

Carotinoide und Vitamin E in Hartweizen und daraus
hergestellten Teigwaren – analytische, technologische
und ernährungsphysiologische Aspekte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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



seit 1558

von Diplom-Trophologin

Susanne Werner (geb. Burkhardt)

geboren am 4. März 1980 in Jena

Gutachter:

1. PD Dr. habil. Volker Böhm

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe
Dornburger Straße 25
07743 Jena

2. Prof. Dr. Gerhard K. E. Scriba

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Institut für Pharmazie
Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie
Philosophenweg 14
07743 Jena

3. Prof. Dr. Meinolf G. Lindhauer

Max Rubner-Institut (Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel)
Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide
Schützenberg 12
32756 Detmold

Tag der Disputation: 05.07.2010

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1 Weizen	3
2.1.1 Die Gattung <i>Triticum</i>	3
2.1.2 Das Weizenkorn – Struktur und Inhaltsstoffe	4
2.2 Teigwaren	8
2.2.1 Begriffsbestimmung, Verbrauch und Geschichte	8
2.2.2 Moderne Teigwarenherstellung und deren Einfluss auf die Inhaltsstoffe	9
2.2.3 Qualitätskriterien für Teigwaren	11
2.3 Carotinoide	12
2.3.1 Struktur und Vorkommen	12
2.3.2 Funktionen	14
2.4 Vitamin E	16
2.4.1 Struktur und Vorkommen	16
2.4.2 Funktionen	18
2.5 Verdauung und Bioverfügbarkeit von lipophilen Verbindungen	21
2.5.1 Verdauung, Resorption und Transport von Carotinoiden und Vitamin E	21
2.5.2 Methoden zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit	23
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Untersuchungsmaterial	27
3.2 Probenvorbereitung	29
3.3 Isolierung und Aufreinigung von Lutein und Zeaxanthin mittels präparativer HPLC	30
3.4 Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin	30
3.4.1 Thermische Isomerisierung	31
3.4.2 Photo-Iod-Isomerisierung	31
3.5 Bestimmung von Carotinoiden	31
3.5.1 Extraktion	31
3.5.1.1 Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide	31
3.5.1.2 Optimierte Extraktionsmethode	34
3.5.2 HPLC-Analytik	35
3.5.2.1 Gradientenmethoden für Xanthophylle und Carotine	36
3.5.2.2 Isokratische Methode für Xanthophylle	37
3.5.2.3 LC-MS-Messung von Lutein und Zeaxanthin	39

3.6	Bestimmung von Vitamin E	40
3.6.1	Extraktion.....	40
3.6.1.1	Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden	40
3.6.1.2	Optimierte Extraktionsmethode	43
3.6.2	HPLC-Analytik	43
3.7	<i>In-vitro</i>-Verdauung	44
3.8	Photometrische Bestimmung der Gelbpigmente	47
3.9	Trockenmassebestimmung	48
3.10	Photometrische Bestimmung freier Aminosäuren	48
3.11	Photometrische Zuckerbestimmung	49
3.12	Nachweis freier Fettsäuren mittels Dünnschichtchromatographie	50
3.13	Statistische Datenauswertung	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Isolierung und Aufreinigung von Lutein und Zeaxanthin mittels präparativer HPLC	52
4.2	Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin	52
4.2.1	Thermische Isomerisierung.....	52
4.2.2	Photo-Iod-Isomerisierung.....	54
4.3	Charakterisierung von Carotinoiden in Hartweizen	55
4.3.1	UV-vis-Spektroskopie	55
4.3.2	Massenspektroskopie	57
4.4	Extrahierbarkeit von Carotinoiden	59
4.4.1	Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen.....	59
4.4.2	Untersuchung potenzieller Ursachen für die reduzierte Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Hartweizen	63
4.4.3	Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Carotinoide in Hartweizen und Teigwaren.....	68
4.4.4	Extraktion von Carotinoiden aus anderen Weizen- und Getreidearten	71
4.5	Extrahierbarkeit von Tocopherolen und Tocotrienolen	72
4.5.1	Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Hartweizen und Teigwaren ..	72
4.5.2	Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Tocopherole und Tocotrienole in Hartweizen und Teigwaren	77
4.6	Veränderungen der Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E während der Teigwarenherstellung und -zubereitung	79
4.6.1	Vorversuche mit Produktionszwischenstufen	79
4.6.2	Veränderungen während der Teigwarenherstellung.....	81
4.6.3	Veränderungen während des Kochens von Teigwaren	82
4.7	Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit mittels <i>in-vitro</i>-Verdauung	84
4.7.1	Beurteilung der <i>in-vitro</i> -Verdauung anhand von freien Fettsäuren, Aminosäuren und Zuckern.....	84
4.7.2	Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide aus Teigwaren.....	86
4.7.3	Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin E aus Teigwaren	90

5	DISKUSSION.....	94
5.1	Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin	94
5.2	Charakterisierung von Carotinoiden in Hartweizen	95
	5.2.1 UV-vis-Spektroskopie	95
	5.2.2 Massenspektroskopie	98
5.3	Extrahierbarkeit von Carotinoiden	99
	5.3.1 Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen	99
	5.3.2 Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Carotinoide in Hartweizen und Teigwaren.....	106
	5.3.3 Extraktion von Carotinoiden aus anderen Weizen- und Getreidearten.....	110
5.4	Extrahierbarkeit von Tocopherolen und Tocotrienolen	113
	5.4.1 Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Hartweizen und Teigwaren	113
	5.4.2 Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Tocopherole und Toco- trienole in Hartweizen und Teigwaren.....	115
5.5	Potenzielle Ursachen für die reduzierte Extrahierbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Hartweizen	118
5.6	Veränderungen der Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E während der Teigwarenherstellung und -zubereitung	125
	5.6.1 Vorversuche mit Produktionszwischenstufen	125
	5.6.2 Veränderungen während der Teigwarenherstellung.....	128
	5.6.3 Veränderungen während des Kochens von Teigwaren.....	133
5.7	Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit mittels <i>in-vitro</i>-Verdauung	136
	5.7.1 Beurteilung der <i>in-vitro</i> -Verdauung anhand von freien Fettsäuren, Amino- säuren und Zuckern.....	136
	5.7.2 Methodische Voruntersuchungen zur <i>in-vitro</i> -Verdauung	138
	5.7.3 Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Teigwaren	147
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	152
7	SUMMARY	156
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	158
	ANHANG A: GERÄTE UND CHEMIKALIEN	XIII
A.1	Verzeichnis der verwendeten Geräte	XIII
A.2	Verzeichnis der verwendeten Arbeitsmittel	XIV
A.3	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Lösungen.....	XVI
	ANHANG B: ANALYSENDATEN.....	XXI

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Wissenschaftliche Publikationen, Poster und Vorträge

Danksagung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Systematik der Gattung <i>Triticum</i>	3
Abb. 2:	Phänotypischer Vergleich der analysierten Weizenarten	4
Abb. 3:	Modell eines Lipidkörpers aus Mais (modifiziert nach TZEN und HUANG 1992).....	7
Abb. 4:	Pro-Kopf-Verbrauch [kg] an Teigwaren in Deutschland (Quelle: Verband der Teigwarenhersteller und Hartweizenmühlen Deutschlands e. V.)	8
Abb. 5:	Strukturformeln ausgewählter Lutein- und Zeaxanthin-Isomere	14
Abb. 6:	Struktur von Tocopherolen (oben) und Tocotrienolen (unten)	17
Abb. 7:	Interaktionen von Vitamin E mit weiteren lipophilen und hydrophilen Antioxidantien (modifiziert nach PACKER <i>et al.</i> 2001).....	19
Abb. 8:	Schematische Darstellung von Resorption und Transport von Carotinoiden und Vitamin E	23
Abb. 9:	Bestimmung von Resorptions- und Bioverfügbarkeit im <i>in-vitro</i> -Modell.....	25
Abb. 10:	Gegenüberstellung der Prozessparameter der industriellen Produktionslinien (Quelle: Erfurter Teigwaren GmbH)	28
Abb. 11:	Überblick über die getesteten Modifikationen zur quantitativen Extraktion von Carotinoiden aus Hartweizen.....	34
Abb. 12:	Chromatographische Trennung von Carotinoid-Standards mit einer Trentec C ₃₀ -Analysensäule (250 x 4,6 mm; 5 µm) mit Gradientenmethoden 1 (A) und 2 (B) sowie isokratischer Elution (C).....	38
Abb. 13:	Prinzip der Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) in einem Massenspektrometer (modifiziert nach GROBOSCH 2008).....	39
Abb. 14:	Chromatographische Trennung eines Vitamin-E-Standardgemisches mit einer Knauer Diol-Analysensäule (250 x 4 mm; 7 µm), mobiler Phase n-Hexan/MtBE (98/2, v/v) und isokratischer Elution bei 35 ± 1 °C und 1,5 ml/min.....	44
Abb. 15:	Schematische Darstellung der simulierten Verdauungsschritte.....	46
Abb. 16:	Reaktion von TNBS mit einer Aminogruppe.....	48
Abb. 17:	HPLC-Chromatogramm der Carotinoide in Maismehl (Trentec PEEK-C ₃₀ -Analysensäule, Gradientenmethode 1) (A) sowie Trennung der Carotinoid-Fractionen mittels präparativer YMC C ₃₀ -Säule (B).....	52
Abb. 18:	HPLC-Chromatogramme von isomerisierten Lutein-Standards (links) und Zeaxanthin-Standards (rechts) nach unterschiedlicher Erhitzungsdauer bei 140 °C	53
Abb. 19:	Veränderung der (E)/(Z)-Verhältnisse [%] von Lutein (links) und Zeaxanthin (rechts) in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer bei 140 °C im Trockenschrank.....	53
Abb. 20:	Veränderung der (E)/(Z)-Verhältnisse [%] von Lutein (links) und Zeaxanthin (rechts) in Abhängigkeit von der verwendeten Menge einer Iodlösung (0,4 mg/ml) und der Belichtungszeit.....	54
Abb. 21:	HPLC-Chromatogramm der Hartweizensorte Prowidur (A) im Vergleich zu einem photo-Iod-isomerisierten Lutein- (B) und Zeaxanthin-Standard (C)	55
Abb. 22:	HPLC-Chromatogramm eines isomerisierten Lutein-Standards (140 °C, 8 h) und PDA-Absorptionsspektren der für Hartweizen und Teigwaren relevanten Isomere	56

Abb. 23:	HPLC-Chromatogramm eines isomerisierten Zeaxanthin-Standards (140 °C, 4 h) und PDA-Absorptionsspektren ausgewählter Isomere.....	56
Abb. 24:	Massenspektren von (<i>all-E</i>)-Lutein (A) und (<i>all-E</i>)-Zeaxanthin (B).....	57
Abb. 25:	Extracted Ion Chromatogram (XIC) einer Teigware (A), eines isomerisierten Lutein-Standards (C) und Zeaxanthin-Standards (D) im Vergleich zu einem PDA-Chromatogramm einer Teigware bei 450 nm (B)	58
Abb. 26:	Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Dauer des Einweichens mit Lösungsmittel bei Raumtemperatur.....	60
Abb. 27:	Carotinoidgehalte von drei Hartweizen-sorten nach Extraktion ohne und mit vorherigem Einweichen mit Lösungsmittel.....	60
Abb. 28:	Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Einweichzeit mit Lösungsmittel bei 30 °C und 35 °C.....	60
Abb. 29:	Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit vom Einweichen mit Lösungsmittel.....	60
Abb. 30:	Gehalte einzelner Carotinoide von frischer und gefriergetrockneter Karotte und Tomate nach direkter Lösungsmittlextraktion.....	63
Abb. 31:	Gehalt einzelner Carotinoide von gefriergetrockneter Tomate in Abhängigkeit von der Einweichzeit mit dem Lösungsmittel	64
Abb. 32:	Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Kartoffeln und Instant-Kartoffelpüree in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proben sowie von der Extraktionsmethode	64
Abb. 33:	Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen (Prowidur) nach enzymatischem Aufschluss mittels α -Amylase (n = 5).....	66
Abb. 34:	Gehalte an Maltose und Glucose der Hartweizensorte Prowidur nach Aufschluss mittels α -Amylase	66
Abb. 35:	Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen (Kombo) durch einen sauren sowie enzymatischen Aufschluss mittels Pepsin.....	67
Abb. 36:	Gehalt freier Aminosäuren der Hartweizensorte Kombo nach Aufschluss mit Pepsin	67
Abb. 37:	Relative Gesamt-Carotinoidgehalte von Hartweizen, Grieß und Teigwaren nach Extraktion ohne und mit Quellung mit Wasser im Vergleich zum Gelbpigmentgehalt.....	69
Abb. 38:	Zusammensetzung der Carotinoid-Fraktion in Hartweizen, Grieß und Teigwaren	70
Abb. 39:	Vergleich der Carotinoid-Zusammensetzung von verschiedenen Getreidearten nach Extraktion mit vorheriger Quellung der Proben mit Wasser	72
Abb. 40:	Mit Hilfe verschiedener Extraktionsmethoden ermittelte Vitamin-E-Gehalte von Grieß und Teigwaren (Mittelwerte aus mindestens drei Bestimmungen).....	74
Abb. 41:	Reproduzierbarkeit der Ermittlung der Vitamin-E-Gehalte von Grieß und Teigwaren (TW) bei verschiedenen Extraktionsmethoden (Dreifachbestimmungen an zwei bzw. drei Analysentagen).....	75
Abb. 42:	Extrahierbarkeit von Vitamin E aus Hartweizen (Kombo) durch einen sauren sowie enzymatischen Aufschluss mittels Pepsin.....	76
Abb. 43:	Mittelwerte der Vitamin-E-Gehalte von mehreren Hartweizen, Grießen und Teigwaren nach Extraktion mit und ohne vorherige Quellung mit Wasser.....	78

Abb. 44:	Zusammensetzung der Vitamin-E-Fraktion in Hartweizen, Grieß und Teigwaren	78
Abb. 45:	Gehalte an Carotinoiden (links) und Vitamin E (rechts) der einzelnen Produktionsstufen der PL2 (Balken) im Vergleich zu deren Trockenmassen (Punkte) ...	79
Abb. 46:	Mittelwerte der Gehalte an Carotinoiden (links, n = 7) und Vitamin E (rechts, n = 5) von rohen und gekochten Teigwaren.....	84
Abb. 47:	Zunahme von freien Aminosäuren (links) und Zuckern (rechts) nach simulierter Verdauung im Vergleich zur unverdauten Teigware	86
Abb. 48:	Prozentuale Verteilung der Gesamt-Carotinoide in Rückstand und Überstand einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode	88
Abb. 49:	Vergleich der prozentualen Verteilung der Gesamt-Carotinoide in Rückstand und Überstand von eifreien Teigwaren (oben) und Eierteigwaren (unten) nach simulierter Verdauung an zwei verschiedenen Tagen mit jeweils drei Verdauungsansätzen	89
Abb. 50:	Prozentuale Verteilung von Vitamin E in Rückstand und Überstand einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode	92
Abb. 51:	Vergleich der prozentualen Verteilung von Vitamin E in Rückstand und Überstand von eifreien Teigwaren (oben) und Eierteigwaren (unten) nach simulierter Verdauung an zwei verschiedenen Tagen mit jeweils drei Verdauungsansätzen.....	93
Abb. 52:	Charakteristische Merkmale von UV-vis-Absorptionsspektren zur Identifizierung von (<i>all-E</i>)- und (<i>Z</i>)-Isomeren der Carotinoide am Beispiel des Luteins..	95
Abb. 53:	HPLC-Trennung isomerisierter Lutein- (grau) und Zeaxanthin-Standards (schwarz) (A) im Vergleich zu einer von AMAN <i>et al.</i> (2005a) publizierten Methode (B).....	98
Abb. 54:	Bildung von Anhydrolutein aus Lutein.....	98
Abb. 55:	Vergleich zwischen Gelbpigment- und Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode	105
Abb. 56:	Abhängigkeit von Oxidation, Bräunung, Enzymaktivität, Vitaminabbau und mikrobiologischer Aktivität von der Wasseraktivität (ZIGERLIG 2006).....	127
Abb. 57:	Zusammenfassende Gegenüberstellung der Prozessparameter der beiden untersuchten Produktionslinien.....	129
Abb. 58:	DC-Trennung einer Teigware vor und nach simulierter Verdauung mittels n-Hexan/Diethylether/Essigsäure (80/20/1, v/v/v) im Vergleich zu einem Standardgemisch.....	137
Abb. 59:	DC-Trennung eines Fettgemisches mit Hexan/Diethyl-ether/ Ameisensäure (80/ 20/2, v/v/v) (CHRISTIE 1989).....	137
Abb. 60:	Mittelwerte der relativen Gehalte an Gesamt-Carotinoiden (links) und Vitamin E (rechts) in Rückstand und Überstand von Teigwaren nach simulierter Verdauung.....	147
Abb. 61:	PDA-Absorptionsspektren der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere einer Teigware	XXIV

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Unterscheidung von HT- und VHT-Trocknung anhand von publizierten Trocknungstemperaturen	10
Tab. 2:	Krankheitspräventive Wirkungen von Lutein und anderen Carotinoiden	15
Tab. 3:	Bioaktivität einzelner Tocopherole und Tocotrienole (SHEPPARD <i>et al.</i> 1993, GABMANN 1995a, BENDER 2003, MØLLER NIELSEN und HANSEN 2008).....	17
Tab. 4:	Krankheitspräventive Wirkungen von Vitamin E	20
Tab. 5:	Übersicht über die verwendeten Hartweizen-Teigwaren	27
Tab. 6:	Übersicht zu den durchgeführten Analysen für die Muster aus der industriellen Teigwarenproduktion	29
Tab. 7:	Verwendete Extraktions- und HPLC-Methoden für das untersuchte Probenmaterial	35
Tab. 8:	HPLC-Gradienten zur Trennung von Xanthophyllen und Carotinen.....	37
Tab. 9:	UV-vis-spektroskopische Daten zur Identifizierung der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere (im HPLC-Eluenten bestimmt (MeOH/H ₂ O, 97/3, v/v)).....	57
Tab. 10:	Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der eingesetzten Wassermenge zur Quellung der Probe (n = 2)	61
Tab. 11:	Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Quelldauer (n = 2)	61
Tab. 12:	Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Quellungstemperatur.....	62
Tab. 13:	Einfluss der Partikelgröße von gemahlenem Hartweizen (Prowidur) auf die ermittelten Gehalte an Carotinoiden [mg/100 g TM].....	62
Tab. 14:	Carotinoidgehalt des Hartweizens Prowidur nach enzymatischem Aufschluss mit α -Amylase im Vergleich zur Quellung mit Wasser und Phosphatpuffer	65
Tab. 15:	Einfluss der Gefriertrocknung auf Carotinoidgehalte von Hartweizen.....	65
Tab. 16:	Carotinoidgehalte von gekochten Teigwaren in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode.....	68
Tab. 17:	Wiederfindungsraten des internen Standards [%] bei der optimierten Extraktion der Carotinoide aus 26 verschiedenen Proben (Hartweizen, Grieß, Teigwaren)	70
Tab. 18:	Einfluss der Gefriertrocknung auf Vitamin-E-Gehalte der Hartweizensorte Kombo.....	76
Tab. 19:	Wiederfindungsraten des internen Standards [%] bei der optimierten Extraktion von Vitamin E aus 19 verschiedenen Proben (Hartweizen, Grieß, Teigwaren)	77
Tab. 20:	Gehalte an Carotinoiden einzelner Produktionszwischenstufen in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode	81
Tab. 21:	Gehalte an Vitamin E einzelner Produktionszwischenstufen in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode.....	81
Tab. 22:	Vergleich der Produktionslinien 1 und 2 hinsichtlich der relativen Veränderung [%] der Gehalte an Gesamt-Carotinoiden und Vitamin E von Rohware und Endprodukt	82

Tab. 23:	Veränderungen des Carotinoidgehaltes von Teigwaren während des Kochens	83
Tab. 24:	Zunahme der (Z)-Isomere des Luteins während der Teigwarenherstellung und des Kochens.....	83
Tab. 25:	Veränderungen des Vitamin-E-Gehaltes von Teigwaren während des Kochens	84
Tab. 26:	Wiederfindungsrate des internen Standards [%] bei Extraktion der Carotinoide aus jeweils 20 Proben (entspricht jeweils 60 Bestimmungen).....	87
Tab. 27:	Resorptionsverfügbarkeit [%] der Gesamt-Carotinoide aus einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode.....	88
Tab. 28:	Resorptionsverfügbarkeit [%] der einzelnen Xanthophylle und Gesamt-Carotinoide aus Teigwaren (Mittelwerte aus allen Verdauungsansätzen).....	90
Tab. 29:	Wiederfindungsrate des internen Standards [%] bei Extraktion von Vitamin E aus jeweils 20 Proben (entspricht jeweils 60 Bestimmungen)	91
Tab. 30:	Resorptionsverfügbarkeit [%] von Vitamin E aus einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode.....	91
Tab. 31:	Resorptionsverfügbarkeit [%] der einzelnen Tocopherole (T), Tocotrienole (T3) und Vitamin E (T+T3) aus Teigwaren (Mittelwerte aus allen Verdauungsansätzen).....	93
Tab. 32:	Vergleich der ermittelten UV-vis-spektroskopischen Daten mit publizierten Werten.....	97
Tab. 33:	Vergleich der untersuchten Partikelgrößen mit typischen Hartweizen-Mahlfraktionen.....	105
Tab. 34:	Publizierte Lutein- bzw. Gesamt-Carotinoidgehalte [mg/100 g] von Hartweizen, Grieß und Teigwaren	109
Tab. 35:	Publizierte Gehalte an Gesamt-Carotinoiden und Lutein [mg/100 g] in Weichweizen	112
Tab. 36:	Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Textur bestimmenden Proteinen und dem Einfluss von Wasser auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide..	125
Tab. 37:	Publizierte Verluste an Gelbpigmenten [%] während der Teigwarenherstellung	130
Tab. 38:	Gegenüberstellung verschiedener <i>in-vitro</i> -Verdauungsmethoden.....	146
Tab. 39:	Publizierte Wiederfindungsraten für Carotinoide nach <i>in-vitro</i> -Verdauung	148
Tab. 40:	Vergleich der Resorptionsverfügbarkeit (RV) von Lutein aus verschiedenen Lebensmitteln	150
<hr/>		
Tab. A 1:	Übersicht über die verwendeten Vollkorn-Getreide und Grieße	XXI
Tab. A 2:	Zur Berechnung von Gesamt-Carotinoidgehalten verwendete Molmassen.....	XXI
Tab. A 3:	Parameter zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der Carotinoide ..	XXII
Tab. A 4:	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Xanthophylle für die isokratische Elutionsmethode (Trentec PEEK-C30-Analysensäule, 250 x 4,6 mm, 5 µm) ...	XXII
Tab. A 5:	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Carotinoide für die Gradientenmethode 1 (Trentec PEEK-C30-Analysensäule, 250 x 4,6 mm, 5 µm).....	XXII

