orangensaft, der die geringste lipophile AOC aller vier untersuchten Säfte im α TEAC-Test aufwies, trug Vitamin E mit ~16 % den höchsten Anteil bei (Tabelle A.1). Nur 5 % kam durch Carotinoide zustande, wobei sich der Beitrag zu etwa gleichen Anteilen aus Lutein und Zeaxanthin zusammensetzte. Orangen und Orangensaft gelten als Hauptquellen für β -Cryptoxanthin in der westlichen Ernährung [37]. Überraschenderweise konnten im untersuchten Orangensaft jedoch weder β -Cryptoxanthin noch das ebenso wichtige β -Carotin detektiert werden, verursacht mglw. durch Abbaureaktionen bei der Verseifung (siehe oben). Um die lipophile AOC von Orangensaft vollständig aufklären zu können, sollten in zukünftigen Studien auch die AOA weiterer typischer Orangensaft-Xanthophylle (Mutatoxanthin, Auroxanthin) und deren Ester, die in nennenswerten Mengen in Orangensaft identifiziert wurden [181], ermittelt werden.

Abschließend wurde der in dieser Arbeit optimierte α TEAC-Test auch zur Ermittlung der lipophilen AOC von **Plasma** genutzt. In einer Humaninterventionstudie wurde die lipophile AOC von Plasma von 10 Probandinnen mittels des α TEAC-Testes bestimmt [163]. Die AOC variierte in Abhängigkeit vom Studienverlauf zwischen 20 und 25 $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE je L Plasma}$, und korrelierte dabei gut mit dem ebenfalls bestimmten Vitamin-E-Gehalt des Plasmas ($R=0,73$). Eine sehr gute Korrelation würde sich mglw. zwischen dem α TEAC-Wert und der Summe aus Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalten ergeben. Wie in Manuskript 2 gezeigt, wirken die nahrungsrelevanten Carotinoide wie Lycopin, β -Carotin und Lutein 2- bis 4-mal stärker antioxidativ im α TEAC-Test als α -Tocopherol. Die Analyse der Carotinoid-Gehalte im Plasma war jedoch nicht Gegen-

stand der durchgeführten Studie. Dieser könnte in zukünftigen Studien bei Bestimmung der AOC von Plasma im α TEAC-Test helfen, den Beitrag von Carotinoiden zur lipophilen AOC von Plasma aufzuklären.

In der vorliegenden Arbeit konnte mehrfach gezeigt werden, dass der auf der Entfärbung des $\text{ABTS}^{\bullet+}$ basierende α TEAC-Test eine schnelle, direkte und reproduzierbare Methode ist, die sowohl zur Bestimmung der AOA von hydrophilen als auch lipophilen Antioxidantien *in vitro* geeignet ist. Der optimierte α TEAC zeigte Unterschiede in der AOA von Carotinoiden in Abhängigkeit von der Ringstruktur und möglicher Substituenten am Ring. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bezüglich Kettenlänge und endständiger funktioneller Gruppe konnten auch für Lykopen-Abbauprodukte aufgezeigt werden. Ein Einfluss der geometrischen Struktur einzelner Lykopen-Isomere oder der Konstitution einzelner Vitamere des Vitamins E auf die AOA im α TEAC-Test wurden dagegen nicht beobachtet.

4.1.3 FRAP-Test

Ein starkes radikalfangendes Antioxidans reagiert oft auch als starkes Reduktionsmittel [23]. Der *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)-Test basiert auf der Fähigkeit von Antioxidantien Fe^{3+} zu reduzieren [182] (siehe Abb. 8 am Beispiel von Lykopen). Um die Bildung des Fe^{2+} mittels UV-vis-Spektrometer zu quantifizieren, wird das Eisen-Ion von zwei Molekülen 2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ) komplexiert. Der nach der Reduktion des Fe^{3+} vorliegende $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPTZ}_2$ -Komplex besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum ($\lambda_{\text{max}}=593 \text{ nm}$; $\epsilon=22\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in schwefelsaurer Lösung $\text{pH}=4,6$) und ist im pH -Bereich von 3,6 bis 5,6 stabil [183]. Wie die $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Bleichung (TEAC-/ α TEAC-Test; Kapitel 4.1.2) wird auch der FRAP-Test, der bisher fast ausschließlich zur Bestimmung der hydrophilen AOA bzw. AOC eingesetzt wurde, als eine schnelle, robuste, kostengünstige Methode zur Erfassung der AOA bzw. AOC angesehen [131,140].

Da der Fe^{3+} -haltige Komplex nur in sauren wässrigen Lösungen löslich ist, war im Zuge der Optimierung für die Messung lipophiler Antioxidantien ein Austausch des Lösungsmittels gegen unpolare organische Lösungsmittel, in welchen sich Carotinoide gut lösen lassen (*n*-Hexan, MtBE, THF), nicht möglich. Daher wurde in Anlehnung an die Reaktionsbedingungen des α TEAC-Tests ein *biphasiges* Reaktionsprinzip entwickelt. Die quantitative Zusammensetzung der oxidantienhaltigen Lösung (FRAP-Reagenz) wurde von Pulido *et al.* (2000) übernommen [184]. Um die Reaktionskinetik des FRAP-

Tests und die notwendige Reaktionszeit für eine vollständige Reaktion zwischen Oxidans und Antioxidans zu bestimmen, wurden verschiedene Konzentrationen von α -Tocopherol und einzelner Carotinoide mit FRAP-Reagenz umgesetzt (*Thermoschüttler*, 25 °C, 1400 min⁻¹) und die Absorption bei 595 nm nach verschiedenen „Schüttelzeiten“ gemessen.

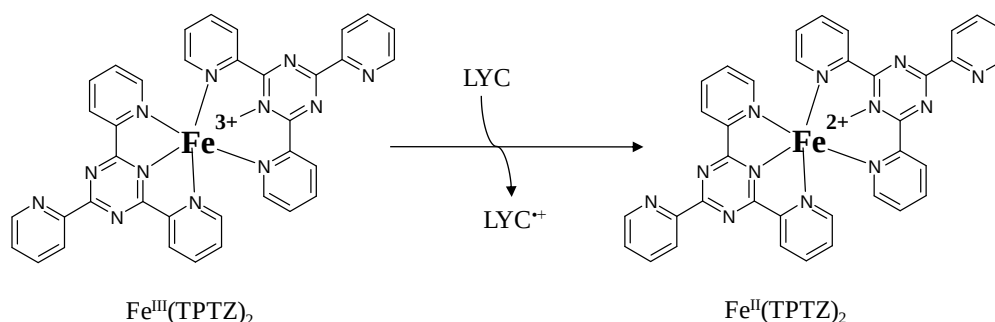


Abbildung 8 Reaktionsmechanismus des FRAP-Tests am Beispiel von Lykopen (nach Huang *et al.* (2005) [129], modifiziert)

Anhand der Ergebnisse, die in Abbildung A.4 beispielhaft für Lykopen dargestellt sind, wurden die Schüttel- und damit Reaktionszeiten auf 6 min festgelegt. Saure pH-Werte können die Isomerisierung und den Abbau von Carotinoiden initiieren [185]. Daher wurde getestet, inwieweit eine 6-minütige Inkubation (25 °C, *Schütteln* bei 1400 min⁻¹) mit saurem, Fe³⁺-freiem FRAP-Reagenz (300 mM Acetatpuffer pH 3,6 + 20 mM TPTZ-Lösung in 40 mM HCl, 10:1, v/v) eine Isomerisierung auslösen kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung A.9 für Lutein und Lykopen dargestellt. Die Umsetzung mit saurem Acetatpuffer führte nicht zu einer gesteigerten Isomerisierung oder zum Abbau von Lykopen und Lutein. Die im FRAP-Test stattfindende Isomerisierung bzw. der Abbau von Carotinoiden ist demnach ausschließlich auf die Reduktion von Fe³⁺ und mögliche Folgereaktionen zurückzuführen. Der FRAP-Test, der bisher nur für hydrophile und schwach hydrophobe Antioxidantien eingesetzt wurde, ist nun auch eine schnelle, einfache, reproduzierbare Methode zur Bestimmung der reduzierenden Eigenschaften von lipophilen Antioxidantien wie Carotinoiden und Vitamin E (Manuskript 1). Auch andere Arbeitsgruppen arbeiteten an einer Optimierung des FRAP-Tests zur Messung lipophiler Antioxidantien. Kürzlich wurde eine lipophile FRAP-Methode unter Verwendung von β -Cyclodextrin publiziert, welche aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht für Lykopen angewandt werden konnte [135] (siehe auch Kapitel 4.2.1, ORAC-Test mit β -CD). Der in der vorliegenden Arbeit optimierte FRAP-Test kann dagegen auch zur Ermittlung der lipophilen AOA stark apolarer Verbindungen wie Lykopen genutzt werden.

Der optimierte FRAP-Test wurde anschließend genutzt, um erstmals die AOA aller 8 Vitamin-E-aktiven **Tocopherole und Tocotrienole** gegenüber Fe^{3+} zu ermitteln (Manuskript 1). Die beiden trimethylierten α -Tocochromanole zeigten die höchste AOA. Im Gegensatz zum α TEAC-Test, aber ähnlich dem DPPH-Test, war die mittels FRAP-Test ermittelte AOA der β -, γ - und δ -Vitamine ca. 20-30 % niedriger als die der α -Vitamine. Wie bereits im DPPH- und α TEAC-Test beobachtet, hatte die Art der Seitenkette keinen Einfluss auf die AOA. Als Schlüsselstelle für die reduzierende Aktivität im FRAP-Test, konnte wie bei der Reduktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ im α TEAC-Test (Seite 35) und der Reduktion des $\text{DPPH}^{\bullet}$ (Seite 30), die Hydroxylgruppe am Chromanring identifiziert werden.

Beim Vergleich der Fe^{3+} -reduzierenden Aktivität von Lykopen zu anderen **Carotinoiden** konnte beobachtet werden, dass das Xanthophyll Rubixanthin die höchste AOA zeigte. Sowohl Lykopen als auch β -Cryptoxanthin, Lutein und Zeaxanthin waren jeweils etwa doppelt so antioxidativ wie α -Tocopherol (Manuskript 2). Erstaunlicherweise zeigten weder α -Carotin noch β -Carotin eine Fe^{3+} -reduzierende Wirkung bei Anwendung des optimierten FRAP-Tests. Dies bestätigt die Ergebnisse von Pulido *et al.* (2000), die ebenfalls keine FRAP-Aktivität für β -Carotin beobachteten [184]. Wie bereits im α TEAC-Test beschrieben, hat das sich aus der chemischen Struktur ergebende Redoxpotential großen Einfluss auf die AOA von Carotinoiden (Seite 35). Abbildung A.10 verdeutlicht den Zusammenhang von Redoxpotential und FRAP-Aktivität am Beispiel einiger Carotinoide. Die Korrelation zwischen FRAP-Werten und den Redoxpotentialen der Carotinoide (aus [162]) ist mit $R=0,50$ deutlich schlechter als im α TEAC-Test, obwohl beide auf einem ET-Mechanismus beruhen. Die schlechtere Korrelation setzte sich auch beim Vergleich von Ionisierungspotential (IP, aus [169]) und FRAP-Werten bzw. E_{HOMO} (aus [170]) und FRAP-Werten fort ($R=0,52$; $R=0,39$; Abb. A.11). Ursache für die vergleichsweise schlechte Korrelation zwischen Redoxpotentialen, IP bzw. E_{HOMO} und FRAP-Werten ist v. a. die fehlende FRAP-Aktivität von α - und β -Carotin. Sterische Hinderungen zwischen den starren Strukturen der *bicyklischen* Carotine (Strukturen siehe Abb. 2) und dem ebenfalls sterisch anspruchsvollen $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2$ -Komplex (chemische Struktur siehe Abb. 8) erschweren mglw. eine Reaktion zwischen dem komplexierten Fe^{3+} und der Polyenkette des Carotins. In eigenen vorangegangenen Studien zeigten weder das (*all-E*)- noch die nahrungsrelevanten (*Z*)-Isomere des β -Carotins, wie (*9Z*)-, (*13Z*)- oder (*15Z*)- β -Carotin, Fe^{3+} -reduzierende Aktivität [175]. Erst durch das Vorhandensein von Hydroxyl- oder

Carbonylgruppen an den Iononringen, wie in Xanthophyllen, wird eine Reaktion mit dem FRAP-Reagenz möglich. Die konjugierten Carbonylgruppen in den β -Iononringen, bspw. in Echinenon, Canthaxanthin und Astaxanthin, senken jedoch gleichzeitig die Elektronendichte im Molekül (+M-Effekt) und damit die Reduktionskraft der Carotinoide gegenüber dem FRAP-Reagenz (siehe Manuskript 2).

Beim Vergleich der Fe^{3+} -reduzierenden AOA von **Lykopen mit der anderer lipophiler Antioxidantien** ähnelten die Ergebnissen des FRAP-Tests denen der $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Reduktion im αTEAC -Test (Seite 37). Einzig Ellagsäure, das Dimer der Gallussäure, besaß einen ähnlich hohen FRAP-Wert wie Lykopen (Abb. A.12), mglw. aufgrund ihrer tetrazyklischen konjugierten Phenolstruktur (Abb. A.1). Die in dieser Arbeit ermittelte hohe AOA von Ellagsäure gegenüber anderen lipophilen Antioxidantien im FRAP-Test bestätigt die Ergebnisse von Soobrattee *et al.* (2005) [186]. BHT zeigte keine AOA im FRAP-Test, wie auch kürzlich publiziert wurde [186]. BHA wies nur sehr geringe AOA auf (Abb. 38). Für Tyrosol konnte eine im Vergleich zu Lykopen etwa 6-fach niedrigere AOA bestimmt werden. Dies bestätigt den von Mateos *et al.* (2008) bestimmten FRAP-Wert für Tyrosol [172]. Die geringe reduzierende AOA geht mglw. auf die „kleine“ phenolische Struktur des Tyrosols zurück, wie bereits im αTEAC -Test beschrieben (Seite 36). Das Ergebnis für die Fe^{3+} -reduzierende AOA für die drei Gallate unterscheidet sich von jenem bei der Reduktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ im αTEAC -Test (Seite 36, sowie Abb. A.7 und A.12). Im FRAP-Test könnte der mit steigender Kettenlänge des Esters steigende Raumbedarf (sterischer Anspruch) die Ursache für die sinkende AOA sein. Für DHLA wurde eine gegenüber Lykopen 75 % niedrigere AOA ermittelt werden. Damit bestätigt sich die von GÜNGÖR *et al.* (2011) publizierte geringe AOA von DHLA [126]. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese vieler Wissenschaftler [126,130, 182], dass thiolhaltige Antioxidantien wie DHLA, Glutathion oder Albumin aufgrund der Nutzung eines sauren pH-Wertes und der damit verbundenen Deprotonierung der Thiolgruppen nur geringe AOA im FRAP-Test besitzen. Eine Anwendung des FRAP-Tests zur Ermittlung der AOA von Substanzen, deren Aktivität auf der Reduktion von Thiolgruppen beruht, unterschätzt die tatsächliche AOA dieser Substanzen.

Auch ein **Vergleich zu** typischen Vertretern **wasserlöslicher Antioxidantien**, wie Ascorbinsäure, Harnsäure und verschiedenen phenolischen Substanzen bekräftigt die hohe AOA von Lykopen (Abb. A.13). Die publizierten FRAP-Daten von Benzie & Strain (1996), Pulido *et al.* (2000), Nilsson *et al.* (2005) und Apak *et al.* (2007) [182,

184,187,188] konnten trotz der Veränderung der Durchführung des FRAP-Tests bestätigt werden. Viele der hydrophilen Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, Harnsäure, Kaffeesäure und Trolox[®], zeigten im FRAP-Test 50 % niedrigere AOA als Lycopin und damit dem α -Tocopherol vergleichbare AOA. Die im FRAP-Test für diese Antioxidantien und Phenolcarbonsäuren bestimmten reduzierenden AOA glichen denen des α TEAC-Tests (Seite 37, sowie Abb. A.8). Dagegen unterschieden sich in der Gruppe der Flavonoide die FRAP-Werte deutlich von den α TEAC-Werten. Viele Flavonoide zeigten im α TEAC-Test eine leicht geringere bis ähnliche AOA wie Lycopin, im FRAP-Test dagegen wiesen einige Flavonoide wie Cyanidin, Epigallocatechin-3-gallat und Quercetin eine 2- bis 3-fach höhere AOA auf. Die Eigenschaft einiger Polyphenole zur Chelatbildung mit Übergangsmetallen, welche Carotinoide nicht besitzen, kann nicht die Ursache sein (siehe Kapitel 1.2.2), wohl aber die hohe Anzahl konjugierter phenolischer OH-Gruppen. Die 60 % geringere AOA von Catechin gegenüber Quercetin macht dies deutlich. Catechin besitzt zwar eine große Polyphenolstruktur, jedoch sind die drei phenolischen Ringe anders als im Quercetin nicht miteinander konjugiert [186,188]. Die mit Abstand höchste FRAP-Aktivität, 3-mal höher als Lycopin, konnte für das Anthocyanidin Cyanidin bestimmt werden. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den FRAP-Daten von Soobrattee *et al.* (2005) [186] und zeigt, dass das konjugierte Kohlenwasserstoffgerüst von Lycopin (11 CDB) eine hohe Fe^{3+} -reduzierende AOA ermöglicht, die konjugierte Polyphenolstruktur von Anthocyanidinen aber noch effektiver reduzierend wirkt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Reduktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ im α TEAC-Test (Seite 37) konnte auch hinsichtlich der Fe^{3+} -reduzierenden Aktivität von **Lycopin-Isomeren** im FRAP-Test kein von der Stellung oder Anzahl an *cis*-Doppelbindungen abhängiger Unterschied beobachtet werden (Manuskript 3). Alle vier untersuchten Lycopin-(*Z*)-Isomere zeigten die gleiche AOA wie das (*all-E*)-Isomer. Damit lässt sich postulieren, dass die Isomerisierung des Lycopins im Lebensmittel oder biologischen Geweben zu (*Z*)-Isomeren nicht den Beitrag des Lycopins zum Fe^{3+} -reduzierenden Status verändert.

Wie auch bei den Lycopin-Isomeren zeigten sich bei den Abbauprodukten des Lycopins, den **apo-Lycopinoiden**, vergleichbare Tendenzen zwischen den AOA, welche im FRAP- und α TEAC-Test ermittelt wurden. Bei gleicher endständiger funktioneller Gruppe z. B. den apo-Lycopinalen nahm mit sinkender Kettenlänge, und

somit sinkender Anzahl konjugierter Doppelbindungen, die AOA ab (Manuskript 4). Während die langkettigen Verbindungen apo-6'- und apo-8'-Lykopinal noch 50 % bzw. 35 % der AOA des Lycopins besaßen, zeigten die kurzkettigen apo-Lycopinale keinerlei messbare Fe^{3+} -reduzierende Aktivität. Dies bestätigt die geringen bzw. nicht messbaren AOA, die im FRAP-Test mit carbonylhaltigen Carotinoiden wie Astaxanthin, Canthaxanthin oder Echinenon erzielt wurden (Seite 44, sowie Manuskript 2), da auch bei den apo-Lycopinalen die konjugierten Ketofunktionen zwar das Polyen-System vergrößern, damit jedoch die Elektronendichte in der konjugierten Kette verringern (+M-Effekt) und so die Fähigkeit zur Elektronenabgabe an das Oxidans (hier $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPTZ}_2$) verringern. Die E_{HOMO} der Substanzen beeinflusste, wie bereits im αTEAC -Test, die AOA sehr. Im Gegensatz zum αTEAC -Test zeigte sich im FRAP-Test, dass ab einer E_{HOMO} von ca. 8 eV (apo-10'-Lykopinal) eine Reaktion der apo-Lycopinale mit dem FRAP-Reagenz nicht mehr stattfand. Dieser Unterschied ist mglw. auf die Redoxpotentialunterschiede zwischen den beiden verwendeten Oxidationsmitteln zurückzuführen ($\text{ABTS}^{\bullet+}/\text{ABTS}$ 680 mV, $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 770 mV; aus [129]). Bei gleicher Kettenlänge der apo-Lycopinoide zeigten die apo-Lycopinoide die höchste Aktivität, gefolgt von den apo-Lycopinsäuren. Mit großem Abstand folgten dann die apo-Lycopinale und apo-Lycopinsäureester aus den bereits im αTEAC -Test beschriebenen Gründen. Bezogen auf die apo-10'-Lykopinoide zeigte der Alkohol etwa 50 % der AOA von Lycopin, die Säure nur noch ca. 25 % der AOA von Lycopin. Dagegen war für den entsprechenden Aldehyd und den Ethylester keine FRAP-Aktivität messbar. Gleiches war für die Gruppe der apo-14'-Lykopinoide beobachtbar. Wie bereits im αTEAC -Test (Seite 38), zeigte keines der 15 untersuchten apo-Lycopinoide eine dem Lycopin vergleichbare oder sogar höhere Fe^{3+} -reduzierende Aktivität.

Wie bereits für die Reduktion des $\text{ABTS}^{\bullet+}$ im αTEAC -Test und der Reduktion von $\text{DPPH}^{\bullet}$ geschehen (Seiten 39 und 32), wurden auch die Fe^{3+} -reduzierenden AOC der verschiedenen Säfte und Öle untersucht, um die Anwendung der entwickelten **FRAP-Methode an Lebensmitteln** zu testen (Manuskript 2). Ähnlich den Ergebnissen bei der Reduktion von $\text{DPPH}^{\bullet}$ und von $\text{ABTS}^{\bullet+}$, zeigte sich für vier Öle auch im FRAP-Test nur eine sehr geringe Korrelation zwischen dem Vitamin-E-Gehalt und der AOC ($R=0,232$). Nach Ausschluss des Olivenöls, welches aufgrund weiterer lipophiler phenolischer Inhaltsstoffe wie Tyrosol und Xanthophyllen trotz niedriger Vitamin-E-Gehalte eine hohe AOC zeigte, korrelierten für die verbliebenen Pflanzenöle die FRAP-Werte sehr gut mit den Vitamin-E-Gehalten ($R=0,995$). Fischöl, welches den höchsten

Vitamin-E-Gehalt aufwies, zeigte kaum FRAP-Aktivität, wobei der hohe Gehalt von oxidationsanfälligen PUFA's der Grund sein könnte (Manuskript 2). Die Fe^{3+} -reduzierende Aktivität beruht also v. a. auf der AOA von Vitamin E, wobei in Abhängigkeit von Herkunft und Verarbeitung des Öls weitere Inhaltsstoffe (lipophile phenolische Antioxidantien wie Tyrosol, sowie Carotinoide) einen Beitrag leisten können. Da Fe^{3+} -Ionen starke Prooxidantien sind, welche die LPO von PUFA's im Öl auslösen können, hat auch die Fettsäurezusammensetzung einen erheblichen Einfluss auf die Fe^{3+} -reduzierenden Eigenschaften der Ölinhaltsstoffe. Bei der Analyse der Saftproben im FRAP-Test wurden ähnliche lipophile AOC wie im α TEAC-Test ermittelt (Manuskript 2). Die lipophilen AOC waren jedoch, aus den bereits im α TEAC-Test beschriebenen Gründen (Seite 39), etwa 5-fach höher als im DPPH-Test. Die Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte sowie die AOC sanken analog der im DPPH-Test und α TEAC-Test beobachteten Reihenfolge (Seiten 39 und 32). Eine sehr gute Korrelation ($R=0,942$) zwischen dem FRAP-Wert und dem Gesamt-Gehalt aus Carotinoiden und Vitamin E wurde beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die lipophilen Substanzen Vitamin E, Lycopin und Xanthophylle in der Lage sind Fe^{3+} zu reduzieren, und so andere wertgebende Bestandteile des Lebensmittels, wie PUFA's, vor Oxidation schützen können. Im Folgenden wird nun der Beitrag einzelner lipophiler Substanzen zur AOC der untersuchten Säfte im FRAP-Test betrachtet – analog der Vorgehensweise im α TEAC-Test (Seite 39). Da die AOA von γ - und δ -Carotin im FRAP-Test aufgrund mangelnder Nahrungsrelevanz nicht gemessen wurden, wurden deren AOA aus den verwandten Carotinoiden Lycopin, α - und β -Carotin abgeleitet und auf ~ 1 mol α -TE pro Mol beziffert. Etwa 44 % der lipophilen AOC des untersuchten Tomatensaftes war auf Carotinoide zurückzuführen und etwa 7 % auf Vitamin E (Abb. 9). Lycopin ist das quantitativ wichtigste Carotinoid in der Tomate (siehe Abb. 3) und besitzt im FRAP-Test im Vergleich zu den anderen Carotinoiden und Vitamin E eine hohe AOA. Wie im α TEAC-Test leistete Lycopin daher auch im FRAP-Test den größten Beitrag zur AOC des Tomatensaftes, mit einem Anteil von 93 % in der Klasse der Carotinoide. Mit einem Anteil von ca. 41 % an der lipophilen AOC des Tomatensaftes gemessen mittels FRAP-Test ist Lycopin damit die wichtigste Fe^{3+} -reduzierende Verbindung im lipophilen Extrakt von Tomatenprodukten. Beim Karottensaft konnten nur 9 % der FRAP-Aktivität auf Carotinoide und Vitamin E zurückgeführt werden. In der Klasse der

Carotinoide waren α - und β -Carotin sowie Lutein dominierend mit Anteilen von 20-50 % (Tabelle A.2).