Tab. A 6: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Carotinoide für die Gradientenmethode 2 (Trentec Vertex-C30-Analysensäule, 250 x 4,6 mm; 5 µm)	XXIII
Tab. A 7: Zur Berechnung von Vitamin E verwendete Molmassen der Tocochromanole	XXIII
Tab. A 8: Absorptionsmaxima und spezifische Extinktionskoeffizienten der Tocopherole und Tocotrienole in Ethanol	XXIII
Tab. A 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Tocopherole und Tocotrienole für Knauer Eurospher-100 DIOL-Analysensäule (250 × 4,0 mm; 7µm)	XXIII
Tab. A 10: Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Einweichzeit mit MeOH/THF (1/1, v/v) sowie dem Zusatz von BHT zum Extraktionsmittel.....	XXIV
Tab. A 11: Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur nach Extraktion unter permanentem Schütteln bei verschiedenen Einweichzeiten	XXIV
Tab. A 12: Carotinoidgehalte verschiedener Weizen- und Getreidearten nach Extraktion mit bzw. ohne vorherige Quellung mit Wasser ^A	XXIV
Tab. A 13: Gehalte an Gesamt-Carotinoiden [mg/100 g TM] von Hartweizen, Grieß und Teigwaren nach Extraktion mit und ohne Quellung mit Wasser im Vergleich zum jeweiligen Gelbpigmentgehalt	XXV
Tab. A 14: Gehalte einzelner Carotinoide in Hartweizen, Grieß und Teigwaren [mg/100 g TM] nach Extraktion mit vorheriger Quellung mit Wasser	XXVI
Tab. A 15: Carotinoidgehalte in Eierteigwaren [mg/100 g TM]	XXVII
Tab. A 16: Vitamin-E-Gehalte von Hartweizen, Grieß und Teigwaren nach Extraktion mit bzw. ohne vorherige Quellung mit Wasser.....	XXVII
Tab. A 17: Gehalte an Tocopherolen, Tocotrienolen und Vitamin E in Hartweizen.....	XXVIII
Tab. A 18: Gehalte an Gesamt-Carotinoiden und Vitamin E von Rohware und Endprodukt verschiedener Chargen der Produktionslinien 1 und 2	XXVIII
Tab. A 19: Resorptionsverfügbarkeit [%] der Tocopherole (T) und Tocotrienole (T3) aus Teigwaren (Mw ± SD aus jeweils 3 Ansätzen an 2 verschiedenen Tagen) ...	XXVIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation, chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AUC	area under the curve, Fläche unter der Kurve
a_w	Wasseraktivität
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	bovine serum albumin, bovines Serumalbumin
CAR	Carotinoid(e)
CE	Cholesterinester
CEM	Channel Electron Multiplier, Kanalelektronenvervielfacher
Chol	Cholesterin
cps	counts per second
CUR	curtain gas, Schutzgas
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DP	declustering potential
E	Extinktion
$E_{1cm}^{1\%}$	spezifischer Extinktionskoeffizient
EP	entrance potential, Eintrittspotential
EPK	Endprodukt nach Kühlung
ET	Endtrocknung
EtOH	Ethanol
EW	Einwaage
FAME	Fettsäuremethylester
FFS	freie Fettsäure
FM	Frischmasse
FP	focussing potential, Fokussierpotential
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GFT	Gefriertrocknung
Glu	Glutaminsäure
GR	Grieß
GS1	Ion source gas 1 (nebulizer gas)
GS2	Ion source gas 2 (auxiliary gas)
HDL	High density lipoprotein
HK	Hexokinase
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeits-

	chromatographie
HT	high temperature
HT-ST	high temperature - short time
HW	Hartweizen (<i>Triticum durum</i>)
ICC	Internationale Gesellschaft für Getreidewissenschaft und –Technologie
IDL	intermediate density lipoprotein
IS	interner Standard
IU	international units, internationale Einheiten
k. A.	keine Angabe
KW	Kurzware
LC	liquid chromatography, Flüssigkeitschromatographie
LDL	Low density lipoprotein
LG	Leergewicht
LOX	Lipoxygenase
LT	low temperature
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MCT	medium-chain triglycerides, mittelkettige Triglyceride bzw. Fettsäuren
MeOH	Methanol
mind.	mindestens
Mio.	Million
MPOD	macular pigment optical density, Makulapigmentdichte
MRI	Max Rubner-Institut
MS	Massenspektroskopie / Massenspektrometer
MtBE	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
Mw	arithmetischer Mittelwert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NC	nebulizer current, Strom an der Koronaentladungsnadel
n. n.	nicht nachweisbar (Wert < Nachweisgrenze)
NP	Normal phase
n. s.	nicht signifikant
PDA	Photodiodenarray
PEEK	Polyetheretherketon
PhL	Phospholipid
PIN	Puroindolin(e)
PL	Produktionslinie
PT	Pressteig (gepresster Teig vor der Ausformung)
PW	Pressware (ausgeformter Teig vor der Trocknung)
r	Korrelationskoeffizient
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur (22 ± 2 °C)
RV	Resorptionsverfügbarkeit

RW	Rückwaage
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdedecylsulfat
SIM	Selected Ion Monitoring
S-N-K	post-hoc-Test nach Student-Newman-Keuls
SR-BI	Scavenger receptor class B Type I
SVT	Schüttelvortrocknung
<i>T.</i>	<i>Triticum</i>
T	Tocopherol(e)
T3	Tocotrienol(e)
α -TAc	α -Tocopherolacetat
α -TÄ	α -Tocopherol-Äquivalente
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerol
TEM	temperature, Verdampfungstemperatur in der APCI-Quelle
TG	Teig
THF	Tetrahydrofuran
TM	Trockenmasse
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
t_R	Retentionszeit
TRL	Triglyceridreiche Lipoproteine
α -TTP	α -Tocopherol-Transfer-Protein
TW	Teigware
U	Unit (Enzymaktivität)
UHT	ultra high temperature
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
var.	Varietät
v. Chr.	vor Christus
VF	Verdünnungsfaktor
VHT	very high temperature
vis	visible, sichtbares Licht
(n-)VLDL	(nascent) very low density lipoprotein
VT	Vortrocknung
wBuOH	wassergesättigtes 1-Butanol
WF	Wiederfindung
WW	Weichweizen (<i>Triticum aestivum</i>)
XIC	extracted ion chromatogram
Zea	Zeaxanthin
zw.	zwischen

1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Getreide zählt seit mehreren Jahrtausenden zu den Grundnahrungsmitteln des Menschen. Weizen nimmt derzeit den zweiten Platz bezüglich des weltweiten Getreideanbaus ein. Unter den Weizenarten hat der Weichweizen (*Triticum aestivum*) aufgrund seiner Eignung für die Brotherstellung eine besondere Bedeutung. Hartweizen (*Triticum durum*) ist die zweitwichtigste Weizenart und hat einen Anteil am Weltweizenanbau von etwa 10 %. Hartweizengrieß wird überwiegend zu Teigwaren verarbeitet. Während in Italien vorrangig reine Hartweizen-Pasta hergestellt wird, sind in Deutschland Eierteigwaren besonderes beliebt. In den letzten Jahrzehnten ist der Teigwarenverzehr in Deutschland stetig angestiegen und liegt derzeit bei über 7 kg pro Person und Jahr.

Ein wichtiges Qualitätskriterium für Teigwaren, welches die Kaufentscheidung der Verbraucher maßgeblich beeinflusst, ist eine gleichmäßige gelbe Farbe. Demzufolge werden von Pflanzenzüchtern und der verarbeitenden Industrie bevorzugt Hartweizensorten bzw. Grieße mit einem hohen Gelbpigmentgehalt ausgewählt. Die exakte Zusammensetzung dieses unspezifischen Summenparameters ist bis heute nicht vollständig geklärt. Etwa die Hälfte des Gehaltes an Gelbpigmenten wird nach derzeitigem Kenntnisstand durch Carotinoide bestimmt. Inwieweit andere Substanzklassen am Gelbpigmentgehalt von Hartweizen beteiligt sind, ist bisher nicht bekannt. Neben den Gelbpigmenten spielen die Hauptnährstoffe, v. a. Proteine und Stärke, eine entscheidende Rolle für die Teigwarenqualität, da sie die Kocheigenschaften der Erzeugnisse bestimmen. Der Einfluss der Teigwarenherstellung auf Proteine und Stärke ist während der letzten Jahrzehnte umfassend untersucht worden. Zu Veränderungen von fettlöslichen Vitaminen und sekundären Pflanzenstoffen während der Verarbeitung von Grieß zu Teigwaren existieren hingegen kaum Literaturdaten.

Getreideprodukte sind nicht zuletzt wegen ihres Beitrags zur Ballaststoffversorgung ein unentbehrlicher Bestandteil einer ausgewogenen Ernährung. Teigwaren werden aufgrund ihrer hohen Gehalte an Proteinen und komplexen Kohlenhydraten und ihrer geringen Fettgehalte auch für die Ernährung bestimmter Bevölkerungsgruppen wie beispielsweise Sportler oder Diabetiker geschätzt. Epidemiologische Studien brachten den Verzehr von Vollkorngetreide und Getreideprodukten in den Zusammenhang mit einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebserkrankungen (Magen-, Darm-, Brust- und Prostatakrebs). Als wirksame Getreideinhaltsstoffe wurden Ballaststoffe, resistente Stärke und Oligosaccharide diskutiert. Die protektiven Effekte wurden außerdem auf die Wirkung von Polyphenolen, Lignanen, Carotinoiden und Vitamin E zurückgeführt. Hierfür ist die Resorption der Verbindungen im Dünndarm sowie ihr Transport zu den entsprechenden Wirkungsorten notwendig. Nicht resorbierte Verbindungen können nach ihrer Freisetzung aus der Lebens-

mittelmatrix ihre Wirkungen auch lokal entfalten und somit zum Schutz vor Magen- und Darmkrebs beitragen.

Die vorliegende Dissertation soll einen Beitrag leisten zur Beurteilung der ernährungsphysiologischen und gesundheitsbezogenen Bedeutung von Teigwaren, basierend auf ihren Gehalten an Carotinoiden und Vitamin E. Hierfür sind Kenntnisse über die exakten Gehalte dieser lipophilen Inhaltsstoffe genauso notwendig wie über ihre Beeinflussung während der Teigwarenherstellung und über ihre Bioverfügbarkeit. Ziele waren demzufolge die Aufklärung der genauen Zusammensetzung des Gelbpigmentgehaltes sowie die Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E, um eine vollständige Extraktion und damit quantitative Analyse beider Substanzklassen aus unterschiedlichen Matrices zu gewährleisten. Weiterhin sollte der Einfluss diverser Prozessparameter der Teigwarenherstellung auf Carotinoide und Vitamin E anhand von zwei verschiedenen industriellen Produktionslinien bewertet werden. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Teigwaren anhand ihrer Freisetzung aus der Lebensmittelmatrix während einer simulierten Verdauung in Magen und Dünndarm und ihrem Transfer in gemischte Mizellen als Voraussetzung für die Resorption dieser lipophilen Verbindungen.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Weizen

2.1.1 Die Gattung *Triticum*

Als Weizen werden eine Reihe von Süßgräsern der Gattung *Triticum* zusammengefasst. Die Vorfahren unserer heutigen Weizenarten stammen aus der Region des „Fruchtbaren Halbmondes“, dem Norden der arabischen Halbinsel. Um 8.500 v. Chr. begann dort die Domestikation von Einkorn (*T. monococcum*) und Emmer (*T. dicoccum*) (AUFHAMMER 2003a). Aus dem Einkorn, der ursprünglichsten Form des kultivierten Weizens, entwickelte sich der Emmer (Abb. 1). Dieser zählte schon 5.000 v. Chr. zu den wichtigsten Getreidearten (KLING *et al.* 2006). Aus ihm entstand durch Züchtung der heute überwiegend für die Teigwarenproduktion eingesetzte Hartweizen (*T. durum*). Die Bedeutung des Emmers nahm im Mittelalter zugunsten des Dinkels (*T. spelta*) ab. Mit Beginn des 20. Jahrhunderts wurde dieser vom leistungsfähigeren Saatweizen (*T. aestivum*) verdrängt (AUFHAMMER 2003a).

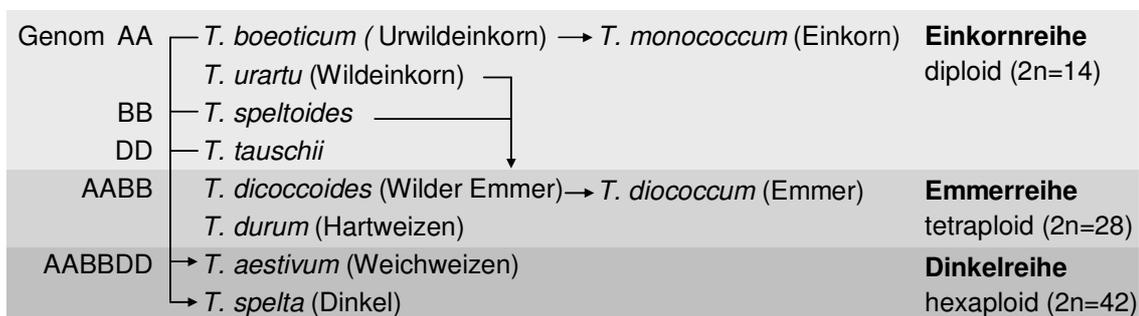


Abb. 1: Systematik der Gattung *Triticum*

Die heutigen Anbauflächen der alten Weizenarten sind verhältnismäßig gering. Die Ursachen sind in ihrer fehlenden Standfestigkeit, bedingt durch ihre Langwüchsigkeit, der Krankheitsanfälligkeit und dem damit verbundenen geringen Kornertrag zu sehen (AUFHAMMER 2003a). Das Korngut der alten Weizenarten zeichnet sich jedoch durch höhere Vitamin- und Mineralstoffkonzentrationen aus (AUFHAMMER 2003c). Einkorn und Emmer erlangten mittlerweile wieder größeres Interesse für den ökologischen Landbau. Einkorn verfügt über den höchsten Gelbpigmentgehalt aller Weizenarten (KLING *et al.* 2006) und wird daher zunehmend für die Herstellung von Gebäck und Teigwaren geschätzt (AUFHAMMER 2003c, SERPEN *et al.* 2008).

Für die Art *Triticum aestivum* existieren im deutschen Sprachgebrauch mehrere Synonyme, u. a. Saatweizen und Brotweizen. In der vorliegenden Arbeit wird diese Art im Folgenden

durchgängig als „Weichweizen“ bezeichnet. Weichweizen tritt in verschiedenen Varianten auf. Der herkömmliche „Brotweizen“ wird auch als Weißmehl-Weizen bezeichnet. Für besondere Verwendungszwecke existieren Züchtungen des Weichweizens mit speziellem Farbpotential wie z. B. der Gelbmehl-Weizen, kurz Gelbweizen genannt. Dieser zeichnet sich durch einen 4-6-fachen Gelbpigmentgehalt im Vergleich zum Weißmehl-Weizen aus (JAHN-DEESBACH und SCHIPPER 2009). Eine weitere Variante ist der Purpurweizen. Hohe Anthocyanengehalte in den äußeren Kornschichten verleihen ihm seine charakteristische violette Färbung (Abb. 2).



Abb. 2: Phänotypischer Vergleich der analysierten Weizenarten

2.1.2 Das Weizenkorn – Struktur und Inhaltsstoffe

Das Weizenkorn besteht aus zusammen gewachsener Frucht- und Samenschale sowie dem Keimling (Embryo). Den Hauptteil nimmt jedoch das Nährgewebe (Endosperm) aus Aleuronschicht und Mehlkörper ein. Der Mehlkörper setzt sich aus dünnwandigen Zellen zusammen. Diese enthalten Proteine als Grundsubstanz und Stärkekörner als Füllmasse (AUFHAMMER 2003c).

Die Körner des Durum- bzw. Hartweizens sind in der Regel sehr hart und glasig. Beide Eigenschaften treten häufig gemeinsam auf, stehen dennoch in keinem direkten Zusammenhang zueinander. Luft einschlüsse zwischen den Stärkekörnern sind charakteristisch für das Endosperm des Weichweizens. Fehlen derartige „Lücken“ erscheint das Weizenkorn glasig (ANJUM und WALKER 1991). Der Mehlkörper der alten Weizenarten ist, verglichen mit dem des Weichweizens, häufiger teil- oder vollglasig (AUFHAMMER 2003c). Die Kornhärte wird bedingt durch die Kontinuität der Proteinmatrix und durch Bindungen zwischen Proteinen und Stärke (ANJUM und WALKER 1991). Das Endosperm des Hartweizens besitzt die härteste Textur unter den Weizenarten (LIU *et al.* 1996). Er ist gekennzeichnet durch ein kompaktes,

dichtes Endosperm, in dem die Stärkepartikel durch das Protoplasma eng miteinander verbunden sind. Das Endosperm von Weichweizen hingegen ist aufgrund seiner diskontinuierlichen Proteinmatrix mehlig und besitzt zahlreiche Poren (D'EGIDIO 2001). Die Stärkekörner sind nur locker mit Protoplastresten verbunden (AUFHAMMER 2003c). Stärkekörner des Hartweizens besitzen gegenüber dem Weichweizen größere Mengen anhaftender Proteine (ANJUM und WALKER 1991). Die Betrachtung der Kornstruktur auf genetischer Basis begann in den 80er Jahren. GREENWELL und SCHOFIELD (1986) entdeckten ein 15 kDa-Protein, welches sie in den Zusammenhang mit dem Härtegrad von Weizenkörnern brachten. Das als Friabilin bezeichnete Protein war in weichen Körnern in höheren und in härteren Körnern in geringen Konzentrationen zu finden. In den sehr harten Körnern des Durum-Weizens fehlte dieses Protein völlig. Friabilin bewirkt als „Antihaf-Protein“ eine schwächere Bindung zwischen den Stärkekörnern und der Proteinmatrix (DARLINGTON *et al.* 2000). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass Friabilin ein Gemisch aus mehreren Polypeptiden, hauptsächlich aus Puroindolin a (PINa) und Puroindolin b (PINb), darstellt. Die entsprechenden Gene für die Puroindoline sind auf Chromosom 5D lokalisiert. PIN-Gene existieren im Genom von diploiden (TRANQUILLI *et al.* 1999) und hexaploiden Weizenarten, nicht jedoch bei tetraploidem Weizen (GAUTIER *et al.* 2000). Diese Gene wurden während der Evolution von Hartweizen von den Chromosomen 5A und 5B entfernt (BHAVE und MORRIS 2008). Den Puroindolinen ähnliche Proteine wurden auch in Gerste, Roggen und Hafer nachgewiesen. Mais, Reis und Hirse besitzen hingegen keine PIN-ähnlichen Gene und zeichnen sich demzufolge durch eine sehr harte Textur aus (GAUTIER *et al.* 2000). Die unterschiedlich starken Interaktionen zwischen Proteinen und Stärke bei harten und weichen Körnern bedingen auch ein unterschiedliches Verhalten beim Mahlen (D'EGIDIO 2001). Aus harten Körnern entstehen größere Partikel, aus mehligem Körnern hingegen Fraktionen mit einem höheren Feinpartikelanteil. Daher ist Hartweizen für die Grießherstellung und Weichweizen eher für die Mehlherstellung geeignet. Neben der höheren Grießausbeute zeichnet sich Hartweizen, verglichen mit Weichweizen auch durch höhere Kleber- und Gelbpigmentgehalte aus (AUFHAMMER 2003d).

Die wasserfreie Kornmasse des Weichweizens (entspricht 86-87 %) besteht aus etwa 79 % Kohlenhydraten, 14 % Eiweiß, 2 % Fett, 3 % Rohfaser und 2 % Mineralstoffen (AUFHAMMER 2003c). Hartweizen besitzt höhere Gehalte an Fetten und Mineralstoffen als Weichweizen (ARMANINO *et al.* 2002). Die für den Menschen verdaulichen Inhaltsstoffe befinden sich vorwiegend im Endosperm, welches die gesamten Kohlenhydrate, etwa 72 % der Proteine, 50 % der Lipide, 32 % der Mineralstoffe, aber nur 8 % der Rohfaser enthält. Mehr als die Hälfte der Mineralstoffe (54 %) und sogar 88 % der Ballaststoffe sind in den Randschichten des Weizenkorns lokalisiert (TSCHEUSCHNER 1996). Die Aleuronschicht enthält stärkefreie Kohlenhydrate, Fette und Mineralstoffe (AUFHAMMER 2003c).

In der Klasse der **Kohlenhydrate** ist die Stärke das dominierende Polysaccharid. Sie macht etwa 65 % der Gesamt-Kohlenhydrate aus und besteht zu etwa 18-25 % aus Amylose und 75-82 % aus Amylopektin (AUFHAMMER 2003c). Stärke liegt in Form organisierter Körner in Pflanzenzellen vor. Im Weizen sind zwei Typen von Stärkekörnern zu finden: große, ovale (> 15,9 µm, A-Typ) und kleinere, kugelförmige Körner (5,3-15,9 µm, B-Typ) (ANJUM und WALKER 1991). Native Stärkekörner besitzen eine kristalline Ordnung aus Clustern und Helices des Amylopektins (TESTER und MORRISON 1990). Weitere Polysaccharide wie Zellulose, Hemizellulose und Pentosane sind Strukturelemente der Zellwände. Während Zellulose und Lignin vorwiegend in den Schalengewebe vorkommen, treten hochpolymere Kohlenhydrate wie Pentosane und Pektin in allen Kornschichten, auch im Mehlkörper auf (AUFHAMMER 2003c). Im ausgereiften Korn ist der Gehalt an Mono- und Disacchariden relativ gering (3 %). Sie sind überwiegend im Keimling und in den Randschichten lokalisiert (KLINGLER 1995a).