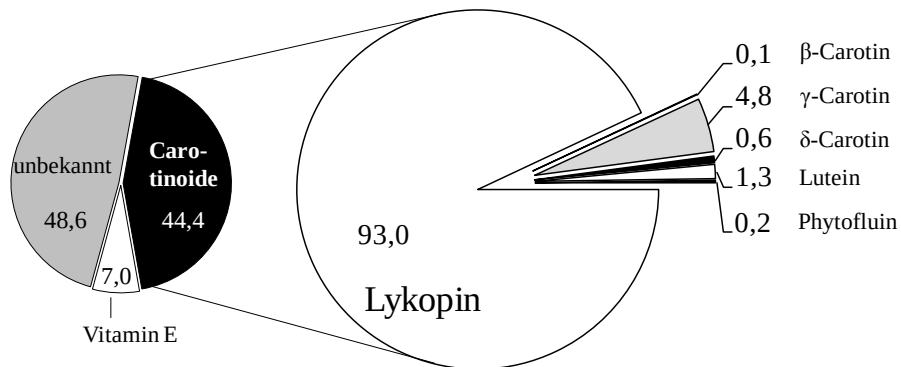


Abbildung 9 Beitrag von Carotinoiden und Vitamin E zur antioxidativen Kapazität von Tomatensaft, gemessen mittels FRAP-Test
Beitrag (Angaben in %) von Vitamin E und von Carotinoiden (links) bzw. einzelner Carotinoide (rechts)

Jedoch trugen die beiden *bizyklischen* Carotine aufgrund ihrer geringen AOA im FRAP-Test (α -, β -Carotin je nur 0,1 mol α -TE/mol) oder im Falle des Luteins aufgrund des geringen Gehaltes in der Karotte zusammen nur etwa 4 % zur lipophilen AOC des Saftes bei. Vitamin E machte einen Anteil von ca. 5 % an der lipophilen AOC von Karottensaft aus. Im Sanddornsaft konnte etwa $\frac{1}{3}$ der lipophilen AOC auf Carotinoide, und dabei hpts. auf Lutein und Zeaxanthin mit 42 % bzw. 34 % zurückgeführt werden (Tabelle A.2). Bezogen auf den Beitrag von Carotinoiden zur lipophilen AOC des Sanddornsaftes, trug Lykopen etwa 18 % bei. Bezogen auf den Anteil von Lykopen an der gesamten lipophilen AOC aller Substanzen waren es nur noch 5 %. Die Aktivität von Vitamin E im FRAP-Test war zwar geringer als die von Lykopen oder vieler Xanthophylle, aber der hohe Vitamin-E-Gehalt in Sanddorn (ca. 170 $\mu\text{mol/kg}$) führte zu einem hohen Beitrag (fast 20 %) des Vitamins E zur lipophilen AOC. Ähnlich dem Karottensaft, trug β -Carotin nur sehr gering zur lipophilen AOC (1,4 %) des Sanddornsaftes bei, trotz des hohen Gehaltes (3,5 $\mu\text{mol/100 g}$). Im Orangensaft konnte fast $\frac{1}{3}$ der lipophilen AOC auf Vitamin E zurückgeführt werden (Tabelle A.2). Nur 10 % trugen Carotinoide bei, mit Lutein und Zeaxanthin als die quantitativ wichtigsten Carotinoide, die in der vorliegenden Arbeit in diesem Saft bestimmt werden konnten. Jedoch gilt β -Cryptoxanthin neben Vitamin C und einigen Flavonoiden als die wichtigste antioxidativ wirksame Verbindung in Orangensaft [189]. Die Ursache für den geringen Beitrag von Carotinoiden zur lipophilen AOC des Orangensaftes ist mglw. auf die fehlende Quantifizierung einiger Carotinoide, insbesondere auf das Fehlen von β -Cryptoxanthin,

dem Hauptcarotinoid in Orangen [35], zurückzuführen (siehe α TEAC-Test auf Seite 41). Abschließend muss betont werden, dass in allen Säften 50-90 % der Fe^{3+} -reduzierenden AOC weder dem Vitamin E noch den quantitativ wichtigen Carotinoiden zugeordnet werden konnte. Dies ist mglw. auf unbekannte synergistische Effekte zwischen Carotinoiden und Vitamin E oder auf weitere fettlösliche mglw. phenolische Inhaltsstoffe sowie Abbaureaktionen bei der Carotinoidanalyse zurückzuführen. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um die AOA der hier untersuchten Carotinoide im lipophilen FRAP-Test zu bestätigen bzw. die AOA der in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchten Carotinoide wie γ -, δ -, ζ -Carotin einzuordnen, die bspw. in carotinreichen Gemüse wie Karotten oder Tomaten eine nennenswerte Rolle spielen.

Die optimierte FRAP-Methode wurde auch genutzt, um die lipophile AOC von lipophilen **Plasma**-Extrakten zu untersuchen. Hierfür diente, wie im DPPH- und α TEAC-Test beschrieben, Plasma von 10 Probandinnen einer Humaninterventionsstudie [163]. Die ermittelten FRAP-Werte der Plasmaproben variierten im Studienverlauf zwischen 24 und 31 $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE pro L Plasma}$. Im Vergleich zu den DPPH- und α TEAC-Werten (Seiten 33 und 41) korrelierten die FRAP-Werte nur sehr gering ($R=0,35$) mit den quantifizierten Vitamin-E-Gehalten. Möglicherweise würde sich die Korrelation verbessern, wenn die lipophile AOC mit der Summe aus Vitamin E und Carotinoiden verglichen werden würde. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass einige der mengenmäßig dominierenden Carotinoide im Plasma (Lycopin, Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, aber nicht α - und β -Carotin) hohe AOA im FRAP-Test besitzen. Die Carotinoid-Gehalte im Plasma waren jedoch nicht Gegenstand der durchgeführten Studie. Der Beitrag zur lipophilen AOC von Plasma durch die Klasse der Carotinoide als Ganzes bzw. des Lycopins im Einzelnen sollte in zukünftigen FRAP-Messungen aufgeklärt werden.

4.2 Antioxidative Aktivität lipophiler Antioxidantien – basierend auf HAT und Adduktbildung

PUFA's und Cholesterol sind bevorzugte Ziele von freien Radikalen. Im Gegensatz zu Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und $\text{NO}^\bullet$, welche *per se* zu unreaktiv sind, um biologische Moleküle anzugreifen und eine Oxidation einzuleiten, sind Peroxylradikale als kettenfortsetzende Spezies der Lipidperoxidation (LPO) mit einer moderaten Aktivität gegenüber biologischen Molekülen wichtige Angriffspunkte für Antioxidantien [23]. Daher

wurden Methoden entwickelt, um die AOA einzelner Substanzen oder die AOC von Lebensmittelextrakten oder Plasma gegenüber Peroxylradikalen zu testen. Die Freisetzung der Peroxylradikale erfolgte in der Regel durch den Einsatz von synthetischen symmetrischen *diazo*-Verbindungen wie AAPH, AMVN oder AIBN. Diese Substanzen setzen bei höheren Temperaturen (meist $> 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) unter N_2 -Abspaltung Alkylradikale frei. In sauerstoffhaltiger Umgebung reagieren sie zu Peroxylradikalen weiter, die dann in der Lage sind, ein Substrat (Fluoreszein, Pyrogallol, Luminol uvm.) zu oxidieren und dessen Fluoreszenz- oder Absorptionseigenschaften zu verändern oder Chemilumineszenz auszulösen.

4.2.1 ORAC mit β -Cyclodextrin

Im ursprünglich von Cao *et al.* (1993) vorgestellten *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)-Test wurde der zeitliche Abbau der Fluoreszenz von β -Phycoerythrin durch Peroxylradikale bei Anwesenheit bzw. Abwesenheit von hydrophilen Antioxidantien verfolgt [190]. Die notwendigen Peroxylradikale wurden beim Zerfall von AAPH freigesetzt. Im Jahre 2001 stellte die Arbeitsgruppe um Prior einen modifizierten ORAC-Test vor, bei dem β -Phycoerythrin durch das wesentlich weniger licht- und sauerstoffempfindliche Fluoreszein ersetzt wurde [142]. Die Auswertung erfolgte über die Fläche unter der Fluoreszenzkurve (AUC, *engl.* Area Under the Curve) mit und ohne Antioxidans. Trolox[®] wurde als Kalibriersubstanz verwendet. Der ORAC-Test bietet durch die Auswertung mittels AUC-Technik den Vorteil, dass sowohl *Lag*-Phase als auch Initiationsphase und das Gesamtausmaß der Hemmung der Oxidation in einem einzigen Wert vereint werden [23]. Im letzten Jahrzehnt wurde der ORAC-Test häufig angewandt, um die AOC von Lebensmitteln und biologischen Proben zu untersuchen [129,142,191,192]. Die US-amerikanische Landwirtschaftsbehörde (USDA) veröffentlichte 2007 eine Datenbank mit den gesammelten ORAC-Daten einer Vielzahl von Lebensmitteln [193].

Neben der Bestimmung der hydrophilen AOA bzw. AOC wurde der ORAC-Test auch für die Untersuchung weniger polarer Antioxidantien wie Vitamin E, Oryzanol und BHT optimiert, wobei β -Cyclodextrin als Lösungsvermittler zwischen den lipophilen Antioxidantien und dem wässrigen Medium eingesetzt wurde [132]. Cyclodextrine (CD) sind zyklische Kohlenhydrate (Abb. 10), wobei die Glukose-Moleküle so angeordnet sind, dass sich eine hydrophile Außenseite und eine lipophile Innenseite ergeben (Abb. 10). In dem sich ergebenden Hohlraum kann ein anderes lipophiles Molekül ein-

gelagert werden, sofern es von seiner Größe und seiner Struktur passt [194]. In der Lebensmittel- und Pharmaindustrie werden CD häufig als Transporter und Stabilisationsmittel für verschiedene fettlösliche niedermolekulare Verbindungen, wie Monoterpene und auch Carotinoide, eingesetzt [195]. Für stark apolare Verbindungen wie Terpene werden häufig hydrophobisierte CD genutzt, z. B. Methyl- β -Cyclodextrin (M- β -CD) oder Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD) [195].

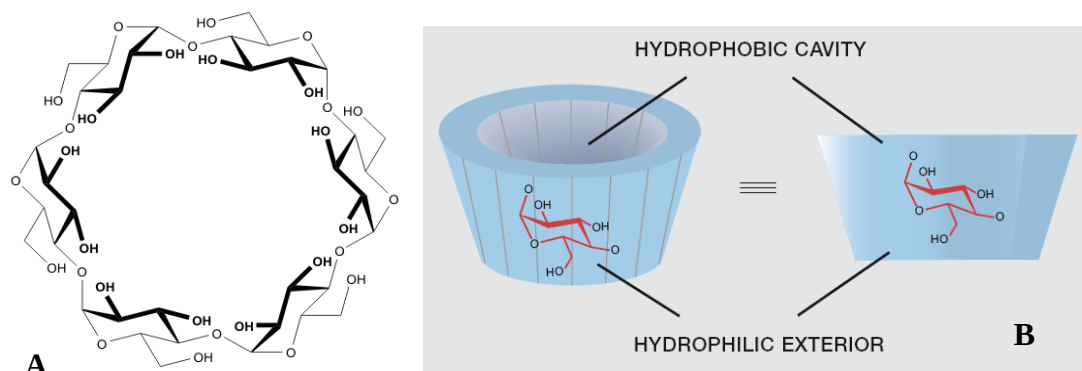


Abbildung 10 Cyclodextrine als Lösungsvermittler
Chemische Struktur von α -Cyclodextrin (A) und Polaritäten im Cyclodextrin-Käfig (B) [194]

In Anlehnung an die Arbeiten von Huang *et al.* (2002) [132] wurde der lipophile ORAC-Test weiterentwickelt. Wie im DPPH-, α TEAC- und FRAP-Test wurde α -Tocopherol als Referenzsubstanz für die Kalibrierung eingesetzt. M- β -CD in einer Konzentration von 2 % in Aceton:Wasser (1+1, v/v) diente als Lösungsvermittler, um die lipophilen Antioxidantien (Vitamin E, Carotinoide uvm.) in wässrigen ORAC-Medium zu lösen.

Zunächst wurden die AOA erstmals aller 8 Vitamin-E-aktiven **Tocopherole und Tocotrienole** im ORAC-Test bestimmt (Manuskript 1). Im Gegensatz zu den Erfahrungen aus den ET-basierenden Testsystemen (FRAP, DPPH, α TEAC) zeigte sich eine starke Abhängigkeit der peroxyradikalabfangenden AOA der Tocochromanole von der Seitenkette. Erstmals zeigte α -Tocopherol die niedrigste AOA. δ -Tocotrienol dagegen zeigte die höchste AOA. Desweiteren hatte wiederum die Methylierung des Chromanolringes einen starken Einfluss. Mit sinkender Anzahl an Methylgruppen am Chromanolring stieg die AOA. Auch Huang *et al.* (2002) beobachteten eine erhöhte AOA der weniger methylierten Vitamin-E-Verbindungen im Vergleich zu den α -Vitaminen [132]. Die Zunahme der ORAC-Aktivität bei sinkender Anzahl an Methylgruppen am Chromanolring könnte auf die *+I*-Effekte zurückzuführen sein, welche die Methylgruppen auf den Chromanolring ausüben. Methylgruppen erhöhen die Elektro-

nendichte im Ring, und erleichtern Reaktionen, die auf einem ET-Mechanismus basieren (α TEAC, DPPH, FRAP). Sie erschweren aber den Ablauf HAT-basierender Reaktionen. Zudem steigt mit sinkendem Methylierungsgrad die Polarität (ermittelt anhand des $\log P$ -Wertes) der Tocopherole (T) und Tocotrienole (T3) in der Reihenfolge: α -T < β -T = γ -T < δ -T (siehe Tabelle A.3, [196]) und erleichtert die Freisetzung der Substanzen ins wässrige Medium und damit die Reaktion gegenüber den dortigen Peroxylradikalen. Ebenso besitzen Tocotrienole durch ihre ungesättigte Seitenkette eine höhere Polarität als ihre verwandten Tocopherole. Dies verdoppelte zusätzlich die AOA. Die polarere Seitenkette der Tocotrienole erleichtert mglw. die Freisetzung des Tocotrienols aus dem CD ins Reaktionsmedium wie oben beschrieben. Wie bereits bei den ET-basierenden Tests beobachtet werden konnte (Seiten 30, 35 und 44, siehe auch Manuskript 1), war die Hydroxylgruppe am Chromanring auch die Schlüsselstelle für eine antioxidative Wirkung gegenüber Peroxylradikalen.

Die Untersuchung der sterisch anspruchsvolleren **Carotinoide** führte in der vorliegenden Arbeit zu Problemen mit dem Testsystem. Lykopen, β -Carotin und seine verwandten Xanthophylle mit substituierten β -Iononring-Gerüsten ließen sich nicht reproduzierbar in das Kohlenhydratgerüst einschließen. Ein endgültiger ORAC-Wert für die einzelnen Carotinoid-Vertreter konnte daher nicht ermittelt werden. Dies bestätigt die Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen. Auch Capitani *et al.* (2009) konnten aufgrund von Löslichkeitsproblemen und daher schlechter Reproduzierbarkeit keinen ORAC-Wert für Lykopen ermitteln [197]. Einzig Polyakov *et al.* (2004) zeigten bereits mit verschiedenen kurzkettigen Analogen des β -Carotins (β -Ionon, Retinoide), dass ein Einschluss von β -Iononringhaltigen Carotinoiden durch verschiedene Typen von CD möglich ist, da der endständige Cyclohexen-Ring die notwendige Größe für den Einschluss in CDs besitzt. Sie schlussfolgerten aus ihren Studien mit verschiedenartigen Carotinoiden, dass nur der β -Iononring in die CD-Hülle eingeschlossen wird, so dass diese Aggregate in wässrigen Medien eine mizellare Struktur annehmen [198]. Experimentell erzeugte Peroxylradikale reagierten nur am Cyclohexen-Ring der Substanzen. Für Lutein und Astaxanthin publizierten Capitani *et al.* (2009) ORAC-Werte von 0,21 bzw. 0,05 TE [197], wodurch die Hypothese von Polyakov erweitert wird: für eine Komplexierung von Carotinoiden in CD scheinen polar substituierte β -Iononringe, wie sie bspw. in den Xanthophyllen Lutein, Zeaxanthin oder Astaxanthin vorliegen, notwendig zu sein. Im Gegensatz zu β -Carotin und den Xanthophyllen ist Lykopen jedoch ein offenkettiger, stark apolarer Kohlenwasserstoff, der sich im Gegensatz zur Publika-

tion von Bangalore *et al.* (2005) [133] in der vorliegenden Dissertation nicht reproduzierbar in CD einschließen ließ.

Auch Capitani *et al.* (2009) und Özyürek *et al.* (2008) zeigten sowohl im ORAC- als auch in anderen polaren Testsystemen wie FRAP und TEAC am Beispiel von Lycopin und β -Carotin, dass sich Carotinoide nicht reproduzierbar in CD einschließen lassen [135,197]. Und auch aus den Experimenten der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, dass CD, auch wenn es wie M- β -CD hydrophobiert sind, aus strukturellen Gründen für die Verwendung als Lösungsvermittler zwischen den starren großen apolaren Carotinoiden und dem hydrophilen Medium in antioxidativen Tests ungeeignet sind. Auf Grund dessen waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch keine Untersuchungen von Lycopin-Isomeren und apo-Lycopinoiden im lipophilen ORAC-Test möglich. Die lipophilen AOA von Lycopin im ORAC-Test konnte daher nicht mit denen anderer Carotinoide oder anderer lipophiler Antioxidantien verglichen werden, wie dies bei den ET-basierenden Methoden erfolgte. Die weniger hydrophoben Antioxidantien konnten jedoch unter einander verglichen werden. Dabei zeigte sich, dass BHT und die Gallate eine dem α -Tocopherol vergleichbare AOA im ORAC-Test aufwiesen. Die „kleineren“ polarerer Substanzen (Tyrosol, EA und BHA) wirkten 2- bis 4-mal so antioxidativ wie α -Tocopherol, mglw. aufgrund der bereits erwähnten erleichterten Freisetzen ins Reaktionsmedium. DHLA zeigte keine Reaktion im ORAC-Test. Ihre peroxyradikalabfangende Aktivität gilt zudem als umstritten [111]. Auch für die Bestimmung der lipophilen AOC carotinoidreicher Lebensmittel und insbesondere carotinreiche Produkte wie Karotte und Tomatensaft ist der vorgestellte lipophile ORAC-Test nicht geeignet. Die in diesen Lebensmitteln enthaltenen Carotine (α -, β -, γ -, δ - und ζ -Carotin, Lycopin, Phytoin, Phytofluin und Neurosporin) würden sich aufgrund ihrer hohen Lipophilie und starren Struktur nur in sehr geringen Mengen und schwer reproduzierbar in CD einschließen lassen.

Problematisch ist auch der Einschluss von Xanthophyllestern in CD. Viele höhere Pflanzen und Algen akkumulieren Xanthophylle wie Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin oder Astaxanthin in Form von Fettsäuremono- oder diestern [179,180,199]. Diese Ester wirken mglw. genauso antioxidativ wie das freie Xanthophyll, da die Veresterung der Hydroxylgruppen des Xanthophylls im Gegensatz zu Vitamin-E-Estern keinen Einfluss auf die konjugierte Polyenstruktur hat. Jedoch steigt durch die gebundenen Fettsäuren (häufig C12:0 bis C18:0) der Raumbedarf und die

Lipophilie des Xanthophylls stark an und eine Inkorporation der Moleküle in CD scheint nahezu unmöglich. Eine vorherige Verseifung des Extraktes zur Spaltung der Xanthophyllester birgt die Gefahr der Veränderung/Abbaus der Xanthophylle (siehe Seite 41). In Algenextrakten kann durch die Verseifung von Astaxanthinestern auch bereits freies Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β,β -carotin-4,4'-dion) zu Astacin (β,β -Carotin-3,3',4,4'-tetron) oxidiert werden [200]. Astacin ist ein Tetraketon mit 15 konjugierten Doppelbindungen, welches theoretisch eine höhere peroxyradikalabfangende AOA besitzen müsste als Astaxanthin, das „nur“ 13 konjugierte Doppelbindungen aufweist. Die Anwendung des lipophilen ORAC-Tests mit CD ist ebenso ungeeignet für die Untersuchung stark fetthaltiger Lebensmittel, wie bspw. pflanzliche oder marine Öle wie sie im DPPH-, α TEAC- und FRAP-Test untersucht wurden. Neben den antioxidativ wirksamen lipophilen Substanzen (Vitamin E u. a.) müssen auch die Triacylglyceride bzw. die Fettsäuren des Öls mittels CD in Lösung gebracht werden.

4.2.3 LPSC-Test

Der von Lissi *et al.* (1992) [201] publizierte Luminol-basierende Test zur Bestimmung der peroxyradikalabfangenden AOA von Substanzen wurde im Rahmen der vorliegenden Disseration weiterentwickelt, um auch apolare Antioxidantien wie Carotinoide messen zu können. Einen Überblick über den möglichen Reaktionsmechanismus des entwickelten Luminol-Chemilumineszenz-basierenden Tests (*engl.* luminol-chemiluminescence based peroxy radical scavenging capacity, LPSC) und die Wirkung von Antioxidantien zeigt die Abbildung 11 (Seite 56) am Beispiel von Lykopin. Das für eine Oxidation des Luminols notwendige basische Milieu (pH~9-10) und die damit verbundene Chemilumineszenz-Reaktion, kann durch Verwendung entsprechender wässriger Puffer erreicht werden [202,203]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Borsäure-Borax-Puffer (pH~9,5) verwendet. Als Oxidantien wurden bisher H_2O_2 oder verschiedene Radikale, wie $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}\text{OH}$ oder *diazo*-Verbindungen wie AAPH und AMVN, die $\text{ROO}^{\bullet}$ freisetzen, beschreiben [202,203]. In der vorliegenden Arbeit wurde AAPH genutzt, um Peroxylradikale zu generieren. Im Gegensatz zum ORAC-Test, der ebenfalls AAPH nutzte, wurde der LPSC-Test in einer *monophasigen* homogenen Lösung durchgeführt, um die im ORAC-Test angesprochenen Löslichkeitsprobleme, die bei der Verwendung von CD zum Lösen von Carotinoiden auftraten, zu umgehen.

Der LPSC-Test wurde anschließend genutzt, um die AOA erstmals aller 8 Vitamin-E-wirksamen **Tocopherole und Tocotrienole** gegenüber Peroxylradikalen im gleichen

Testsystem zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass die Struktur der Kohlenwasserstoff-Seitenkette der Tocochromanole keinen Einfluss auf die ermittelte AOA hatte, wie es auch bei den ET-basierenden, ebenso in homogenen Lösungen durchgeführten Methoden (DPPH, α TEAC, FRAP) beobachtet wurde (Seiten 30, 35 und 44). Tocopherole und ihre verwandten Tocotrienole zeigten vergleichbare AOA (Manuskript 1). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den ORAC-Messungen, in denen Tocotrienole 3-mal so effektiv Peroxylradikale abfangen wie ihre verwandten Tocopherole und verdeutlicht den Einfluss des Cyclodextrins in den ORAC-Messungen.

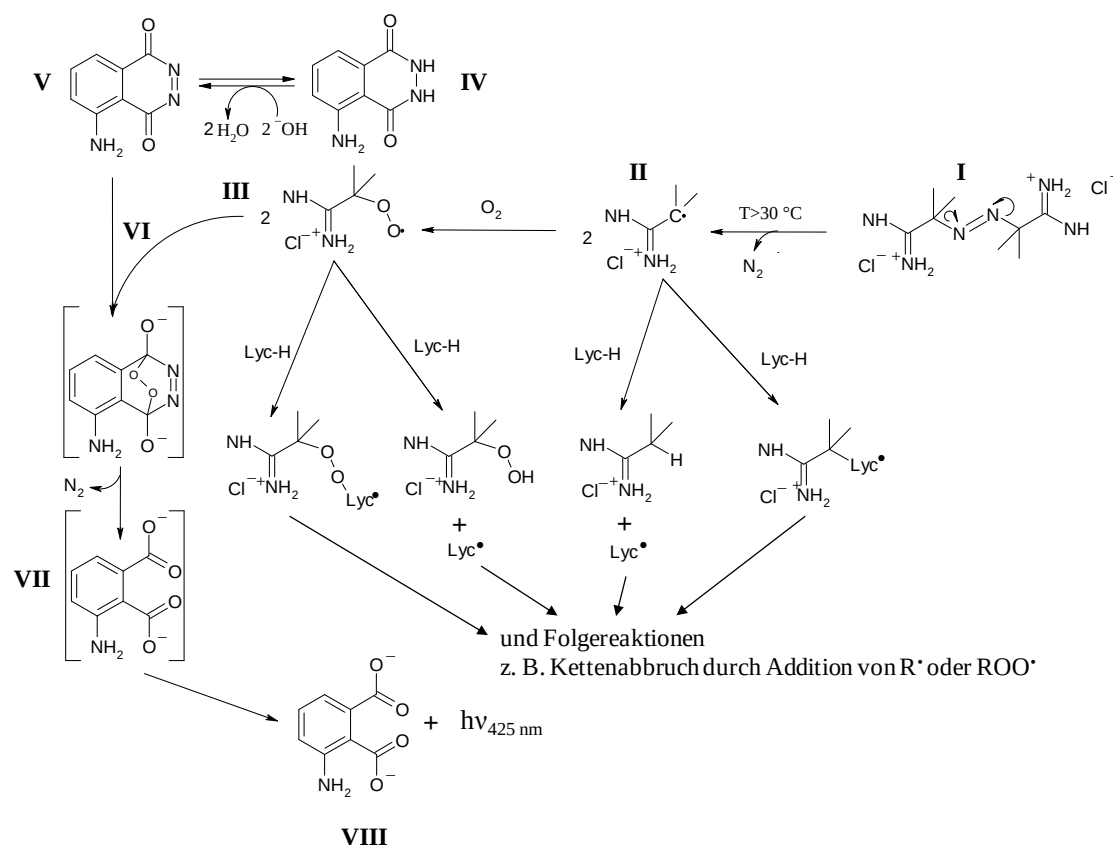


Abbildung 11 Möglicher Reaktionsmechanismus des LPSC-Tests

Die thermische Zersetzung von AAPH (I) bei Temperaturen über 30 °C setzt unter Abspaltung von Stickstoff Alkylradikale (II) frei, die dann sofort mit Sauerstoff der Umgebung zu Peroxylradikalen (III) weiter reagieren. Diese zweite Reaktion ist auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Im Basischen (hier: Boraxpuffer pH~9,5) liegt Luminol (IV) deprotoniert vor (V), so dass ein nukleophiler Angriff der Peroxylradikale an den Carbonylgruppen des Luminols möglich wird (VI). Unter Stickstoff-Abspaltung entsteht das angeregte 3-Aminophthalat-Dianion (VII), das unter Lichtaussendung ($h\nu=425\text{ nm}$) in den Grundzustand zurückfällt (VIII) [145,204], modifiziert). Antioxidantien wie Lycopin sind in der Lage die reaktiven Alkyl- und Peroxylradikale durch Adduktbildung oder HAT abzufangen.

Auch Trolox[®], das wasserlösliche Analogon des α -Tocopherols, wies die gleiche AOA wie α -Tocopherol auf (siehe Abb. A.17), und bestätigt damit die postulierte Unabhängigkeit der AOA der Tocochromanole von der Art der Seitenkette. Bereits Cynshi *et al.* (1995) zeigte in einem Luminol-Chemilumineszenz-Test, jedoch mit $\bullet\text{OH}$

anstelle von $\text{ROO}^\bullet$ als Oxidans [205], die gleiche AOA von Trolox[®] und α -Tocopherol. Das Methylierungsmuster der Tocochromanole hatte einen signifikanten Einfluss auf die AOA im LPSC-Test. Die höchsten AOA zeigten die in Position C-7 desmethylierten β - und δ -Tocochromanole. Ihre Aktivität war ca. 50 % höher als die der α - und δ -Tocochromanole. Sterische Vorteile durch das Fehlen der Methylgruppe in *ortho*-Stellung zur Hydroxylgruppe könnten die höhere AOA der β - und δ -Tocochromanole verursacht haben. Zudem könnte der *+I*-Effekt, den die *ortho*-Methylgruppe in den α - und γ -Tocochromanolen auf den Chromanolring ausübt, eine Reaktion mittels HAT-Mechanismus erschweren. Schlüsselstelle für die Reaktion von Vitamin E mit Oxidantien ist wie bei den ET-basierenden Methoden (Seiten 30, 35 und 44) auch bei den HAT-basierenden Testsystemen die Hydroxylgruppe. Da nicht nur der ET, sondern auch der HAT über die freie Hydroxylgruppe abläuft, sinkt durch eine Veresterung, wie sie im α -Tocopherolacetat vorliegt, die LPSC-Aktivität gegen Null.

Im Gegensatz zu Vitamin E werden Peroxylradikale von **Carotinoiden** nicht ausschließlich über einen HAT-Mechanismus abgefangen. Eine Adduktbildung ist ebenso möglich (siehe Seite 10). Mortensen & Skibsted (2001) favorisierten für die Reaktion von Carotinoiden mit Peroxylradikalen in homogenen Lösungen einen Adduktbildungsmechanismus [206]. Studien zur Reaktion von Carotinoiden mit Benzylperoxylradikalen belegen dies [207]. Mittels LC-MS konnten bereits Addukte von β -Carotin mit Alkyl- und Alkoxy-Radikalen, welche durch thermische Zersetzung von AMVN entstanden, nachgewiesen werden [208]. Die Möglichkeit der Adduktbildung könnte die Ursache für die um das 10-fach höheren AOA von Carotinoiden im LPSC-Test im Vergleich zu α -Tocopherol sein (Manuskript 2). Die Reaktivität hängt von der Differenz der Redoxpotentiale des Carotinoids und des Peroxylradikals ab. Mit steigendem Ionisierungspotentials (IP, aus [169]) bzw. steigender E_{HOMO} (aus [170]) des Carotinoids stieg auch die Aktivität zum Abfangen von Peroxylradikalen (LPSC-Wert) (Abb. A.15). Für einen HAT müsste diese Korrelation aber umgekehrt proportional verlaufen, wie im α TEAC- oder FRAP-Test gezeigt (Abb. A.6 und 11), denn ein HAT vom Carotinoid auf das Peroxylradikal kann nur stattfinden, wenn aus dem Carotinoid ein stabiles Carotinoidradikal entsteht. Dies geschieht nur, wenn die Energie zur Abgabe eines Elektrons oder Wasserstoffatoms (IP, E_{HOMO}) möglichst niedrig ist, wie bspw. bei Lycopin. All das unterstützt die Hypothese, dass die Reaktion zwischen Carotinoiden und Peroxylradikalen im LPSC-Test hpts. auf eine Adduktbildung zurückzuführen ist und nicht ausschließlich auf einen HAT-Übergang zwischen Carotinoid

und Peroxylradikal. Terao *et al.* (1989) postulierte, dass die Substitution von H-Atomen gegen Carbonylgruppen in 4- und 4'-Position die peroxyradikalabfangende Wirkung von Carotinoiden in homogenen Lösungen erhöht (Astaxanthin $\approx$ Canthaxanthin $\gg$ β -Carotin $\approx$ Zeaxanthin) [50]. Jørgensen & Skibsted (1993) nutzten verschiedene *diazo*-Verbindungen wie AIBN, AMVN und AAPH um Peroxylradikale zu generieren, und bestätigten mit ihren Experimenten diese Hypothese [209]. Und auch die Ergebnisse des in der vorliegenden Arbeit genutzten LPSC-Tests bekräftigen die Erfahrungen (Manuskript 2). Der +M-Effekt der mit dem Polyen-System konjugierten Carbonylgruppen reduziert die Elektronendichte im Kohlenstoffgerüst des Carotinoids [26] und erhöht der Reaktivität für eine Adduktbildung mit dem Peroxylradikal. Das erklärt auch die geringe AOA der Carotine insbesondere von Lykopen, welches die geringste AOA aller untersuchten Carotinoide in diesem Test zeigte, im Vergleich zum carbonylhaltigen Astaxanthin, welches die höchste AOA aufwies. Carotinoide mit Hydroxylgruppen (Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin) zeigten eine geringere AOA als Carotinoide mit Ketogruppen (Echinenon, Canthaxanthin). Die Erklärung dafür liefern Experimente mit synthetischen Carotinoiden. Jeevarajan *et al.* (1994) beobachteten, dass Carotinoide mit Gruppen, die als Elektronendonatoren wirken (Ketogruppen) leichter zu oxidieren waren als jene mit Elektronenakzeptorgruppen (Hydroxylgruppen) [210]. Auch die chemische Umgebung im Testsystem hat großen Einfluss auf die Messergebnisse. Die Zusammensetzung des Testmediums, insbesondere seine Viskosität (η), beeinflusst sowohl die Zerfallsraten der *diazo*-Verbindungen (AAPH, AMVN, AIBN) als auch die Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen Oxidans und Luminol bzw. Oxidans und Antioxidans [211]. Je höher die Viskosität des Mediums desto höher die Bildungsrate von nicht-radikalischen Produkten des AAPH-Zerfalls („Kettenabbruch“), da durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Radikale die Wahrscheinlichkeit der Reaktion mit Luminol oder dem zugesetzten Antioxidans sinkt („Käfig-Effekt“). Die Effizienz der Bildung von Peroxylradikalen ist in DMSO ($\eta_{25\text{ °C}}=1,99$) deutlich geringer als in Wasser ($\eta_{25\text{ °C}}=0,89$) [212]. Die höhere Polarität von Astaxanthin ($\log P=13,27$ [30]) im Vergleich zu Lykopen ($\log P=17,64$ [30]) erhöht dessen Beweglichkeit im Testmedium und erhöht damit auch die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit Peroxylradikalen.

Um die AOA von Lykopen hinsichtlich der Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen einschätzen zu können, wurden **weitere lipophile Antioxidantien** im LPSC-Test untersucht. Lykopen zeigte zwar die zweitniedrigste AOA aller getesteten Carotinoide im

LPSC-Test (Manuskript 2), jedoch wies keines der lipophilen Antioxidantien außerhalb der Klasse der Carotinoide eine höhere AOA als Lycopin auf (Abb. A.16). Alle synthetischen Gallate zeigten eine etwa 75 % geringere AOA als Lycopin. Innerhalb der Gruppe der synthetischen Gallate sank mit steigender Kettenlänge die AOA tendenziell in der Reihenfolge: *n*-Propylgallat > *n*-Octylgallat > Laurylgallat. Mit steigender Kettenlänge erhöht sich auch die Lipophilie der Gallate. Damit sinkt jedoch die Beweglichkeit der Substanzen im genutzten Testmedium (Gemisch aus DMSO, MtBE, PBS und Boraxpuffer) und somit die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion zwischen den Peroxylradikalen und dem Gallat. Die beiden synthetischen phenolischen Antioxidantien BHA und BHT zeigten die gleiche, etwa 60 % niedrigere AOA als Lycopin. Im lipophilen ORAC-Test mit β -CD als Lösungsvermittler war das sterisch weniger anspruchsvolle BHA stärker antioxidativ als BHT, da es leichter mit den Peroxylradikalen außerhalb des CD reagieren konnte. Im LPSC-Test war dagegen kein Unterschied zwischen beiden Substanzen beobachtbar aufgrund der Durchführung des Testsystems in einer homogenen Lösung. Tyrosol (Tyr) und DHLA zeigten sogar weniger als 5 % der AOA von Lycopin. Eine Stabilisierung eines sich nach der Reaktion mit Peroxylradikalen über einen HAT bildenden $\text{Tyr}^\bullet$ bzw. $\text{DHLA}^\bullet$ ist nur schwer möglich. Auch eine Adduktbildung mit dem Peroxylradikal zu $\text{Tyr-ROO}^\bullet$ bzw. $\text{DHLA-ROO}^\bullet$ ist aufgrund der geringen Anzahl konjugierter Doppelbindungen in Tyrosol bzw. fehlender Doppelbindungen in DHLA, die das entstehende Radikal über Resonanz stabilisieren würden, nicht möglich.

Auch typische **hydrophile Antioxidantien** wie Ascorbinsäure, Harnsäure, verschiedene Phenolcarbonsäuren und Flavonoide, sowie deren Glykoside wurden als Vergleich zur AOA von Lycopin herangezogen (Abb. A.17). Keine der hydrophilen Substanzen zeigte eine dem Lycopin vergleichbare AOA im LPSC-Test. Die höchsten AOA zeigten die Flavonoide Quercetin und Cyanidin, mit ca. 20-25 % der AOA von Lycopin. Beide Flavonoide besitzen zwar ein großes konjugiertes Polyen-System. Im Gegensatz zu Lycopin besitzen sie aber auch eine hohe Anzahl an OH-Gruppen. Diese liegen aufgrund des leicht basischen pH-Wertes des Testmediums (pH~9,5) im LPSC-Test deprotoniert vor und üben so einen +I-Effekt auf das Polyphenolsystem aus. Dies hemmt die Reaktion mit Peroxylradikalen auf Basis eines HAT. Die Fähigkeit zur Adduktbildung mit dem Peroxylradikal, wie sie bei Carotinoiden bekannt ist, wurde für viele Polyphenole ausgeschlossen. Einige Antioxidantien, wie Harnsäure und die

phenolischen Substanzen Ferulasäure, Catechin und Epicatechin, zeigten eine dem α -Tocopherol vergleichbare AOA. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten LPSC-Werte für hydrophile Substanzen bestätigen die publizierten AOA von Perez *et al.* (2000) und Parejo *et al.* (2000), welche ebenfalls verschiedene Antioxidantien in einem Luminol-Chemilumineszenz-Test mit AAPH zur Generierung von Peroxylradikalen testeten [213,214]. Im Gegensatz zu den ET-basierenden Methoden, in denen Ferulasäure häufig die höhere AOA im Vergleich mit Kaffeesäure besaß, zeigt sich gegenüber dem Angriff von Peroxylradikalen ein umgekehrtes Bild, und bestätigt damit die Beobachtungen von Cheng *et al.* (2003) [204]. Die Methoxygruppe der Ferulasäure bewirkt einen -M-Effekt, was zur Abschwächung der Reaktion mit den Peroxylradikalen mittels HAT führt. Die geringsten peroxyradikalabfangenden AOA besaßen Ascorbinsäure und das Chalkon-Glykosid Phloridzin. Ascorbinsäure ist sehr temperatur- und sauerstoffempfindlich, so dass die im LPSC-Test vorherrschenden Bedingungen bei Temperaturen von 37 °C an sauerstoffhaltiger Atmosphäre für eine Zeitdauer von bis zu 2 h die Ascorbinsäure zusätzlich oxidierte, und ein umfassender Schutz des Luminols vor Peroxylradikalen nicht möglich war. Phloridzin, das Glykosid des Phloretins, zeigte aufgrund seiner Chalkonstruktur nur geringe AOA. Zwar besitzt Phloretin zwei Phenolringe, jedoch liegen deren Polyen-Systeme im Gegensatz zu denen des Quercetins oder Cyanidins nicht konjugiert vor (siehe Abb. A.2). Zusammenfassend war Lycopin im Vergleich zu anderen lipophilen Antioxidantien und hydrophilen Antioxidantien die am stärksten peroxyradikalabfangende Substanz, jedoch schwächer als viele andere Carotinoide.

Lycopin (LYC) ist aufgrund seiner hohen Anzahl an konjugierten Doppelbindungen ($n=11$) anfällig für Isomerisierungsreaktionen. **Lykopin-Isomere** spielen sowohl im Lebensmittel als auch in humanen Geweben eine bedeutsame Rolle. Anders als in den ET-basierenden Testsystemen (α TEAC, FRAP; Seiten 37 und 46) zeigten die Untersuchungen von Lykopin-Isomeren im LPSC-Test, dass die AOA gegenüber synthetischen Peroxylradikalen aus AAPH in der Reihenfolge (*all-E*)-LYC < (*5Z*)-LYC < (*9Z*)-LYC signifikant anstieg. Je weiter die *cis*-Doppelbindung ins Zentrum des Moleküls rückte desto höher war die AOA des Lykopin-Isomers (Manuskript 3). Als Ursache dieses Trends ist womöglich neben der höheren Reaktivität auch eine bessere Löslichkeit der einzelnen Isomere im Reaktionsgemisch zu sehen. Im Allgemeinen sind (*Z*)-Isomere polarer als die (*all-E*)-Form [84]. Aufgrund ihrer „geknickten“ Struktur sind (*Z*)-Isomere sowohl in Ölen als auch in organischen Lösungsmitteln wie *n*-Hexan

besser löslich als das (*all-E*)-Isomer und neigen weniger schnell zur Kristallisation [84]. Selbiges könnte auch im genutzten Testsystem gelten. Jedoch einzig für das (9Z)-Isomer wurde eine höhere Löslichkeit in Form des log*P*-Wertes ermittelt ($15,5 \pm 0,4$) [196]. Für alle anderen (Z)-Isomere als auch für das (*all-E*)-Isomer wurden gleiche log*P*-Werte von $14,5 \pm 0,5$ publiziert [196], so dass laut Literatur die Löslichkeit zwischen den untersuchten Isomeren sich nicht unterscheidet. Allein das Lösen der einzelnen Isomere in MtBE und DMSO für die Durchführung des LPSC-Tests in der vorliegenden Arbeit bestätigt die Aussagen von Shi (2000) [84] über eine bessere Löslichkeit der Lycopin-(Z)-Isomere gegenüber (*all-E*)-Lycopin.

Das ebenfalls untersuchte (13Z)-Lycopin folgte dem oben genannten Trend nicht. Eine Erklärung könnte in der Stabilität dieses Isomers liegen. (13Z)-Lycopin ist instabiler als (*all-E*)-Lycopin und das instabilste Isomer der drei untersuchten *mono*-(Z)-Isomere [76]. Parallel zur Bestimmung der AOA der einzelnen Isomere im LPSC-Test wurde daher mittels HPLC die Reinheit der untersuchten Lycopin-Isomere geprüft. Dabei zeigte sich, dass sowohl das (*all-E*)-Isomer als auch (5Z)- und (9Z)-Lycopin eine Isomeren-Reinheit von 93-96 % aufwiesen. Das (13Z)-Isomer wies jedoch nur eine Reinheit von 63 % auf. Beim Lösen des Isomers, welches nach der Isolierung unter Schutzatmosphäre gelagert wurde, in *n*-Hexan entstand durch Rückisomerisierung des (13Z)-Isomers ein Anteil von über 30 % anderer Lycopin-Isomere, insbesondere (*all-E*)- und (5Z)-Lycopin. Zum Vergleich: direkt nach der Isolierung der Lycopin-Isomere mittels *semi*-präparativer HPLC betrug die Reinheit jedes Isomers ~99 %. Der hohe Anteil anderer Lycopin-Isomere durch die schnelle Rückisomerisierung von (13Z)-Lycopin nach dem Lösen könnte die Ursache für die im Vergleich zu (9Z)-Lycopin signifikant geringere AOA und die fehlende Fortsetzung des angesprochenen Trends hinsichtlich der AOA von Lycopin-Isomeren im LPSC-Test sein.

Isomerisierung ist nur der erste Schritt beim Abbau von Carotinoiden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden sowohl in lycopinreichen Lebensmitteln als auch im Humanplasma mittels LC-MS bereits verschiedene kurzkettige, vom Lycopin stammende, Aldehyde detektiert [106]. Mit Hilfe des LPSC-Testes sollte die **AOA unterschiedlichster apo-Lycopinoide** gegenüber Peroxylradikalen *in vitro* analysiert werden. Entscheidend für die AOA eines apo-Lycopinoids war die Anzahl konjugierter Doppelbindungen, und damit die Länge der Kohlenwasserstoffkette (Manuskript 4). So zeigte sich beim Vergleich von Lycopin mit apo-6'- und apo-8'-Lycopinal kein signifi-

kanter Unterschied hinsichtlich der AOA im LPSC-Test, da alle drei Verbindungen 10 bzw. 11 konjugierte Doppelbindungen besitzen. Erst durch eine weitere Kürzung der Kettenlänge und damit des Polyen-Systems sank die AOA. So sank die AOA in der Gruppe der apo-Lykopinale in der Reihenfolge: apo-6' = apo-8' > apo-10' > apo-12' > apo-14' > apo-11. Diese Struktur-Aktivitäts-Beziehung hinsichtlich der Kettenlänge bestätigte sich für die Gruppe der apo-Lykopinoide, apo-Lykopinsäuren und deren Ester. Betrachtet man apo-Lykopinoide gleicher Kettenlänge, so erhöhen Carbonylfunktionen, wie sie in apo-Lykopinalen, apo-Lykopinsäuren und deren Estern präsent sind, die Größe des Polyen-Systems gegenüber dem verwandten apo-Lycopinol, da die C=O-Doppelbindungen mit dem C-C-Doppelbindungssystem in Konjugation vorliegen. Carbonylfunktionen erzeugen zudem einen hohen Elektronenzug, der die Elektronendichte im Polyen-System verringert (+M-Effekt, -I-Effekt) und die Addition von Peroxylradikalen erleichtert. Daher konnte die folgende Reihenfolge der AOA der apo-Lykopinoide bei gleicher Kohlenstoff-Kettenlänge ermittelt werden: COOR > COOH > CHO > CH₂OH. Durch die schrittweise Kürzung des Polyen-Systems und das Einfügen von endständigen funktionellen Gruppen veränderten sich zudem die Absorptionseigenschaften der Chromophore der apo-Lykopinoide (Tabelle A.4). Während die langkettigen Lykopinale ihre Absorptionsmaxima noch in einem dem Lycopin vergleichbaren Bereich hatten, verschoben sich die Absorptionsmaxima mit sinkender Kettenlänge der apo-Lykopinoide zu niedrigeren Wellenlängen bis hin in den UV-Bereich (z. B. apo-14'- und apo-11-Lykopinoide).

Die entwickelte **LPSC-Methode**, welche das Abfangen von Peroxylradikalen durch Antioxidantien bestimmt, wurde abschließend auch zur Bestimmung der lipophilen AOC **verschiedener Lebensmittel** (Öle, Saft) genutzt (Manuskript 2). Die lipophile AOC der Öle im LPSC-Test folgte der Reihenfolge, wie sie im α TEAC-Test beobachtet wurde (Seite 39). Und wie bereits im FRAP- und α TEAC-Test beschrieben (Seite 39 und 48), korrelierten die lipophilen AOC erst nach Ausschluss des Olivenöls mit dem quantifizierten Vitamin-E-Gehalt. Während anzunehmen ist, dass Vitamin E das Hauptantioxidans in vielen Ölen ist, spielen in Olivenöl weitere lipophile phenolische Antioxidantien wie Tyrosole eine wichtige Rolle (siehe Seite 15). Aufgrund der hohen AOA von Carotinoiden im LPSC-Test im Vergleich zu Vitamin E zeigten die Säfte 8- bis 10-mal höhere lipophile AOC im LPSC-Test im Vergleich zu den AOC, die in den ET-basierenden Tests (DPPH, α TEAC, FRAP) ermittelt wurden. Folglich korrelierte die

lipophile AOC, ermittelt im LPSC-Test, sehr gut mit den chromatografisch quantifizierten Carotinoidgehalten der Säfte ($R=0,94$). Carotinoide sind demnach als wichtige peroxyradikalabfangende Antioxidantien in carotinoidreichen Lebensmitteln anzusehen.

Wie bereits im α TEAC- und FRAP-Test geschehen (Seiten 40 und 49), wurden anschließend auch im LPSC-Test die Beiträge einzelner Carotinoide und von Vitamin E zu lipophilen AOC errechnet. γ - und δ -Carotin wurden aufgrund ihres seltenen Vorkommens im Lebensmittel im LPSC-Test nicht untersucht, sodass die LPSC-Werte aus den verwandten Verbindungen Lykopen sowie α - und β -Carotin mit jeweils 16,5 mol α -TE pro mol abgeschätzt wurden. Fast 56 % der AOC des Tomatensaftes war auf die AOA von Carotinoiden zurückzuführen (Abb. 12).

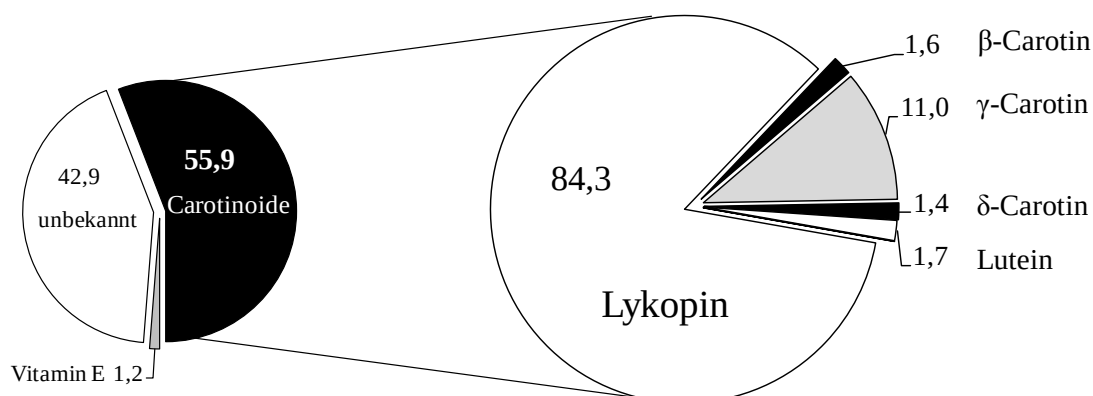


Abbildung 12 Beitrag von Carotinoiden und Vitamin E zur antioxidativen Kapazität von Tomatensaft, gemessen mittels LPSC-Test
Beitrag (Angaben in %) von Vitamin E und von Carotinoiden (links) bzw. einzelner Carotinoide (rechts)

Etwa 84 % des Carotinoid-Beitrages zur AOC trug allein Lykopen bei. Bezogen auf die gesamte lipophile AOC des Tomatensaftes bedeutet das, dass Lykopen etwa 47 % der lipophilen AOC ausmacht. Nur geringe Beiträge (ca. 9 %) lieferten weitere Carotine, wobei γ -Carotin den größten Anteil ausmachte. Vitamin E spielte mit einem Anteil von 1,2 % eine unbedeutende Rolle. Den höchsten Beitrag zur lipophilen AOC des Karottensaftes lieferten die Carotinoide mit 33 %. Vitamin E trug dagegen aufgrund der geringen Aktivität gegenüber Peroxyradikalen nur 0,3 % bei (Tab. A.5). Etwa $\frac{2}{3}$ des Carotinoidanteils der lipophilen AOC lieferte β -Carotin, gefolgt von α -Carotin mit ca. 29 % und Lutein mit 2 %. Damit konnten etwa 33 % der lipophilen AOC des Karottensaftes auf α - und β -Carotin zurückgeführt werden. Jedoch konnten wie auch im Tomatensaftextrakt ca. 66 % der AOC nicht zugeordnet werden. Im Carotinoid- und

Vitamin-E-reichen Sanddornsaft wurde die lipophile AOC, die mittels LPSC-Test gemessen wurde, merklich durch die AOA von Carotinoiden bestimmt. Circa 40 % der lipophilen AOC trugen Carotinoide bei, wobei Lutein (35 %), Zeaxanthin (29 %), β -Carotin (23 %) und Lykopen (10 %) zusammen mehr als 90 % der AOC des Carotinoidanteils lieferten (Tabelle A.5). Der Beitrag von Vitamin E mit 2,3 % war wiederum vernachlässigbar gering. Mehr als die Hälfte der lipophilen AOC konnte nicht auf die AOA von Vitamin E oder die AOA von Carotinoiden zurückgeführt werden. Im Orangensaft konnten nur 13 % der lipophilen AOC im LPSC-Test auf die AOA des enthaltenen Vitamins E und die enthaltenen Carotinoide zurückgeführt werden. Etwa 3 % trug Vitamin E zur lipophilen AOC des Orangensaftes bei. Lutein und Zeaxanthin machten zu jeweils gleichen Anteilen insgesamt nur ca. 10 % aus (Tab. A.5). Ursache für den hohen Anteil lipophiler AOC, der nicht den beiden Substanzklassen zugeordnet werden konnte, könnte wie bereits im α TEAC- und FRAP-Test erläutert wurde (Seiten 41 und 49) die fehlende Detektion einiger für Orangensaft typischer Carotinoide sein. Insbesondere β -Cryptoxanthin mit Gehalten von bis zu 7,6 mg pro L [215] spielt für die AOC im Orangensaft eine wichtige Rolle [189]. Die Verseifung des Orangensaftextraktes vor der HPLC-Analyse könnte nicht nur die Fettsäure-Xanthophyll-Ester gespalten haben, sondern auch einen Teil der Carotinoide abgebaut haben, so dass der Carotinoidgehalt des Orangensaftes unterschätzt wurde. Für die Bestimmung der AOC wurden jedoch nicht die verseiften, sondern die unverseiften *n*-Hexanextrakte genutzt. In allen 4 untersuchten Saftproben konnten ca. 40 bis 85 % der peroxyradikalabfangenden AOA weder den quantifizierten Carotinoiden noch Vitamin E zugeordnet werden (Tab. A.5). Eine Quantifizierung der farblosen Carotine und die Untersuchung möglicher synergistischer Effekte zwischen den lipophilen Substanzen in zukünftigen Studien könnte diese Lücke schließen.

Die Gesamtkonzentration der wichtigsten Carotinoide **im Plasma** (Lutein, β -Cryptoxanthin, α - und β -Carotin, Lykopen) beträgt meist nicht mehr als 2 μ mol pro L [216] gegenüber den Vitamin-E-Konzentrationen mit 22-30 μ mol je L (Manuskript 1). Zudem ist Vitamin E als wichtigstes kettenbrechendes und peroxyradikalabfangendes Antioxidans im Plasma lange bekannt [217]. Die Aktivität von Carotinoiden gegenüber Peroxyradikalen *in vitro* wurde in der vorliegenden Arbeit in homogenen Lösungen mit der 10-30-fachen AOA von α -Tocopherol bestimmt (Manuskript 2). Zu der signifikant höheren Abfangrate der Carotinoide kommt noch hinzu, dass die Abfangrate von Peroxyradikalen durch α -Tocopherol, wenn es in Membranen eingebaut wurde, noch-

mals niedriger war als in homogenen Lösungen [218,219]. Dies wird wahrscheinlich durch die eingeschränkte Beweglichkeit des α -Tocopherols aufgrund der langen Phytylkette und der reaktiven Hydroxylgruppe an der Oberfläche von Membranen und Lipoproteinen verursacht [23]. Wie bereits einleitend beschrieben, befinden sich die unpolaren Carotinoide dagegen mehr im Inneren von Membranen (insbesondere Carotine, wie Lycopin) und können daher Peroxylradikale, die im Inneren entstehen, aktiv abfangen.