Das **Rohprotein** im Getreide lässt sich in verschiedene Fraktionen unterteilen. Albumine und Globuline sind Struktur- und Enzymeiweiße und befinden sich hauptsächlich im Keimling und in den Aleuronzellen. Prolamine und Gluteline sind Reserveproteine und demzufolge überwiegend im Endosperm eingelagert. Die Albumine und Globuline sind aufgrund höherer Gehalte an Lysin, Arginin, Leucin und Cystin als physiologisch wertvoller als die Reserveproteine einzustufen, welche sich vorwiegend aus Glutaminsäure und Prolin zusammensetzen (AUFHAMMER 2003c). Limitierende Aminosäuren im Weizenkorn sind Lysin, Cystin und Methionin (KLINGLER 1995a). Die Sonderstellung des Weizens unter den Getreidearten beruht auf den teigbildenden Eigenschaften der Reserveproteine. Die Weizen-Prolamine (= Gliadine) und Weizen-Gluteline (= Glutenine) bilden zusammen mit Wasser einen kohäsiven, viskoelastischen Eiweiß-Komplex, den man Kleber bzw. Gluten nennt. Dieser ist maßgeblich verantwortlich für die Backeigenschaften von Weichweizen. Hartweizen-Gluten ist weicher, klebriger und dehnbarer, aber weniger elastisch (BOYACIOGLU und D'APPOLONIA 1994). Ursache hierfür ist der disproportional hohe Gehalt an Gliadinen.

Weizenlipide sind im Keimling und in den Aleuronzellen konzentriert. Im Zytosol sind sie in speziellen Speicherorganellen, den Lipidkörpern, eingelagert (MURPHY 2001). Diese werden in der Literatur auch als Ölkörper, Oleosome oder Spherosome bezeichnet. Plastide können ebenso Lipidkörper, so genannte Plastoglobuli, enthalten. Diese speichern neben Triglyceriden und Sterolestern auch Carotinoide und andere fettlösliche Pigmente (MURPHY und VANCE 1999, MURPHY 2001). Lipidkörper bestehen aus einer Triglyceridmatrix, die von einer Monoschicht aus Phospholipiden umgeben ist (Abb. 3). Diese trägt charakteristische Proteine, die Oleosine, welche den Lipidkörper stabilisieren und somit eine Koaleszenz verhindern (TZEN und HUANG 1992). Im Mehlkörper ist der Fettanteil sehr gering. Fette, die im Stärkekomplex enthalten sind, werden als Stärkelipide, außerhalb gelagerte als Nichtstärke-

lipide bezeichnet. Nichtstärkelipide, vornehmlich Triglyceride, werden im Endosperm ebenfalls als Lipidkörper gespeichert (HARGIN und MORRISON 1980, GUNSTONE *et al.* 2007). Darüber hinaus zählen zu den Nichtstärkelipiden auch geringe Mengen an freien Fettsäuren, Monoacyllipiden, Sterolen, Tocopherolen und Carotinoiden (MORRISON 1981). Stärkelipide sind überwiegend Lysophospholipide, die im Komplex mit Amylose vorliegen. Bei den Oberflächenlipiden von Stärkekörnern handelt es sich vorrangig um freie Fettsäuren (ANJUM und WALKER 1991). In der Fettsäurezusammensetzung dominieren die ungesättigten Fettsäuren (> 70 %). Die Linolsäure hat einen Anteil von über 50 % am Gesamtfett. In der Gruppe der gesättigten Fettsäuren dominiert die Palmitinsäure ($\approx 20\%$) (AUFHAMMER 2003b).

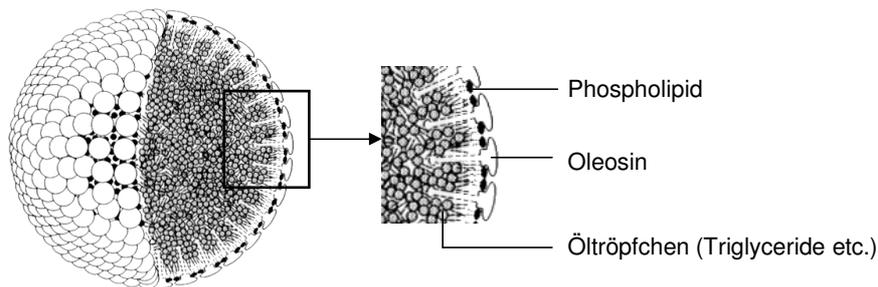


Abb. 3: Modell eines Lipidkörpers aus Mais (modifiziert nach TZEN und HUANG 1992)

Das Weizenkorn enthält neben den wasserlöslichen **Vitaminen** der B-Gruppe (Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Niacin, Pantothersäure) die fettlöslichen Vitamine E und K. Bezüglich des Vitamins E nehmen die Getreide eine Sonderstellung ein. Ihr Vitamin-E-Gehalt setzt sich überwiegend aus Tocotrienolen zusammen (QURESHI und QURESHI 1993, SHEPPARD *et al.* 1993). Die Vitamine C und D fehlen nahezu völlig. Vitamine liegen im Keimling und im Skutellum, dem Verbindungsorgan zwischen Keimling und Mehlkörper, konzentriert vor. Auch die Aleuronzellen sind reich an Vitaminen. In der Literatur sind Angaben zu Vitaminen teils unvollständig, teils sehr variabel (AUFHAMMER 2003b). Provitamin-A-wirksame Carotinoide wie β -Carotin und β -Cryptoxanthin sind in bedeutenden Mengen im Mais zu finden. Zur Anwesenheit von β -Carotin in Weizen unterscheiden sich die Literaturangaben. Bereits seit den 30er Jahren herrscht die Meinung, dass es sich bei den Carotinoiden im Hartweizen um Xanthophylle handelt (MARKLEY und BAILEY 1935, MUNSEY 1938, LEPAGE und SIMS 1968). Lutein wurde als vorherrschendes Pigment identifiziert. Andere Autoren fanden in verschiedenen Weizenarten, u. a. auch in Hartweizen, geringe Mengen an Carotinen (WILDFEUER und ACKER 1968, PANFILI *et al.* 2004, FRATIANNI *et al.* 2005, ABDEL-AAL *et al.* 2007). Dabei entfiel jedoch nur etwa 1 % des Carotinoidgehaltes auf β -Carotin. Weizen leistet demnach keinen nennenswerten Beitrag zur Vitamin-A-Versorgung. Lediglich beim Einkorn setzt sich der Gesamt-Carotinoidgehalt zu 25-33 % aus α - und β -Carotin zusammen (HIDALGO *et al.* 2006).

2.2 Teigwaren

2.2.1 Begriffsbestimmung, Verbrauch und Geschichte

Teigwaren sind in den Leitsätzen für Teigwaren von 1998 definiert als „beliebig geformte Erzeugnisse, die aus Getreidemahlerzeugnissen mit oder ohne Verwendung von Hühner-eiern und/oder anderen Zutaten durch Einteigen, Formen und Trocknen ohne Anwendung eines Gärungs- oder Backverfahrens hergestellt werden.“ Die Verwendung von Hartweizen (*Triticum durum* L.) hat sich in der Praxis durchgesetzt. Für die Herstellung von Eierteigwaren dürfen Vollei, Eigelb und Eiklar, auch in tiefgefrorener und getrockneter Form, eingesetzt werden. Der Zusatz von Salz, Milch, Gemüse, Kräutern, Pilzen, Gewürzen, Soja etc. ist erlaubt. Vom Verkehr ausgeschlossen sind gelb gefärbte und mit Ei-Ersatzmitteln hergestellte Teigwaren. Die Produkte dürfen einen Wassergehalt von höchstens 13 % und einen Salzgehalt von höchstens 1 % aufweisen. Im allgemeinen Sprachgebrauch werden Teigwaren als Nudeln oder Pasta bezeichnet, wobei der Begriff „Pasta“ meist nur für reine Hartweizenprodukte verwendet wird. 80-85 % der deutschen Teigwarenproduktion entfallen auf Eierteigwaren. In Italien werden hingegen überwiegend reine Hartweizen-Teigwaren hergestellt (MENGER 1964). Italien steht mit einem jährlichen Pro-Kopf-Verbrauch von knapp 30 kg auf Platz 1 beim Teigwarenkonsum. In Deutschland lag der Verzehr im Jahr 2008 bei 7,4 kg pro Person. Den Daten der ersten Nationalen Verzehrsstudie zufolge, verzehrten die Deutschen zwischen 1985 und 1988 durchschnittlich 7 g Teigwaren/Tag (ADOLF *et al.* 1995), was einem jährlichen Konsum von etwa 2,5 kg entspricht. Seit den 90er Jahren ist eine stetige Zunahme des Teigwarenverzehrs zu verzeichnen (Abb. 4).

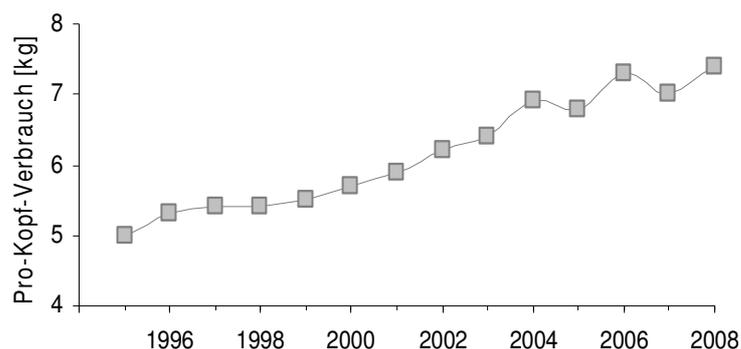


Abb. 4: Pro-Kopf-Verbrauch [kg] an Teigwaren in Deutschland (Quelle: Verband der Teigwarenhersteller und Hartweizenmühlen Deutschlands e. V.)

Während sich Italien gern als Ursprungsland der Pasta sieht, hat deren Entwicklung vermutlich in mehreren Regionen gleichzeitig stattgefunden (SCHMIDT 2007). Bei Ausgrabungen in China fanden Archäologen einen 4.000 Jahre alten Steinguttopf mit gut erhaltenen spaghetti-tähnlichen Nudeln. Diese waren im Gegensatz zu den heute handelsüblichen Teigwaren aus Hirse hergestellt (LU *et al.* 2005). Etwa genauso alt ist das erste überlieferte Rezept aus China zur Herstellung von Nudeln aus Weizenmehl, Wasser und Eiern. Auch im antiken Griechenland und im Römischen Reich kannte man Nudelgerichte. Grabreliefs der Etrusker aus dem 4. Jahrhundert v. Chr. zeigten Mehlsack, Nudelbrett, Teigzange, Nudelholz und Teigrädchen. Die Araber waren die Ersten, die die Teigwaren zur Haltbarmachung trockneten. Die Verbreitung der Teigwarenherstellung in Italien könnte auch mit der Besetzung Siziliens durch die Araber im 9. Jahrhundert n. Chr. begonnen haben. In Süddeutschland blickt man auf eine mehr als 400 Jahre alte Spätzle-Tradition zurück. Die Teigwaren wurden zunächst handgefertigt und im Freien getrocknet. Die älteste deutsche Nudelfabrik ist die 1793 gegründete Erfurter Teigwaren GmbH. In den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts kamen die ersten kontinuierlich arbeitenden Teigwarenpressen und etwa 10 Jahre später entsprechende Trockner auf den Markt.

2.2.2 Moderne Teigwarenherstellung und deren Einfluss auf die Inhaltsstoffe

Die industrielle Teigwarenproduktion besteht im wesentlichen aus drei Arbeitsschritten (KLINGLER 1995b, ERNST-DE GROE 2004):

- Dosierung und Mischen der Einzelkomponenten und Erzeugung eines Teiges
- Ausformung (Walz-, Koch- und Press-, bzw. Extrusionsverfahren)
- Trocknung (Vor-, Endtrocknung, Kühlung, Stabilisierung)

Beim **Mischen** der Zutaten sind eine gleichmäßige Feuchtigkeitsverteilung und eine ausreichende Quelldauer entscheidend (KLINGLER 1995b). Für die **Ausformung** der Teigwaren kommen in der Industrie überwiegend Pressverfahren zur Anwendung. Dazu werden Teigwarenextruder als kombinierte Misch-, Knet- und Formpressen eingesetzt. Das Mischgut wird mit Hilfe der Extruderschnecke transportiert, komprimiert, plastifiziert und geknetet. Unter Einsatz eines Vakuum-Systems kann dem Teig eingearbeitete Luft entzogen werden, wodurch Produkte mit höherer Dichte und Transparenz entstehen (ERNST-DE GROE 2004). Anschließend wird der Teig durch eine Matrize gedrückt und mittels rotierender Messer auf die gewünschte Länge geschnitten. Diese Vorgehensweise wird zur Herstellung von Kurzwaren (KW) wie Spiralen, Hörnchen oder Penne praktiziert. Langwaren (Spaghetti, Makaroni) werden zuerst hängend getrocknet und danach zugeschnitten. Bei der Herstellung von Walzware (Lasagne, Bandnudeln) wird die Teigmasse zu Platten gewalzt, die stufenweise dünner ausgerollt und dazwischen mehrmals zusammengelegt (laminiert) werden. Anschlie-

Bend werden die Teigbänder den Schneidewalzen zugeführt. Spätzle entstehen im Kochverfahren. Der feuchte Teig tropft oder wird durch Lochbleche ins Kochwasser gedrückt. Nach dem Blanchieren werden sie auf die richtige Länge geschnitten.

Die **Trocknung** dient der Haltbarmachung der Teigwaren durch die Absenkung des Wassergehaltes und der Wasseraktivität. Wichtig ist ein gleichmäßiger Wasserentzug, der stufenweise in unterschiedlich klimatisierten Zonen unter definierten Luftfeuchte- und Temperaturbedingungen erreicht wird. Die Trocknungszonen werden in Vortrocknung, Endtrocknung, Kühlung und Stabilisation eingeteilt. Kurzwaren werden meist direkt nach der Ausformung und dem Zuschnitt auf einem Schüttelvortrockner etwas angetrocknet, damit sie nicht zusammen kleben. Während der Vortrocknung wird die Teigware dann bei hoher Luftfeuchtigkeit erwärmt, was eine starke Reduzierung des Wassergehaltes um etwa 50 % bewirkt und eine Oberflächenverkrustung verhindert. Bei der Haupt- bzw. Endtrocknung wird die Luftfeuchte langsam abgesenkt. Anschließend werden die Teigwaren auf Raumtemperatur herunter gekühlt und dem Raumklima noch einige Zeit ausgesetzt. Dadurch werden Restspannungen ausgeglichen und die Produkte stabilisiert. Das Ergebnis sind glasig-harte Teigwaren mit einer Restfeuchte von höchstens 13 %. Für Kurzwaren sind Schüttel-, Band- und Trommeltrockner im Einsatz. Die konventionelle Trocknung (LT, *low temperature*) erfolgt bei etwa 50 °C über 14-20 Stunden (KLINGLER 1995b). Ein entscheidender Wandel in der Teigwarenerstellung vollzog sich in den 70er Jahren mit der Einführung neuer Trocknungstechnologien (Tab. 1). Die Hochtemperatur-Trocknung (HT, *high temperature*) verbesserte sowohl die hygienischen Bedingungen als auch die Kocheigenschaften der Teigwaren. Durch die spätere Anwendung der Ultra-Hochtemperatur-Trocknung (UHT, *ultra high temperature*), auch VHT-Trocknung (*very high temperature*) genannt, wurde eine weitere Verkürzung der Trocknungszeiten auf 2-3 Stunden für Kurzwaren erreicht (ACQUISTUCCI 2000, DEXTER und MARCHYLO 2001).

Tab. 1: Unterscheidung von HT- und VHT-Trocknung anhand von publizierten Trocknungstemperaturen

Quelle	HT	VHT / UHT
ACQUISTUCCI 2000	≈ 75 °C	75-100 °C und darüber
DEXTER und MARCHYLO 2001	60-85 °C	85-110 °C
DONNELLY und PONTE JR. 2000	55-75 °C	75-100 °C
ERNST-DE GROE 2004	70-80 °C	80-100 °C
FANG und KHAN 1996	73 °C	90 °C
KLINGLER 1995b	≈ 75 °C	100 °C und darüber
KURZHALS 2003	70-85 °C	100-130 °C

Während der Teigbildung finden vorwiegend Interaktionen des Wassers mit Proteinen statt. Für eine effektive Quellung der Stärke sind die während des Mischvorgangs herrschenden Temperaturen zu gering (D'EGIDIO 2001). Ein Glutengerüst entsteht unter Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Polypeptiden und von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Glutamin-Seitenketten (D'EGIDIO 2001). Im Gegensatz zum Brotteig wird im Pastateig aufgrund der relativ geringen Feuchtigkeit kein komplettes Glutennetzwerk ausgebildet (MATSUO *et al.* 1978, CUNIN *et al.* 1995). Extrudierte Teigwaren besitzen eine kompakte Struktur, in der die Stärkekörner tief in eine Proteinmatrix eingebettet sind (MATSUO *et al.* 1978). Mit Hilfe der Polymatik[®]-Presstechnologie können Pigmentverluste reduziert werden (DEXTER und MARCHYLO 2001). Der Sauerstoffabschluss verringert Oxidationsreaktionen. Neben dem Pigmentgehalt spielen aber auch strukturelle Eigenschaften der Teigware eine Rolle für die Farbausprägung. Mit einem höheren Pressdruck und der Vakuumbehandlung gewinnt man glatte, glänzende Produkte durch die Verringerung von Lufteinschlüssen. Eine raue Oberfläche ergibt eine unerwünschte helle Farbe. Das kann jedoch mit der Verwendung von Teflon-Matrizen verhindert werden (MENGER 1964).

Bei der LT-Trocknung (55 °C) wird ein loses und schwach strukturiertes Proteinnetzwerk gebildet. Hohe Trocknungstemperaturen hingegen verursachen gravierende strukturelle Veränderungen der Proteinpolymere, welche in ihrer Größe und Stärke zunehmen. Dabei entsteht ein festeres, strukturierteres Proteinnetzwerk (FARDET *et al.* 1999). Das Resultat ist ein reduziertes Wasserbindungsvermögen der eingelagerten Stärkekörner, welches die Klebrigkeit von Nudeln verringert, deren Festigkeit erhöht (LAMACCHIA *et al.* 2007) und das Auslaugen während des Kochens reduziert (D'EGIDIO 2001). Geringere Kochverluste sind ebenso in der verringerten Proteinlöslichkeit durch die stärkere Proteindenaturierung begründet (AKTAN und KHAN 1992, FARDET *et al.* 1999). Eine Reduzierung der Kochverluste wurde bereits ab Trocknungstemperaturen von 70 °C erreicht (AKTAN und KHAN 1992). Durch die Anwendung von HT- und VHT-Trocknungsmethoden kann auch ein besserer Farberhalt während der Teigwarenherstellung erreicht werden (DEXTER *et al.* 1981, AKTAN und KHAN 1992).

2.2.3 Qualitätskriterien für Teigwaren

Die Kochqualität wird bestimmt durch das Kochgewicht als Maß für die Wasserabsorption, durch Kochverluste sowie die Konsistenz und die Festigkeit der Teigwaren (DONNELLY und PONTE JR. 2000). Die Kochqualität wird sowohl durch den Gehalt als auch die Qualität der Proteine bestimmt (DONNELLY und PONTE JR. 2000), wobei der Klebermenge der größere Einfluss als der Kleberqualität zugesprochen wird (KLINGLER 1995b). Neuere Untersuchungen ergaben jedoch auch einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss der Stärke auf die Kochqualität von Teigwaren (DELCOUR *et al.* 2000). Diese ist abhängig von der Wasserauf-

nahmekapazität und der Gelkonsistenz der Stärke sowie ihrer Fähigkeit, das Glutennetzwerk zu brechen.

Abgesehen von den untersuchten Inhaltsstoffen ist die bereits erwähnte Farbe ein entscheidendes Qualitätskriterium für Teigwaren. Die Farbe wird hauptsächlich vom Pigmentgehalt des verwendeten Grießes, von den Prozessbedingungen während der Teigwarenherstellung und der Aktivität verschiedener Enzyme bestimmt (TRONO *et al.* 1999). Die Gelbpigmente, in der Regel photometrisch als Summenparameter erfasst, sind nach derzeitigem wissenschaftlichem Kenntnissstand der Klasse der Carotinoide zuzuordnen. Aufgrund der Diskrepanz zwischen photometrisch bestimmtem Gelbpigmentgehalt und flüssigchromatographisch ermitteltem Carotinoidgehalt wurde jedoch die Beteiligung weiterer Substanzen am Pigmentgehalt von Hartweizen und Teigwaren vermutet (HENTSCHEL *et al.* 2000 und 2002, LEENHARDT *et al.* 2006a, ABDEL-AAL *et al.* 2007). Zwischen 30 % und 50 % des Gelbpigmentgehaltes entfielen auf Carotinoide in Form von Lutein und Spuren von Zeaxanthin (HENTSCHEL *et al.* 2002). Auch Flavonoide können zur Farbe von eifreien Teigwaren beitragen (MENGER 1964). Daneben wird die Farbe von Teigwaren mitunter auch durch produktionsbedingte, unerwünschte Verbindungen beeinflusst. Eine braune Teigwarenfarbe steht im Zusammenhang mit der Aktivität von Peroxidase (PO) und/oder Polyphenoloxidase (PPO), dem Asche- sowie dem Proteingehalt (TAHA und SAGI 1987, BORRELLI *et al.* 1999, FEILLET *et al.* 2000). Die Beteiligung von PO und PPO an der Braunfärbung von Teigwaren wurde in verschiedenen Studien widersprüchlich belegt. Braune bis rötliche Färbungen können auch durch Maillard-Produkte verursacht werden (ACQUISTUCCI 2000, FEILLET *et al.* 2000). Diese treten vor allem bei hohen Trocknungstemperaturen (> 60 °C) auf (DEXTER und MARCHYLO 2001). Neben der Beeinflussung der Teigwarenfarbe kann die Maillard-Reaktion auch mit einer Abnahme der essentiellen Aminosäure Lysin einhergehen (KLINGLER 1995b).