4.3 Vergleich der antioxidativen Aktivität aller lipophilen Antioxidantien in den verschiedenen Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Methoden zur Bestimmung der AOA lipophiler Substanzen und der lipophilen AOC von Lebensmitteln basieren auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen.

AOA, die in Methoden ermittelt wurden, welche auf einem ähnlichen Reaktionsmechanismus beruhen, müssten miteinander korrelieren. Eine gute bis sehr gute Korrelation ($R > 0,9$) wurde bei der Untersuchung von hydrophilen phenolischen Antioxidantien oder hydrophilen Extrakten von Lebensmitteln zwischen den Werten verschiedener ET-basierender Methoden (insbesondere zwischen FRAP, TEAC und Gesamtphenoltest) gefunden [187,220]. Die mittels TEAC- und DPPH-Test ermittelten AOA für phenolische Substanzen korrelierten dagegen weniger gut ($R < 0,6$) [147]. Ursache könnte der weiterhin umstrittene Reaktionsmechanismus im DPPH-Test sein, der mglw. in Abhängigkeit vom jeweiligen Antioxidans ET- oder HAT-vermittelt abläuft.

In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen für Carotinoide keine sehr gute Korrelation zwischen den AOA im FRAP-Test und im α TEAC-Test ermittelt werden ($R = 0,44$). Niki beschrieb im vergangenen Jahr, dass die peroxylradikalfangenden Aktivitäten, welche mit kompetitiven Methoden, bspw. dem in dieser Arbeit genutzten ORAC- oder LPSC-Test gemessen wurden, häufig nicht mit den AOA des FRAP-Tests oder anderer ET-basierender Methoden korrelieren [23]. Die vorliegende Arbeit bestätigt dies. Nur eine geringe Korrelation ($R = 0,33$) wurde zwi-

schen den Werten im FRAP-Test und denen des LPSC-Tests für die 20 untersuchten Carotinoide ermittelt. Die α TEAC-Werte und LPSC-Werte zeigten keine Korrelation ($R=0,19$). Tabart *et al.* (2009) beobachtete an einer Vielzahl von phenolischen Substanzen zwischen den ORAC- und TEAC-Werten ebenso keine Korrelation ($R<0,1$) [147]. Ursache in beiden Fällen ist der Umstand, dass die ORAC- bzw. LPSC-Werte nicht ausschließlich den Radikalabfang oder die Reduktion eines Metallions oder stabilen Radikals widerspiegeln, wie es im Falle des TEAC-, DPPH- oder FRAP-Tests der Fall ist [23]. Im ORAC- und LPSC-Test werden kontinuierlich durch thermischen Zerfall von AAPH Peroxylradikale freigesetzt. Im Gegensatz zu den spektralphotometrischen Endpunktmethoden (FRAP, α TEAC, DPPH) wird nicht nur die Inhibierung nach einer bestimmten Zeitdauer bestimmt, sondern die Kombination aus Inhibierungszeit und Grad der Inhibierung durch Auswertung mittels AUC-Technik [147].

Da die Ergebnisse eines antioxidativen Tests nicht nur von der Substanz selbst, sondern auch von der Art des genutzten Radikals, dem zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus zwischen Oxidans und Antioxidans, sowie dem genutzten Lösungsmittel und den Umgebungsbedingungen abhängen, gibt kein Testsystem die „wahre“ AOA einer Substanz bzw. die AOC eines Lebensmittelextraktes oder biologischen Extraktes wieder [129,221,222]. Die Ergebnisse der AOA einer Substanz in einem spezifischen Test geben nur einen ersten Eindruck von der AOA unter den spezifischen Testbedingungen [147]. Da die Messung der AOA der untersuchten lipophilen Substanzen testabhängig unterschiedliche Ergebnisse erzielte, ist für eine zusammenfassende Aussage über das antioxidative Potential die Berechnung eines „allumfassenden“ Mittelwertes aus den Ergebnissen der Einzeltests notwendig [147]. Basierend auf α -Tocopherol als Referenz, wird jedoch die Bildung eines einfachen Mittelwertes diesem Umstand nicht gerecht, da α -Tocopherol in LPSC-Test deutlich geringere AOA zeigte als bspw. Carotinoide, und so die Ergebnisse dieses Testsystems überschätzt werden würden. Andererseits reagierten Carotinoide im DPPH-Test nicht. Ein **gewichteter Mittelwert** auf Basis der AOA im FRAP-, α TEAC-, DPPH-, ORAC- und LPSC-Test aller lipophilen Antioxidantien ist in diesem Fall sinnvoll (Manuskript 2). Der gewichtete Mittelwert berechnet sich (am Beispiel von Lykopen, LYC) wie folgt:

$$x(LYC) = \frac{\frac{DPPH_{LYC}}{\bar{x}_{DPPH}} + \frac{\alpha TEAC_{LYC}}{\bar{x}_{\alpha TEAC}} + \frac{FRAP_{LYC}}{\bar{x}_{FRAP}} + \frac{ORAC_{LYC}}{\bar{x}_{ORAC}} + \frac{LPSC_{LYC}}{\bar{x}_{LPSC}}}{5}$$

Innerhalb der untersuchten 8 **Vitamin-E-aktiven Substanzen** zeigte sich unter Berücksichtigung aller fünf Testsysteme, dass Tocotrienole eine 10-40 % höhere AOA besaßen als die verwandten Tocopherole, aufgrund ihrer höheren AOA im lipophilen ORAC-Test (siehe Tab. A.6). δ -Tocotrienol bspw. zeigte trotz der geringsten AOA in den ET-basierenden Tests (DPPH, α TEAC, FRAP), aber aufgrund der hohen peroxyradikalabfangenden Aktivität im LPSC-Test und insbesondere im ORAC-Test, eine 40 % höhere AOA als α -Tocopherol. Bei Ausschluss des DPPH- und ORAC-Tests, in denen die AOA von Carotinoiden nicht gemessen werden konnten (Kapitel 4.1.1 und 4.2.1), wurde auf Basis der verbleibenden Ergebnisse (FRAP-, α TEAC- und LPSC-Test) für Rubixanthin die höchste AOA aller 18 untersuchten **Carotinoide** bestimmt (gewichteter Mittelwert: 1,7). β -Cryptoxanthin und Lycopin folgten mit einem gewichteten Mittelwert von je 1,5 (Tab. A.7). Die geringste AOA zeigten die farblosen Carotine Phytoin und Phytofluin (gewichteter Mittelwert von je 0,2), aufgrund ihrer geringen Anzahl konjugierter Doppelbindungen und den daraus resultierenden geringen AOA.

Weitet man die Berechnung des gewichteten Mittelwertes auf alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten **lipophilen Antioxidantien** aus (Carotinoide, Tocopherole, Tocotrienole, synthetische Antioxidantien uvm.) muss der lipophile ORAC-Test von der Berechnung des gewichteten Mittelwertes ausgeschlossen werden, da eine Bestimmung des ORAC-Wertes von Carotinoiden mit Cyclodextrin als Lösungsvermittler nicht möglich war (Kapitel 4.2.1). Auf Basis der vier verbleibenden Testsysteme (DPPH, α TEAC, FRAP und LPSC) zeigte sich, dass Ellagsäure, das Dimer der Gallussäure, mit einem gewichteten Mittelwert von 2,4 die höchste lipophile AOA besaß, da sie in allen Testsystemen eine Reaktion zeigte und dies häufig stärker als α -Tocopherol (Tab. A.8). Der Ellagsäure folgten mit etwa 30 % niedrigerer AOA die Carotinoide Lycopin, Rubixanthin und β -Cryptoxanthin (gewichteter Mittelwert je 1,6), aufgrund der fehlenden Aktivität im DPPH-Test, aber hohen Aktivität in α TEAC-, FRAP- und LPSC-Test. Die geringsten AOA aller untersuchten Substanzen zeigten BHT, die Carotinoide Phytoin und Phytofluin, sowie Tyrosol und DHLA mit gewichteten Mittelwerten zwischen 0,2 und 0,3. Lycopin (1,6) war damit ebenso wie β -Cryptoxanthin und Rubixanthin das Zweitstärkste aller 37 untersuchten lipophilen Antioxidantien – stärker als α -Tocopherol (1,4), β -Carotin und viele Xanthophylle (0,8-1,4) sowie synthetische Antioxidantien (0,3-0,9). Die AOA von DHLA gehörte zu den niedrigsten aller gemessenen AOA (0,2). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, dass **Lycopin-(Z)-Isomere** im Vergleich zur (*all-E*)-Form eine bis zu 33 % (v. a. (9Z)-Lycopin) höhere

peroxylradikalabfangende Aktivität zeigten, würde der gewichtete Mittelwert der AOA der untersuchten Lykopin-(Z)-Isomere sogar von 1,6 auf 1,8 steigen. Die AOA der untersuchten **apo-Lykopinoide** sank drastisch mit sinkender Kettenlänge (Tab. A.8). Innerhalb aller vom Lykopin abgeleiteten Substanzen (Isomere, apo-Lykopinoide) zeigten die Lykopin-(Z)-Isomere die höchste AOA (Tab. A.9) mit einem gewichteten Mittelwert von 2,7-2,9, gefolgt von (*all-E*)-Lykopin (2,6). Die Verkürzung der Kettenlänge um 9 bis 11 Kohlenstoffeinheiten in den apo-Lykopinoiden, und somit einer Verkürzung des kohlenstoffbasierten Polyen-Systems um 1-2 CDB, verringerte die AOA im Vergleich zum Lykopin drastisch – im Falle des apo-6'-Lykopinals um 45 % bzw. im Falle von apo-8'-Lykopinal um 63 %, trotz der konjugierten endständigen Carbonylfunktionen in beiden apo-Lykopinoiden. Die gewichteten Mittelwerte der weiteren apo-Lykopinoide schwankten zwischen nicht messbarer AOA und 0,4, abgesehen von apo-10'-Lykopinol und apo-10'-Lykopinsäure mit gewichteten Mittelwerten von 0,9 bzw. 1,0. Damit besaßen die meisten apo-Lykopinoide eine mehr als 90 % niedrigere AOA als Lykopin.

Ein großes Problem, dass bereits von vielen Autoren angesprochen wurde (siehe auch Seite 65), ist die fehlende Korrelation zwischen den gemessenen AOA, welche am gleichen Probenmaterial unter Nutzung verschiedener Methoden ermittelt wurden. Auch besteht häufig keine Korrelation zwischen den AOA mit dem gleichen Testsystem, die aber in verschiedenen Laboren bestimmt wurden [140]. Da es aber im Moment keine einfache, universell einsetzbare Methode zur Bestimmung der „gesamten“ antioxidativen Kapazität gibt [23,140], wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden basierend auf unterschiedlichen Oxidationsmitteln und Reaktionsmechanismen entwickelt, um die Reaktion unterschiedlicher Substanzen mit den verschiedensten Radikalspezies zu untersuchen. Eine Standardisierung, also eine Festlegung auf eine „Handvoll“ von Methoden, und international durchgeführte Ringversuche mit einigen wenigen standardisierten Proben (bspw. koordiniert durch die IUPAC) wird daher dringend empfohlen. Auf dem Gebiet der wasserlöslichen Antioxidantien schlug vor einigen Jahren die Arbeitsgruppe um R. L. Prior vor, den Gesamtphenol-Test, den TEAC-Test und den ORAC-Test in die Routine-Analytik aufzunehmen [140]. Der TEAC-Test ist eine Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Substanzen, basierend auf Elektronentransfer (ET). Der ORAC-Test zur Bestimmung der Aktivität von Antioxidantien gegenüber Peroxylradikalen auf Basis von HAT-Reaktionen besitzt dagegen höhere biologische Relevanz. Der Gesamtphenol-Test ist zusätzlich ein schneller, einfa-

cher, kostengünstiger, reproduzierbarer und robuster Test, der für die Hochdurchsatzanalytik automatisierbar ist [140], und einen ersten Eindruck von der zu erwartenden antioxidativen Kapazität von Lebensmitteln vermittelt. Sowohl der ORAC-Test als auch der TEAC-Test bieten die Möglichkeit hydrophile als auch lipophile Lebensmittelextrakte zu messen. Der in dieser Arbeit optimierte TEAC-Test (α TEAC-Test) erlaubt sogar die Messung stark apolarer Antioxidantien wie Lycopin. Im Gegensatz dazu muss der ORAC-Test mit CD für die Messung stark apolarer Verbindungen in zukünftigen Experimenten optimiert werden, denn die bisher publizierten Anwendungen und die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigten die Grenzen des ORAC-Tests für eine Anwendung bei lipophilen Verbindungen auf (Seite 54). Eine sehr aufwändige und für die Routineanalytik ungeeignete Methode zur Herstellung von binären Lycopin-CD-Lösungen wurde 2006 publiziert. Die hergestellten wässrigen Lösungen besaßen jedoch nur Halbwertszeiten von 1-4 Tagen bei 4 °C [223]. Studien zeigten, dass die Radikalabfangrate von Carotinoiden gegenüber Peroxylradikalen bei der Nutzung von CD im Vergleich zu Messungen in homogenen Lösungen stark erniedrigt war [224]. Wenn dies auch für andere lipophile Substanzen zutreffen würde, müsste der Einsatz von Cyclodextrinen überdacht werden. Die Bildung von Mizellen durch den Einsatz von Triton X-100, anstelle des Einsatzes von CD, zeigte in Untersuchungen von Romero *et al.* (2010) im ORAC-Test mit Pyrogallol als oxidierbares Substrat, dass sich bspw. β -Carotin nur schlecht in die Mizellen integrieren ließ und keinerlei antioxidativen Schutz bot [225]. In zukünftigen ORAC-Messungen könnte das Einbringen von Carotinoiden in das Testsystem durch Bindung an komplexe Kohlenhydrate wie Arabinogalaktan erfolgen. Polykov (2009) zeigten, dass so Canthaxanthin in Konzentrationen bis 5 mM in Lösung gebracht werden konnte [226].

4.4 Schlussfolgerungen

Als Schlüsselstelle für die AOA von **Vitamin E** konnte in allen 5 Testsystemen die Hydroxylgruppe am Chromanolring identifiziert werden. Eine Veresterung führte zum Verlust der AOA von Vitamin E. α -Tocopherylester, wie α -Tocopherolacetat oder -succinat, bieten folglich keinen Schutz vor LPO in Lebensmitteln oder Kosmetika. Für eine Supplementation zur Erhöhung der Vitamin-E-Zufuhr sind Vitamin-E-Ester dennoch geeignet, da diese Ester durch intestinale Enzyme gespalten werden können. Tocotrienole besaßen häufig eine ähnlich hohe (DPPH-, α TEAC-, FRAP-, LPSC-Test) oder mitunter sogar höhere AOA (ORAC-Test) als ihre verwandten Tocopherole, und könnten damit als fettlösliche Antioxidantien im Lebensmittel von Interesse sein.

Auf Basis eines gewichteten Mittelwertes, der aus den Einzelwerten aller genutzten Testsysteme berechnet wurde, wurde **Ellagsäure** als stärkstes lipophiles Antioxidans ermittelt. Ellagsäure ist jedoch schlecht bioverfügbar, da sie nur geringe Stabilität im Basischen aufweist und im Epithelium des GIT akkumuliert [227]. Zudem wird sie, wie viele ebenfalls *in vitro* hoch antioxidativ wirksame wasserlösliche Polyphenole, schnell wieder aus dem Gewebe ausgeschleust [228]. Die mögliche präventive Wirkung der Ellagsäure aufgrund ihrer hohen AOA beschränkt sich demnach auf das Darmepithel. Die hohe AOA von Ellagsäure kann als Schutz vor LPO bei der Lagerung von Lebensmitteln eher zum Tragen kommen. Neben Ellagsäure wurden **Carotinoide** (insbesondere Lycopin) als sehr starke fettlösliche Antioxidantien *in vitro* ermittelt. Im Gegensatz zu Ellagsäure reichern sich Carotinoide im Fettgewebe an und stehen damit dem Körper längerfristig als Antioxidantien zur Verfügung. *In vivo* richten sich Xanthophylle mit ihren weit entfernten polaren Gruppen membranübergreifend aus. [229]. Dagegen ordnen sich Carotine im hydrophoben cholesterolesterreichen Kern von LDL oder in Membranen vollständig rechtwinklig zu den Acylketten der Phospholipide an [230]. Vitamin E befindet sich an der Oberfläche von LDL-Partikeln und Membranen. Während bis zu 12 Moleküle Vitamin E an der Oberfläche von LDL-Partikel verankert sind, enthält ein LDL-Partikel nur 0,7-1,2 Moleküle der jeweiligen Carotinoide Lycopin, β -Carotin und Lutein [231,232]. Bedenkt man jedoch die im Vergleich zu α -Tocopherol mehr als 10- bis 20-fach höhere Aktivität der Carotinoide gegenüber Peroxylradikalen im LPSC-Test, erhöht sich die Bedeutung der Carotinoide als antioxidativer Schutz für LDL-Partikel beträchtlich. Carotine könnten v. a. unpolare Radikale im Kern von LDL oder Membranen effektiver abfangen als Vitamin E und Xanthophylle hätten besseren Zugang zur Peripherie von LDL-Partikeln, um präventiv eine Kettenfortpflanzung ins Innere zu inhibieren. Die Relevanz von **Liponsäure** als endogenes Antioxidans wird aufgrund der niedrigen Konzentrationen im menschlichen Gewebe von einigen Autoren als unwahrscheinlich erachtet [123]. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der AOA für DHLA, die in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen *in-vitro*-Testsystemen (α TEAC, FRAP, DPPH, ORAC, LPSC) ermittelt wurden, gestützt.

Die AOC spielt jedoch nicht nur *in vivo*, sondern auch im Lebensmittel eine Rolle. Die Haltbarkeit von Lebensmitteln gegenüber oxidativem Verderb hängt von der AOC der Lebensmittelinhaltsstoffe ab. **Lycopin** ist das quantitativ bedeutsamste Carotinoid der Tomate (~60 % des Gesamt-Carotinoidgehaltes) [66]. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand verschiedener Testsysteme auch gezeigt werden, dass Lycopin das wichtigste

lipophile Antioxidans in Tomatenprodukten ist (Anteil an der lipophilen AOC: ca. 40-80 %). Aufgrund der hohen AOA von Lycopin im Vergleich zu α -Tocopherol und synthetischen Antioxidantien könnte Lycopin natürlicher Ersatz für bisher verwendete Antioxidantien in fettreichen Lebensmitteln sein, um eine LPO zu hemmen.

(Z)-Isomere des Lycopins wurden in der vorliegenden Arbeit als antioxidativ wirksamste Lycopin-Verbindungen *in vitro* ermittelt. Die Isomerisierung des Lycopins während der Verarbeitung von Tomaten zu Tomatenprodukten (Ketchup, Tomatenmark, Tomatensuppe, Tomatensoße) verändert nicht die Fe^{3+} -reduzierenden Eigenschaften und erhöht sogar die Aktivität gegenüber Peroxylradikalen und damit den Beitrag des Lycopins zum antioxidativen Potential im Tomatenprodukt. Aus den vorgestellten *in-vitro*-Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der hohe Beitrag von Lycopin-(Z)-Isomeren in humanen Geweben von bis zu 70 % am Gesamt-Lycopingehalt [87] nicht mit einer Veränderung des Beitrags von Lycopin zur ET-basierenden AOC assoziiert werden kann. Die auf Peroxylradikalabfang basierende AOC wird sogar erhöht. Für eine Absicherung dieser Hypothese sind jedoch zukünftige *in-vivo*-Studien erforderlich. Um die gegenüber dem (*all-E*)-Lycopin höhere AOA von Lycopin-(Z)-Isomeren im Plasma nutzen zu können, ist eine Zufuhr höherer Konzentrationen an (Z)-Isomeren möglich, bspw. über verarbeitete Tomatenprodukte, in denen durch den Erhitzungsprozess der Anteil an (Z)-Isomeren höher ist, wie von Schierle *et al.* (1997) beschrieben [86]. Auch das in *Tangerine*-Tomaten dominierende (7Z,9Z,7Z',9'Z)-Lycopin ist eine Möglichkeit zur Nutzung der hohen antioxidativen Wirkung von Lycopin-(Z)-Isomeren, da zum Einen dieses *tetra*-(Z)-Isomer bereits in rohen *Tangerine*-Tomaten in großen Mengen vorkommt (Anteil am Gesamt-Lycopin bis zu 90 % [233]) und zum anderen auch besser verfügbar ist als das in roten Tomaten dominierende (*all-E*)-Isomer [234], welches erst bei der Absorption im GIT bzw. in der Leber in (Z)-Isomere umgewandelt werden müsste. Zudem sind Hagebuttenprodukte reich an (Z)-Isomeren des Lycopins [235].

Kombiniert man die niedrigen AOA der **apo-Lycopinoide**, die in der vorliegenden Arbeit mittels verschiedener *in-vitro*-Tests gemessen wurden, und die mittels LC-MS von Kopec *et al.* (2009) gefundenen Gehalte der apo-Lycopinoide in Humanplasma von ca. 1 nmol pro L, bzw. in Tomatenprodukten von ca. 100 μg je 100 g [106], lässt sich die *direkte* AOA dieser Substanzen sowohl im Lebensmittel als auch im Humangewebe im Vergleich mit Lycopin als vernachlässigbar einstufen. Dieser Umstand wurde bereits

von Erdman *et al.* (2009) vermutet [6]. Lycopin zeigte in der vorliegenden Arbeit eine deutlich höhere AOA und ist in viel höheren Konzentrationen sowohl im Plasma (bis zu 1 $\mu\text{mol pro L}$) und als auch in Tomatenprodukten (bis zu 34 mg je 100 g) enthalten [106]. Dementgegen wird eine antioxidative Wirkung der apo-Lycopinoide im GIT vermutet. In einem *in-vitro*-Modell, welches den physiologischen Bedingungen des Darms nachempfunden war, zeigten apo-6'- und apo-8'-Lycopinal eine höhere AOA als Lycopin selbst [236]. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten *in-vitro*-Ergebnisse kann aber eine antioxidative Wirkung von Lycopin-Isomeren und apo-Lycopinoiden *in vivo* nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dies muss in zukünftigen Experimenten ermittelt werden. Eine Wirkung der Lycopin-Abbauprodukte könnte in der bereits vermuteten und teilweise auch gezeigten Aktivierung der Genexpression liegen [6,108]. Neueste Erkenntnisse weisen daraufhin, dass einige Antioxidantien oder ihre Abbauprodukte Aktivität auf zellulärer Ebene besitzen und so in die Regulierung antioxidativer Substanzen und Enzyme eingreifen [23]. Diapo-Carotindiale, oxidative Carotinoid-Abbauprodukte, welche auf beiden Seiten der Kohlenstoffkette Aldehydgruppen tragen, zeigten eine stärkere Aktivierung der über Transkription gesteuerten antioxidativen Antwort (ARE, *engl.* Antioxidant Response Element Transcription System) als Lycopin selbst [237]. Lycopinmetabolite konnten die Expression von Phase-II-Enzymen über den gleichen Mechanismus aktivieren wie Carotinoide – teilweise sogar effizienter als Carotinoide selbst [238].

4.5 Physiologische Relevanz der Testsysteme

Die biologische bzw. physiologische Relevanz vieler *in-vitro*-Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität wird häufig in Frage gestellt. Während der ORAC- und der LPSC-Test Peroxylradikale als Oxidantien nutzen und damit die Propagationsphase der Lipidperoxidation imitieren, werden im αTEAC -Test und DPPH-Test synthetische Radikale genutzt. Im FRAP-Test wird ein physiologisch wenig relevanter saurer pH-Wert genutzt.

Das im lipophilen **αTEAC -Test** bzw. hydrophilen **TEAC-Test** eingesetzte $\text{ABTS}^{\bullet+}$ wurde als ein unphysiologisches Chromophor diskutiert [239]. Die Bestimmung der AOC biologischer Proben mittels αTEAC -/TEAC-Test bietet gegenüber dem FRAP-Test und auch Gesamtphenoltest den Vorteil, dass die $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Bleichung bei einem physiologischen pH-Wert (7,4) durchgeführt wird. So lassen sich im Hinblick auf den pH-Wert die *in-vitro*-Ergebnisse des αTEAC -Tests besser auf die Wirkung *in vivo*

übertragen als die FRAP-Werte. Die Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen, die diesen *in-vitro*-Test in verschiedenen *in-vivo*-Studien nutzten, weisen ebenso auf eine mögliche physiologische Relevanz hin. Einige Studien zeigten in der Vergangenheit, dass die Messung des antioxidativen Potentials mittels ABTS^{•+}-Bleichung zur Aufklärung der Ursache einiger Erkrankungen beitragen kann. Rahman *et al.* (1996) zeigten in ihren Studien, dass die antioxidativen Status im Plasma von Rauchern nach Zigarettenkonsum, gemessen mittels TEAC-Test, im Vergleich zu nichtrauchenden Probanden sanken [240]. Körperliche Belastung durch Sport erniedrigte signifikant den antioxidativen Status im Plasma, gemessen mittels TEAC-Test, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe [241]. Ein erhöhter oxidativer Stress spielt mglw. auch eine pathophysiologische Rolle bei Schizophrenie. So detektierten Yao *et al.* (1998) mittels TEAC-Test signifikant erniedrigte antioxidative Status in schizophrenen Patienten gegenüber einer gesunden Probandengruppe [242]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einer Studie von Ilzecka (2003) in Patienten mit amyotroper Lateralsklerose ($n=28$) ein signifikant erhöhter antioxidativer Status im Plasma im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ($n=20$), unabhängig von Alter, Geschlecht oder Grad der Erkrankung. Der erhöhte antioxidative Status wurde als ein Ergebnis des endogenen Schutzmechanismus' gegen freie Radikale interpretiert [243]. Auch Epilepsie wurde mit erniedrigten antioxidativen Kapazitäten im Plasma, gemessen u. a. mittels TEAC-Test, assoziiert [244]. Patienten mit Nierenerkrankungen im Endstadium leiden häufig unter arteriosklerotischen Veränderungen. Diese Veränderungen werden mit Hämodialyse-induziertem oxidativen Stress assoziiert. Im Plasma von Hämodialyse-Patienten konnten u. a. mittels TEAC-Test signifikant niedrigere antioxidative Kapazitäten detektiert werden [245]. Zudem wurden in einer Humaninterventionsstudie auch signifikant niedrigere antioxidative Status in älteren Personen ($n=30$, mittleres Alter > 65 Jahre) im Vergleich zu einer jüngeren Kontrollgruppe ($n=20$, mittleres Alter < 26 Jahre), gemessen mittels TEAC-Test, beobachtet [246]. Dies zeigt, dass eine große Anzahl degenerativer Erkrankungen mit veränderten antioxidativen Status der Personen assoziiert wird, und die ABTS^{•+}-Bleichmethode eine einfache, schnelle, reproduzierbare Methode ist, um die nicht-enzymatische antioxidative Kapazität (sowohl hydrophil als auch lipophil) zu bestimmen. Zusätzlich sollten aber auch immer die Aktivitäten der enzymatischen Schutzsysteme (Katalase, Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase etc.) bestimmt werden.