2.3 Carotinoide

2.3.1 Struktur und Vorkommen

Die Carotinoide sind eine heterogene Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe mit mehr als 700 Vertretern (BRITTON *et al.* 2004). Als Tetraterpene sind sie aus 8 Isopreneinheiten aufgebaut. Ihre Synthese erfolgt über die Verbindung zweier Moleküle Geranylgeranyldiphosphat (BRITTON 1995a). Die Absorption von Licht spezifischer Wellenlängen verleiht den Carotinoiden charakteristische Farben (gelb, orange, rot). Sie lassen sich unterteilen in Carotine und Xanthophylle. Carotine sind reine Kohlenwasserstoffe. Als bedeutende Vertreter sind α - und β -Carotin sowie Lycopin zu nennen. Die Xanthophylle sind sauerstoffhaltige Carotinoide, die polare Substituenten wie z. B. Hydroxyl-, Epoxy-, Aldehyd- oder Ketogruppen enthalten

(ZARIPHEH und ERDMAN 2002). Zu den Xanthophyllen zählen beispielsweise Lutein, Zeaxanthin, Canthaxanthin und β -Cryptoxanthin. Die strukturellen Unterschiede von Carotinen und Xanthophyllen bedingen ihre unterschiedliche Polarität und Fettlöslichkeit (Lipophilie).

Nur etwa 50 der bekannten Carotinoide sind in der menschlichen Nahrung zu finden. Carotinoide werden hauptsächlich über Obst und Gemüse konsumiert. Aber auch einige tierische Lebensmittel (Krustentiere, Lachs, Eier) enthalten Carotinoide, die von den Tieren ebenfalls über die Nahrung aufgenommen wurden. Zur Carotinoidsynthese sind ausschließlich höhere Pflanzen, Algen, Bakterien und Pilze befähigt. Anhand der Daten der ersten Nationalen Verzehrsstudie (1985-1988) wurde eine mittlere Gesamt-Carotinoidzufuhr von 5,3 mg/Tag ermittelt. Die mittlere Luteinaufnahme lag bei 1,9 mg/Tag. Zeaxanthin blieb aufgrund mangelnder Mengenangaben in Lebensmitteln in der Gesamtauswertung unberücksichtigt (PELZ *et al.* 1998). Auch neuere Daten ergaben eine tägliche Zufuhr an Carotinoiden von 5-6 mg/Tag (DGE 2004). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) geht momentan sogar von einer noch höheren Zufuhr aus (DGE 2008). Lutein hatte in zahlreichen Interventionsstudien in Konzentrationen von 20-40 mg/Tag über mehrere Monate keine negativen Auswirkungen (ALVES-RODRIGUES und SHAO 2004). Als einziger Nebeneffekt ist eine unschädliche, reversible Hyperpigmentierung der Haut beschrieben worden, die als Carotinodermie bezeichnet wird.

Grüne Blattgemüse wie Spinat, Grünkohl und Salat sind die Hauptlieferanten für Lutein. Zeaxanthin wird überwiegend mit Mais und oranger Paprika aufgenommen (SCHIEBER und CARLE 2008). Auch Eier und Kartoffeln sind gute Lieferanten für Lutein und Zeaxanthin (PELZ *et al.* 1998). In einigen Lebensmitteln wurden, vor allem in Abhängigkeit von der Verarbeitung, neben den (*all-E*)-Isomeren auch verschiedene (*Z*)-Isomere von Lutein und Zeaxanthin detektiert (UPDIKE und SCHWARTZ 2003, AMAN *et al.* 2005a). Im Gegensatz zu Zeaxanthin ist Lutein kein zentralsymmetrisches Molekül. Daher existieren Paare geometrischer Isomere wie z. B. (*9Z*)- und (*9'Z*)-Lutein (Abb. 5). Diese und weitere Isomere konnten ebenfalls in Humanplasma (KRINSKY *et al.* 1990, KHACHIK *et al.* 1992a, 1999) und Muttermilch (KHACHIK *et al.* 1997b) sowie in der menschlichen Netzhaut und der Netzhaut verschiedener Tiere (KHACHIK *et al.* 1997a, DACHTLER *et al.* 1998, 2001) detektiert werden. Die zuletzt genannten Befunde resultieren aus der Anreicherung der beiden Xanthophylle im Auge (siehe Kapitel 2.3.2).

Carotinoide in ihrer Funktion als Antioxidantien die Menge an freien Radikalen, die Peroxidaseaktivität und die Lipidperoxidation. Damit wirken sie der Kornalterung entgegen und fördern die Keimung (HOWITT und POGSON 2006).

Die bekannteste Funktion der Carotinoide im menschlichen Organismus ist sicherlich die Wirkung als Vorstufe von Vitamin A. Voraussetzung für die Provitamin-A-Aktivität von Carotinoiden ist mindestens ein unsubstituierter β -Iononring am Ende der Polyenkette. Diese wird u. a. von α - und β -Carotin sowie von β -Cryptoxanthin erfüllt. Lutein und Zeaxanthin sind nicht Provitamin-A-wirksam. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit auf die Vitamin-A-Wirkung nicht näher eingegangen werden. Carotinoide sind außerdem bedeutsame Antioxidantien in Biomembranen. Weitere Wirkungen der Carotinoide, die zum Teil unabhängig von ihrer antioxidativen Aktivität sind, wurden in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Krankheitspräventive Wirkungen von Lutein und anderen Carotinoiden

Einflussnahme auf	vermutete Wirkungsmechanismen
Krebserkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduktion von oxidativen DNA-Schäden (antioxidative Wirkung)¹ ▪ Förderung der Zell-Zell-Kommunikation über <i>gap junctions</i>² ▪ Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Nuklearrezeptoren² ▪ Induktion von Phase-I- und Phase-II-Enzymen² ▪ Beeinflussung von Wachstumsfaktoren² ▪ Induktion der Zelldifferenzierung²
Kardiovaskuläre Erkrankungen, Arteriosklerose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemmung der LDL-Oxidation³ ▪ Verhinderung inflammatorischer Prozesse durch Inhibierung der Monocytenmigration³
Neurologische Erkrankungen (Alzheimer-Krankheit)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduktion von oxidativen DNA-Schäden⁴
Diabetes mellitus	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduktion von ROS, die aus der Hyperglykämie resultieren⁵
Immunsystem	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Erhöhung der Aktivität natürlicher Killerzellen⁶ ▪ Steigerung der Sekretion von Tumornekrosefaktor-α⁶
lichtinduzierte Hautschäden	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Absorption von energiereichem Licht⁷
Augenerkrankungen (AMD)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Absorption von energiereichem Licht⁸ ▪ Inaktivierung von freien Radikalen und ROS⁸

¹ POOL-ZOBEL *et al.* 1997

² SHARONI *et al.* 2004

³ DWYER *et al.* 2001

⁴ CALVO 2005

⁵ COYNE *et al.* 2005

⁶ WATZL und BUB 2001

⁷ SIES und STAHL 2003

⁸ SCHALCH *et al.* 2007

Auf die spezielle Wirkung von Lutein und Zeaxanthin soll aufgrund der spezifischen Gewebeverteilung etwas näher eingegangen werden. Die selektive Anreicherung dieser Xanthophylle im menschlichen Auge steht in direktem Zusammenhang mit dem Schutz vor häufig auftretenden Augenerkrankungen wie altersbezogener Makuladegeneration (AMD), Katarakt und Retinitis pigmentosa (FULLMER und SHAO 2001). AMD ist die Hauptursache für eine Erblindung im Alter (> 65 Jahre). Lutein und Zeaxanthin sind zusammen mit *meso*-Zeaxanthin die einzigen Pigmente im gelben Fleck (Macula lutea) in der Mitte der Netzhaut (Retina). Die hohe Dichte an Photorezeptoren in diesem Bereich machen die Makula zum

Ort des schärfsten Sehens. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sauerstoff und Licht können schädigende Radikale und Singulett-Sauerstoff entstehen, die in der Lage sind, mehrfach ungesättigte Fettsäuren in den Photorezeptoren zu zerstören. Diese degenerativen Prozesse spielen bei der AMD eine Rolle und wirken sich drastisch auf die Sehschärfe aus. Da aktuell keine wirksamen Therapiemethoden existieren, wird der Prävention dieser Erkrankung eine besondere Bedeutung beigemessen. Die Carotinoide der Makula besitzen die Fähigkeit, blaues Licht (400-475 nm) zu absorbieren bevor es schädliche photochemische Reaktionen in den Photorezeptoren auslösen kann. Ihre antioxidative Aktivität *in vitro* wurde mehrfach nachgewiesen (CHOPRA und THURNHAM 1993, MILLER *et al.* 1996, BÖHM *et al.* 2002). Daher können Lutein und Zeaxanthin vermutlich auch durch ihre Fähigkeit, freie Radikale und ROS unschädlich zu machen, eine Schutzwirkung für die Netzhaut ausüben (SCHALCH 1999). Diese Hypothese wird durch die Detektion von Oxidationsprodukten beider Carotinoide in der Retina gestützt (KHACHIK *et al.* 1997a). Epidemiologische Studien ergaben eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme von Lutein und Zeaxanthin und dem AMD-Erkrankungsrisiko (SEDDON *et al.* 1994, SIES und STAHL 2003). Eine positive Beziehung bestand dabei sowohl zwischen der Lutein- und Zeaxanthinaufnahme und den Serumkonzentrationen der Xanthophylle (WANG *et al.* 2007) als auch zwischen der Zufuhr und der optischen Dichte des Makulapigments (MPOD) (SCHALCH *et al.* 2007, TRIESCHMANN *et al.* 2007) bzw. den Serumkonzentrationen und der MPOD (LANDRUM *et al.* 1999, BONE *et al.* 2000). In anderen Fall-Kontroll-Studien wurde kein Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen und dem AMD-Risiko gefunden (COOPER *et al.* 1999). Zu bedenken sei auch, dass für Lutein, wie auch für andere Carotinoide, so genannte „Nonresponder“ existierten, bei denen eine Zufuhr über die Nahrung nicht mit einer Erhöhung der Serumspiegel einherging. Darüber hinaus wurden auch „retinale Nonresponder“ gefunden, bei denen zwar die Serumspiegel im Zuge einer Luteinzufuhr anstiegen, nicht jedoch die Makulapigmentdichte (HAMMOND *et al.* 1997).

2.4 Vitamin E

2.4.1 Struktur und Vorkommen

Als Vitamin E werden 8 Verbindungen zusammengefasst, die aus einem Chromanring und einer Phytol-Seitenkette bestehen. Bei den Tocopherolen ist diese isoprenoide Seitenkette gesättigt, bei den Tocotrienolen hingegen ungesättigt. Je nach Anzahl und Position der Methylgruppen am Chromanring unterscheidet man α -, β -, γ - und δ -Isomere (Abb. 6). Tocopherole und Tocotrienole werden zusammen auch als Tocochromanole bezeichnet. Natürliche Tocochromanole liegen in der RRR-Konformation vor und werden ausschließlich von höheren Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert. Der aromatische Ring wird vom Tyro-

sinzweig der Shikimisäuresynthese und die isoprenoide Seitenkette auf dem Weg der Terpensynthese gebildet (DÖRMANN 2007).

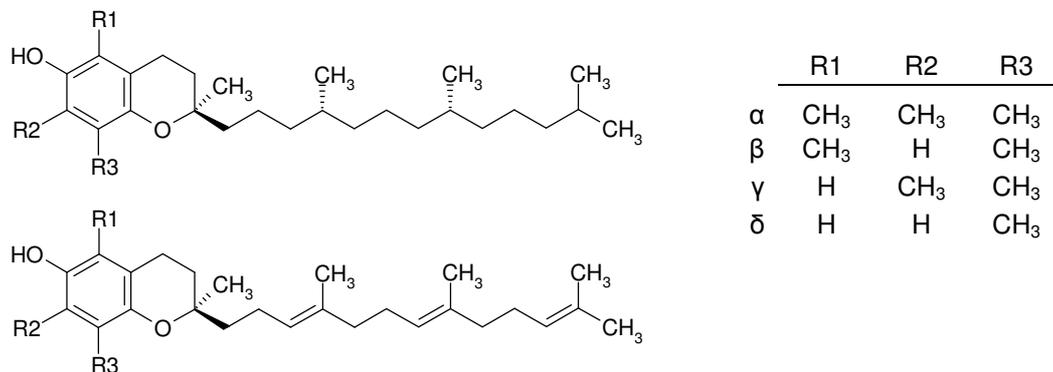


Abb. 6: Struktur von Tocopherolen (oben) und Tocotrienolen (unten)

Aufgrund ihrer ausgeprägten Lipophilie werden diese Verbindungen dem menschlichen Organismus hauptsächlich mit pflanzlichen Ölen und Nüssen zugeführt. Aber auch alkoholfreie (angereicherte) Getränke und Gerichte auf Gemüsebasis leisten einen nennenswerten Beitrag zur Vitamin-E-Zufuhr (MAX RUBNER-INSTITUT 2008). Die Vitamin-E-Gehalte in tierischen Lebensmitteln resultieren aus der Fütterung der Tiere. Die Tocochromanol-Fraktion in Pflanzenölen besteht entweder überwiegend aus α -Tocopherol (Sonnenblumenöl, Distelöl) oder aus γ -Tocopherol (Leinöl). Rapsöl weist ähnliche Gehalte der beiden Tocopherole auf (FRANKE 2008). Der Vitamin-E-Gehalt des Weizens setzt sich hingegen aus 36 % Tocopherolen und 64 % Tocotrienolen zusammen (QURESHI und QURESHI 1993). Im Humanplasma und in Geweben ist aufgrund der selektiven Bindung an Transportproteine hauptsächlich α -Tocopherol zu finden (siehe Kapitel 2.5.1). Damit besitzt es die höchste biologische Aktivität aller Tocochromanole (Tab. 3). Der Vitamin-E-Gehalt von Lebensmitteln wird als Summe der Gehalte von Tocopherolen und Tocotrienolen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Molmassen der einzelnen Verbindungen in μmol je 100 g Lebensmittel angegeben. In die Berechnung der Vitamin-E-Aktivität in mg α -Tocopherol-Äquivalente (α -TÄ) gehen die unterschiedlichen biologischen Wirksamkeiten der Tocochromanole ein.

Tab. 3: Bioaktivität einzelner Tocopherole und Tocotrienole (SHEPPARD *et al.* 1993, GAßMANN 1995a, BENDER 2003, MØLLER NIELSEN und HANSEN 2008)

Tocopherole	α -T-Äquivalente	Tocotrienole	α -T-Äquivalente
α -Tocopherol	1,00	α -Tocotrienol	0,30
β -Tocopherol	0,50	β -Tocotrienol	0,05
γ -Tocopherol	0,10	γ -Tocotrienol	0,01
δ -Tocopherol	0,03	δ -Tocotrienol	- *

* Der Beitrag von δ -Tocotrienol zur Vitamin-E-Aktivität gilt als vernachlässigbar.

Die wünschenswerte Zufuhr liegt laut DACH-Referenzwerten in Abhängigkeit des Geschlechts zwischen 12 und 15 mg α -TÄ pro Tag (DGE 2000). Dem gegenüber steht eine mittlere Aufnahme (Median) von 13,7 mg/Tag bei Männern und 12,0 mg/Tag bei Frauen. Immerhin knapp die Hälfte der deutschen Bevölkerung erreicht die empfohlene Zufuhr für Vitamin E nicht (MAX RUBNER-INSTITUT 2008). Bereits 1922 entdeckten EVANS und BISHOP, dass Vitamin E essentiell für die Fruchtbarkeit weiblicher Ratten ist (EVANS und BISHOP 1922). Hierauf beruht auch die Bestimmung der biologischen Aktivität der einzelnen Vitamere im Gestations-Resorptionstest an Vitamin-E-depletierten Ratten. In Tierstudien resultierten aus einem Mangel an Vitamin E neben den erwähnten Reproduktionsstörungen auch nekrotisierende Myopathien, Leber- und Nierenschäden sowie neurologische Funktionsstörungen. Für den Menschen ist ein Mangel an Vitamin E aufgrund relativ großer Gewebespeicher wenig relevant. Risikogruppen sind jedoch Personen mit gestörter Fettresorption, Mukoviszidose und cholestatischen Lebererkrankungen (BENDER 2003). Vitamin E ist im Vergleich zu anderen fettlöslichen Vitaminen relativ untoxisch. Bisher wurde eine chronische tägliche Zufuhr von 200-600 mg als unkritisch betrachtet (BENDER 2003). Eine Meta-Analyse von 19 klinischen Studien ergab jedoch eine erhöhte Sterblichkeit bei Supplementierung mit täglichen Vitamin-E-Dosen \geq 400 IU, was etwa 267 mg/Tag entspricht (MILLER *et al.* 2005).

2.4.2 Funktionen

Die am längsten bekannte und intensiv erforschte Funktion von Vitamin E ist dessen antioxidative Wirkung. Vitamin E dient der Unterbrechung von Kettenreaktionen, wie sie beispielsweise bei der Lipidperoxidation stattfinden. Es reagiert dabei mit den Lipidperoxyradikalen, bevor diese an weiteren Fettsäuren Wasserstoff abstrahieren können. Die gebildeten Tocopheroxyl- und Tocotrienoxylradikale können mit weiteren Peroxylradikalen Addukte bilden, mit Vitamin-E-Radikalen zu Dimeren reagieren oder von anderen enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien regeneriert werden (Abb. 7). Auch Selen hat eine Bedeutung im Recyclingprozess von Vitamin E. Die Oxidation von Glutathion wird von der Glutathionperoxidase, einem Selenoenzym, katalysiert (BENDER 2003). Von besonderer Relevanz für die vorliegende Arbeit sind die Wechselwirkungen mit Carotinoiden. Die Kombination von γ -Tocopherol und Lutein inhibierte die Autoxidation von Triglyceriden effizienter als das Tocopherol allein (HAILA *et al.* 1996). Neben Radikalfänger-Eigenschaften besitzt Vitamin E auch die Fähigkeit, Singulett-Sauerstoff zu inaktivieren.

Die antioxidative Kapazität der Tocopherole *in vivo* sinkt im Allgemeinen in der Reihenfolge $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ (KAMAL-ELDIN und APPELQVIST 1996, BALL 2006). In *in-vitro*-Testsystemen wurden häufig recht unterschiedliche Rangordnungen beobachtet, da die Aktivität der einzelnen Vitamere von den jeweiligen Testbedingungen beeinflusst wird. MÜLLER *et al.* (2010) unter-

suchten die antioxidative Aktivität aller 8 Tocochromanole in 5 verschiedenen *in-vitro*-Testsystemen und erhielten dabei keine übereinstimmenden Ergebnisse. Die Autoren ermittelten die Phenolgruppe als Schlüssel für die Wirksamkeit. Die isoprenoide Seitenkette hatte größtenteils keinen Einfluss auf die antioxidative Aktivität. Lediglich im *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)-Test zeigte α -Tocotrienol eine höhere Wirksamkeit gegenüber Peroxylradikalen als α -Tocopherol. Auch andere Autoren nahmen eine höhere antioxidative Aktivität der Tocotrienole gegenüber den Tocopherolen an (KAMAL-ELDIN und APPELQVIST 1996, QURESHI *et al.* 2000). Letztendlich kann, auch aufgrund der bereits erwähnten Selektierung von α -Tocopherol im menschlichen Organismus, nicht automatisch von der antioxidativen Aktivität einzelner Tocochromanole *in vitro* auf ihre Wirkungen *in vivo* geschlossen werden.

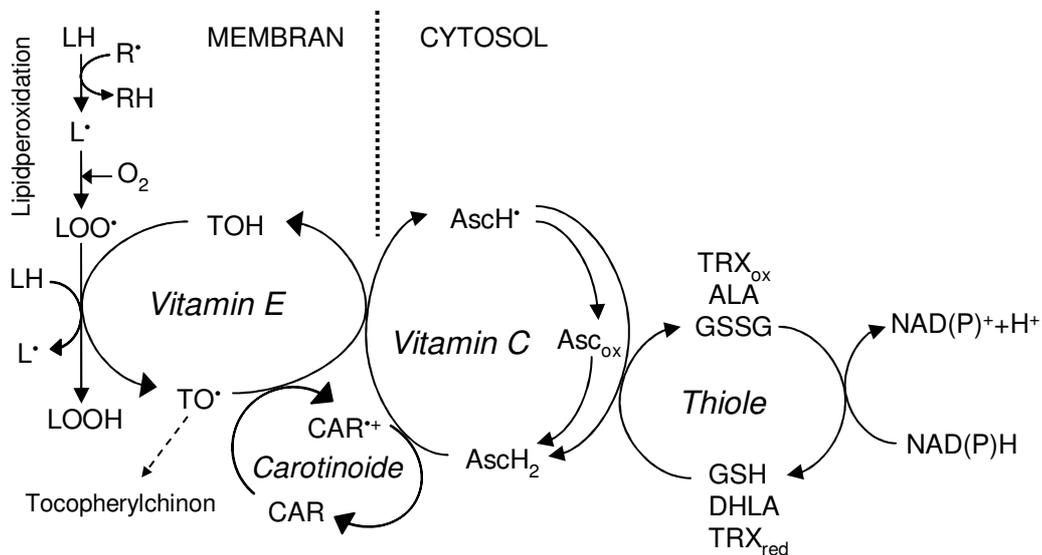


Abb. 7: Interaktionen von Vitamin E mit weiteren lipophilen und hydrophilen Antioxidantien (modifiziert nach PACKER *et al.* 2001)

LH Fettsäure, R^\cdot Radikal, L^\cdot Lipidradikal, LOO^\cdot Lipidperoxyradikal, $LOOH$ Lipidhydroperoxyd, TOH Tocopherol/Tocotrienol, TO^\cdot Tocopheryloxylradikal/Tocotrienoxylradikal, CAR Carotinoid, CAR^\cdot Carotinoidradikal, $AscH_2$ Ascorbinsäure, $AscH^\cdot$ Semidehydroascorbylradikal, Asc_{ox} Dehydroascorbinsäure, GSH Glutathion (reduzierte Form), $GSSG$ Glutathion-Disulfid (oxidierte Form), $DHLA$ Dihydroliponsäure, ALA α -Liponsäure, TRX Thioredoxin, $NADP$ Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

Die antioxidative Wirkung von Vitamin E ist sowohl für Pflanzen und Tiere als auch für den menschlichen Organismus von Bedeutung. Bei der Alterung von Weizen erhöht sich der Gehalt an freien ungesättigten Fettsäuren (DAHLE 1965), was vermehrt zu Oxidationsreaktionen führt. Bei der enzymatischen Lipidperoxidation findet eine Cooxidation von Carotinoiden statt, welche das Ausbleichen von Weizenmehlen und -grießen zur Folge hat. Tocopherole

können die oxidative Stabilität dieser Pigmente positiv beeinflussen (DAHLE 1965). In erster Linie dient Vitamin E im Getreide dem Schutz von gespeicherten Lipiden vor Oxidationen (FALK *et al.* 2004). Für den Menschen steht der Schutz von Membranen, Lipoproteinen und Geweben vor oxidativen Schädigungen für die Prävention von degenerativen Erkrankungen im Vordergrund (Tab. 4). Einige der protektiven Wirkungen der Tocopherole und Tocotrienole, z. B. die Beeinflussung der Signaltransduktion oder des Cholesterinstoffwechsels, sind jedoch unabhängig von der antioxidativen Aktivität von Vitamin E zu sehen.