Übergangsmetallinitiierte oxidative Prozesse finden beim Verderb von Lebensmitteln statt. Für die Lagerung von Lebensmitteln ist somit die Kenntnis über die Fe^{3+} -reduzierende Aktivität von Komponenten von essentieller Bedeutung. Die Anwendung der **FRAP-Methode** könnte daher einen wichtigen Beitrag leisten. Jedoch die physiologische Relevanz der Messung der Fe^{3+} -reduzierenden AOA/AOC ist umstritten [130,131]. Der FRAP-Test nutzt die Eigenschaft von Antioxidantien Übergangsmetallionen zu reduzieren (siehe Kapitel 1.3.1). Als ein Nachteil der Methode wird der physiologisch unrealistische, aber mechanistisch notwendige pH-Wert diskutiert. Im FRAP-Test ist der pH von 3,6 zur Realisierung eines stabilen $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPTZ}_2$ -Komplexes notwendig [182]. Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse zur reduzierenden AOC im FRAP-Test von Antioxidantien auf die *in-vivo*-Situation ist daher schwierig. Die menschliche Nahrung enthält aber eine Vielzahl von Prooxidantien, bspw. $\text{Fe}^{2+/3+}$ frei oder in komplexer Form als Häm, insbesondere bei einer „fleischlastigen“ Ernährung [247]. Häm und hämhaltige Proteine gelten als starke Prooxidantien und nichtresorbiertes Häm wird mit prooxidativen Effekten im Kolon in Verbindung gebracht [247]. Die Ergebnisse des FRAP-Wertes ermöglichen daher einen Einblick in mögliche antioxidative Wirkungen von Substanzen im Magen (pH~2). Antioxidantien aus der Nahrung, wie das fettlösliche Lycopin, könnten aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung bereits vor der Absorption zur Vermeidung oxidativen Stresses und den damit assoziierten Erkrankungen im GIT hilfreich sein [247]. Als weiterer Nachteil der FRAP-Methode wird die geringe Reaktion thiolhaltiger Antioxidantien angeführt. Thiole, die physiologisch eine bedeutende Rolle in der Abwehr von ROS/RNS einnehmen, zeigen bei sauren pH-Werten und gegenüber Fe^{3+} nur sehr geringe Aktivität, wie bereits in der Literatur für Protein-SH-Gruppen bspw. in Albumin beschrieben [130], so dass deren antioxidative Wirkung unterschätzt wird. Das Redoxpaar α -LA/DHLA zeigte daher in der vorliegenden Arbeit nicht überraschend eine geringe Fe^{3+} -reduzierende Wirkung. Im Gegensatz dazu bietet die kürzlich vorgestellte CUPRAC-Methode, die sowohl für hydrophile als auch lipophile Antioxidantien optimiert wurde [135,248], den Vorteil der Nutzung eines physiologischen pH-Wertes (pH~7), ähnlich dem α TEAC-Test, so dass im Gegensatz zum FRAP-Test eine intensive Reaktion mit thiolhaltigen Antioxidantien (Glutathion, Albumin, DHLA) möglich ist [126]. Bei der Verwendung des FRAP-Tests zur Bestimmung der AOA bzw. AOC muss in Betracht gezogen werden, dass das entstehende Fe^{2+} reaktiver ist als Fe^{3+} [23]. Folglich können Antioxidantien, welche Fe^{3+} reduzieren, unter bestimmten Umständen prooxidative Effekte auslösen. Ein typisches

Beispiel hierfür wäre die Kombination von niedrigkonzentrierten Ascorbinsäure-Lösungen und Eisenionen. Die prooxidative Wirkung ist lange bekannt und wird auch bewusst genutzt um bspw. *in vitro* eine durch freie Radikale vermittelte Oxidation auszulösen [23,249]. *In vivo* wurde diese prooxidative Reaktion jedoch bisher nicht beschrieben, da *in vivo* Metallionen nicht frei vorliegen, sondern durch Proteine gebunden werden [250]. Der FRAP-Test wurde in Studien mehrfach eingesetzt, um den antioxidativen Status von Probanden zu messen, trotz der diskutierten Nachteile. In Patienten mit rheumatischer Arthritis und Osteoarthritis wurden erhöhte Konzentrationen von Eisen und auch Kupfer und ein damit verbundener oxidativer Stress (hohe Superoxidkonzentration, niedrige GSH und Gesamt-Thiol-Gehalte) detektiert [251,252]. Die Bestimmung der AOC mittels FRAP-Test könnte in diesem Fall sinnvoll sein, um festzustellen, inwieweit sich das nicht-enzymatische antioxidative Potential als Schutz vor den höheren Gehalten an prooxidativ wirksamen Übergangsmetallionen im Vergleich zu gesunden Personen unterscheidet. In Studien von Rodrigo *et al.* (2008) besaßen Patienten mit chronischem Bluthochdruck ($n=110$) eine signifikant ($p<0,01$) geringere AOC im Plasma, gemessen mittels FRAP-Test, als normotensive Probanden ($n=110$). Die Supplementation der Bluthochdruck-Patienten ($n=55$) mit den antioxidativen Vitaminen C und E (täglich 1 g L-Ascorbinsäure und 400 IU Vitamin E als *RRR- α -Tocopherolacetat*) erhöhte zum einen die FRAP-Werte und senkte den Blutdruck hoch signifikant ($p<0,01$) gegenüber der Bluthochdruck-Patientengruppe ohne Supplementation ($n=55$) [253]. Auch in HKE-Patienten ($n=73$) wurden mittels FRAP-Test höchst signifikant ($p<0,001$) niedrigere AOC im Plasma im Vergleich zu gesunden Patienten ($n=63$) detektiert [254]. Dies zeigt, dass Antioxidantien, die im FRAP-Test hohe Fe^{3+} -reduzierende Aktivitäten zeigten, auch *in vivo* die Entwicklung mit oxidativem-Stress-assoziiierter degenerativer Erkrankungen verzögern könnten, wenn sie gut bioverfügbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde u. a. *in vitro* mittels **LPSC-Test** die Aktivität von Lykopen gegenüber Peroxylradikalen, die in der Propagationsphase der LPO von Membranen eine wichtige Rolle spielen, untersucht. Die Reihenfolge der ermittelten AOA der Carotinoide im lösungsmittelbasierenden LPSC-Test glich derer, die in einem physiologischorientierten membranbasierenden Test ebenfalls unter Nutzung von *diazo*-Verbindungen als Radikalinitiatoren bestimmt wurde: Lykopen < β -Carotin < Lutein=Zeaxanthin < Astaxanthin [255]. Dies zeigt, dass der weniger aufwändigere LPSC-Test die gleichen Ergebnisse lieferte, wie physiologischorientierte Methoden.

Luminol-Chemilumineszenz-Methoden, wie der in der vorliegenden Arbeit angewandte LPSC-Test, wurden daher bereits vielfach zur Bestimmung der AOC von Plasma eingesetzt, insbesondere bei Studien an Patientengruppen, die an oxidativem-Stress-assoziierten Erkrankungen litten. So berichteten Koren *et al.* (2009) von einer erhöhten AOC des Plasmas in Glykogenose-Patienten (Glykogenspeicher-Erkrankung Ia) gegenüber einer Kontrollgruppe, gemessen mittels Chemilumineszenz-basierender Methode. Diese Patienten zeigten aber trotz erhöhten oxidativen Stresses durch die erhöhten Blutglukosespiegel keine Anzeichen von Arteriosklerose. Die Autoren postulierten, dass die ebenfalls detektierten erhöhten Harnsäurekonzentrationen im Blut dieser Patienten einer Arteriosklerose vorbeugen. Durch Anwendung des FRAP-Tests konnte dieser Zusammenhang untermauert werden [256]. Ein Luminol-AAPH-basierendes Testsystem wurde auch von Serra *et al.* (2009) genutzt, um die AOC von Plasma in Patienten mit altersassoziierten Erkrankungen zu untersuchen. Die Gesamt-AOC im Plasma der Parkinson-, Demenz- und Alzheimerpatienten ($n=15$, $n=48$, $n=68$) war dabei hoch bis höchst signifikant niedriger ($p<0,01$ bzw. $p<0,001$) als jene der gesunden Kontrollgruppe ($n=46$) [257].

4.6 Ausblick

Hinsichtlich der Testsysteme arbeiteten die lipophilen Varianten des DPPH-, FRAP-, α TEAC- und LPSC-Test zuverlässig und waren für Einzelsubstanzen als auch für komplexe Lebensmittelproben einsetzbar. Im Gegensatz zu vielen anderen lipophilen Antioxidantien zeigten Carotinoide jedoch keine Reaktion mit DPPH. Dieses „Phänomen“ sollte aufgeklärt werden. Im ORAC-Test mit β -CD als Lösungsvermittler gelang dagegen eine Messung von stark apolaren Antioxidantien (wie Lykopen) nicht. In zukünftigen ORAC-Messungen könnte das Einbringen von Carotinoiden in das Testsystem durch Bindung an komplexe Kohlenhydrate wie Arabinogalaktan erfolgen. Die Ursache für die unterschiedliche Abhängigkeit der AOA der Gallate von der Kettenlänge des Esters in den einzelnen Testsystemen sollte aufgeklärt werden.

Olivenöl zeigte in der vorliegenden Arbeit häufig eine höhere AOC, als dies anhand der Vitamin-E-Gehalte zu erwarten gewesen wäre. Zur vollständigen Aufklärung der lipophilen AOC von Olivenöl sollten in zukünftigen Studien fettlösliche phenolische Verbindungen wie Tyrosol in die Analytik einbezogen werden. Sowohl in Karottensaft als auch in Sanddornsaft und Orangensaft konnten in den genutzten Testsystemen 30-90 % der lipophilen AOC weder den chromatografisch quantifizierten farbigen Carotinoiden

noch dem Vitamin E zugeordnet werden. Dies ist mglw. auf die nicht-quantifizierten farblosen azyklischen Carotinoide (Phytoin u. a.) sowie α - und β -Carotin-Vorstufen zurückzuführen. Daher sollten in zukünftigen Studien die AOA dieser Carotine bestimmt werden. Auch andere fettlösliche phenolische Komponenten oder mögliche synergistische Effekte müssten analysiert werden. Um die lipophile AOC der xanthophyllreichen Säfte (Orangensaft, Sanddornsaft) vollständig aufklären zu können, sollten in zukünftigen Studien die Konzentrationen von Xanthophyllen und insbesondere deren Ester mittels LC-MS anstelle von HPLC-DAD ermittelt werden. So ließe sich ein bei der Verseifung ausgelöster Abbau von Carotinoiden vermeiden. Anschließend könnte unter Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Testsysteme ihr Beitrag zur AOA der Säfte ermittelt werden.

Zukünftige Studien sollten sich der Adaption des in dieser Arbeit genutzten LPSC-Tests zur Messung von Plasma widmen. Interessant wäre zudem, den Beitrag einzelner Carotinoide sowie von Vitamin E zur lipophilen AOC biologischer Flüssigkeiten wie Plasma oder Serum zu kennen. In den letzten Jahren wurde begonnen, Methoden zur Bestimmung der AOC von Lebensmittelextrakten, wie TEAC- und DPPH-Test, mit chromatografischen Methoden (HPLC) zu koppeln, sog. *online*-Methoden zur Bestimmung der AOC [258-260]. Auf die Detektion der schrittweise eluierenden Einzelsubstanzen des Extraktes, bspw. mit einem UV-vis-Detektor [261] oder MS-Detektor [262] folgt eine Nachsäulen-Derivatisierung mit ABTS^{•+} (im TEAC-Test) oder DPPH[•] (im DPPH-Test), wobei die durch die Antioxidantien verursachte Absorptionsabnahme mit einem weiteren UV-vis-Detektor verfolgt werden kann. Durch diese Anordnung wird eine Zuordnung der AOA zu einzelnen Verbindungen in der komplexen Matrix möglich. Auch luminolbasierende Chemilumineszenz-Methoden wurden bereits mit den Vorteilen der HPLC-Analytik gekoppelt [263,264]. Die Bestimmung der AOA einzelner stark apolarer Verbindungen (wie Lycopin) im Lebensmittelextrakt oder auch im Plasma mittels *online*-Kopplungen zwischen HPLC und den in der vorliegenden Arbeit genutzten Methoden zur Bestimmung der AOA/AOC muss Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

In zukünftigen Experimenten muss ermittelt werden, inwieweit die in der vorliegenden Arbeit zusammengestellten *in-vitro*-Ergebnisse zur antioxidativen Wirkung von Carotinoiden, Lycopin-Isomeren und apo-Lycopinoiden *in vivo* relevant sind.

5 Zusammenfassung

Verschiedene degenerative Erkrankungen des Menschen, wie Arteriosklerose, Alzheimer, Typ-II-Diabetes, Krebs oder Parkinson, werden mit oxidativem Stress assoziiert. Epidemiologische Studien ließen den Schluss zu, dass über die Nahrung zugeführte wasser- und fettlösliche Antioxidantien, welche häufig der Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe entstammen, diesem Stress entgegenwirken können. Sowohl das französische Paradoxon als auch die mediterrane Ernährung zeigen den Zusammenhang von antioxidantienreicher Ernährung (in Frankreich in Form von Rotwein; spanische Ernährung allgemein reich an Antioxidantien) und dem niedrigeren Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, trotz eines hohen Fettkonsums. Zudem führt die Lipidperoxidation zu einem oxidativen Verderb von Lebensmitteln bei der Lagerung. Daher ist eine Kenntnis über die antioxidative Aktivität einzelner Verbindungen, der humanen Gewebe und der verzehrten Lebensmittel wichtig.

Über die antioxidative Wirkung von wasserlöslichen Antioxidantien wie Vitamin C ist viel bekannt. Zur Bestimmung der hydrophilen antioxidativen Aktivität einzelner Substanzen oder der antioxidativen Kapazität von Lebensmitteln und Plasma wurden in den letzten zwei Jahrzehnten zahlreiche Methoden etabliert. Bisher fehlten jedoch geeignete Methoden, um die antioxidative Aktivität von insbesondere stark apolaren Antioxidantien, wie dem in Tomaten enthaltenen Lycopin, gegenüber verschiedenen „freien Radikalen“ *in vitro* messen zu können.

Tomaten sind, mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 24,6 kg pro Jahr (frische Tomaten und Tomatenprodukte, 2009/2010), das in Deutschland mengenmäßig meistverzehrteste Gemüse. Neben der (*all-E*)-Form spielen (*Z*)-Isomere des Lycopins sowohl in verarbeiteten Tomatenprodukten als auch in humanem Gewebe eine quantitativ bedeutsame Rolle. Zudem wurden kürzlich verschiedene apo-Lycopinale in geringsten Mengen in verschiedenen lycopinreichen Lebensmitteln und auch in Humanplasma bestimmt. Lycopin-(*Z*)-Isomere sowie kurzkettige Lycopin-Abbauprodukte (sog. *apo-Lycopinoide*) werden als mögliche bioaktive Metaboliten des Lycopins diskutiert, welche die präventive Wirkung von Lycopin gegen degenerative Erkrankungen erklären könnten.

Die Dissertation hatte daher folgende Zielstellungen:

- Optimierung von bereits publizierten Methoden und/oder Neuentwicklung von Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität lipophiler Substanzen.

- Ermittlung der antioxidativen Aktivität von verschiedenen lipophilen Substanzen, wie Tocopherolen, Tocotrienolen, Carotinoiden, synthetischen Antioxidantien wie BHT, BHA, Gallussäureester uvm. sowie der antioxidativen Kapazität ausgewählter Lebensmittel.
- Untersuchung des Einflusses der Konfigurationsisomerie von Lycopin auf dessen antioxidative Aktivität in verschiedenen Testmethoden.
- Beurteilung der antioxidativen Aktivität von Lycopin-Abbauprodukten im Vergleich zu Lycopin selbst, und Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen in Abhängigkeit von Kettenlänge und endständiger funktioneller Gruppe der Verbindungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene **Methoden optimiert**, die bereits für wasserlösliche Antioxidantien etabliert wurden bzw. **Methoden neuentwickelt**, um lipidlösliche Antioxidantien schnell und reproduzierbar messen zu können. Für die Vitamin-E-aktiven Tocopherole und Tocotrienole konnten fünf Testsysteme erfolgreich optimiert werden. Drei dieser Testsysteme beruhen auf Elektronentransfer-Reaktionen, und messen somit die Reduktion des genutzten Oxidans durch das Antioxidans. Im Falle des *α -Tocopherol Equivalent Antioxidant Capacity* (α TEAC)-Tests wurde das stabile ABTS^{•+} als Oxidans genutzt, während im *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)-Test Fe³⁺-Ionen durch Antioxidantien reduziert wurden. Desweiteren kam die Bleichung des stabilen Stickstoffradikals DPPH[•] zur Anwendung. Basierend auf Wasserstoffatomtransfer-Reaktionen bzw. Adduktbildung wurden der *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)-Test und der *Luminol-chemiluminescence based Peroxyl radical Scavenging Capacity* (LPSC)-Test etabliert, mit denen sich die Aktivität lipophiler Antioxidantien gegenüber Peroxylradikalen bestimmen lässt.

In Abhängigkeit vom Testsystem zeigten sich deutliche Unterschiede in der **antioxidativen Aktivität von Tocopherolen und Tocotrienolen**, die sich anhand der chemischen Struktur des jeweiligen Vitamers als auch durch die im Testsystem genutzten Bedingungen erklären lassen. Schlüsselstelle der antioxidativen Aktivität der Vitamin-E-aktiven Verbindungen war die Hydroxylgruppe am Chromanring. Eine Veresterung der Gruppe (wie in α -Tocopherolacetat) führte unabhängig vom gewählten Testsystem zum Verlust der antioxidativen Wirkung. Die Art der Seitenkette hatte nur im ORAC-Test, bei dem Methyl- β -Cyclodextrin als Lösungsvermittler genutzt wurde, einen Einfluss. Die ungesättigte Phytanylstruktur der Tocotrienole resultierte in einer 2-fach höheren peroxylradikalabfangenden Wirkung gegenüber den verwandten Tocopherolen.

Drei dieser fünf optimierten Methoden – α TEAC-, FRAP- und LPSC-Test – konnten auch für eine Bestimmung der **antioxidativen Aktivität von Carotinoiden** sowie von Lykopen-Isomeren und Lykopen-Abbauprodukten erfolgreich optimiert werden. Carotinoide zeigten im DPPH-Test keine Reaktion. Aufgrund des stark wässrigen Testmediums im ORAC-Test ließen sich stark apolare Verbindungen, insbesondere β -Carotin und Lykopen, nicht quantitativ reproduzierbar lösen, so dass auch der ORAC-Test nicht für Carotine geeignet war.

Lykopen zeigte die höchste Aktivität aller 36 untersuchten lipophilen Substanzen beim „Bleichen“ von ABTS^{•+} (α TEAC-Test) – 4-fach höher als α -Tocopherol (Vitamin E). Auch bei der Reduktion von Fe³⁺ im FRAP-Test zeigte Lykopen eine der höchsten Aktivitäten – doppelt so hoch wie die von Vitamin E. Nur Ellagsäure, das Dimer der Gallussäure, und das Xanthophyll Rubixanthin zeigten eine höhere antioxidative Aktivität, aufgrund ihrer ausgedehnten konjugierten Polyphenolstruktur. Beim Abfangen von Peroxylradikalen (LPSC-Test), erzeugt durch thermischen Zerfall einer *diazo*-Substanz, zeigte Lykopen eine mehr als 10-fach höhere Aktivität als Vitamin E, jedoch 30-50 % niedriger als die vieler Xanthophylle. Insbesondere Astaxanthin (3,3'-Dihydroxy- β,β -carotin-4,4'-dion) fing aufgrund der größeren Polyenstruktur Peroxylradikale stärker ab als Lykopen. Fasst man die antioxidativen Aktivitäten der verschiedenen lipophilen Antioxidantien in den unterschiedlichen Testmethoden in Form eines gewichteten Mittelwertes zusammen, so zeigte sich, dass Ellagsäure das stärkste aller untersuchten lipophilen Substanzen war, gefolgt von Lykopen, β -Cryptoxanthin und Rubixanthin.

In Experimenten zur Bestimmung der **antioxidativen Aktivität von Lykopen-(Z)-Isomeren**, die in größeren Mengen in stark verarbeiteten Tomatenprodukten und im menschlichen Plasma detektiert wurden ((5Z), (9Z), (13Z), (7Z,9Z,7'Z,9'Z)), konnte im FRAP-Test und im α TEAC-Test kein Einfluss der Anzahl oder der Stellung der *cis*-Doppelbindung auf die antioxidative Aktivität beobachtet werden. Im Gegensatz dazu stieg die peroxyradikalabfangende Aktivität (LPSC-Test) je weiter sich die *cis*-Doppelbindung im Zentrum des Lykopen-Moleküls befand. Daraus lässt sich für Lebensmittel schlussfolgern, dass die bei der Verarbeitung von Tomaten auftretende Isomerisierung von (*all-E*)-Lykopen zu (Z)-Isomeren die antioxidative Aktivität des Lykens nicht verringert, sondern vielmehr verstärkt. Die hohen Anteile an (Z)-Isomeren in Human- gewebe (bis über 50 % Anteil am Gesamt-Lykopen) resultieren damit in einem höheren antioxidativen Potential als dies ausschließlich durch (*all-E*)-Lykopen möglich wäre.

Apo-Lykopinoide wurden bereits in lykopinreichen Lebensmitteln (Tomate, Wassermelone, Guave) und auch im menschlichen Plasma detektiert. Mit Hilfe der drei für Carotinoide erfolgreich optimierten Methoden wurde die **antioxidative Aktivität von apo-Lykopinoiden** im Vergleich zu Lykopin untersucht. Die antioxidative Aktivität der untersuchten 15 apo-Lykopinoide sank erwartungsgemäß mit sinkender Kettenlänge. Alle untersuchten apo-Lykopinoide zeigten im Vergleich zu Lykopin geringere Aktivitäten in allen drei Testsystemen. Nur die Aktivität von apo-6'- und apo-8'-Lykopinal gegenüber Peroxylradikalen (LPSC-Test) war vergleichbar hoch wie die von Lykopin. In Abhängigkeit vom gewählten Testsystem zeigten auch die endständigen funktionellen Gruppen (Alkohol, Aldehyd, Carbonsäure, Ester) Einfluss auf die antioxidative Aktivität.

Für Lykopin selbst und einige kurzkettige Lykopin-Abbauprodukte konnte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* ein hohes antioxidatives Potential bestimmt werden, verursacht durch die Polyen-Systeme dieser Substanzen. Die meisten apo-Lykopinoide zeigten jedoch nur sehr geringe antioxidative Aktivität. Für die apo-Lykopinoide scheint aufgrund der geringen Konzentrationen im Plasma ($c < 1 \text{ nM}$) im Vergleich zu Lykopin ($c \sim 1 \text{ }\mu\text{M}$) ein Schutz des LDL vor Oxidation und damit eine Prävention von Arteriosklerose über einen direkten antioxidativen Mechanismus ausgeschlossen. Ein Einfluss als direkte Antioxidantien im GIT kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Lykopin ist ein wichtiges, *in vitro* hoch wirksames Antioxidans. In den Studien zum gesundheitlichen Nutzen von Tomatenprodukten muss jedoch bedacht werden, dass Tomaten nicht nur reich an Lykopin sind, sondern auch viele weitere Mikronährstoffe enthalten. Die Forschung sollte sich daher möglichen weiteren Mechanismen der Wirkung von Lykopin im Zusammenhang mit anderen Mikronährstoffen zu widmen.

Summary

Certain degenerative diseases such as arteriosclerosis, cancer, Alzheimer's disease, diabetes type II or Parkinson's disease were associated with oxidative stress. Furthermore, oxidative modifications of lipids can lead to deterioration of food rich in unsaturated fatty acids. Epidemiological studies, as well as the French Paradox and the typical Mediterranean diet have strengthened the theory that dietary antioxidants can counteract oxidative stress. Antioxidants are predominantly found as "phytochemicals" in plant food. Therefore, collecting data on antioxidant activities of various single compounds, as well as of typical food and human tissues, is necessary. Much is known about the antioxidant activities of hydrophilic antioxidants such as vitamin C. A variety of assays to determine the antioxidant capacities of water-soluble antioxidants in food and biological tissues were established. However, simple *in vitro* methods to determine the antioxidant activities of highly apolar compounds, such as lycopene, against various oxidants are missed. Tomatoes are the most frequently consumed vegetables in Germany and in the European Union. Beside the (*all-E*)-form, lycopene (*Z*)-isomers play a quantitatively important role in processed tomatoes and human tissues. Recently, series of lycopene breakdown products, commonly named *apo-lycopenoids*, were quantified in certain lycopene-rich products and in human plasma. Apo-lycopenoids were discussed as possible bioactive metabolites of lycopene and could possibly explain the preventive effects of lycopene against degenerative diseases. Therefore, the aims of the present investigations were optimisation and development of assays to determine the antioxidant activities of fat-soluble antioxidants (e.g. vitamin E and carotenoids), which are based on different mechanisms and use of various oxidants. Additionally, an evaluation of the structure-activity relationship of antioxidant activities of lycopene isomers and apo-lycopenoids should be drawn up.

Five assays were successfully optimised for the determination of the antioxidant capacities of single lipophilic compounds and food extracts. Three assays are based on electron-transfer (ET) reactions: α -Tocopherol Equivalent Antioxidant Capacity (α TEAC) assay, based on bleaching of the stable ABTS $^{\bullet+}$, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical bleaching assay and the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay, based on reduction of Fe $^{3+}$ embedded in a *di*-TPTZ-complex. Additionally, two assays were installed, which are based on hydrogen atom transfer (HAT): Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay and Luminol-chemilumi-

nescence based Peroxyl radical Scavenging Capacity (LPSC) assay. Both assays measure the activity of antioxidants to scavenge peroxyl radicals, generated by the decomposition of the *diazo*-compound AAPH under atmospheric conditions.

As expected, the hydroxyl group of tocopherols and tocotrienols was found to be the key of the antioxidant activities of the vitamin-E-active compounds. An influence of the type of the side chain was not found, except for the ORAC assay, where the unsaturated phytyl chain in the tocotrienols led to a doubling of the antioxidant activities compared to the related tocopherols. The influence of the pattern of methyl groups at the chromanol ring on the antioxidant activity depended on the assay used.

Surprisingly, carotenoids as well as their breakdown products did not react with the DPPH[•] radical. Additionally, the strong apolar compounds β -carotene and lycopene could not be measured in the ORAC assay. Despite the use of methyl β -cyclodextrin as solubility enhancer, the dissolution of both carotenes in the hydrophilic media was not reproducible.

Lycopene was assessed as the strongest antioxidant of all 36 investigated lipophilic compounds in the α TEAC assay – four times more active than α -tocopherol. In addition, lycopene was as strong as most xanthophylls in reducing ferric ions in the FRAP assay. Using the LPSC assay, lycopene was 10-times more antioxidant than vitamin E, however less antioxidant than xanthophylls like astaxanthin, due to a greater polyene system in these diketocarotenoids. Summarising the results as a weighted average, ellagic acid was the strongest antioxidant followed by lycopene, β -cryptoxanthin and rubixanthin.

Within the group of various lycopene isomers, a dependence from position and number of *cis* double bonds was not detected in both ET-based assays (α TEAC, FRAP). In the LPSC assay, the antioxidant activities of the *mono*-(*Z*)-isomers increased in the order: (*all-E*) < (*5Z*) < (*9Z*). (*13Z*)-Lycopene did not follow these tendencies. (*7Z,9Z,7'Z,9'Z*)-Lycopene, isolated from *Tangerine* tomato variety, was as antioxidant as the (*all-E*)- and (*5Z*)-forms.

As expected, the antioxidant activities of apo-lycopenoids with the same terminal function decreased in the three assays used with decreasing chain length system in the order: apo-6' > apo-8' > apo-10' > apo-12' > apo-14' > apo-11, due to the decrease of the polyene system. Most of the compounds investigated were less antioxidant than

lycopene itself. Only apo-6'- and apo-8'-lycopenal were similar active in scavenging peroxy radicals in the LPSC assay.

The results led to the conclusion that lycopene is one of the strongest fat-soluble antioxidants. In contrast, the role of apo-lycopenoids as *direct* antioxidants in food and human tissues could be stated as negligible, due to their low antioxidant activities found *in vitro* combined with the very low concentrations ($c < 1$ nM) found *in vivo* and in lycopene-rich products ($c < 100$ µg/100 g) compared to lycopene itself (in plasma: $c \sim 1$ µM; in food: $c \sim 3.5$ -35 mg/100 g).

6 Literaturverzeichnis

1. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411: 1875-1822,
2. Hwang E-S, Kim G-H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology* 2007; 229: 1-10,
3. Nojiri S, Daida H, Inaba Y. Antioxidants and cardiovascular disease: Still a topic of interest. *Environmental Health and Preventive Medicine* 2004; 9: 200-213,
4. Chong-Han K. Dietary lipophilic antioxidants: implications and significance in the aging process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2010; 50: 931-937,
5. Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* 2007; 55: 207-216,
6. Erdman JW, Jr., Ford NA, Lindshield BL. Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2009; 483: 229-235,
7. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 2006; 113: 189-207,
8. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997; 82: 291-295,
9. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P et al. Antioxidant measurements. *Physiological Measurement* 2007; 28: R41-55,
10. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology* 1996; 271: C1424-C1437,
11. Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews* 2010; 39: 4067-4079,
12. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. Lipide - Peroxidation ungesättigter Acyllipide. In: Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P, (Hrsg.) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (5. Auflage). Berlin: Springer Verlag; 2001: 182-205
13. Guillen MD, Goicoechea E. Toxic oxygenated α,β -unsaturated aldehydes and their study in foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2008; 48: 119-136,
14. Singh M, Nam DT, Arseneault M et al. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: A focus on acrolein. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010; 21: 741-756,
15. Zarkovic N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 24: 281-291,
16. Blair IA. DNA adducts with lipid peroxidation products. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 15545-15549,
17. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiology Reviews* 1998; 78: 547-581,
18. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 2003; 53: S26-38,
19. Lee CY, Seet RC, Huang SH et al. Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of dengue fever, stroke, and Parkinson's disease patients: cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009; 11: 407-420,
20. Nam DT, Arseneault M, Zarkovic N et al. Molecular regulations induced by acrolein in neuroblastoma SK-N-SH cells: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease* 2010; 21: 1197-1216,
21. Ottonello L, Frumento G, Arduino N et al. Immune complex stimulation of neutrophil apoptosis: investigating the involvement of oxidative and nonoxidative pathways. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 30: 161-169,
22. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications* 1990; 9: 1-32,
23. Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 49: 503-515,
24. Jackson H, Braun CL, Ernst H. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *American Journal of Cardiology* 2008; 101: 50D-57D,
25. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal* 1995; 9: 1551-1558,
26. Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM et al. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *Free Radical Research* 1997; 26: 381-398,
27. Zhu C, Bai C, Sanahuja G et al. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 2010; 504: 132-141,
28. Breitenbach J, Sandmann G. ζ -Carotene *cis* isomers as products and substrates in the plant poly-*cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta* 2005; 220: 785-793,
29. Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in food. Washington: ILSI Press; 2001:64,

30. Cooper DA, Webb DR, Peters JC. Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *Journal of Nutrition* 1997; 127: S1699-1709,
31. Zagalsky PF. Carotenoid-protein complexes. *Pure and Applied Chemistry* 1976; 47: 103-120,
32. Lakshman MR, Okoh C. Carotenoid-protein complexes. *Methods in Enzymology* 1993; 214: 74-86,
33. Britton G, Helliwell JR. Carotenoid-Protein Interactions. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, (Hrsg.) *Carotenoids* (4. Auflage). Basel: Birkhäuser Verlag; 1995: 99-118,
34. Mo F. X-ray crystallographic studies. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, Hrsg. *Carotenoids* (4. Auflage). Basel: Birkhäuser Verlag; 1995: 321-342,
35. Maiani G, Caston MJ, Catasta G et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009; 53: S194-S218,
36. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J et al. Carotenoids and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 83: 1265-1271,
37. Tucker KL, Chen H, Vogel S et al. Carotenoid intakes, assessed by dietary questionnaire, are associated with plasma carotenoid concentrations in an elderly population. *Journal of Nutrition* 1999; 129: 438-445,
38. Mangels AR, Holden JM, Beecher GR et al. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of the American Diet Association* 1993; 93: 284-296,
39. Moussa M, Landrier JF, Reboul E et al. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *Journal of Nutrition* 2008; 138: 1432-1436,
40. Nagao A. Absorption and function of dietary carotenoids. *Forum of Nutrition* 2009; 61: 55-63,
41. Erdman JW, Jr., Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 691: 76-85,
42. El-Sohemy A, Baylin A, Kabagambe E et al. Individual carotenoid concentrations in adipose tissue and plasma as biomarkers of dietary intake. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76: 172-179,
43. Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 1997; 41: 189-200,
44. Palozza P, Krinsky NI. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. *Methods in Enzymology* 1992; 213: 403-420,
45. Polyakov NE, Focsan AL, Bowman MK et al. Free radical formation in novel carotenoid metal ion complexes of astaxanthin. *Journal of Physical Chemistry B* 2010; 114: 16968-16977,
46. Wagner KH, Elmadfa I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2003; 47: 95-106,
47. Foote CS, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. 7. Quenching by β -carotene. *Journal of the American Chemical Society* 1968; 90: 6233-6235,
48. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989; 274: 532-538,
49. Conn PF, Schalch W, Truscott TG. The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 1991; 11: 41-47,
50. Terao J. Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids* 1989; 24: 659-661,
51. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 2001; 385: 20-27,
52. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2005; 26: 459-516,
53. Kong K-W, Khoo H-E, Prasad KN et al. Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules* 2010; 15: 959-987,
54. Eichler O, Sies H, Stahl W. Divergent optimum levels of lycopene, β -carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblastst. *Photochemistry Photobiology* 2002; 75: 503-506,
55. Stahl W. Carotenoids – mechanisms of photoprotection in the skin. *Acta Biologica Cracoviensa* 2011; 53: S12,
56. Kennedy TA, Liebler DC. Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers – effect of oxygen partial-pressure. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 4658-4663,
57. Truscott TG, McGarvey D, Lambert C et al. The interaction of carotenoids with reactive oxy-species. *Biochemical Society Transactions* 1995; 23: S252,
58. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 24: 345-351,

59. Elliott R. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1740: 147-154,
60. Isaacson T, Ronen G, Zamir D et al. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* 2002; 14: 333-342,
61. Grünwald J, Jänicke C, Freder J. Lycopin: Eine neue Wunderwaffe gegen Zivilisationskrankheiten? *Deutsche Apothekerzeitung* 2002; 142: 856-869,
62. Sesso HD. Carotenoids and cardiovascular disease: what research gaps remain? *Current Opinion in Lipidology* 2006; 17: 11-16,
63. Cohen LA. Nutrition and prostate cancer: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 963: 148-155,
64. Omoni AO, Aluko RE. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science & Technology* 2005; 16: 344-350,
65. BMELV. Gemüseverbrauch (Marktgemüseanbau) 2009/10 gestiegen. Referat 123 vom 04.08.2010,
66. Clinton SK. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews* 1998; 56: 35-51,
67. Bhuvaneswari V, Nagini S. Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents* 2005; 5: 627-635,
68. Woodall AA, Britton G, Jackson MJ. Antioxidant activity of carotenoids in phosphatidylcholine vesicles: chemical and structural considerations. *Biochemical Society Transactions* 1995; 23: S133,
69. Woodall AA, Britton G, Jackson MJ. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxyl radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects* 1997; 1336: 575-586,
70. Miller NJ, Sampson J, Candeias LP et al. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 1996; 384: 240-242,
71. Böhm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 221-226,
72. Liu D, Shi J, Colina Ibarra A et al. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Science and Technology* 2008; 41: 1344-1349,
73. Ghaffari MA, Ghiasvand T. The study of kinetic inhibition of copper (II)-induced oxidation of low-density lipoprotein by lycopene. *Journal of Food Biochemistry* 2011; 35: 228-240,
74. Kim JY, Paik JK, Kim OY et al. Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Atherosclerosis* 2011; 215: 189-195,
75. Zechmeister L. *Cis-trans* isomerization and stereochemistry of carotinoids and diphenylpolyenes. *Chemical Reviews* 1944; 34: 267-344,
76. Chasse GA, Mak ML, Deretey E et al. An *ab initio* computational study on selected lycopene isomers. *Journal of Molecular Structures (THEOCHEM)* 2001; 571: 27-37,
77. Nguyen M, Francis D, Schwartz S. Thermal isomerisation susceptibility of carotenoids in different tomato varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2001; 81: 910-917,
78. Perkins-Veazie P, Collins JK. Flesh quality and lycopene stability of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biology and Technology* 2004; 31: 159-166,
79. Pyke KA, Howells C, A. Plastid and stromule morphogenesis in tomato. *Annals of Botany* 2002; 90: 559-566,
80. Lambelet P, Richelle M, Bortlik K et al. Improving the stability of lycopene Z-isomers in isomerised tomato extracts. *Food Chemistry* 2008; 112: 156-161,
81. Gupta R, Balasubramaniam VM, Schwartz SJ et al. Storage stability of lycopene in tomato juice subjected to combined pressure-heat treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 8305-8513,
82. Toma RB, Frank GC, Nakayama K et al. Lycopene content in raw tomato varieties and tomato products. *Journal of Foodservice* 2008; 19: 127-132,
83. Jacob K, Garcia-Alonso FJ, Ros G et al. Stability of carotenoids, phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant capacity of tomatoes during thermal processing. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 2010; 60: 192-198,
84. Shi J, Le Maguer M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology* 2000; 20: 293-334,
85. Nguyen ML, Schwartz SJ. Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technology* 1999; 53: 38-45,

-
86. Schierle J, Bretzel W, Bühler I et al. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chemistry* 1997; 59: 459-465,
 87. Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Advances in Food and Nutrition Research* 2006; 51: 99-164,
 88. Boon CS, Xu Z, Yue X et al. Factors affecting lycopene oxidation in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 1408-1414,
 89. Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ et al. *cis-trans* Lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1996; 5: 823-833,
 90. Olmedilla B, Granado F, Southon S et al. A European multicentre, placebo-controlled supplementation study with alpha-tocopherol, carotene-rich palm oil, lutein or lycopene: analysis of serum responses. *Clinical Science* 2002; 102: 447-456,
 91. Re R, Fraser PD, Long M et al. Isomerization of lycopene in the gastric milieu. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2001; 281: 576-581,
 92. Boileau AC, Merchen NR, Wasson K et al. *Cis*-lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene *in vitro* and *in vivo* in lymph-cannulated ferrets. *Journal of Nutrition* 1999; 129: 1176-1181,
 93. Boileau TWM, Boileau AC, Erdman JW, Jr. Bioavailability of all-*trans* and *cis*-isomers of lycopene. *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227: 914-919,
 94. Parker RS. Bioavailability of carotenoids. *European Journal of Clinical Nutrition* 1997; 51: S86-S90,
 95. Gärtner C, Stahl W, Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *American Journal of Clinical Nutrition* 1997; 66: 116-122,
 96. Richelle M, Sanchez B, Tavazzi I et al. Lycopene isomerisation takes place within enterocytes during absorption in human subjects. *British Journal of Nutrition* 2010; 103: 1800-1807,
 97. Fröhlich K, Kaufmann K, Bitsch R et al. Effects of ingestion of tomatoes, tomato juice and tomato puree on contents of lycopene isomers, tocopherols and ascorbic acid in human plasma as well as on lycopene isomer pattern. *British Journal of Nutrition* 2006; 95: 734-741,
 98. Fröhlich K. Lycopin-Isomere in Lebensmitteln und Humanplasma – Strukturaufklärung, antioxidative Aktivität, Gehalte und relative (E)-(Z)-Verhältnisse. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Dissertation 2007,
 99. Unlu NZ, Bohn T, Francis DM et al. Lycopene from heat-induced *cis*-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-*trans*-rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition* 2007; 98: 140-146,
 100. Zhao W, Kang B, Hu G. Advances in research on carotenoids in watermelon flesh. *Guoshu Xuebao* 2008; 25: 908-915,
 101. Carail M, Caris-Veyrat C. Carotenoid oxidation products: from villain to saviour? *Pure and Applied Chemistry* 2006; 78: 1493-1503,
 102. Kim SJ, Nara E, Kobayashi H et al. Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids* 2001; 36: 191-199,
 103. Caris-Veyrat C, Schmid A, Carail M et al. Cleavage products of lycopene produced by *in vitro* oxidations: characterization and mechanisms of formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 7318-7325,
 104. Rodriguez EB, Rodriguez-Amaya DB. Lycopene epoxides and apo-lycopenals formed by chemical reactions and autoxidation in model systems and processed foods. *Journal of Food Science* 2009; 74: C674-C682,
 105. Ben-Aziz A, Britton G, Goodwin TW. Carotene epoxides of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry* 1973; 12: 2759-2727,
 106. Kopec RE, Riedl KM, Harrison EH et al. Identification and quantification of apo-lycopenals in fruits, vegetables, and human plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 3290-3296,
 107. Mein JR, Lian F, Wang XD. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. *Nutrition Reviews* 2008; 66: 667-683,
 108. Lindshield BL, Canene-Adams K, Erdman JW. Lycopenoids: Are lycopene metabolites bioactive? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 458: 136-140,
 109. Tuck KL, Hayball PJ. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 636-644,
 110. Carreau JP. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods in Enzymology* 1979; 62: 152-158,
 111. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine* 1995; 19: 227-250,
 112. Devasagayam TP, Subramanian M, Pradhan DS et al. Prevention of singlet oxygen-induced DNA damage by lipoate. *Chemico Biological Interaction* 1993; 86: 79-92,

113. Haekkinen S, Heinonen M, Karenlampi S et al. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International* 1999; 32: 345-353,
114. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS et al. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 2200-2206,
115. Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology* 2001; 36: 703-725,
116. Zusatzstoff-Zulassungsverordnung – Ausfertigungsdatum: 29.01.1998: Teil D – Antioxidationsmittel für bestimmte Lebensmittel,
117. Kahl R, Kappus H. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1993; 196: 329-338,
118. Umemura T, Kodama Y, Hioki K et al. Butylhydroxytoluene (BHT) increases susceptibility of transgenic rasH2 mice to lung carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2001; 127: 583-590,
119. Tosti A, Bardazzi F, Valeri F et al. Contact dermatitis from butylated hydroxyanisole. *Contact Dermatitis* 1987; 17: 257-258,
120. Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A et al. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radical Research* 2010; 44: 1216-1262,
121. Mukai K, Tokunaga A, Itoh S et al. Comparison between the free-radical-scavenging activities with vitamin E and ubiquinol in biological systems based on their reaction rates: a research account. *Biofactors* 2008; 32: 49-58,
122. Konya C, Ferdinandy P. Vitamin C: new role of the old vitamin in the cardiovascular system? *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: 125-127,
123. Foti MC, Amorati R. Non-phenolic radical-trapping antioxidants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009; 61: 1435-1448,
124. Sato K, Niki E, Shimasaki H. Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990; 279: 402-405,
125. Edge R, Land EJ, McGarvey D et al. Relative one-electron reduction potentials of carotenoid radical cations and the interactions of carotenoids with the vitamin E radical cation. *Journal of the American Chemical Society* 1998; 120: 4087-4090,
126. Güngör N, Özyürek M, Güclü K et al. Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different *in vitro* methods. *Talanta* 2011; 83: 1650-1658,
127. Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J et al. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 2772-2777,
128. Özyürek M, Güclü K, Apak R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry* 2011; 30: 652-664,
129. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 1841-1856,
130. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radical Research* 2010; 44: 711-720,
131. Wood LG, Gibson PG, Garg ML. A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006; 86: 2057-2066,
132. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M et al. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 1815-1821,
133. Bangalore DV, McGlynn W, Scott DD. Effect of β -cyclodextrin in improving the correlation between lycopene concentration and ORAC values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 1878-1883,
134. Adom KK, Liu RH. Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 6572-6580,
135. Özyürek M, Bektasoglu B, Güclü K et al. Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl- β -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta* 2008; 630: 28-39,
136. Zhang J, Stanley RA, Melton LD. Lipid peroxidation inhibition capacity assay for antioxidants based on liposomal membranes. *Molecular Nutrition & Food Research* 2006; 50: 714-724,
137. Naguib YMA. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Analytical Biochemistry* 1998; 265: 290-298,

-
138. Aldini G, Yeum K-J, Russell RM et al. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 31: 1043-1050,
 139. Singleton VL, Rossi JA, Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965; 16: 144-158,
 140. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 4290-4302,
 141. Apak R, Güclü K, Özyürek M et al. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radical Research* 2005; 39: 949-961,
 142. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 4619-4626,
 143. Popov IN, Lewin G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1996; 31: 1-8,
 144. Popov I, Lewin G. Photosensitized chemiluminescence in the quantification of antioxidants. *Bioforum* 2000; 23: 46-48,
 145. García-Campaña AM, Baeyens WRG. Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. *Analysis* 2000; 28: 686-698,
 146. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science & Technology* 1995; 28: 25-30,
 147. Tabart J, Kevers C, Pincemail J et al. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 2009; 113: 1226-1233,
 148. Ferreres F, Pereira DM, Valentao P et al. New phenolic compounds and antioxidant potential of *Catharanthus roseus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 9967-9974,
 149. Lopez-Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J et al. Kinetic and stoichiometry of the reaction of chlorogenic acid and its alkyl esters against the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 863-870,
 150. Goupy P, Bautista-Ortin A-B, Fulcrand H et al. Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the DPPH Radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 5762-5770,
 151. Foti MC, Daquino C, Geraci C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions. *Journal of Organic Chemistry* 2004; 69: 2309-2314,
 152. Goupy P, Dufour C, Loonis M et al. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 615-622,
 153. Niki E, Kawakami A, Saito M et al. Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *Journal of Biological Chemistry* 1985; 260: 2191-2196,
 154. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research* 1986; 19: 194-201,
 155. Niki E. Mechanisms and dynamics of antioxidant action of ubiquinol. *Molecular Aspects of Medicine* 1997; 18: S63-S70,
 156. Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Sanchez-Moreno C et al. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 1686-1690,
 157. Nomura T, Kikuchi M, Kubodera A et al. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochemistry and Molecular Biology International* 1997; 42: 361-370,
 158. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 2009; 113: 1202-1205,
 159. Liu X, Osawa T. *Cis*-Astaxanthin and especially 9-*cis* astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity *in vitro* compared to the all-*trans* isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 357: 187-193,
 160. Gizdavic-Nikolaidis M, Trava-Sejdic J, Bowmaker GA et al. The antioxidant activity of conducting polymers in biomedical applications. *Current Applied Physics* 2004; 4: 347-350,
 161. Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996; 31: 671-701,
 162. El-Agamey A, McGarvey DJ. Carotenoid radicals and radical ions. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, (Hrsg.) *Carotenoids - Natural functions* (4. Auflage). Basel: Birkhäuser Verlag; 2008:119-154,

163. Müller L, Theile K, Finzel S et al. Antioxidant capacity and antioxidant vitamins in human plasma as affected by intervention with a multi-component beverage rich in vitamin C and vitamin E. *Ernährung/Nutrition* 2011; 35: 101-110,
164. Packer L. Antioxidant action of carotenoids *in vitro* and *in vivo* and protection against oxidation of human low-density lipoproteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 691: 48-60,
165. Re R, Pellegrini N, Proteggente A et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 26: 1231-1237,
166. Pellegrini N, Re R, Yang M et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology* 1999; 299: 379-389,
167. Kranl K, Schlesier K, Bitsch R et al. Comparing antioxidative food additives and secondary plant products - use of different assays. *Food Chemistry* 2005; 93: 171-175,
168. Scott SL, Chen WJ, Bakac A et al. Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *Journal of Physical Chemistry* 1993; 97: 6710-6714,
169. Galano A. Relative antioxidant efficiency of a large series of carotenoids in terms of one electron transfer reactions. *Journal of Physical Chemistry B* 2007; 111: 12898-12908,
170. Soffers AE, Van Haandel MJ, Boersma MG et al. Antioxidant activities of carotenoids: quantitative relationships between theoretical calculations and experimental literature data. *Free Radical Research* 1999; 30: 233-240,
171. Ivekovic D, Milardovic S, Roboz M et al. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *Analyst* 2005; 130: 708-714,
172. Mateos R, Trujillo M, Pereira-Caro G et al. New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 10960-10966,
173. Campos AM, Lissi EA. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics* 1997; 29: 219-224,
174. Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* 2000; 68: 457-462,
175. Müller L, Böhm V. Antioxidant activity of β -carotene compounds in different *in vitro* assays. *Molecules* 2011; 16: 1055-1069,
176. Vulcano D, Sandei L, Leoni C. Contributo specifico del licopene all'attività antiossidante della frazione liposolubile dei derivati del pomodoro - Specific contribution of lycopene to the antioxidant activity of the fat-soluble fraction of tomato products. *Industria Conserve* 2002; 77: 219-239,
177. Simon PW, Wolff XY. Carotenes in typical and dark orange carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1987; 35: 1017-1022,
178. Andersson SC, Olsson ME, Johansson E et al. Carotenoids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries during ripening and use of pheophytin a as a maturity marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 250-258,
179. Breithaupt DE, Bamedi A. Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on β -cryptoxanthin esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 2064-2070,
180. Breithaupt DE. Identification and quantification of astaxanthin esters in shrimp (*Pandalus borealis*) and in a microalga (*Haematococcus pluvialis*) by liquid chromatography-mass spectrometry using negative ion atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 3870-3875,
181. Melendez-Martinez AJ, Vicario IM, Heredia FJ. Review: Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis* 2007; 20: 638-649,
182. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996; 239: 70-76,
183. Hela PG, Reddy RN, Anipindi NR et al. Reactions of 2,4,6-Tripyridyl-1,3,5-s-triazine and its Fe(II) complex with $\bullet$ OH and e-aq. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters* 2005; 85: 79-87,
184. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48: 3396-3402,
185. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M, Godoy HT et al. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis* 2008; 21: 445-463,

186. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2005; 579: 200-213,
187. Nilsson J, Pillai D, Oenning G et al. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005; 49: 239-246,
188. Apak R, Güçlü K, Demirata B et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007; 12: 1496-1547,
189. Sanchez-Moreno C, Plaza L, de Ancos B et al. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003; 83: 430-439,
190. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine* 1993; 14: 303-311,
191. Wu X, Gu L, Holden J et al. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004; 17: 407-422,
192. Müller L, Gnoyke S, Popken AM et al. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology* 2010; 43: 992-999,
193. Bhagwat S, Haytowitz DB, Holden JM. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected foods. 2007
194. www.wacker.com/cms/de/products-markets/trademarks/cavamax/cavamax.jsp; Stand: 15.08.11
195. Fahr A, Liu X. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2007; 4: 403-416,
196. SciFinder.com; Stand: 12.08.11,
197. Capitani CD, Carvalho ACL, Rivelli DP et al. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2009; 111: 1090-1099,
198. Polyakov NE, Leshina TV, Hand EO et al. β -Ionone cyclodextrins inclusion complexes ^1H NMR study and photolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 2004; 161: 261-267,
199. Weller P, Breithaupt DE. Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 7044-7049,
200. Tischer J. Über Carotinoide von *Hämatococcus pluvialis*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 1944; 281: 143,
201. Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radical Research Communications* 1992; 17: 299-311,
202. Roda A, Pasini P, Guardigli M et al. Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2000; 366: 752-759,
203. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 2005; 92: 235-254,
204. Cheng Z, Yan G, Li Y et al. Determination of antioxidant activity of phenolic antioxidants in a Fenton-type reaction system by chemiluminescence assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003; 375: 376-380,
205. Cynshi O, Takashima Y, Katoh Y et al. Action of phenolic antioxidants on various active oxygen species. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 1995; 10: 261-269,
206. Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 2001; 385: 13-19,
207. Mortensen A. Scavenging of benzylperoxyl radicals by carotenoids. *Free Radical Research* 2002; 36: 211-216,
208. Liebler DC, McClure TD. Antioxidant reactions of β -carotene: identification of carotenoid-radical adducts. *Chemical Research in Toxicology* 1996; 9: 8-11,
209. Jørgensen K, Skibsted LH. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1993; 96: 423-429,
210. Jeevarajan AS, Khaled M, Kispert LD. Simultaneous electrochemical and electron paramagnetic resonance studies of keto and hydroxy carotenoid. *Chemical Physics Letters* 1994; 225: 340-345,
211. Noguchi N, Yamashita H, Gotoh N et al. 2,2'-Azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile), a new lipid-soluble azo initiator: application to oxidations of lipids and low-density lipoprotein in solution and in aqueous dispersions. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 24: 259-268,
212. Jin H, Liang M, Arzhantsev S et al. Photophysical characterization of benzylidene malononitriles as probes of solvent friction. *Journal of Physical Chemistry B* 2010; 114: 7565-7578,