Tab. 4: Krankheitspräventive Wirkungen von Vitamin E

Einflussnahme auf	vermutete Wirkungsmechanismen
Tocopherole (v. a. α-Tocopherol)	
Krebserkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemmung der Lipidperoxidation (antioxidative Wirkung) ▪ Verminderung der Aktivität der Proteinkinase C¹ ▪ Induktion der Apoptose in Tumorzellen über die Aktivierung der Kaspase-3-Kaskade² ▪ Hemmung der Umwandlung von Nitrit zu Nitrosaminen³
Kardiovaskuläre Erkrankungen, Arteriosklerose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemmung der LDL-Oxidation (antioxidative Wirkung) ▪ Regulierung der Cholesterinsynthese ▪ Reduktion der Ausschüttung von Interleukinen^{2,4} ▪ Hemmung der Thrombozytenaggregation^{2,4} ▪ Hemmung der Monozyten-Adhäsion an Endothelzellen^{2,4} ▪ Reduzierung der Aktivität von Scavenger-LDL-Rezeptoren^{2,4}
Entzündungsreaktionen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ verminderte Cytokin-Freisetzung durch Hemmung von Cyclooxygenase und Lipoxygenase^{4,5}
Immunsystem	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduzierung der Eicosanoidsynthese⁶ ▪ Beeinflussung der Membranfluidität von Immunzellen⁶ ▪ Antioxidative Wirkungen⁶
Augenerkrankungen (Katarakt)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Verminderung oxidativer Schäden⁶
Tocotrienole	
Krebserkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inhibierung der Aktivierung der Src-Kinase¹ ▪ Induktion von Zellzyklusarrest (G1-Phase) und Apoptose¹
Neurologische Erkrankungen (Alzheimer-, Parkinson-, Huntington-Krankheit, Epilepsie)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemmung des Glutamat-induzierten Zelltods über die Reduzierung des oxidativen Stresses (antioxidative Wirkung) und über die Hemmung der Aktivierung der pp60 c-Src-Kinase¹
lichtinduzierte Hautschäden	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vorbeugung von oxidativem Stress durch UV-Strahlung¹
Kardiovaskuläre Erkrankungen, Arteriosklerose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hemmung der LDL-Oxidation (antioxidative Wirkung) ▪ Hemmung der Cholesterinsynthese
Cholesterinsynthese	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduzierung der Expression der HMG-CoA-Reduktase^{1,7}

¹ PACKER *et al.* 2001

² BRIGELIUS-FLOHE *et al.* 2002

³ NIKI 1996

⁴ BENDER 2003

⁵ PACKER 1993

⁶ TRABER und SIES 1996

⁷ HOOD 1998

2.5 Verdauung und Bioverfügbarkeit von lipophilen Verbindungen

2.5.1 Verdauung, Resorption und Transport von Carotinoiden und Vitamin E

Die Resorption von Carotinoiden und Vitamin E ist eng an die Fettverdauung gekoppelt (Abb. 8). Voraussetzung für die Resorption ist die Freisetzung aus der Lebensmittelmatrix. Eine mechanische Zerstörung von Zellwänden und Zellorganellen geschieht beim Kauvorgang im **Mund** bzw. schon vorher bei der Verarbeitung oder Zubereitung von Lebensmitteln, nicht jedoch bei der Verdauung (FAULKS und SOUTHON 2005).

Im **Magen** werden freigesetzte Carotinoide und Vitamin E in die Fettphase überführt. Diese wird durch die Motilität des Magens zerkleinert und mit Enzymen vermischt. Die Fettemulgierung ist von großer Bedeutung für die Verdauung, da sich hierdurch die angreifbare Oberfläche für die Lipasen drastisch erhöht. Die Fettverdauung beginnt bereits im Magen durch die Magenlipase. Diese ist für die Freisetzung kurz- und mittelkettiger Fettsäuren, die direkt aus dem Magen resorbiert werden, verantwortlich (FRIEDMAN und NYLUND 1980).

Die Fettemulsion wird ins **Duodenum** (Zwölffingerdarm) abgegeben und mit Pankreassaft und Galle versetzt. Beide Verdauungsflüssigkeiten sind essentiell für die Resorption lipophiler Verbindungen. Von entscheidender Bedeutung ist die Triglyceridhydrolyse durch die Pankreaslipase. Colipase fungiert als Coenzym. Tocopherol-, Xanthophyll- und Cholesterinester werden mit Hilfe der Carboxylesterlipase, auch Carboxylesterhydrolase oder Cholesterinesterase genannt, gespalten (CHITCHUMROONCHOKCHAI und FAILLA 2006). Phospholipase A₂ ist für die Hydrolyse von Phospholipiden bedeutsam und benötigt Trypsin zur Aktivierung und Calcium-Ionen als Cofaktor (FRIEDMAN und NYLUND 1980). Mit fortschreitender Hydrolyse werden die Fettpartikel immer kleiner. Die Lipolyseprodukte bilden unter Anwesenheit von Gallensäuren gemischte Mizellen, in die weitere lipophile Verbindungen wie Cholesterin und fettlösliche Vitamine eingeschlossen werden. Während Xanthophylle teilweise spontan aus der Fettemulsion in Mizellen übertreten können, ist für die unpolaren Carotine die Lipolyse mittels Pankreaslipase entscheidend (BOREL *et al.* 1996). Ursache hierfür scheint die unterschiedliche Lokalisation der Verbindungen in den Fetttropfchen zu sein. Im Lipidkern werden sehr unpolare Carotinoide wie β -Carotin oder Lycopin gelöst. Polarere Verbindungen wie Lutein und Zeaxanthin, aber auch Tocochromanole, orientieren sich mit ihren Hydroxylgruppen in Richtung Oberfläche (BOREL *et al.* 1996). Die gleiche Verteilung lipophiler Verbindungen findet sich auch in den gemischten Mizellen. Carotinoide und Vitamin E, die nicht in der Mizellenfraktion lokalisiert sind, werden mit den Fäzes ausgeschieden.

Mit Hilfe der Darmperistaltik gelangen die gemischten Mizellen durch die Grenzschicht („*unstirred water layer*“) zwischen wässrigem Darmmilieu und der Bürstensaummembran der

Mucosazellen. Carotinoide und Vitamin E werden vorrangig im Duodenum zum Teil durch passive Diffusion, teilweise aber auch durch rezeptorvermittelte Transportprozesse in die **Enterozyten** aufgenommen. Aktuelle Publikationen bestätigen die Beteiligung von SR-B1, einem Vertreter der ABC-Transporter, an der Aufnahme von Carotinoiden und Vitamin E in Enterocyten (REBOUL *et al.* 2005a, 2006a). SR-B1 weist eine geringe Substratspezifität auf und transportiert auch Cholesterin, Cholesterinester, Phospholipide und Phytosterine (YONEKURA und NAGAO 2007). Demzufolge kann von einer Konkurrenz der lipophilen Verbindungen um die Aufnahme in Enterozyten ausgegangen werden. Eine Bedeutung weiterer Transporter, wie z. B. ABCG5 für den Carotinoidtransport wird vermutet (BOREL und REBOUL 2006, HERRON *et al.* 2006). In den Enterocyten werden freie Fettsäuren zügig durch das Fettsäuren bindende Protein abtransportiert. Dieses könnte neben dem Retinol bindenden Protein auch für den Xanthophylltransport verantwortlich sein (BOREL und REBOUL 2006). Intrazellulär erfolgen dann die Veresterung von Monoglyceriden und Fettsäuren sowie die Resynthese von Phospholipiden und Cholesterinestern. Provitamin-A-wirksame Carotinoide werden zum Teil in Retinol umgewandelt und verestert. Im endoplasmatischen Retikulum werden unter Hinzufügung von Apoproteinen Prächylomikronen gebildet. Diese werden im Golgi-Apparat glykosyliert. So entstehen Partikel mit hydrophiler Oberfläche, deren Kern größtenteils aus Lipiden besteht. Auch Carotinoide, Retinylester und Tocochromanole werden in diese Chylomikronen eingeschlossen.

Die Chylomikronen werden mittels Exozytose in den Interzellulärraum und anschließend in die **Lymphbahn** abgegeben. Von dort gelangen sie in den **Blutkreislauf**. Durch die Lipoproteinlipase (LPL) werden Triglyceride hydrolysiert und die freien Fettsäuren anschließend resorbiert. Auch ein Teil des Vitamins E wandert direkt und ohne Selektion in Gewebezellen ab (GABMANN 1995c). Die verbliebenen Chylomikronenreste (Remnants) können Carotinoide und Vitamin E mit anderen zirkulierenden Lipoproteinen austauschen, bevor sie von **Leberzellen** aufgenommen und metabolisiert werden. Das Cytosol der Leberzellen ist neben den Enterocyten ein Ort der Umwandlung von β -Carotin zu Vitamin A. Von der Leber werden synthetisierte und recycelte lipophile Verbindungen wiederum in Lipoproteine (VLDL) gepackt und ins Blut abgegeben. Durch das α -Tocopherol-Transfer-Protein (α -TTP) in den Hepatozyten wird gezielt α -Tocopherol selektiert und für den Einbau in VLDL zur Verfügung gestellt. Die anderen Vitamine werden zusammen mit überschüssigem α -Tocopherol mit der Galle ausgeschieden. Aus den VLDL entstehen durch die Wirkung der LPL Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL). Diese werden zur Leber zurückgeführt oder unter Abspaltung von Apoprotein E zu Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) umgewandelt. Die LDL-Partikel transportieren überwiegend Cholesterinester zu den **peripheren Geweben**, von denen sie durch LDL-rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden. Auch Vitamin E und Carotinoide gelangen auf diesem Weg in die Peripherie. Überschüssige Cholesterinester, Phospholipide

und Triglyceride werden mit Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) zur Leber zurück transportiert. Vitamin E kann durch seine Lokalisation an der Oberfläche von Lipoproteinen zwischen LDL und HDL ausgetauscht werden und wird zu etwa gleichen Teilen auf die beiden Lipoproteinklassen verteilt. Gleiches gilt auch für die Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin. Carotine wie β -Carotin und Lycopin werden überwiegend im Inneren von Lipoproteinen eingeschlossen. Sie finden sich hauptsächlich in LDL-Partikeln (YEUM und RUSSELL 2002).

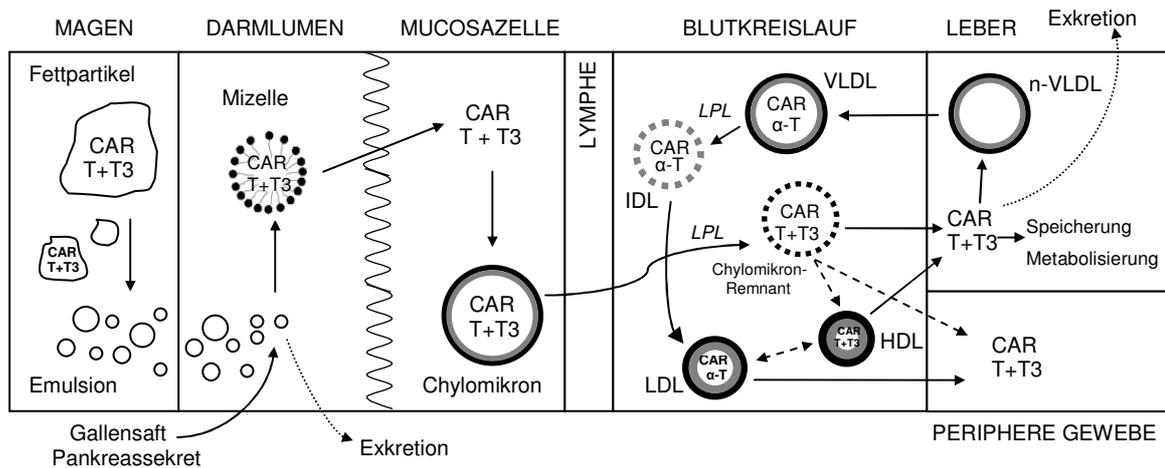


Abb. 8: Schematische Darstellung von Resorption und Transport von Carotinoiden und Vitamin E

CAR = Carotinoide, T+T3 = Tocopherole + Tocotrienole, LDL = low density lipoprotein, HDL = high density lipoprotein, IDL = immediate density lipoprotein, n-VLDL = nascent very low density lipoprotein, LPL = Lipoproteinlipase

Für Vitamin E existieren keine echten **Speicherorgane**. Die Hauptmenge wird im Fettgewebe deponiert, ist jedoch nicht schnell verfügbar. Auch der Hauptteil der Carotinoide (80 %) wird im Fettgewebe gespeichert. Etwa 10 % befinden sich in der Leber. Xanthophyllester wurden ebenfalls in der Haut gefunden. Auch im Gehirn besteht der Hauptteil der gespeicherten Carotinoide aus Xanthophyllen (BOREL und REBOUL 2006). Die Retina (Netzhaut) des menschlichen Auges ist mit der selektiven Anreicherung von Lutein und Zeaxanthin einen Sonderfall. Der Ort mit der größten Konzentration an Sehzellen, die Makula lutea (gelber Fleck), besitzt gleichzeitig die höchste Pigmentdichte. Eine gewebespezifische Anreicherung findet auch für Lycopin in der Prostata statt.

2.5.2 Methoden zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit

Die **Bioverfügbarkeit** wird häufig der Resorptionsrate gleichgesetzt und definiert als der Anteil einer oral verabreichten Dosis, der den Blutkreislauf erreicht und somit für die Auf-

nahme in Gewebe verfügbar ist. SOUTHON und FAULKS (2002) schlugen die Einbeziehung der Bioaktivität, also der funktionellen Konsequenzen der Resorption, vor.

Der Begriff der **Bioaktivität** spielt vor allem für Vitamin E eine große Rolle. Die Verbindung mit der höchsten biologischen Aktivität ist α -Tocopherol (Tab. 3, Seite 17). Der mitunter beträchtliche Unterschied zwischen den einzelnen Vitameren ist nicht auf eine unterschiedliche Resorption zurückzuführen. Diese liegt für alle Tocopherolformen zwischen 15 % und 75 % (GABMANN 1995b). Ursache für die niedrigere Bioaktivität der anderen Vitamere ist deren geringere Retention im Körper, die sich aus der selektiven Anreicherung von Lipoproteinen mit α -Tocopherol durch das α -TTP in der Leber ergibt (siehe Kapitel 2.5.1).

Von der Bioverfügbarkeit („*bioavailability*“) ist die **Resorptionsverfügbarkeit** („*bioaccessibility*“) zu unterscheiden. Für lipophile Verbindungen setzt sich die Resorptionsverfügbarkeit zusammen aus der Freisetzung der Substanzen aus der Lebensmittelmatrix, deren Lösung in der Fettphase sowie deren Einbindung in gemischte Mizellen. Sie gibt demzufolge den Anteil einer Verbindung an, der nach der Verdauung zur Resorption in die Enterozyten zur Verfügung steht. Die Bioverfügbarkeit schließt hingegen die Resorption der Substanzen ein.

Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit finden verschiedene Methoden Anwendung. *In-vivo*-Techniken umfassen **Perfusionsstudien** mit Hilfe von Magen und/oder Darmsonden, Massebilanzstudien und vergleichsweise einfach durchzuführende und häufig angewandte Plasmauntersuchungen. In **Massebilanzstudien** wird die fäkale Ausscheidung der relevanten Substanzen in Relation zur oralen Aufnahme betrachtet. Mit Hilfe von **Pharmakokinetik-Studien** kann die Plasmaresonanz nach einer Einzeldosis ermittelt werden. Hierfür wird die Konzentration einer Substanz im Plasma oder in triglyceridreichen Lipoproteinen (TRL) im Zeitverlauf gemessen und die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet. Sie sind die am häufigsten verwendeten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit *in vivo*. Gesamtplasma ist für die Bestimmung der Resorption lipophiler Verbindungen jedoch ungeeignet, da es nicht nur neu absorbierte Carotinoide und Vitamin E enthält. Auch die TRL-Fraktion kann VLDL mit Carotinoiden und Vitamin E aus der Leber enthalten (Abb. 8). AUC-Daten zeichnen sich in der Regel durch eine sehr hohe interindividuelle Varianz aus. Ursache hierfür ist der Einfluss der individuellen Kinetik der Chylomikronensekretion und -clearance. Eine fehlende Plasmawirkung ist demzufolge nicht zwangsläufig mit einer fehlenden oder geringen Resorption gleichzusetzen (SOUTHON und FAULKS 2002, FAULKS und SOUTHON 2005). Mit Kinetik-Studien kann keine absolute Absorptionsrate bestimmt werden, sondern nur die relative Bioverfügbarkeit z. B. von verschiedenen Darreichungsformen, Lebensmitteln, Verarbeitungs- und Zubereitungsverfahren oder zwischen unterschiedlichen Probandenkollektiven (FAULKS und SOUTHON 2005). In **Interventionsstudien** kann der Langzeit-Effekt einer chronischen Aufnahme auf die Plasmaspiegel gemessen werden. Rückschlüsse auf die Gehalte in spezi-

fischen Geweben sind jedoch in der Regel nicht möglich (SOUTHON und FAULKS 2002). Eine viel versprechende Methodik zur Bestimmung der Absorption von Carotinoiden und Vitamin E ist die **Markierung mit stabilen Isotopen**, wodurch mit der Nahrung aufgenommene Verbindungen im Plasma von denen aus Gewebespeichern unterschieden werden können. Derartige Studien sind jedoch arbeitsaufwändig und kostenintensiv. Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Lutein und Zeaxanthin hat sich auch die **Messung der Makulapigment-Dichte** als hilfreich erwiesen (PARKER *et al.* 1999, YEUM und RUSSELL 2002).

Bei den *in-vitro*-Techniken muss zwischen Methoden zur Bestimmung der Resorptionsverfügbarkeit und der Darmpermeabilität unterschieden werden. Die Resorptionsverfügbarkeit wird meist mit Hilfe statischer **Verdauungsmodelle** ermittelt, bei denen ein Lebensmittel mit Verdauungsenzymen unter kontrollierten Temperatur- und pH-Bedingungen aufgeschlossen wird. Dynamische Modelle, die freigesetzte Verbindungen mittels Dialyse aus dem System entfernen, sind der *in-vivo*-Situation ähnlicher, kommen aber durch den höheren technischen Aufwand zur Routineanalytik bzw. als Screening-Methoden kaum in Frage. Zur Messung der **Transportvorgänge am Darmepithel** können die Ussing-Kammer oder isolierte Bürstensaummembran-Vesikel dienen (VERSANTVOORT *et al.* 2000). Sowohl für die Aufnahme von Carotinoiden und Vitamin E in die Enterozyten als auch für den Transport durch die Epithelzellen haben sich **Zellkultur-Methoden** etabliert. Am häufigsten werden Caco-2-Zellen verwendet. Diese Colocarcinom-Zelllinie stimmt in wesentlichen Eigenschaften wie der Ausbildung einer Bürstensaummembran, von Tight Junctions und der Expression zahlreicher Verdauungsenzyme sowie von Phase-I- und Phase-II-Enzymen der Biotransformation, mit Enterozyten überein (VERSANTVOORT *et al.* 2000). In Kombination mit *in-vitro*-Verdauungsmodellen sind Caco-2-Zellen prädestiniert zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E (Abb. 9).

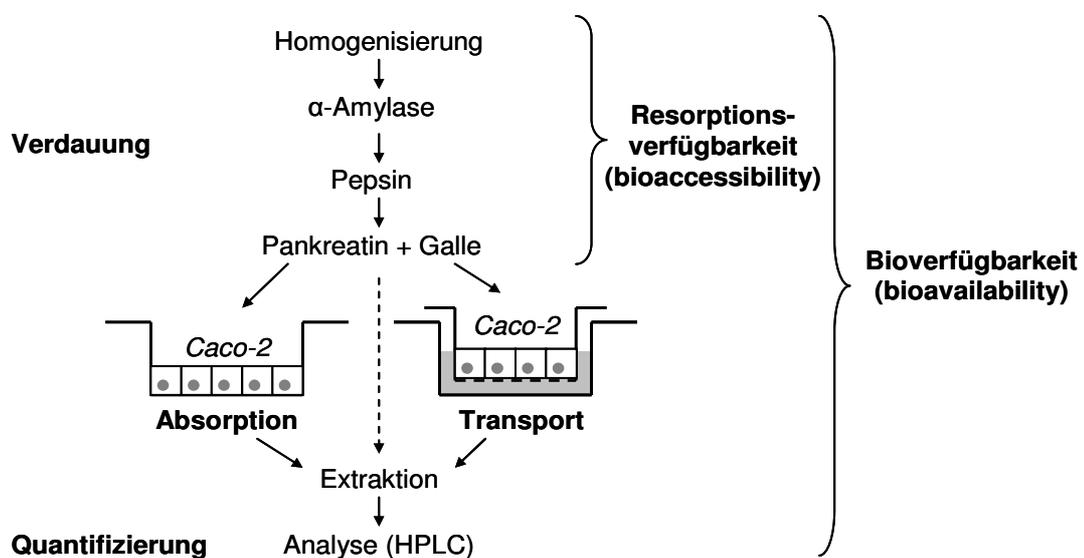


Abb. 9: Bestimmung von Resorptions- und Bioverfügbarkeit im *in-vitro*-Modell

Die Übertragbarkeit von *in vitro* ermittelten Ergebnissen auf die tatsächlichen Vorgänge im menschlichen Organismus muss kritisch betrachtet werden. REBOUL *et al.* (2006) stellten eine signifikante Korrelation ($r = 0,90$, $p = 0,038$) zwischen ihren Ergebnissen zur Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse und den *in vivo* gefundenen Gehalten in gemischten Mizellen fest. GRANADO *et al.* (2006) konnten jedoch einige Beobachtungen *in vivo* nicht mit ihren Ergebnissen der *in-vitro*-Verdauung erklären. Auch GRANADO-LORENCIO *et al.* (2009b) fanden keine Übereinstimmung, da die *in vitro* beobachtete Verbesserung der Resorption von Carotinoiden und Vitamin E durch Milch *in vivo* die Signifikanz verfehlte. Anhand der veröffentlichten Arbeiten ist dennoch ein zunehmendes Interesse an Untersuchungen der Bioverfügbarkeit *in vitro* zu erkennen. So resultierte eine SciFinder-Suche nach „*in vitro* digestion“ in 19 Publikationen für 1990 und bereits 34 für das Jahr 2000. Im Jahr 2009 wurden 83 Studien zu diesem Thema publiziert. Eine simulierte Verdauung kann insbesondere in Kombination mit Zellmodellen wertvolle Informationen über die Mechanismen von Verdauung und Absorption verschiedenster Lebensmittelinhaltsstoffe sowie deren Beeinflussung liefern. Des Weiteren können die Auswirkungen von Verarbeitung oder Zubereitung von Lebensmitteln systematisch untersucht werden (FAILLA *et al.* 2008). Da *in-vitro*-Modelle jedoch nie die physiologischen Bedingungen im menschlichen Verdauungstrakt vollständig simulieren, können sie Humanstudien nicht ersetzen. Sie sind jedoch als technisch einfache und preiswerte Screening-Methoden durchaus hilfreich und können als Vorversuche für Humanstudien dienen.