213. Perez DD, Leighton F, Aspee A et al. A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biological Research* 2000; 33: 71-77,
214. Parejo I, Codina C, Petrakis C et al. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 2000; 44: 507-512,
215. Gama JTT, Sylos CM. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. *Food Research International* 2005; 38: 899-903,
216. Brown ED, Micozzi MS, Craft NE et al. Plasma carotenoids in normal men after a single ingestion of vegetables or purified β -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition* 1989; 49: 1258-1265,
217. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 1982; 2: 327-328,
218. Niki E, Takahashi M, Komuro E. Antioxidant activity of vitamin E in liposomal membranes. *Chemistry Letters* 1986; 9: 1573-1576,
219. Barclay LRC, Baskin KA, Dakin KA et al. The antioxidant activities of phenolic antioxidants in free radical peroxidation of phospholipid membranes. *Canadian Journal of Chemistry* 1990; 68: 2258-2269,
220. Dudonné S, Vitrac X, Coutiere P et al. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 1768-1774,
221. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 1925-1941,
222. Hengst C, Werner S, Müller L et al. Determination of the antioxidant capacity: influence of the sample concentration on the measured values. *European Food Research and Technology* 2009; 230: 249-254,
223. Vertzoni M, Kartezini T, Reppas C et al. Solubilization and quantification of lycopene in aqueous media in the form of cyclodextrin binary systems. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 309: 115-122,
224. Polyakov NE, Leshina TV, Kononova TA et al. Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: ^1H NMR, EPR, and optical studies. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36: 872-880,
225. Romero M, Rojano B, Mella-Raipan J et al. Antioxidant capacity of pure compounds and complex mixtures evaluated by the ORAC-pyrogallol red assay in the presence of Triton X-100 micelles. *Molecules* 2010; 15: 6152-6167,
226. Polyakov NE, Leshina TV, Meteleva ES et al. Water soluble complexes of carotenoids with Arabinogalactan. *Journal of Physical Chemistry B* 2009; 113: 275-282,
227. Whitley AC, Stoner GD, Darby MV et al. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid - extensive binding to protein and DNA. *Biochemistry and Pharmacology* 2003; 66: 907-915,
228. Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clinica Chimica Acta* 2004; 348: 63-68,
229. Gruszecki WI, Siewiewski J. Orientation of xanthophylls in phosphatidylcholine multibilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; 1023: 405-412,
230. Van de Ven M, Kattenberg M, Van Ginkel G et al. Study of the orientational ordering of carotenoids in lipid bilayers by resonance-Raman spectroscopy. *Biophysical Journal* 1984; 45: 1203-1209,
231. Romanchik JE, Morel DW, Harrison EH. Distributions of carotenoids and α -tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. *Journal of Nutrition* 1995; 125: 2610-2617,
232. Milde J, Elstner EF, Grassmann J. Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation. *Molecular Nutrition & Food Research* 2007; 51: 956-961,
233. Zechmeister L, LeRosen AL, Went FW et al. Prolycopene, a naturally occurring stereoisomer of lycopene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1941; 2: 468-471,
234. Burri BJ, Chapman MH, Neidlinger TR et al. Tangerine tomatoes increase total and tetra-*cis*-lycopene isomer concentrations more than red tomatoes in healthy adult humans. *International Journal Food Science and Nutrition* 2009; 60: 1-16,
235. Böhm V, Fröhlich K, Bitsch R. Rosehip - a "new" source of lycopene? *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 24: 385-389,

-
236. Goupy P, Reynaud E, Dangles O et al. Antioxidant activity of (*all-E*)-lycopene and synthetic apolycopeneoids in an experimental model of oxidative stress in the gastro-intestinal tract. zur Publikation eingereicht 2011,
237. Linnewiel K, Ernst H, Caris-Veyrat C et al. Structure activity relationship of carotenoid derivatives in activation of the electrophile/antioxidant response element transcription system. *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 47: 659-667,
238. Ben-Dor A, Steiner M, Gheber L et al. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Molecular Cancer Therapeutics* 2005; 4: 177-186,
239. Strube M, Haenen GRMM, Van Den Berg H et al. Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Radical Research* 1997; 26: 515-521,
240. Rahman I, Morrison D, Donaldson K et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996; 154: 1055-1060,
241. Sinha S, Ray US, Saha M et al. Antioxidant and redox status after maximal aerobic exercise at high altitude in acclimatized lowlanders and native highlanders. *European Journal of Applied Physiology* 2009; 106: 807-814,
242. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG et al. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 1998; 32: 1-8,
243. Ilzecka J. Total antioxidant status is increased in the serum of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2003; 63: 297-302,
244. Hamed SA, Abdellah MM, El-Melegy N. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *Journal of Pharmacological Science* 2004; 96: 465-473,
245. Nassiri AA, Hakemi MS, Soulati M et al. Effects of heparin and dalteparin on oxidative stress during hemodialysis in patients with end-stage renal disease. *Iranian Journal of Kidney Diseases* 2009; 3: 162-167,
246. Pardo-Andreu GL, Philip SJ, Riano A et al. *Mangifera indica* L. (Vimang) protection against serum oxidative stress in elderly humans. *Archives of Medical Research* 2006; 37: 158-164,
247. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radical Research* 2000; 33: 819-830,
248. Celik SE, Özyürek M, Güclü K et al. Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta* 2011; 81: 1300-1309,
249. Büttner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research* 1996; 145: 532-541,
250. Suh J, Zhu BZ, Frei B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine* 2003; 34: 1306-1314,
251. Yazar M, Sarban S, Kocyigit A et al. Synovial fluid and plasma selenium, copper, zinc, and iron concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biological trace element research* 2005; 106: 123-132,
252. Kamanli A, Naziroglu M, Aydilek N et al. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochemistry & Function* 2004; 22: 53-57,
253. Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W et al. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clinical Science* 2008; 114: 625-634,
254. Karajibani M, Hashemi M, Montazerifar F et al. The status of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, vitamins A, C, E and malondialdehyde in patients with cardiovascular disease in Zahedan, Southeast Iran. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2009; 55: 309-316,
255. McNulty H, Jacob RF, Mason RP. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *American Journal of Cardiology* 2008; 101: D20-D29,
256. Koren E, Lipkin J, Klar A et al. Total oxidant-scavenging capacities of plasma from glycogen storage disease type Ia patients as measured by cyclic voltammetry, FRAP and luminescence techniques. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2009; 32: 651-659,
257. Serra JA, Dominguez RO, Marschoff ER et al. Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. *Neurochemical Research* 2009; 34: 2122-2132,
258. Koleva II, Niederlaender HAG, van Beek TA. An On-Line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. *Analytical Chemistry* 2000; 72: 2323-2328,
259. Dapkevicius A, van Beek TA, Niederlaender HAG. Evaluation and comparison of two improved techniques for the *on-line* detection of antioxidants in liquid chromatography eluates. *Journal of Chromatography A* 2001; 912: 73-82,

-
260. Bandoniene D, Murkovic M. On-Line HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Radical Scavenging Phenols Extracted from Apples (*Malus domestica* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 2002; 50: 2482-2487,
 261. Cano A, Alcaraz O, Acosta M et al. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS•+ assay. Redox Report 2002; 7: 103-109,
 262. Qian SY, Yue G-H, Tomer KB et al. Identification of all classes of spin-trapped carbon-centered radicals in soybean lipoxygenase-dependent lipid peroxidations of w-6 polyunsaturated fatty acids via LC/ESR, LC/MS, and tandem MS. Free Radical Biology & Medicine 2003; 34: 1017-1028,
 263. Dapkevicius A, van Beek TA, Niederlaender HAG et al. Online detection of antioxidative activity in High-Performance Liquid Chromatography eluates by chemiluminescence. Analytical Chemistry 1999; 71: 736-740,
 264. Toyooka T, Kashiwazaki T, Kato M. On-line screening methods for antioxidants scavenging superoxide anion radical and hydrogen peroxide by liquid chromatography with indirect chemiluminescence detection. Talanta 2003; 60: 467-475

Anhang

Abbildungen

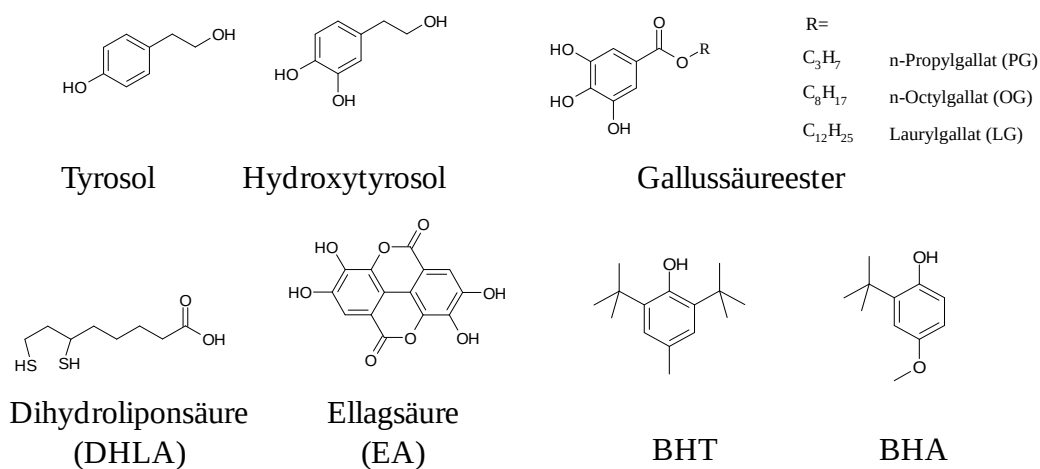


Abbildung A.1 Chemische Strukturen natürlicher und synthetischer fettlöslicher Antioxidantien

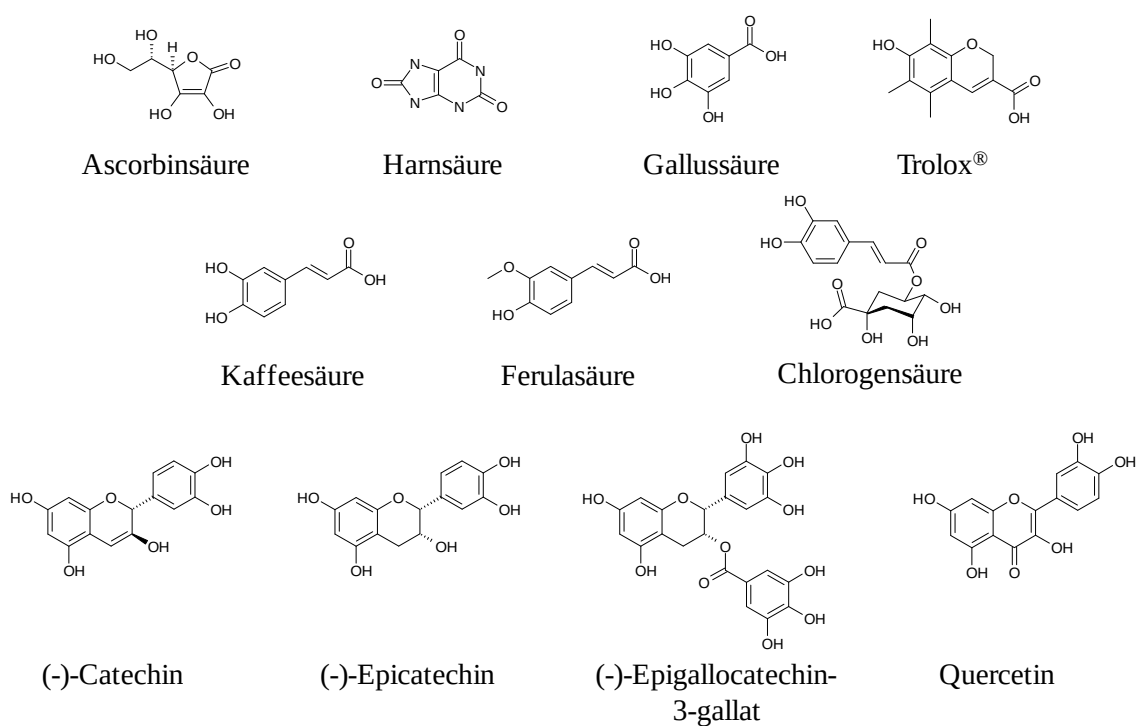


Abbildung A.2 Chemische Strukturen einiger wasserlöslicher Antioxidantien

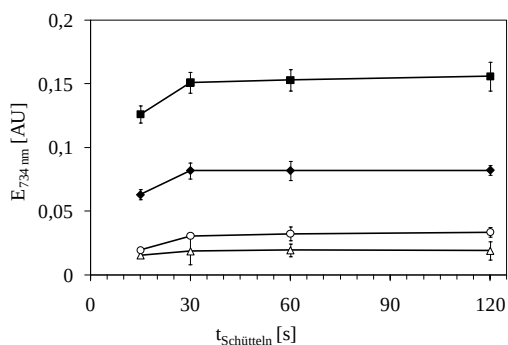


Abbildung A.3 α TEAC-Reaktionskinetik am Beispiel von Lycopin
Anstieg der Blindwert-korrigierten Absorption bei 734 nm für 1 μ M (Δ), 2 μ M ($\circ$), 10 μ M ($\blacklozenge$) und 20 μ M ($\blacksquare$) (*all-E*)-Lycopin

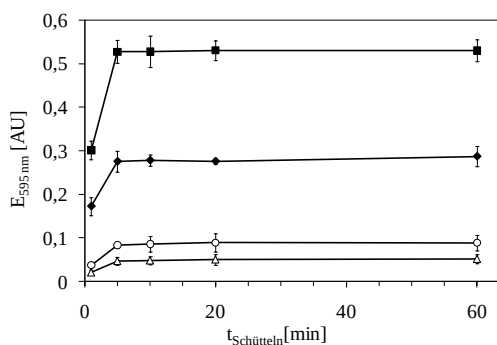


Abbildung A.4 FRAP-Reaktionskinetik am Beispiel von Lycopin
Anstieg der Blindwert-korrigierten Absorption bei 595 nm für 1 μ M (Δ), 2 μ M ($\circ$), 10 μ M ($\blacklozenge$) und 20 μ M ($\blacksquare$) (*all-E*)-Lycopin

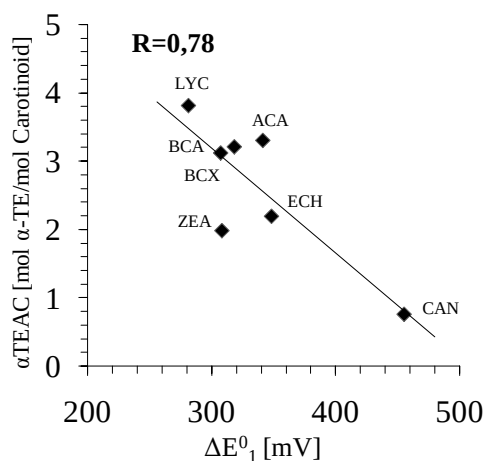


Abbildung A.5 Korrelation von Redoxpotential und antioxidativer Aktivität im α TEAC-Test am Beispiel einiger Carotinoide; Redoxpotentiale aus [33]; ACA, α -Carotin; BCA, β -Carotin; BCX, β -Cryptoxanthin; CAN, Canthaxanthin; ECH, Echinenon; LYC, Lycopin; ZEA, Zeaxanthin

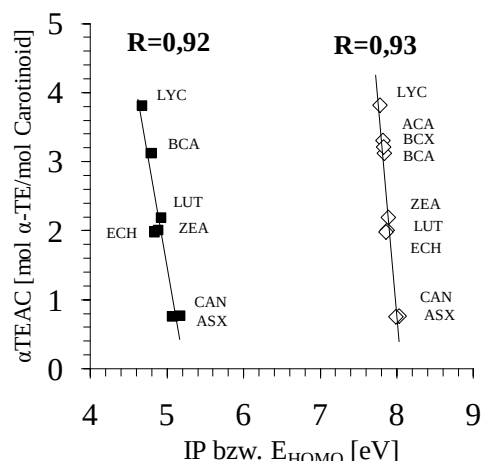


Abbildung A.6 Korrelation von IP bzw. E_{HOMO} und antioxidativer Aktivität im α TEAC-Test am Beispiel einiger Carotinoide; Ionisierungspotentiale (IP) und E_{HOMO} aus [169] und [170]; ACA, α -Carotin; ASX, Astaxanthin; BCA, β -Carotin; BCX, β -Cryptoxanthin; CAN, Canthaxanthin; ECH, Echinenon; LUT, Lutein; LYC, Lycopin; ZEA, Zeaxanthin; Korrelation IP und AOA ($\blacksquare$) bzw. E_{HOMO} und AOA (Δ)

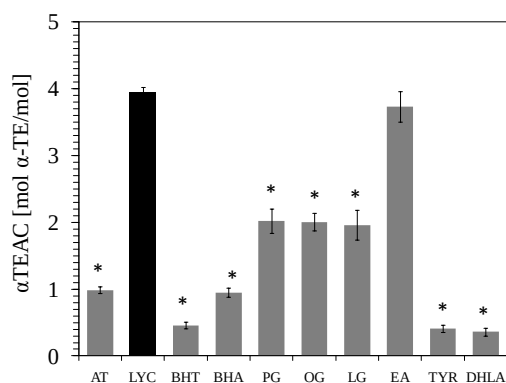


Abbildung A.7 Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im α TEAC-Test im Vergleich zu Lykopen; *signifikant verschieden zu Lykopen (ANOVA, $p < 0,05$); AT, α -Tocopherol; BHA, *tert*-Butylhydroxyanisol; BHT, Di-*tert*-butylhydroxytoluol; DHLA, Dihydroliponsäure; EA, Ellagsäure; LG, Laurylgallat; OG, *n*-Octylgallat; TYR, Tyrosol

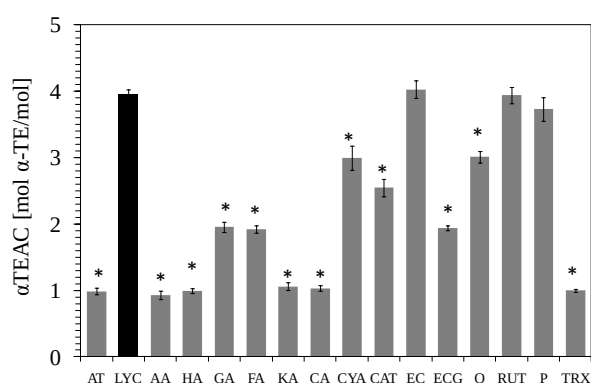


Abbildung A.8 Antioxidative Aktivität einiger hydrophiler Substanzen im α TEAC-Test im Vergleich zu Lykopen; * signifikant verschieden zu Lykopen (ANOVA, $p < 0,05$); AA, Ascorbinsäure; AT, α -Tocopherol; CA, Chlorogensäure; CAT, Catechin; CYA, Cyanidin; EC, (-)-Epicatechin; ECG, Epi-gallocatechin-3-gallat; FA, Ferulsäure; GA, Gallussäure; HA, Harnsäure; KA, Kaffeesäure; LYC, Lykopen; P, Phloridzin; Q, Quercetin; RUT, Rutin; TRX, Trolox®

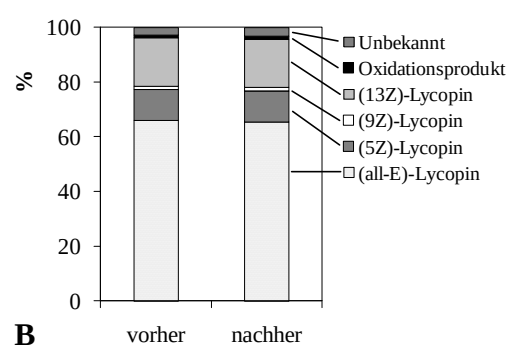
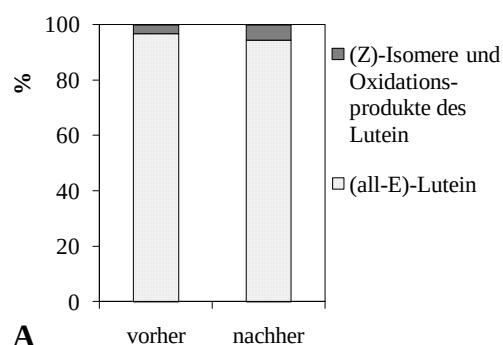


Abbildung A.9 Zusammensetzung der Carotinoidstandards vor und nach Inkubation mit Fe^{3+} -freiem FRAP-Reagenz
Luteinstandard (A) und Lykopinstandard (B) vor und nach einer 6-minütigen Inkubation (25 °C, Schütteln 1.400 min^{-1}) mit saurem, Fe^{3+} -freiem FRAP-Reagenz (300 mM Acetatpuffer pH 3,6 + 20 mM TPTZ in 40 mM HCl, 10:1, v/v)

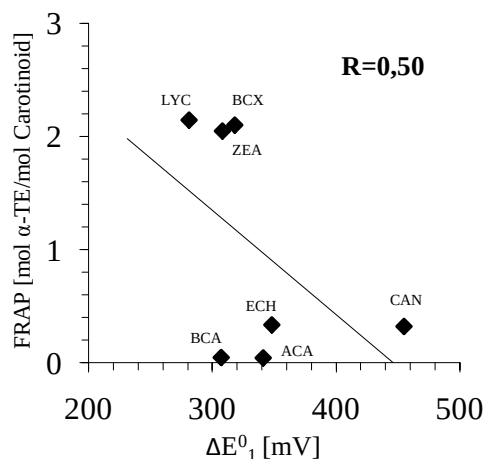


Abbildung A.10 Korrelation von Redoxpotential und antioxidativer Aktivität im FRAP-Test am Beispiel einiger Carotinoide; Redoxpotentiale aus [169]; ACA, α -Carotin; BCA, β -Carotin; BCX, β -Cryptoxanthin; CAN, Canthaxanthin; ECH, Echinenon; LYC, Lykopin; ZEA, Zeaxanthin

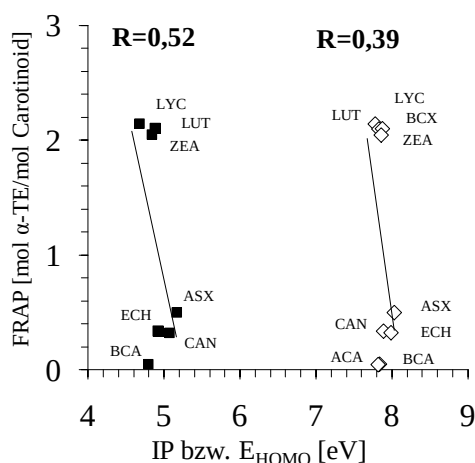


Abbildung A.11 Korrelation von IP bzw. E_{HOMO} und antioxidativer Aktivität im FRAP-Test am Beispiel einiger Carotinoide; Ionisierungspotentiale (IP) und E_{HOMO} aus [169] und [170]; ACA, α -Carotin; ASX, Astaxanthin; BCA, β -Carotin; BCX, β -Cryptoxanthin; CAN, Canthaxanthin; ECH, Echinenon; LUT, Lutein; LYC, Lykopin; ZEA, Zeaxanthin; Korrelation IP und AOA (■) bzw. E_{HOMO} und AOA (Δ)

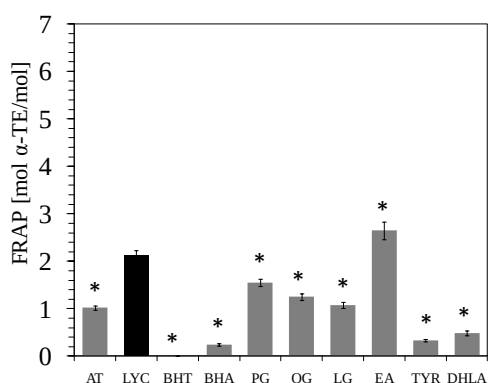


Abbildung A.12 Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im FRAP-Test im Vergleich zu Lykopin; * signifikant verschieden zu Lykopin (ANOVA, $p < 0,05$); AT, α -Tocopherol; BHA, *tert*-Butylhydroxyanisol; BHT, Di-*tert*-butyl-hydroxytoluol; DHLA, Dihydroliponsäure; EA, Ellagsäure; LG, Laurylgallat; LYC, Lykopin; PG, *n*-Propylgallat; OG, *n*-Octylgallat; TYR, Tyrosol

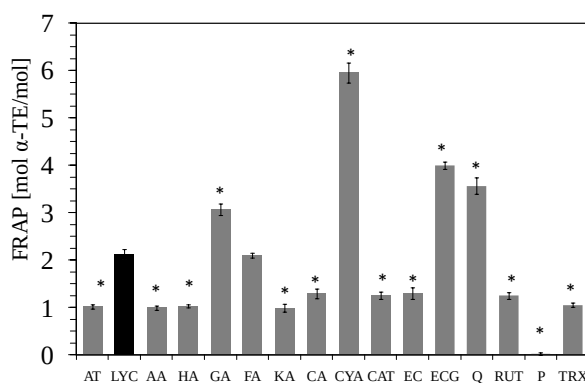


Abbildung A.13 Antioxidative Aktivität einiger hydrophiler Substanzen im FRAP-Test im Vergleich zu Lykopin; * signifikant verschieden zu Lykopin (ANOVA, $p < 0,05$); AA, Ascorbinsäure; AT, α -Tocopherol; CA, Chlorogensäure; CAT, Catechin; CYA, Cyanidin; EC, (-)-Epicatechin; ECG, Epigallocatechin-3-gallat; FA, Ferulasäure; GA, Gallussäure; HA, Harnsäure; KA, Kaffeesäure; LYC, Lykopin; P, Phloridzin; Q, Quercetin; RUT, Rutin; TRX, Trolox®

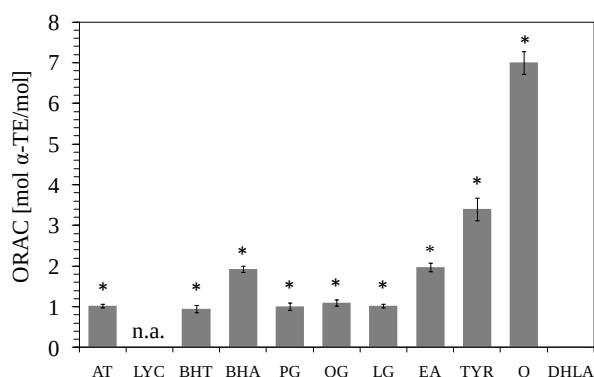


Abbildung A.14 Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im ORAC-Test im Vergleich zu α -Tocopherol; * signifikant verschieden zu Lykopen (ANOVA, $p < 0,05$); n. a., nicht auswertbar; AT, α -Tocopherol; BHA, *tert*-Butylhydroxyanisol; BHT, Di-*tert*-butylhydroxytoluol; DHLA, Dihydroliponsäure; EA, Ellagsäure; LG, Laurylgallat; LYC, Lykopen; PG, *n*-Propylgallat; OG, *n*-Octylgallat; Q, Quercetin; TYR, Tyrosol

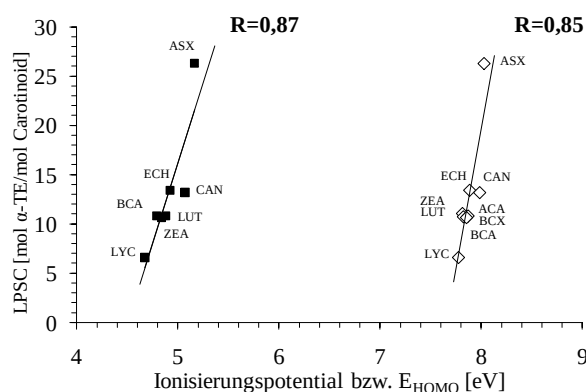


Abbildung A.15 Korrelation von IP bzw. E_{HOMO} und antioxidativer Aktivität im LPSC-Test am Beispiel einiger Carotinoide; ACA, α -Carotin; ASX, Astaxanthin; BCA, β -Carotin; BCX, β -Cryptoxanthin; CAN, Canthaxanthin; ECH, Echinenon; LUT, Lutein; LYC, Lykopen; ZEA, Zeaxanthin; Korrelation IP und AOA (■) bzw. E_{HOMO} und AOA (□)

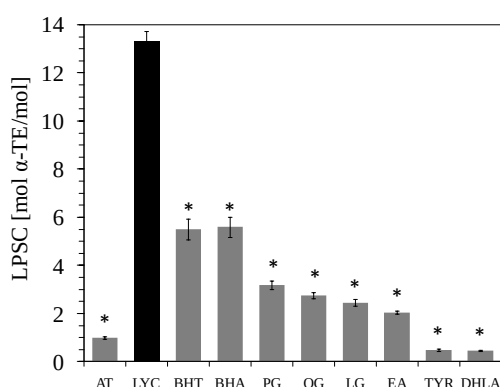


Abbildung A.16 Antioxidative Aktivität einiger lipophiler Substanzen im LPSC-Test im Vergleich zu Lykopen; * signifikant verschieden zu Lykopen (ANOVA, $p < 0,05$); AT, α -Tocopherol; BHA, *tert*-Butylhydroxyanisol; BHT, Di-*tert*-butylhydroxytoluol; DHLA, Dihydroliponsäure; EA, Ellagsäure; LG, Laurylgallat; LYC, Lykopen; PG, *n*-Propylgallat; OG, *n*-Octylgallat; TYR, Tyrosol

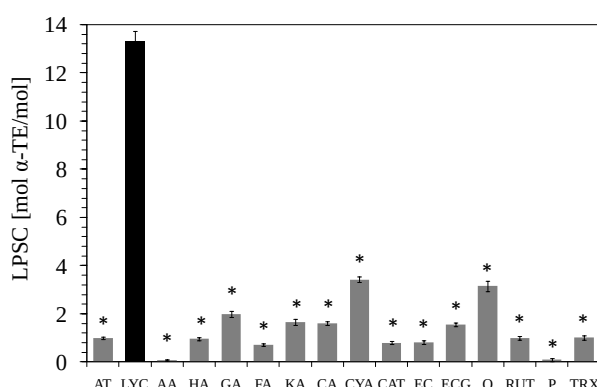


Abbildung A.17 Antioxidative Aktivität einiger hydrophiler Substanzen im LPSC-Test im Vergleich zu Lykopen; * signifikant verschieden zu Lykopen (ANOVA, $p < 0,05$); AA, Ascorbinsäure; AT, α -Tocopherol; CA, Chlorogensäure; CAT, Catechin; CYA, Cyanidin; EC, (-)-Epicatechin; ECG, Epigallocatechin-3-gallat; FA, Ferulasäure; GA, Gallussäure; HA, Harnsäure; KA, Kaffeesäure; LYC, Lykopen; P, Phloridzin; Q, Quercetin; RUT, Rutin; TRX, Trolox®

Tabellen**Tabelle A.1** Anteil einzelner Antioxidantien an der lipophilen AOC verschiedener Säfte im α TEAC-Test

Beitrag von ... [%]	Tomaten-saft	Karotten-saft	Sanddorn-saft	Orangen-saft
Vitamin E	6,8	3,8	21,3	16,3
unbekannt	1,0	33,2	28,8	78,6
Carotinoide	92,2	63,0	49,9	5,1
davon Phytoin	*2,2	n.b.	n.b.	n.b.
davon Phytofluin	*2,2	n.b.	n.b.	n.b.
davon Neurosporin	*3,8	n.b.	n.b.	n.b.
davon Lykopin	81,4	-	21,7	-
davon α -Carotin	-	29,6	-	-
davon β -Carotin	0,9	69,1	27,5	-
davon γ -Carotin	*7,9	n.b.	n.b.	n.b.
davon δ -Carotin	*1,0	n.b.	n.b.	n.b.
davon β -Cryptoxanthin	-	-	4,9	-
davon Lutein	0,6	1,3	26,0	48,1
davon Zeaxanthin	-	-	19,9	51,9

* basierend auf Literaturwerten für die Carotinoidgehalte; n.b. nicht bestimmt; - nicht nachweisbar

Tabelle A.2 Anteil einzelner Antioxidantien an der lipophilen AOC verschiedener Säfte im FRAP-Test

Beitrag von ... [%]	Tomaten-saft	Karotten-saft	Sanddorn-saft	Orangen-saft
Vitamin E	7,1	5,1	19,3	29,0
unbekannt	48,6	91,0	51,2	61,1
Carotinoide	44,4	3,9	29,5	9,9
davon Phytoin	*0,2	n.b.	n.b.	n.b.
davon Phytofluin	*0,0	n.b.	n.b.	n.b.
davon Neurosporin	*0,0	n.b.	n.b.	n.b.
davon Lykopin	93,0	-	17,8	-
davon α -Carotin	-	20,6	-	-
davon β -Carotin	0,1	49,6	1,4	-
davon γ -Carotin	*4,8	n.b.	n.b.	n.b.
davon δ -Carotin	*0,6	n.b.	n.b.	n.b.
davon β -Cryptoxanthin	-	-	4,7	-
davon Lutein	1,3	29,8	42,1	50,6
davon Zeaxanthin	-	-	34,0	49,4

* basierend auf Literaturwerten für die Carotinoidgehalte; n.b. nicht bestimmt; - nicht nachweisbar

Tabelle A.3 Polarität von Tocopherolen und Tocotrienolen anhand des $\log P$ -Wertes (aus [196])

$\log P$ bei T=25 °C (MW $\pm$ Stabw)	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	β -T3	γ -T3	δ -T3
	10,962	10,724	10,724	10,493	9,700	9,461	9,461	9,230
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	0,355	0,349	0,352	0,349	0,405	0,403	0,403	0,402

T, Tocopherol; T3, Tocotrienol

Tabelle A.4 Absorptionsmaxima von Lycopin und apo-Lycopinoiden

Lycopin	apo-6'- Lycopinal	apo-8'- Lycopinal	apo-10'-...				
			Lycopinol	Lycopinal	Lykopinsäure	Lykopinsäure- ethylester	
λ_{max}^* [nm]	472	490	470	417	451	436	438
		apo-12'- Lycopinal	apo-14'-...				
			Lycopinol	Lycopinal	Lykopinsäure	Lykopinsäure- methylester	
			λ_{max}^* [nm]	431	365	394	347
			apo-11'-...				
			Lycopinol	Lycopinal	Lykopinsäure	Lykopinsäure- ethylester	
			λ_{max}^* [nm]	277	355	261	310

* ermittelt in Ethanol+n-Hexan (1+1, v/v); aufgelistet sind jeweils nur die Hauptmaxima

Tabelle A.5 Anteil einzelner Antioxidantien an der lipophilen AOC verschiedener Säfte im LPSC-Test

Beitrag von ... [%]	Tomaten- saft	Karotten- saft	Sanddorn- saft	Orangen- saft
Vitamin E	1,2	0,3	2,3	3,0
unbekannt	42,9	66,7	57,1	87,0
Carotinoide	55,9	33,0	40,6	10,0
davon Phytoin	*0,0	n.b.	n.b.	n.b.
davon Phytoflavin	*0,0	n.b.	n.b.	n.b.
davon Neurosporin	*0,0	n.b.	n.b.	n.b.
davon Lycopin	84,3	-	10,1	-
davon α -Carotin	-	28,7	-	-
davon β -Carotin	1,6	69,2	22,7	-
davon γ -Carotin	11,0	n.b.	n.b.	n.b.
davon δ -Carotin	1,4	n.b.	n.b.	n.b.
davon β -Cryptoxanthin	-	-	3,9	-
davon Lutein	1,7	2,1	34,6	50,0
davon Zeaxanthin	-	-	28,7	50,0

* basierend auf Literaturwerten für die Carotinoidgehalte; n.b. nicht bestimmt; - nicht nachweisbar

Tabelle A.6 Antioxidative Aktivität von Tocopherolen und Tocotrienolen mit α -Tocopherol als Referenz

Substanz		α TEAC	FRAP	DPPH	LPSC	ORAC	gewichteter Mittelwert
		[mol α -TE/mol]					
Tocopherole (T)	α -T	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
	β -T	0,9	0,7	0,9	1,5	1,5	1,0
	γ -T	0,9	0,7	0,9	1,3	1,5	1,0
	δ -T	0,9	0,6	0,7	1,5	3,0	1,1
Tocotrienole (T3)	α -T	1,0	1,1	1,1	1,2	2,0	1,2
	β -T	0,9	0,8	0,9	1,5	3,0	1,1
	γ -T	0,9	0,8	0,9	1,3	3,0	1,1
	δ -T	0,9	0,9	0,7	1,6	5,6	1,4
α -Tocopherol- acetat	α -TA	0,0	0,0	0,1	0,05	0,0	0,0
Mittelwerte		0,8	0,7	0,8	1,2	2,3	1,0

Die rechte Spalte zeigt die gewichteten Mittelwerte, errechnet nach der Formel auf Seite 66.

Tabelle A.7 Antioxidative Aktivität von Carotinoiden mit α -Tocopherol als Referenz

Carotinoid	αTEAC	FRAP	LPSC	gewichteter Mittelwert
	[mol α-TE/mol]			
Phytoin	1,0	0,1	0,1	0,2
Phytofluin	1,0	0,0	0,1	0,2
Neurosporin	2,1	0,0	0,0	0,3
Lykopin	4,0	2,1	13,7	1,5
β -Carotin	3,1	0,1	19,1	0,9
α -Carotin	3,3	0,0	19,0	0,9
β -Cryptoxanthin	3,2	2,1	19,6	1,5
Lutein	2,0	2,1	19,9	1,3
Zeaxanthin	1,9	2,0	20,3	1,3
Echinenon	2,2	0,3	26,3	1,0
Canthaxanthin	0,8	0,3	21,0	0,6
Astaxanthin	0,8	0,5	26,3	0,8
Capsanthin	2,0	2,1	25,3	1,4
Rubixanthin	3,3	3,3	8,9	1,7
Violaxanthin	1,6	1,4	22,5	1,1
Neoxanthin	1,1	1,3	20,6	0,9
Antheraxanthin	2,1	1,7	24,7	1,3
Bixin	1,3	1,7	29,1	1,2
Crocetin	2,4	0,9	19,5	1,0
Mittelwert	2,0	1,2	17,7	1,0

Die rechte Spalte zeigt die gewichteten Mittelwerte, errechnet nach der Formel auf Seite 66.

Tabelle A.8 Antioxidative Aktivität lipophiler Antioxidantien mit α -Tocopherol als Referenz

		α TEAC	FRAP	DPPH	LPSC	gewichteter Mittelwert
		[mol α -TE/mol]				
Vitamin E	α -Tocopherol	1,0	1,0	1,0	1,1	1,4
	β -Tocopherol	0,9	0,7	0,9	1,5	1,3
	γ -Tocopherol	0,9	0,7	0,9	1,3	1,3
	δ -Tocopherol	0,9	0,6	0,7	1,5	1,1
	α -Tocotrienol	1,0	1,1	1,1	1,2	1,5
	β -Tocotrienol	0,9	0,8	0,9	1,5	1,2
	γ -Tocotrienol	0,9	0,8	0,9	1,3	1,3
	δ -Tocotrienol	0,9	0,9	0,7	1,6	1,1
	α -Tocopherolacetat	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
Carotinoide	Phytoin	1,0	0,1	0,0	0,1	0,3
	Phytofluin	1,0	0,0	0,0	0,1	0,2
	Neurosporin	2,1	0,0	0,0	0,0	0,5
	Lykopin	4,0	2,1	0,0	13,7	1,6
	β -Carotin	3,1	0,1	0,0	19,1	1,3
	α -Carotin	3,3	0,0	0,0	19,0	1,3
	β -Cryptoxanthin	3,2	2,1	0,0	19,6	1,6
	Lutein	2,0	2,1	0,0	19,9	1,3
	Zeaxanthin	1,9	2,0	0,0	20,3	1,3
	Echinenon	2,2	0,3	0,0	26,3	1,2
	Canthaxanthin	0,8	0,3	0,0	21,0	0,8
	Astaxanthin	0,8	0,5	0,0	26,3	0,9
	Capsanthin	2,0	2,1	0,0	25,3	1,4
	Rubixanthin	3,3	3,3	0,0	8,9	1,6
	Violaxanthin	1,6	1,4	0,0	22,5	1,2
	Neoxanthin	1,1	1,3	0,0	20,6	1,0
	Antheraxanthin	2,1	1,7	0,0	24,7	1,4
	Bixin	1,3	1,7	0,0	29,1	1,3
	Crocetin	2,4	0,9	0,0	19,5	1,2
sonstige	Ellagsäure	3,7	2,6	1,0	2,1	2,4
	Tyrosol	0,4	0,3	0,0	0,5	0,2
	DHLA	0,4	0,5	0,0	0,5	0,2
synthetische	<i>n</i> -Propylgallat	2,0	1,5	0,1	3,2	0,9
	<i>n</i> -Octylgallat	2,0	1,3	0,2	2,8	0,9
	Laurylgallat	2,0	1,1	0,2	2,5	0,9
	BHT	0,3	0,0	0,1	5,5	0,3
	BHA	0,9	0,2	0,3	5,6	0,7
Mittelwert		1,6	1,0	0,3	10,2	1,1

Die rechte Spalte zeigt die gewichteten Mittelwerte, errechnet nach der Formel auf Seite 66. BHA, *tert*-butylhydroxyanisol; BHT, Di-*tert*-butylhydroxytoluol; DHLA, Dihydroliponsäure

Tabelle A.9 Antioxidative Aktivität von Lykopinverbindungen

Substanz	Summenformel	α TEAC	FRAP	LPSC	gewichteter Mittelwert
		[mol α -TE/mol]			
(<i>all-E</i>)-Lycopin	C ₄₀ H ₅₆	4,0	2,1	13,7	2,6
(5 <i>Z</i>)-Lycopin	C ₄₀ H ₅₆	4,0	2,0	17,9	2,8
(9 <i>Z</i>)-Lycopin	C ₄₀ H ₅₆	3,9	2,0	20,5	2,9
(13 <i>Z</i>)-Lycopin	C ₄₀ H ₅₆	3,9	1,9	16,3	2,7
(7 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,7' <i>Z</i> ,9' <i>Z</i>)-Lycopin	C ₄₀ H ₅₆	3,7	2,0	19,0	2,7
apo-6'-Lycopinal	C ₃₁ H ₄₁ -CHO	1,5	1,0	14,1	1,6
apo-8'-Lycopinal	C ₂₉ H ₃₉ -CHO	0,4	0,7	14,4	1,1
apo-10'-Lycopinol	C ₂₆ H ₃₅ -CH ₂ OH	1,0	1,0	3,6	1,0
apo-10'-Lycopinal	C ₂₆ H ₃₅ -CHO	0,2	0,0	6,5	0,3
apo-10'-Lycopinsäure	C ₂₆ H ₃₅ -COOH	1,0	0,5	7,5	0,9
apo-10'-Lycopinsäure- ethylester	C ₂₆ H ₃₅ -COOC ₂ H ₅	0,1	0,0	8,9	0,3
apo-12'-Lycopinal	C ₂₄ H ₃₃ -CHO	0,2	0,0	5,1	0,3
apo-14'-Lycopinol	C ₂₁ H ₂₉ -CH ₂ OH	0,4	0,5	1,0	0,4
apo-14'-Lycopinal	C ₂₁ H ₂₉ -CHO	0,1	0,0	2,0	0,1
apo-14'-Lycopinsäure	C ₂₁ H ₂₉ -COOH	0,5	0,2	2,6	0,4
apo-14'-Lycopinsäure- methylester	C ₂₁ H ₂₉ -COOCH ₃	0,0	0,0	3,1	0,1
apo-11-Lycopinol	C ₁₄ H ₂₁ -CH ₂ OH	0,1	0,0	0,0	0,1
apo-11-Lycopinal	C ₁₄ H ₂₁ -CHO	0,0	0,0	0,1	0,0
apo-11-Lycopinsäure	C ₁₄ H ₂₁ -COOH	0,1	0,1	0,3	0,1
apo-11-Lycopinsäure- ethylester	C ₁₄ H ₂₁ -COOC ₂ H ₅	0,0	0,0	0,5	0,0
Mittelwert		0,6	0,4	5,2	0,6

Die rechte Spalte zeigt die gewichteten Mittelwerte, errechnet nach der Formel auf Seite 66.

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, dass...

mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

ich keine Textabschnitte eines Dritten ohne entsprechende Kennzeichnung übernommen habe.

alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben sind.

mich keine weiteren als die angegebenen Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes unterstützt haben.

ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe.

Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhielten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

ich diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

ich weder die gleiche noch eine in wesentlichen Teile ähnliche, noch eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, August 2011

Lars Müller

Wissenschaftliche Publikationen

- PUBLIKATIONEN:

Müller, L., Böhm, V.:

Antioxidant activity of β -carotene compounds in different *in vitro* assays.

Molecules (2011) 16 (2), 1055-1069.

Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V.:

Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay.

Food Chemistry (2011), 129, 139-148.

Müller, L., Goupy, P., Fröhlich, K., Dangles, O., Caris-Veyrat, C., Böhm, V.:

Comparative study on antioxidant activity of lycopene (Z)-isomers in different assays.

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2011), 59 (9), 4504-4511.

Müller, L., Theile, K., Finzel, S., Böhm, V.:

Antioxidant capacity and antioxidant vitamins in human plasma as affected by intervention with a multi-component beverage rich in vitamin C and vitamin E.

Ernährung – Nutrition (2011) 35 (3), 101-110.

Müller, L., Gnoyke, S., Böhm, V.:

Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations.

LWT – Food Science and Technology (2010) 43, 992-999.

Müller, L., Theile, K., Böhm, V.:

In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in a human intervention study.

Molecular Nutrition and Food Research (2010) 54, 731-742.

Müller, L., Goupy, P., Reynaud, E., Caris-Veyrat, C., Böhm, V.:

Do apo-lycopenoids have antioxidant activities *in vitro*?

Journal of the American Oil Chemists Society, akzeptiert am 14.10.2011

Hesse, J., **Müller, L.**, Zieger, M., Hipler, U.-C., Böhm, V.:

Prüfung von 16 Pflanzenextrakten auf antioxidative Kapazität im Hinblick auf mögliche präventive Wirkungen.

Lebensmittelchemie (2011) 65 (5), 142-143.

Stangl, V., Kuhn, C., Hentschel, S., Jochmann, N., Jacob, C., Böhm, V., Fröhlich, K., **Müller, L.**, Gericke, C., Lorenz, M.:

Lack of effects of tomato products on endothelial function in humans: Results of a randomized, placebo controlled cross-over study.

British Journal of Nutrition (2011) 105, 263-267.

Al-Duais, M., **Müller, L.**, Böhm, V., & Jetschke, G.:

Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays.

European Food Research and Technology (2009) 228 (5), 813-821.

Hengst, C., Werner, S., **Müller, L.**, Fröhlich, K., Böhm, V.:
Determination of the antioxidant capacity: Influence of the sample concentration on the measured values.

European Food Research and Technology (2009), 230, 249-254.

Hengst, C., Müller, L., Böhm, V.:

Standard-Küvettenphotometer versus Mikrotiterplattenlesegerät – Ein Vergleich aus analytischer und ökonomischer Sicht.

Lebensmittelchemie (2007) 61 (6), 166.

- POSTER:

Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V.

Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Eisen(III)-reduzierenden und peroxyradikal-abfangenden Aktivität von Lycopin und verwandten Verbindungen.

40. *Lebensmittelchemiker-Tag, Halle/Saale, 12.-14.09.2011*

Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V.

Ferric reducing and peroxy radical scavenging activity of lycopene compounds.

16th *International Symposium on Carotenoids, Krakau (PL), 17.-22.07.2011*

Müller, L., Theile, K., Finzel, S., Böhm, V.:

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Vitamin C, Vitamin E und weiteren Antioxidantien aus einem antioxidantienreichen Mischgetränk.

47. *Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Jena, 11.-12.03.2010*

Müller, L., Böhm, V.:

Hydrophile antioxidative Kapazität verschiedener Handelsproben.

37. *Deutscher Lebensmittelchemiker-Tag, Kaiserslautern, 08.-10.09.2008*

Müller, L., Hengst, C., Böhm, V.:

Anwendung von Küvettenphotometer und Mikroplattenlesegerät bei der Messung der antioxidativen Aktivität in hydrophilen Testsystemen.

42. *Vortragstagung „Antioxidantien in pflanzlichen Lebensmitteln“ der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung -Pflanzliche Nahrungsmittel- e.V. (DGQ), Kiel, 19.-20. März 2007*

Hengst, C., **Müller, L.**, Fröhlich, K., Böhm, V.

Bestimmung der antioxidativen Aktivität – Einfluss der Probenverdünnung auf die Messwerte.

36. *Deutscher Lebensmittelchemiker-Tag, Erlangen-Nürnberg, 10.-12.09.2007*

- VORTRÄGE BEI WISSENSCHAFTLICHEN KONGRESSEN/TAGUNGEN:

Müller, L., Böhm, V.:

Antioxidative Aktivität von Carotinoiden - speziell von Lycopin, seinen Isomeren und Metaboliten.

48. *Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Potsdam, 16.-18.03.2011*

Müller, L., Böhm, V.:

Antioxidative Aktivität von Carotinoiden in verschiedenen *in-vitro*-Testsystemen.

20. *Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG), Dresden, 25.-26.03.2010*

Müller, L., Theile, K., Finzel, S., Böhm, V.:

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Vitamin C, Vitamin E und weiteren Antioxidantien aus einem antioxidantienreichen Mischgetränk.

47. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Jena, 11.-12.03.2010

Müller, L., Theile, K., Böhm, V.:

In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in a human intervention study.

“Vitamin E Satellite Symposium (VESS”) im Rahmen des “Society of Free Radical Research (SFRR)-Europe Meeting”, Rom (IT), 26.-29.08.2009

Hesse, J., **Müller, L.,** Zieger, M., Hipler, U.-C., Böhm, V.:

Prüfung von 16 Pflanzenextrakten auf antioxidative Kapazität im Hinblick auf mögliche präventive Wirkungen.

21. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG), Halle/Saale, 24.-25.03.2011 (Koautor)

Stangl, V., Kuhn, C., Henschel, S., Witzel, V., Jochmann, N., Jacob, C., Böhm, V., Fröhlich, K., **Müller, L.,** Gericke, C., Baumann, G., Stangl, K., & Lorenz, M.:

Consumption of tomato products failed to modulate endothelial function in healthy postmenopausal women.

3rd International Symposium on Health Effects of Fruits and Vegetables, Avignon (F), 18.-21.10.2009 (Koautor)

Gnoyke, S., **Müller, L.,** Böhm, V.:

Smoothie – Die flüssige Alternative zu Obst und Gemüse?

18. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG), Jena, 03.-04.04.2008 (Koautor)

Hengst, C., **Müller, L.,** Böhm, V.:

Standard-Küvettenphotometer versus Mikrotiterplattenlesegerät – Ein Vergleich aus analytischer und ökonomischer Sicht.

17. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG), Halle/Saale, 29.-30.03.2007 (Koautor)

- KONFERENZBEITRÄGE:

Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V.:

Ferric reducing and peroxy radical scavenging activity of lycopene compounds (Poster).

Proceedings of the 16th International Symposium on Carotenoids, erschienen in *Acta Biologica Cracoviensia*, 53 (2011), S79.

Müller, L., Böhm, V.:

Antioxidative Aktivität von Carotinoiden, speziell von Lycopin, seinen Isomeren und Metaboliten (Referat).

Proceedings of the German Nutrition Society 15 (2011) 31.

Müller, L., Theile, K., Finzel, S., Böhm, V.:

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Vitamin C, Vitamin E und weiteren Antioxidantien aus einem antioxidanzienreichen Mischgetränk (Poster & Referat)

Proceedings of the German Nutrition Society 14 (2010) 59.

Müller, L., Theile, K., Böhm, V.:

In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant activity in a human intervention study (Referat).

Free Radical Research (2009) 43 Suppl. 1, 56.

Müller, L., Hengst, C., Böhm, V.:

Anwendung von Küvettenphotometer und Mikroplattenlesegerät bei der Messung der antioxidativen Aktivität in hydrophilen Testsystemen (Poster).

42. Vortragstagung „Antioxidantien in pflanzlichen Lebensmitteln“ der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung -Pflanzliche Nahrungsmittel- e. V. (DGQ) Abstractband 71-73 (2007).

- BUCHKAPITEL:

Böhm, V., **Müller, L.**

Methods to measure the antioxidant capacity of meat products.

In: *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*, L.M.L. Nollet and F. Toldrá (editors), CRC Taylor & Francis (2010) Boca Raton, Fl., 273-289