3 MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten Geräte, Arbeitsmittel und Reagenzien für die einzelnen Bestimmungsmethoden sind im Anhang A aufgelistet.

3.1 Untersuchungsmaterial

Vollkorngetreide und Grieße

Die meisten der sortenreinen Getreide wurden vom Institut für Sicherheit und Qualität bei Getreide des Max Rubner-Instituts (MRI) in Detmold zur Verfügung gestellt. Die beiden Purpurweizen stammten von der Firma Saatbau Linz (Linz, Österreich). Weitere Vollkorn-Getreide wurden im Handel bzw. direkt beim Erzeuger erworben (Tab. A 1). Für die Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen wurde die Sorte Prowidur aus dem Erntejahr 2001 verwendet. Zur Ursachenforschung für die reduzierte Extrahierbarkeit wurde u. a. ein enzymatischer Aufschluss mit Pepsin durchgeführt. Hierzu diente die Hartweizensorte Kombo aus dem Erntejahr 2007.

Teigwaren aus dem Handel

Für die Optimierung der *in-vitro*-Verdauungsmethode wurde eine eifreie Teigware aus dem Handel verwendet. Aus dem Handel stammten ebenfalls drei weitere eifreie Teigwaren sowie drei Teigwaren mit 10 % Eianteil (Tab. 5).

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Hartweizen-Teigwaren

	Bezeichnung	Herkunft	Bemerkungen
ohne Ei	Handelsware	Supermarkt	Spiralen
	Buitoni	Supermarkt	Spaghetti
	Erfurter	Supermarkt	Spaghetti
	Alnatura	Reformhaus	Bio-Spaghetti
mit Ei	Riesa	Supermarkt	Spiralen mit 10 % Frischei
	3 Glocken	Supermarkt	Spiralen mit 10 % Vollei
	REWE	Supermarkt	Spiralen mit 10 % Frischei
	Auftragsprobe 1		Eianteil unbekannt
	Auftragsprobe 2		Eierspätzle, Eianteil unbekannt

Muster aus der industriellen Teigwarenproduktion

Mehrere Chargen von Rohwaren, Zwischenstufen und Endprodukten der Teigwarenherstellung von zwei unterschiedlichen Produktionslinien wurden von der Erfurter Teigwaren GmbH zur Verfügung gestellt. Alle Muster waren Kurzwaren (KW) ohne Ei. Die Produktions-

linie 1 (PL1) war mit einer Polymatik®-Presse sowie einer modernen VHT-Trocknung ausgestattet. Die Produktionslinie 2 (PL2) nutzte einen konventionellen Mischprozess in Kombination mit einer HT-Trocknung (Abb. 10). Die Produktionszwischenstufen mit einem höheren Wassergehalt wurden bis zur Abholung im Werk in einem handelsüblichen Tiefkühlschrank zwischengelagert (maximal 1-2 Tage nach Probennahme). Trockene Proben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden sämtliche Proben bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Für einen Lagerungsversuch wurde eine Charge auch bei -30 °C aufbewahrt (Tab. 6). Einige Industriemuster dienten ebenfalls für die Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit mittels *in-vitro*-Verdauung (Tab. 6).

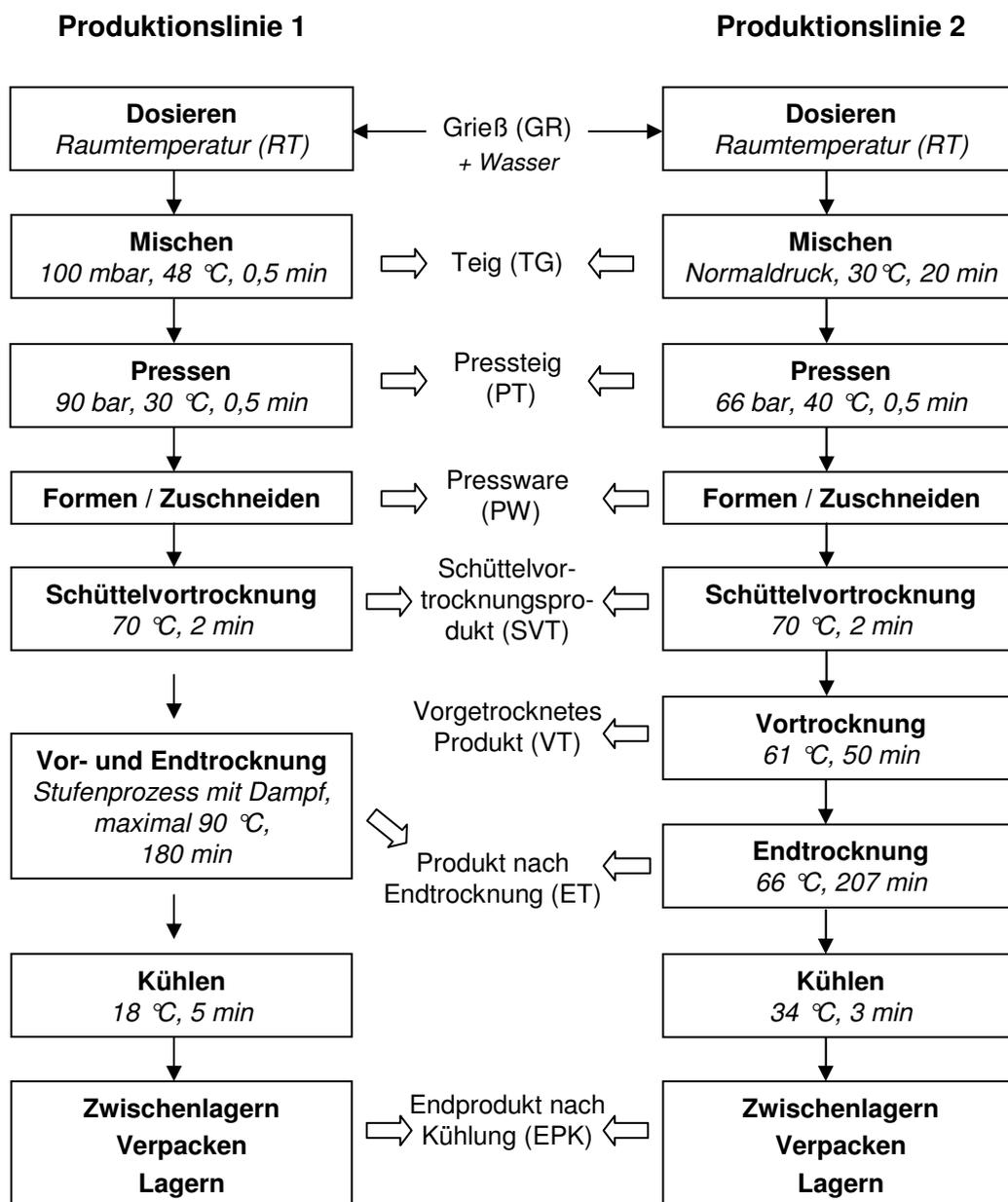


Abb. 10: Gegenüberstellung der Prozessparameter der industriellen Produktionslinien (Quelle: Erfurter Teigwaren GmbH)

Tab. 6: Übersicht zu den durchgeführten Analysen für die Muster aus der industriellen Teigwarenproduktion

Untersuchungen	Parameter	Probenmaterial
Lagerstabilität bei -30 °C	Vitamin E	KW 1 Charge 5 (GR, PT, SVT, EPK)
Lagerstabilität bei -80 °C	Carotinoide, Vitamin E	KW 2 Charge 3 (GR, TG, SVT, EPK)
Extrahierbarkeit	Carotinoide, Vitamin E	KW 2 Charge 3 (TG, PW, SVT, VT)
	Vitamin E	KW 2 Charge 4 (GR, EPK, EPK gekocht)
Teigwarenherstellung	Carotinoide, Vitamin E	KW 1 Chargen 2, 3; KW 2 Char. 1, 2 (GR, EPK)
		KW 2 Charge 3 (alle Muster)
Teigwarenherstellung	Gelbpigmente	KW 1 Chargen 3, 4; KW 2 Charge 4 (GR, EPK)
Kochprozess	Carotinoide, Vitamin E	KW 1 Char. 2; KW 2 Char. 1, 2, 3, 4 (EPK)
<i>in-vitro</i> -Verdauung	Carotinoide, Vitamin E	KW 1 Chargen 1, 2; KW 2 Chargen 1, 2

GR = Grieß, TG = Teig, PT = Pressteig, PW = Pressware, SVT = Schüttelvortrocknungsprodukt, VT = vorgetrocknetes Produkt, EPK = Endprodukt nach Kühlung

3.2 Probenvorbereitung

Vermahlung

Sämtliche Vollkorngetreide und Teigwaren wurden vor der Aufarbeitung mit der Labormühle Grindomix GM 200 (Retsch, Haan) möglichst fein gemahlen. Hierbei war eine starke Erhitzung des Mahlgutes zu vermeiden. Feinere Mahlfractionen, z. B. für die Untersuchungen verschiedener Partikelgrößen, wurden mit der Labormühle A 10 (IKA Labortechnik, Staufen) erreicht. Zur Herstellung verschiedener Mahlfractionen wurden Prüfsiebe mit unterschiedlichen Maschenweiten (0,1 mm; 0,2 mm; 0,5 mm; 1 mm; 2 mm) verwendet. Grieße (Industrie- und Handelsproben) wurden in der Regel ohne vorheriges Mahlen extrahiert.

Gefriertrocknung

In einigen Fällen wurden die Proben vor der Analyse gefriergetrocknet. Diese Methode wurde u. a. verwendet, um den Einfluss eines enzymatischen Aufschlusses auf die Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Hartweizen zu untersuchen und dabei den Effekt des Wassers auszuschließen (siehe Kapitel 3.5.1.1).

Bei der Gefriertrocknung wird die feste Phase unter Umgehung des flüssigen Zustandes direkt in Dampf überführt. Dies geschieht bei geringen Temperaturen und unter reduziertem Druck. Die Gefriertrocknung fand in drei Schritten statt. Zunächst wurde das Trocknungsgut mit möglichst geringer Schichtdicke eingefroren, im konkreten Fall über Nacht bei -25 °C in Petrischalen. Die Haupttrocknung erfolgte bei 0,34 mbar unter leichter Erwärmung. Die anschließende Nachtrocknung bei 0,01 mbar und weiterer Erwärmung bewirkte die Sublimation stärker gebundenen Wassers aus dem Produkt. Der entstandene Wasserdampf wurde dem System durch Kondensation an Kühlrohren entzogen. Die gesamte Trocknungszeit variierte

je nach Feuchtigkeitsgehalt der Proben zwischen 16 und 24 Stunden. Die Lyophilisate behielten ihre Struktur und konnten nach der Trocknung vermahlen werden.

3.3 Isolierung und Aufreinigung von Lutein und Zeaxanthin mittels präparativer HPLC

Zur Gewinnung größerer Mengen (*all-E*)-Lutein und (*all-E*)-Zeaxanthin für die Isomerisierungsversuche (siehe Kapitel 3.4) wurde die präparative HPLC angewandt. Beide Carotinoide wurden aus einem Maismehl nach der im Kapitel 3.5.1.2 beschriebenen Methode extrahiert. Der Extrakt wurde nach dem Einengen im Rotationsverdampfer in Methanol gelöst. Diese Lösung wurde zunächst mit einer präparativen C₃₀-Säule (300 × 10 mm, 5 µm, YMC Europe, Dinslaken) vorisoliert. Dabei wurden die Lutein- und Zeaxanthin-Fractionen erst mit einem Gemisch aus Methanol (MeOH) und Methyl-*tert*-Butylether (MtBE) (90/10, v/v) getrennt. Anschließend wurden alle weiteren Carotinoide des Maismehls mit 100 % MtBE eluiert. Vor jedem Lauf wurde die Säule mit dem Lösungsmittelgemisch konditioniert. Die isolierten Fractionen mussten anschließend weiter aufgereinigt werden. Hierfür wurde Methanol als Fließmittel verwendet. Die Methode zur Aufreinigung wurde ebenfalls für Lutein-Standards verwendet. Die kommerziell erhältlichen Substanzen enthielten meist geringe Zeaxanthin-Gehalte von 5-10 %. Diese konnten mit der beschriebenen Methode jedoch zuverlässig abgetrennt werden. Die isolierten Fractionen mehrerer HPLC-Läufe wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bei 30-35 °C abgedampft. Der Rückstand wurde in Ethanol gelöst und bei -25 °C gelagert.

	Vorisolierung	Aufreinigung
mobile Phase:	0-25 min MeOH/MtBE (90/10, v/v) 25-35 min MeOH/MtBE (0/100, v/v)	Methanol isokratische Elution
Laufzeit:	35 min	35 min
Flussrate:	4 ml/min	5 ml/min
Säulentemperatur:	15 ± 1 °C	25 ± 1 °C
Injektionsvolumen:	1 ml	1 ml

3.4 Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin

Eine *cis-trans*-Isomerisierung von Carotinoiden kann durch Hitze, Iod, Säuren und Licht katalysiert werden (ZECHMEISTER 1944). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Isomerisierungsmethoden angewandt. Zum einen wurde eine Isomerisierung der (*all-E*)-Standards durch die Kombination von Iod und Licht erreicht, zum anderen durch Hitzeeinwirkung.

3.4.1 Thermische Isomerisierung

Die thermische Isomerisierung wurde in verschraubbaren Zentrifugenröhrchen aus Glas durchgeführt. Jeweils 500 µl der (*all-E*)-Lutein- bzw. (*all-E*)-Zeaxanthin-Lösungen wurden für 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h bei 100 °C unter Lichtausschluss im Trockenschrank inkubiert. Diese Experimente wurden als Einfachbestimmung durchgeführt. Des Weiteren wurde die Isomerisierung bei 140 °C für Lutein als Doppelbestimmung und für Zeaxanthin als Einfachbestimmung untersucht. Hierfür wurden die Standard-Lösungen nach 1 h, 2 h, 4 h und 8 h analysiert. Die isomerisierten Lösungen wurden vor der Analyse unter Stickstoffstrom getrocknet und die Rückstände in 250 µl Methanol gelöst (Ultraschallbad).

3.4.2 Photo-Iod-Isomerisierung

In ein 1,5-ml-Tube wurden 500 µl einer methanolischen (*all-E*)-Lutein- bzw. (*all-E*)-Zeaxanthin-Lösung ($c \approx 50-100 \mu\text{g/ml}$) gegeben und mit einer definierten Menge (20-100 µl) einer Iod-Lösung (0,4 mg/ml n-Hexan) versetzt. Der Ansatz wurde unter normaler Laborbeleuchtung 10 min bzw. 30 min stehen gelassen. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, indem Lösungsmittel und Iod unter einem starken Stickstoffstrom entfernt wurden. Der trockene Rückstand wurde mit Hilfe eines Ultraschallbades in 250 µl Methanol gelöst. Die Photo-Iod-Isomerisierung wurde als Einfachbestimmung durchgeführt.

3.5 Bestimmung von Carotinoiden

Die Bestimmung des Carotinoidgehaltes erfolgte flüssigchromatographisch nach Extraktion mit MeOH/Tetrahydrofuran (THF) (1/1, v/v; + 0,1 % BHT) in Anlehnung an eine in der Arbeitsgruppe etablierte Methode (HENTSCHEL *et al.* 2002, SEYBOLD *et al.* 2004). Alle Arbeiten wurden unter reduziertem Licht durchgeführt, um Abbau- und Isomerisierungsreaktionen zu vermeiden. Für die Analyse von Getreideprodukten musste sowohl die Extraktion der Carotinoide als auch die chromatographische Trennung optimiert werden.

3.5.1 Extraktion

3.5.1.1 Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide

Zur Optimierung der Extraktionsrate bei Hartweizen-Proben wurde größtenteils die Sorte Prowidur aus dem Erntejahr 2001 als Vollkorn verwendet. Abweichungen davon sind an entsprechender Stelle genannt. Vor der Analyse wurden die Getreidekörner, wie im Abschnitt

3.1 beschrieben, gemahlen. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Modifikationen zur Extraktion der Carotinoide aus Hartweizen erfolgte in Abb. 11.

Einweichen der Proben mit Lösungsmittel

Nach Zugabe von MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) und des internen Standards (*all-E*)- β -apo-8'-Carotinal wurde die Probe mit dem Extraktionsmittel bis zu 36 h bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) bzw. bis zu 24 h bei 30 °C und 35 °C im Dunkeln stehen gelassen. Die Messung des Carotinoidgehaltes erfolgte in regelmäßigen Abständen (4-6 h). Hierfür wurden die Proben mit Hilfe des Ultra-Turrax extrahiert (siehe Kapitel 3.5.1.2).

Schütteln während des Einweichens mit Lösungsmittel

Die Proben wurden mit dem organischen Lösungsmittelgemisch in einem Schüttelwasserbad bei 25 ± 1 °C mit einer Frequenz von 130 U/min geschüttelt. Die Messung der Carotinoide erfolgte während der ersten 4 h der Einweichzeit. Die Extraktion erfolgte mittels Ultra-Turrax (siehe Kapitel 3.5.1.2).

Quellung der Proben mit Wasser vor der Extraktion mit Lösungsmittel

Zur Quellung der Hartweizen-Proben wurden verschiedene Volumina HPLC-Wasser verwendet (3 ml, 5 ml und 7 ml). Ebenso wurde die Quellungsdauer variiert (5 min bis 4 h). Die Quellung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur (22 ± 1 °C), 30 °C, 40 °C und 60 °C. Anschließend wurde der interne Standard zugegeben und die Probe am Ultra-Turrax wie im Abschnitt 3.5.1.2 erläutert extrahiert.

Partikelgröße

Um den Einfluss der Partikelgröße gemahlene Hartweizens auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide zu untersuchen, wurde die Probe stufenweise vermahlen (siehe Abschnitt 3.1). Fraktionen unterschiedlicher Partikelgröße wurden mit Hilfe von Sieben unterschiedlicher Maschenweiten (0,1-2 mm) erhalten. Folgende Fraktionen wurden gesammelt: 1-2 mm, 0,2-0,5 mm und 0,1-0,2 mm. Sämtliche Fraktionen wurden direkt bzw. nach einer Quellung mit Wasser mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) extrahiert. Hierfür wurde ein Ultra-Turrax, wie in Abschnitt 3.5.1.2 erläutert, genutzt. Darüber hinaus wurden alle Fraktionen durch einfaches Schütteln anstelle der Nutzung des Ultra-Turrax extrahiert. Dazu wurden die Proben dreimal für jeweils 5 min in einem Inkubationsschüttler bei 22 ± 1 °C mit einer Frequenz von 250 U/min geschüttelt.

Enzymatischer Aufschluss mittels α -Amylase

Für Vorversuche wurden jeweils 5 g gemahlener Hartweizen mit 2,5 ml Amylase-Lösung und 2,5 ml Phosphatpuffer (pH 6,9) gemischt und 5 min inkubiert. Im Vergleich dazu wurde die Probe ohne Enzym mit 5 ml Puffer-Lösung für 5 min inkubiert. Die anschließende Extraktion der Carotinoide erfolgte am Ultra-Turrax wie im Abschnitt 3.5.1.2 beschrieben.

Um die Wirkung der Amylase ohne den Einfluss des Wassers zu beurteilen, wurde die Gefriertrocknung herangezogen. 40 g Hartweizen wurde 60 min mit 50 ml Amylase-Lösung (20 mg/ml Puffer, pH 6,9) bzw. 50 ml HPLC-Wasser eingeweicht. Anschließend wurden die Proben innerhalb von 24 h gefriergetrocknet (siehe Abschnitt 3.1). Nach der Gefriertrocknung wurden die Carotinoide jeweils mit und ohne Quellung der Proben mit Wasser am Ultra-Turrax extrahiert (siehe Abschnitt 3.5.1.2). Zur Kontrolle des enzymatischen Aufschlusses wurde der Gehalt an Glucose und Maltose sowohl vor als auch nach der Amylase-Behandlung gemessen (siehe Kapitel 3.11).

Enzymatischer Aufschluss mittels Pepsin

Für die Versuche mit Pepsin stand keine ausreichende Menge des Prowidur aus dem Erntejahr 2001 zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit einem Vollkorn-Hartweizen der Sorte Kombo, 2007 geerntet, durchgeführt. 50 g gemahlene Probe wurde jeweils mit 50 ml Pepsinlösung (20 mg/ml 0,1 M HCl) oder 50 ml 0,1 M HCl-Lösung ohne Enzym gemischt. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wurden alle Ansätze mit etwa 6-7 ml NaOH (20 g/l) neutralisiert. Zur Kontrolle des pH-Wertes wurde Universal-Indikatorpapier verwendet. Anschließend wurden alle Proben innerhalb von 24 h gefriergetrocknet (siehe Abschnitt 3.1). Die Extraktion von Carotinoiden erfolgte, wie im Kapitel 3.5.1.2 beschrieben, jeweils mit und ohne Wasserzugabe vor der Lösungsmittelextraktion. Um die Eiweißspaltung nachzuweisen, wurde der Gehalt freier Aminosäuren in sämtlichen Proben bestimmt (siehe Abschnitt 3.10).

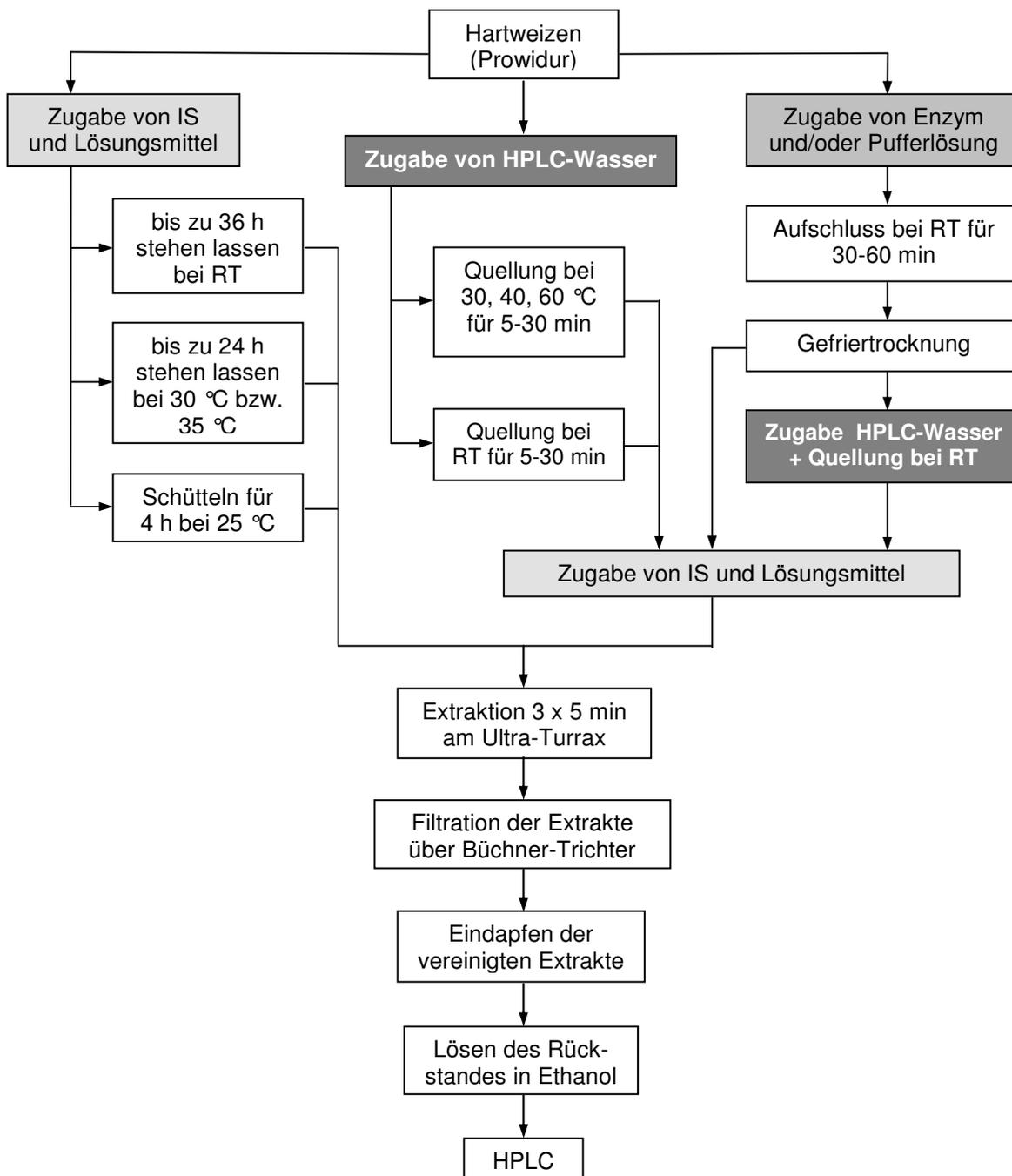


Abb. 11: Überblick über die getesteten Modifikationen zur quantitativen Extraktion von Carotinoiden aus Hartweizen

IS: interner Standard, RT: Raumtemperatur ($22 \pm 2 \text{ °C}$)

3.5.1.2 Optimierte Extraktionsmethode

In einen 50-ml-Erlenmeyerkolben wurden 5 g der Hartweizen-Probe eingewogen und mit ca. 5 ml HPLC-Wasser versetzt. Nach einer Quellzeit von mindestens 5 min wurden etwa 200 mg Magnesiumhydroxidcarbonat, 100 μl (*all-E*)- β -apo-8'-Carotinal (IS) und 35 ml MeOH/THF (1/1, v/v; + 0,1 % BHT) hinzugefügt. Anschließend wurde die Probenlösung 5 min mit

einem Ultra-Turrax (Dispergierstab S25N-18G) im Eisbad homogenisiert. Nachdem sich die Probe abgesetzt hatte, wurde der Überstand unter Vakuum über einen Büchner-Trichter filtriert. Die Extraktion des Rückstandes mit je 35 ml Lösungsmittel und anschließender Filtration wurde mindestens zweimal wiederholt (bis das Lösungsmittel farblos war). Die vereinigten Filtrate wurden in Braunglas-Rundkolben im Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei ca. 30-35 °C bis auf etwa 10 ml eingengt und anschließend in Braunglas-Spitzkolben überführt und bis zur Trockene eingedampft. Um das zuvor zugesetzte Wasser aus dem Extrakt zu entfernen, wurde einerseits bei jeder Filtration mittels Büchner-Trichter ein Löffelspatel Natriumsulfat (wasserfrei) auf den Filter gegeben und andererseits am Ende des Einengens im Rotationsverdampfer einige Milliliter Ethanol zugegeben. Nach vollständiger Trocknung wurde das Vakuum mit Stickstoff aufgehoben. Der Rückstand wurde schrittweise mit insgesamt 5 ml Ethanol im Ultraschallbad in Lösung gebracht und anschließend 5 min mit 14.000 U/min (\approx 15.800 g) zentrifugiert. Von diesem Extrakt wurden 50 μ l in die HPLC-Apparatur injiziert.

Für weitere Proben wurden verschiedene Einwaagen und Endvolumina verwendet. Nicht für alle Proben war eine Quellung mit HPLC-Wasser vor der Lösungsmittel-Extraktion notwendig. Eine Übersicht zu den verwendeten Extraktions- und HPLC-Methoden gibt Tab. 7.

Tab. 7: Verwendete Extraktions- und HPLC-Methoden für das untersuchte Probenmaterial

Probenmaterial	Einwaage	Quellung mit H ₂ O	Endvolumen	Lösungsmittel zur Injektion	HPLC-Methode ^A
Tomaten, Karotten roh	5 g	–	10 ml	MeOH/THF (1/1, v/v)	Gradient 1
Tom., Kar. getrocknet	5 g	–	10 ml	MeOH/THF (1/1, v/v)	Gradient 1
Mais	2 g	+	10 ml	MeOH/THF (1/1, v/v)	Gradient 1
Einkorn	5 g	–	5 ml	Ethanol	Gradient 2
Emmer	5 g	+	5 ml	Ethanol	isokratisch
Hartweizen	5 g	+	5 ml	Ethanol	isokratisch
Teigwaren roh	5 g	+	5 ml	Ethanol	isokratisch
Teigwaren gekocht	5 g	–	5 ml	Ethanol	isokratisch
Eierteigwaren roh	5 g	+	5 ml	Ethanol	isokratisch (verlängert)
Kartoffelprodukte	2 g	+	5 ml	Ethanol	isokratisch
Eierteigwaren gekocht	5 g	–	5 ml	Ethanol	isokratisch (verlängert)
Weichweizen, Dinkel, Hafer, Roggen, Einkorn	5 g	–	5 ml	EtOH oder MeOH/THF ^A	je nach Probe ^B

^A Die HPLC-Methoden sind in den Kapiteln 3.5.2.1 und 3.5.2.2 beschrieben.

^B nur Xanthophylle enthalten: Lösen in Ethanol, isokratische Elution

Xanthophylle + Carotine enthalten: Lösen in MeOH/THF (1/1, v/v), Gradientenelution

3.5.2 HPLC-Analytik

Die flüssigchromatographische Trennung der Probenextrakte wurde mit Hilfe verschiedener RP-C₃₀-Analysensäulen erreicht. Die Detektion der getrennten Analyten erfolgte mittels Photodiodenarray (PDA)-Detektor bei einer Wellenlänge von 450 nm. Ein PDA-Detektor ist

eine Sonderform des UV-Detektors, der während der Entwicklung eines Chromatogramms bei einer spezifischen Wellenlänge auch UV-Spektren aufnehmen kann und somit zusätzliche Informationen über die getrennten Substanzen liefert. Die Verbindungen wurden über den Vergleich der Retentionszeiten und PDA-Absorptionsspektren mit denen der Standardsubstanzen identifiziert. Zur Quantifizierung wurden die Peakflächen mit denen der Standards definierter Konzentrationen verglichen. Hierfür wurden Stammlösungen der (*all-E*)-Isomere von Lutein und Zeaxanthin (50-100 µg/ml) 1:50 verdünnt. (*Z*)-Isomere von Lutein und Zeaxanthin wurden durch Vergleich mit isomerisierten Standards (siehe Kapitel 3.3) identifiziert und mangels Referenzsubstanzen über die Peakfläche des jeweiligen (*all-E*)-Standards quantifiziert. Zur Berechnung der Konzentrationen in den Proben wurden die Wiederfindungsraten des internen Standards (*all-E*)-β-apo-8'-Carotinal berücksichtigt. Gesamt-Carotinoidgehalte wurden mit Hilfe der molaren Massen der Einzelverbindungen berechnet (Tab. A 2).

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Carotinoid-Stammlösungen erfolgte in regelmäßigen Abständen mit Hilfe der adäquaten Absorptionsmaxima und spezifischen Extinktionskoeffizienten ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) (Tab. A 3). Die Konzentrationen wurden nach folgender

$$\text{Formel berechnet: } c [\text{g}/100 \text{ ml}] = \frac{E}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \times \text{VF} \quad \text{VF: Verdünnungsfaktor}$$

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Carotinoide wurden anhand des Basislinienrauschens festgelegt. Dabei entspricht die Nachweisgrenze etwa dem dreifachen und die Bestimmungsgrenze etwa dem zehnfachen Basislinienrauschen (KROMIDAS 1999). Da Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nicht nur von der verwendeten Trennsäule, sondern auch von der Elutionsmethode abhängen, wurden beide Kenngrößen für verschiedene HPLC-Methoden ermittelt (Tab. A 4-Tab. A 6).

3.5.2.1 Gradientenmethoden für Xanthophylle und Carotine

Die ersten chromatographischen Trennungen erfolgten mit einer C₃₀-Analysensäule von YMC (Dinslaken) in Anlehnung an eine von BÖHM (2001) etablierte Methode. Dabei war eine Trennung von Carotinoiden unterschiedlichster Polaritäten inklusive Lycopin möglich (Tab. 8, Gradient 1). Die Trennung konnte ebenfalls mit den C₃₀-Säulen von Trentec (Rutesheim) erreicht werden (Abb. 12). Für die PEEK-C₃₀-Säulen musste die Säulentemperatur jedoch je nach Charge reduziert werden.

Da in der vorliegenden Arbeit vorwiegend Xanthophylle bestimmt werden sollten und die Trennung der Xanthophylle und speziell der verschiedenen Isomere mit der Gradientenmethode 1 nicht zufrieden stellend war, wurde diese modifiziert. Ein geringer

Anteil Wasser im Elutionsmittel resultierte in einer höheren Trennleistung im vorderen Bereich des Chromatogramms (Xanthophylle). Durch die Gradientenelution war ebenfalls eine gute Trennung von (*all-E*)- α -Carotin und verschiedener β -Carotin-Isomere gewährleistet (Tab. 8, Gradient 2; Abb. 12).

	Gardientenmethode 1	Gradientenmethode 2
mobile Phase:	MeOH und MtBE	MeOH/H ₂ O (98/2, v/v) und MtBE
Laufzeit:	70 min	65 min
Flussrate:	1,3 ml/min	1,5 ml/min
Säulentemperatur:	23 ± 1 °C	19 ± 1 °C
Injektionsvolumen:	50 µl	50 µl

Tab. 8: HPLC-Gradienten zur Trennung von Xanthophyllen und Carotinen

Zeit [min]	Gradient 1		Zeit [min]	Gradient 2	
	MeOH [%]	MtBE [%]		MeOH/H ₂ O [%]	MtBE [%]
0	90	10	0	100	0
35	55	45	10	100	0
45	40	60	35	70	30
60	40	60	55	70	30
65	90	10	60	100	0
70	90	10	65	100	0

3.5.2.2 Isokratische Methode für Xanthophylle

Da es sich bei den Carotinoiden im Hartweizen ausschließlich um Xanthophylle handelt, wurde eine Trennmethode speziell für diese Stoffklasse entwickelt, mit der die verschiedenen (*Z*)-Isomere von Lutein und Zeaxanthin besser getrennt werden konnten als mit den beiden Gradientenmethoden. Die Vorteile dieser isokratischen Methode lagen in dem geringeren Lösungsmittelverbrauch und den kürzeren Laufzeiten. Die isokratische Methode ermöglichte die Trennung von 9 Xanthophyllen (Abb. 12). Allerdings konnte keine Trennung von Antheraxanthin und Astaxanthin erreicht werden. Für die praktische Anwendung spielte das jedoch keine Rolle, da Astaxanthin vorrangig in Meerestieren (Lachs, Shrimps) zu finden ist, welche kein Antheraxanthin enthalten. Für die Messung von Carotinoiden in Eiern und Eierteigwaren wurde lediglich die Laufzeit auf 75 min erhöht. Dies ermöglichte die Detektion von acht Xanthophyllen (Capsanthin, Lutein, Zeaxanthin, β -apo-8'-Carotinal, Canthaxanthin, Citranaxanthin, β -apo-8'-Carotinsäureethylester, β -Cryptoxanthin), die fütterungsbedingt in Hühnereiern vorkommen können (SCHLATTERER und BREITHAUPT 2006).

Bei anderen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe wurden Oxidationsreaktionen der Carotinoide, v. a. von Lycopin in der Vertex-C₃₀-Säule beobachtet, weshalb die Vertex-Säule durch eine PEEK-Säule ersetzt wurde (FRÖHLICH 2007). Da eine Oxidation der Xanthophylle nicht festgestellt wurde, konnte die Vertex-Säule verwendet werden, bis die Trennleistung altersbedingt nicht mehr ausreichte. Die Messungen erfolgten anschließend mit der PEEK-C₃₀-Säule. Die isokratische Methode musste jedoch beim Wechsel von der Trentec Vertex-Säule auf die Trentec PEEK-Säule geringfügig modifiziert werden.

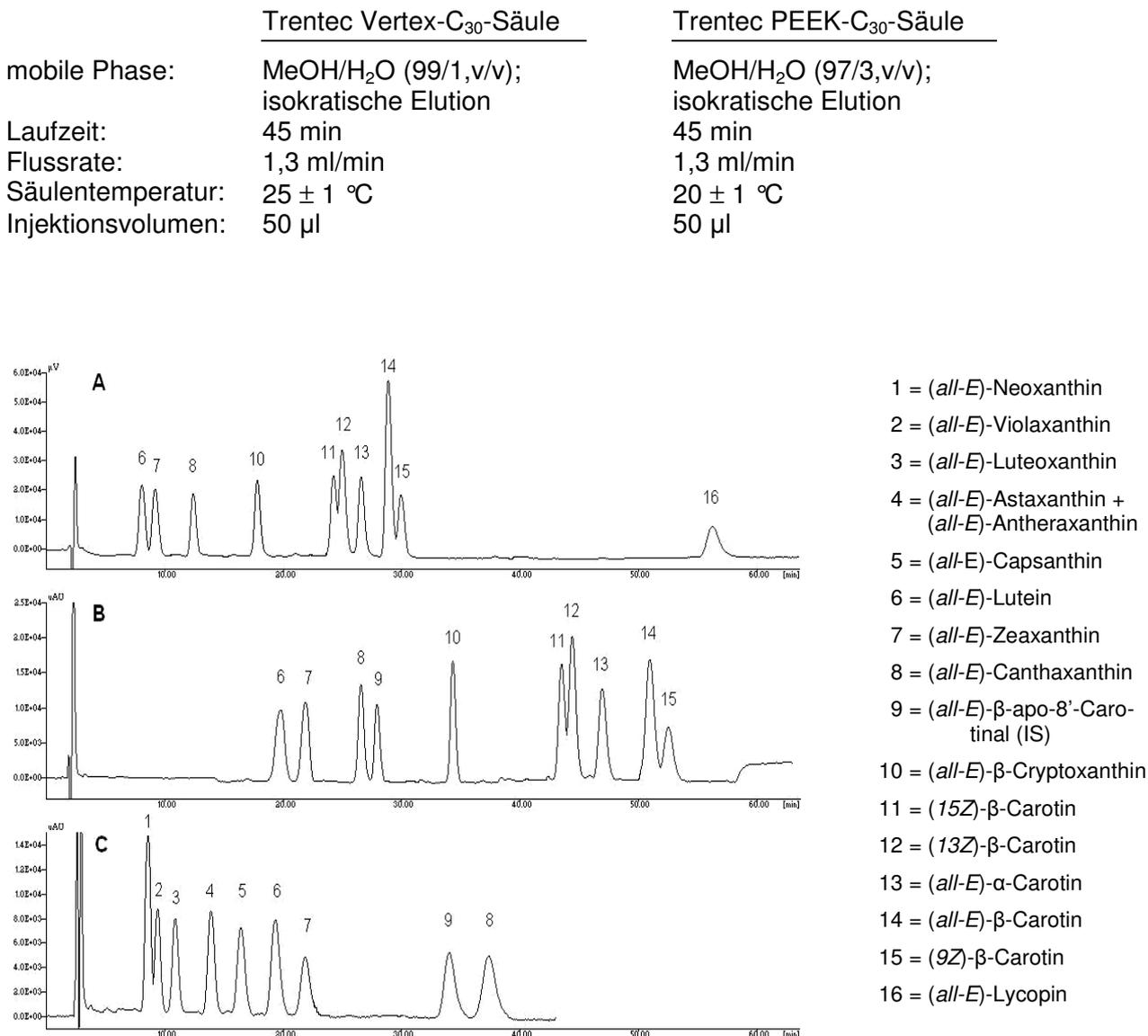


Abb. 12: Chromatographische Trennung von Carotinoid-Standards mit einer Trentec C₃₀-Analysensäule (250 x 4,6 mm; 5 µm) mit Gradientenmethoden 1 (A) und 2 (B) sowie isokratischer Elution (C); HPLC-Bedingungen sind im Text beschrieben.

3.5.2.3 LC-MS-Messung von Lutein und Zeaxanthin

Zur Identifizierung von Substanzen können neben charakteristischen Eigenschaften der UV-vis-Spektren auch die Molekülmassen hilfreich sein. Die Grenzen der Massenspektroskopie (MS) liegen jedoch in der Unterscheidung von massengleichen Carotinoiden wie z. B. Lutein und Zeaxanthin. Auch zwischen (*E*)- und (*Z*)-Isomeren kann mittels Massenspektroskopie nicht unterschieden werden. Mit Hilfe der MS-Messungen sollte jedoch geprüft werden, inwieweit es sich bei den im Hartweizen vorkommenden Carotinoiden tatsächlich um Lutein- und Zeaxanthin-Isomere handelt oder ob weitere Carotinoide bzw. Metabolite mit abweichenden Massen detektierbar sind. Hierfür wurden zunächst Standardlösungen von Lutein und Zeaxanthin, isomerisierte Standards (3 h, 140 °C, siehe Kapitel 3.4.1) und ein konzentrierter Teigwarenextrakt (20 g Probe/5 ml) in Methanol gelöst und nach der isokratischen Methode für Xanthophylle aufgetrennt. Im angeschlossenen Massenspektrometer wurden die Analyten zunächst unter Atmosphärendruck im positiven Modus ionisiert (APCI⁺) (Abb. 13). Die entstandenen Ionen wurden anschließend im Quadrupol-Massenanalysator selektiert, in dem nur Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis (m/z) eine stabile Flugbahn durch das elektrische Feld beschreiben. Diese wurden dann im Kanalelektronenvervielfacher (CEM) detektiert. Lutein- und Zeaxanthin-Standards wurden zunächst im Full-Scan-Modus (m/z 400-700) gemessen. Der Vergleich der isomerisierten Standards mit dem Probenextrakt erfolgte im SIM-Modus. Hierbei wurden die Massen von 551,5 und 569,5 selektiert.

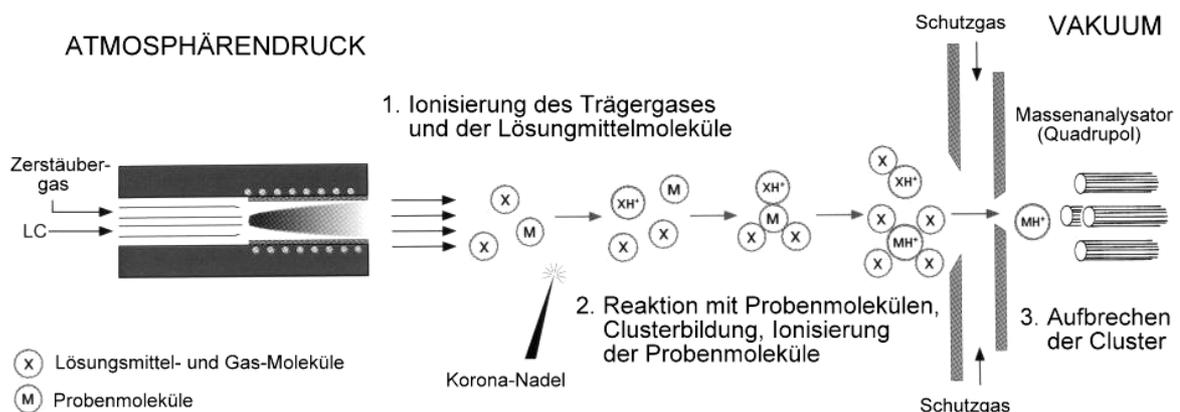


Abb. 13: Prinzip der Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) in einem Massenspektrometer (modifiziert nach GROBOSCH 2008)

3.6 Bestimmung von Vitamin E

3.6.1 Extraktion

3.6.1.1 Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden

Sämtliche Extraktionsversuche wurden an Hartweizengrieß, den rohen Nudeln und den gekochten Nudeln der PL2 (KW2 Charge 4) durchgeführt. Alle Arbeiten fanden unter reduziertem Licht statt, um die lichtempfindlichen Inhaltsstoffe zu schützen.

Einfache Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln mittels Vortex

Zu etwa 1 g Probe wurden 20 µl α -Tocopherolacetat (IS) gegeben und mit 3 ml Lösungsmittel 1 min auf dem Reagenzglasschüttler extrahiert. Nach einer Zentrifugation von 3 min mit 5.000 U/min (\approx 3.900 g) wurde der Überstand in einen Braunglas-Spitzkolben überführt und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Extrakte wurden im Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei 30-35 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) gelöst. Vor der HPLC-Analyse wurde die Lösung 5 min mit 14.000 U/min (\approx 15.800 g) zentrifugiert. Folgende Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Extraktionsmittel für Vitamin E verglichen: Ethanol, Methanol, Methanol/Tetrahydrofuran (1/1, v/v), Ethanol/Cyclohexan (1/1, v/v), n-Hexan und n-Hexan/Ethylacetat (9/1, v/v).

Schrittweise Extraktion mit Methanol, Tetrahydrofuran und n-Hexan mittels Vortex

Vor der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wurden die Proben mit Wasser eingeweicht. Für 1 g Grieß bzw. rohe Nudeln wurde 1,5 ml Wasser und für 1 g gekochte Nudeln 1 ml Wasser verwendet. Anschließend wurden die Proben mit 20 µl α -Tocopherolacetat (IS) versetzt und mit 2 ml MeOH/THF (1/1, v/v) 1 min auf dem Reagenzglasschüttler gemischt. Nach der Zugabe von 2 ml n-Hexan wurden die Proben erneut 1 min geschüttelt. Danach wurden die Proben mit 5.000 U/min (\approx 3.900 g) 3 min zentrifugiert und die Überstände in Braunglas-Spitzkolben überführt. Die Extraktion mit MeOH/THF und n-Hexan wurde zweimal wiederholt. Die vereinigten Extrakte wurden im Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei 30-35 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) gelöst. Vor der HPLC-Analyse wurde die Lösung 5 min mit 14.000 U/min (\approx 15.800 g) zentrifugiert.

Extraktion nach Balz (mit und ohne Wasser)

Die Extraktion wurde in Anlehnung an eine von BALZ *et al.* (1993) publizierte Methode zur Vitamin-E-Extraktion aus Frühstücksflocken durchgeführt. Etwa 1 g Probe wurde mit 1 ml

HPLC-Wasser für 30 s auf dem Reagenzglasschüttler gemischt. Nach der Zugabe von 20 µl α-Tocopherolacetat wurden nacheinander jeweils 1 ml Ethanol, MtBE und Petrolether hinzugefügt. Nach jeder Zugabe wurde die Probe 30 s geschüttelt. Die Zentrifugenröhrchen wurden 3 min mit 5.000 U/min (≈ 3.900 g) zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde in einen Braunglas-Spitzkolben überführt. Die Extraktion mit MtBE und Petrolether wurde zwei weitere Male durchgeführt. Die vereinigten Extrakte wurden im Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei 30-35 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) gelöst. Vor der HPLC-Analyse wurde die Lösung 5 min mit 14.000 U/min (≈ 15.800 g) zentrifugiert. Zum Vergleich dazu wurden die Proben ebenfalls nach dieser Methode, jedoch ohne die Zugabe von Wasser zu Beginn der Extraktion, aufgearbeitet.

Extraktion am Ultra-Turrax (mit und ohne Wasser)

Diese Extraktionsmethode wurde analog der Carotinoid-Extraktion (siehe Kapitel 3.5.1.2) durchgeführt. Zu etwa 5 g Probe wurden 50 µl α-Tocopherolacetat (IS) pipettiert. Die Extraktion mit jeweils 35 ml MeOH/THF (1/1, v/v) wurde am Ultra-Turrax (Dispergierstab S25N-18G) durchgeführt. Die Extrakte wurden über einen Büchner-Trichter unter Vakuum filtriert und im Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) gelöst, zentrifugiert und vor der Analyse 1:2 mit Fließmittel verdünnt. Parallel dazu wurde die Probe vor der Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v) mit 5 ml HPLC-Wasser für 5 min eingeweicht.

Alkalischer Aufschluss mit 60-%-iger KOH-Lösung bei 70 °C

Der Aufschluss mit Kaliumhydroxid wurde in Anlehnung an die Methode von PANFILI *et al.* (2003) durchgeführt. Etwa einem Gramm Probe wurden nacheinander 20 µl δ-Tocopherol, 1,25 ml ethanolische Pyrogallol-Lösung, 0,5 ml Ethanol, 0,5 ml Natriumchlorid-Lösung und 0,5 ml 60 %ige KOH-Lösung zugefügt. Anschließend wurde 30 s geschüttelt. Der Aufschluss erfolgte innerhalb von 45 min bei 70 ± 1 °C im Wasserbad. Dabei wurden die Proben alle 5 bis 10 min geschüttelt. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurden 3 ml NaCl-Lösung zugegeben und 30 s geschüttelt. Die anschließende Extraktion mit jeweils 2 ml n-Hexan/Ethylacetat (9/1, v/v) wurde insgesamt viermal durchgeführt. Das Lösungsmittel musste nicht neutral gewaschen werden. Nach dem Eindampfen im Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei 30-35 °C wurde der Rückstand in 2 ml n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) gelöst und 5 min mit 14.000 U/min (≈ 15.800 g) zentrifugiert.

Alkalischer Aufschluss mit 10 %iger KOH bei Raumtemperatur

Der Aufschluss mit 10 %iger Kaliumhydroxid-Lösung erfolgte analog der zuvor beschriebenen Methode. Die Proben wurden jedoch 45 min bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) verseift.

Heißextraktion im Wasserbad

Die Extraktion im Wasserbad bei 70 ± 1 °C für 45 min wurde analog dem alkalischen Aufschluss durchgeführt. Dabei wurde lediglich die KOH-Lösung durch Wasser ersetzt.

Heißextraktion mittels Soxhlet-Apparatur

Die Soxhlet-Extraktion wurde in Anlehnung an eine von BALZ *et al.* (1992) publizierte Methode für Getreide durchgeführt. Etwa 1 g Probe wurde in Extraktionshülsen eingewogen, mit 20 µl α -Tocopherolacetat versetzt, mit Seesand überschichtet und mit Watte abgedeckt. Die Hülsen wurden in Lösungsmittelbecher geklemmt, denen 140 ml Ethanol/Cyclohexan (1/1, v/v) sowie einige Siedesteinchen zugefügt wurden. Diese Becher wurden in die Soxhlet-Apparatur eingespannt. Die Extraktion erfolgte automatisch mit folgenden Parametern:

Extraktionstemperatur:	150 °C	Lösungsmittelabsenkung A:	5 x 15 ml
Grenztemperatur:	200 °C	Lösungsmittelabsenkung B:	0 min
Kochzeit:	30 min	Lösungsmittelabsenkung C:	0 min
Extraktionszeit:	90 min	Lösungsmittelabsenkung Intervall:	4 min
		Lösungsmittelabsenkung Impuls:	3 s

In der Kochphase befanden sich die Proben im siedenden Lösungsmittel, wodurch bereits ein großer Teil des Extraktes in Lösung gebracht wurde. Zur vollständigen Extraktion wurde der Lösungsmittelspiegel so weit abgesenkt, dass sich eine deutliche Trennung von Lösungsmittel und Extraktionshülse ergab (Absenkung A). Das verdampfte Lösungsmittel kondensierte im Kühler und wurde gesammelt (Dauer = Intervall). Zur Absenkung wurde Druckluft eingeleitet (Dauer = Impuls). Die Extraktion mittels Lösungsmitteldampf dauerte 90 Minuten. Nach beendeter Extraktion kann das Lösungsmittel in der Absenkphase B abgedampft werden. Hierauf wurde verzichtet, um den Extrakt nicht zu verändern. In der Absenkphase C wurden die Extraktionsbecher von den Heizplatten abgehoben. In dieser Phase fand noch eine minimale Verdampfung im Warmluftstrom statt.

Die Extrakte wurden aus den Extraktionsbechern in Braunglas-Rundkolben überführt und im Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck bei 30-35 °C eingeeengt. Das verbliebene Lösungsmittel wurde in Braunglas-Spitzkolben abgedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) gelöst und 5 min mit 14.000 U/min (\approx 15.800 g) zentrifugiert.

Enzymatischer Aufschluss mittels Pepsin

Um die direkte Wirkung des Enzyms ohne den Einfluss des Wassers beurteilen zu können, wurden die Proben nach dem enzymatischen Aufschluss gefriergetrocknet. Für die Versuche

mit Pepsin stand keine ausreichende Menge des Prowidur aus dem Erntejahr 2001 zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit einem Vollkorn-Hartweizen der Sorte Kombo, 2007 geerntet, durchgeführt. 50 g gemahlene Probe wurde jeweils mit 50 ml Pepsinlösung (20 mg/ml 0,1 M HCl) oder 50 ml 0,1 M HCl-Lösung ohne Enzym gemischt. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wurden alle Ansätze mit etwa 6-7 ml NaOH (20 g/l) neutralisiert. Zur Kontrolle des pH-Wertes wurde Universal-Indikatorpapier verwendet. Anschließend wurden alle Proben innerhalb von 24 h gefriergetrocknet (siehe Abschnitt 3.2). Die Extraktion von Vitamin E erfolgte, wie im Kapitel 3.6.1.2 beschrieben, jeweils mit und ohne Wasserzugabe vor der Lösungsmittlextraktion. Um die Eiweißspaltung nachzuweisen, wurde der Gehalt freier Aminosäuren in sämtlichen Proben bestimmt (siehe Abschnitt 3.10).

3.6.1.2 Optimierte Extraktionsmethode

Die Extraktion von Vitamin E erfolgte gemeinsam mit der der Carotinoide. Hierfür wurden die Proben ebenfalls vor der Lösungsmittel-Extraktion mit Wasser eingeweicht. Anschließend wurden 100 µl α -Tocopherolacetat (IS) zu 5 g gequollener Probe gegeben. Die Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) am Ultra-Turrax erfolgte wie in Abschnitt 3.5.1.2 für die Carotinoide beschrieben. Vom Probenextrakt in Ethanol wurden 500 µl in einen 1-ml-Maßkolben pipettiert und das Lösungsmittel unter Stickstoff-Strom abgedampft. Der Maßkolben wurde mit n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) aufgefüllt und der Rückstand im Ultraschallbad gelöst (entspricht einer Verdünnung von 1:2). Nach der Zentrifugation mit 14.000 U/min (\approx 15.800 g) für 5 min wurden 20 µl der Lösung in die HPLC-Apparatur injiziert.

3.6.2 HPLC-Analytik

Die flüssigchromatographische Trennung mittels Normalphasen-HPLC entlang einer Diol-Säule wurde in Anlehnung an die Methode von BALZ *et al.* (1992) durchgeführt. Um eine Trennung aller Tocopherole, Tocotrienole und α -Tocopherolacetat (IS) bei geringerer Säulentemperatur zu realisieren, musste die Zusammensetzung der mobilen Phase geringfügig gegenüber der Originalmethode geändert werden. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor. Die Abb. 14 zeigt die optimierte Trennung eines Standardgemisches.

mobile Phase:	n-Hexan/MtBE (98/2, v/m); isokratische Elution
Laufzeit:	45 min
Flussrate:	1,5 ml/min
Säulentemperatur:	35 \pm 1 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Anregung:	292 nm
Emission:	330 nm

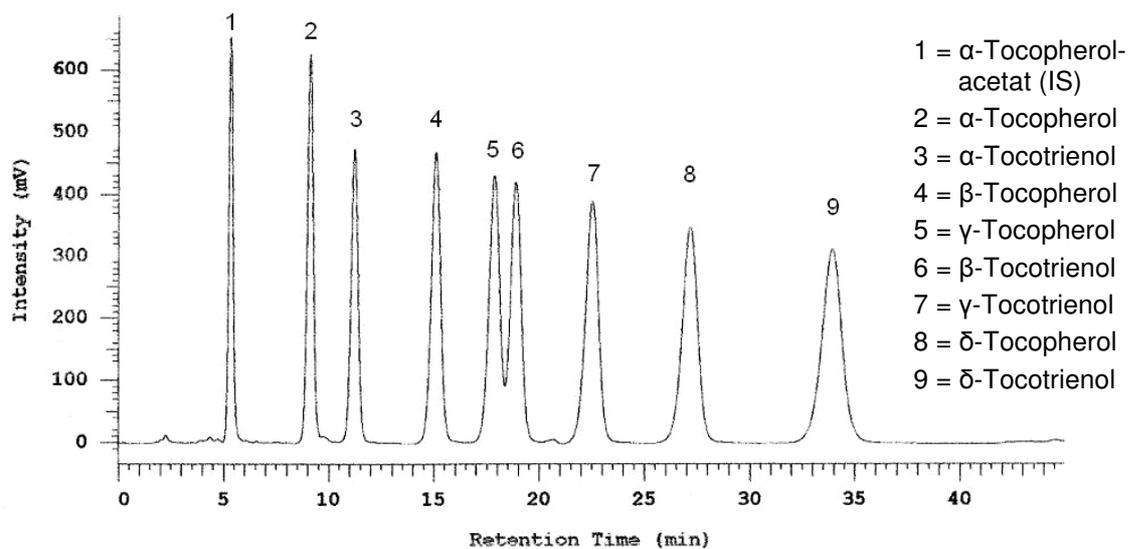


Abb. 14: Chromatographische Trennung eines Vitamin-E-Standardgemisches mit einer Knauer Diol-Analysensäule (250 x 4 mm; 7 µm), mobiler Phase n-Hexan/MtBE (98/2, v/v) und isokratischer Elution bei 35 ± 1 °C und 1,5 ml/min.

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten. Zur Quantifizierung der Analyten dienten die Peakflächen, welche mit Kalibriergeraden für die einzelnen Standard-Verdünnungen verglichen wurden. Zur Berechnung der Konzentrationen in den Proben wurden die Wiederfindungsraten des internen Standards α-Tocopherolacetat berücksichtigt. Der Vitamin-E-Gehalt wurde mit Hilfe der molaren Massen der Einzelverbindungen berechnet (Tab. A 7).

Die photometrische Konzentrationsbestimmung der Tocopherol- und Tocotrienol-Stammlösungen erfolgte in regelmäßigen Abständen mit Hilfe der adäquaten Absorptionsmaxima und spezifischen Extinktionskoeffizienten ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) (Tab. A 8). Die Konzentrationen wurden nach

$$\text{folgender Formel berechnet: } c \text{ [g/100 ml]} = \frac{E}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \times VF$$

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Tocopherole und Tocotrienole (Tab. A 9) wurden anhand des Basislinienrauschens festgelegt. Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 und für die Bestimmungsgrenze von 10:1 angenommen (KROMIDAS 1999).

3.7 *In-vitro*-Verdauung

Die *in-vitro*-Verdauung zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Carotinoiden wurde erstmals von GARRETT *et al.* (1999) beschrieben. REBOUL *et al.* (2006b) modifizierten die

Methode von GARRETT *et al.* aufgrund verschiedener unphysiologischer Parameter in der Originalmethode. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode von Reboul *et al.* angewandt, jedoch um eine simulierte Verdauung im Mund erweitert und leicht modifiziert.

Vor der **Verdauung** wurden die gekochten Nudeln in einer Labormühle zerkleinert und in 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen ($10,00 \pm 0,05$ g). Die Vorversuche zur Reproduzierbarkeit und Modifikation der Methode (siehe unten) wurden jeweils mit drei Verdauungsansätzen an einem Tag durchgeführt ($n = 3$). Nach erfolgter Methodenoptimierung wurden von jeder Probe an zwei unterschiedlichen Tagen jeweils drei Ansätze verdaut und analysiert ($n = 6$). Die einzelnen Verdauungsschritte sind detailliert in Abb. 15 dargestellt. Alle Lösungen wurden auf 37 ± 1 °C vorgewärmt. Nach Zugabe der Kochsalzlösung wurden die Proben mit Stickstoff überschichtet und in einem abgedunkelten Schüttler bei 200 U/min inkubiert. An die Verdauung mittels α -Amylase bei etwa neutralem pH-Wert schloss sich ein Aufschluss mit Pepsin bei pH 4 an. Die Verdauung, Emulgierung und Mizellenbildung im Duodenum (Zwölffingerdarm) wurde durch die Zugabe von Pankreatin und Galleextrakt (vom Schwein) bei einem pH-Wert von etwa 6,5-7,0 simuliert. Anschließend wurde der komplette Ansatz in 90-ml-Zentrifugengläser umgefüllt und der Kolben mit einer entsprechenden Menge HPLC-Wasser nachgespült, um ein Gesamtvolumen von 50 ml zu erreichen. Danach wurde die Probe 20 min bei 10 °C mit 4.500 U/min (≈ 3.900 g) zentrifugiert. Etwa 15 ml des wässrigen Überstandes wurden auf 1,5-ml-Tubes aufgeteilt und erneut zentrifugiert (5 min, 14.000 U/min, ≈ 15.800 g). Abschließend wurde die wässrige Phase mit den gemischten Mizellen durch einen Spritzenvorsatzfilter mit Polypropylen-Membran (0,2 μ m) filtriert, um anhaftende Öltröpfchen und Partikel abzutrennen. Aliquote von Filtrat und festem Rückstand wurden mit Stickstoff überschichtet und bis zur Analyse (innerhalb der nächsten 3 Tage) bei -25 °C eingefroren.

Die Ausgangsmethode ohne die erhöhte Menge an Galleextrakt wurde an drei verschiedenen Tagen auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geprüft. Anschließend wurden folgende Parameter der Durchführung modifiziert und hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E betrachtet:

- Zentrifugation zur Isolierung der Mizellenfraktion
- Filtration des Verdauungsüberstandes
- pH-Wert im Magen (pH 2)
- verlängerte Inkubationszeiten (Magen und Darm jeweils 1 h)
- Effektivität der erhöhten Menge an Galleextrakt
- Zugabe von 10 % Öl zur Probe

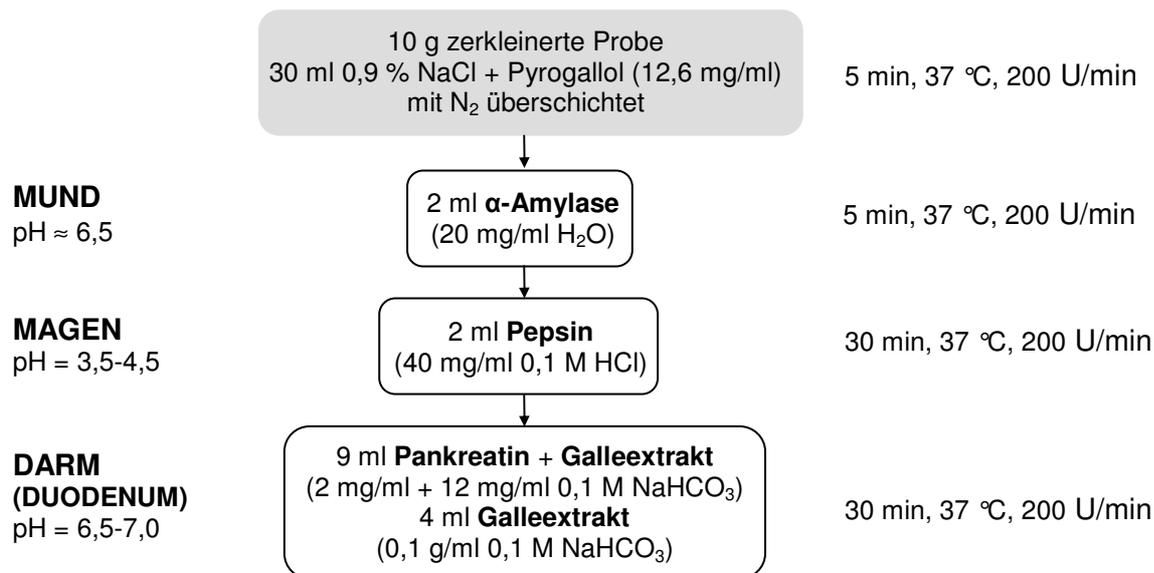


Abb. 15: Schematische Darstellung der simulierten Verdauungsschritte

Die **Extraktion** der gekochten Nudeln, Verdauungsrückstände und wässrigen Überstände erfolgte in Anlehnung an die Methode von BALZ *et al.* (1993). Diese wurde ausführlich im Kapitel 3.6.1.1 beschrieben. In Vorversuchen wurden die Überstände für jeden Verdauungsansatz doppelt extrahiert ($n = 6$ bei 3 Ansätzen pro Probe). Aufgrund der guten Übereinstimmung der Werte und des erheblichen Analysenaufwandes wurde der Überstand eines jeden Verdauungsansatzes anschließend einfach extrahiert. Zu etwa 5 g des wässrigen Überstandes wurden jeweils 20 μl α -Tocopherolacetat und (*all-E*)- β -apo-8'-Carotinal als interne Standards gegeben. Die Extraktion erfolgte durch 30 s Schütteln auf dem Vortex nach jeder Zugabe von jeweils 1 ml Ethanol, MtBE und Petrolether. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation mit 3.000 U/min (≈ 1.400 g) wurden die Überstände in Spitzkolben überführt und im Rotationsverdampfer bei 30-35 °C unter reduziertem Druck bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Ethanol gelöst (Ultraschallbad) und 5 min mit 14.000 U/min (≈ 15.800 g) zentrifugiert. Diese Lösung wurde zur HPLC-Analyse der Carotinoide verwendet. Für die Vitamin-E-Bestimmung wurden 500 μl der Lösung unter einem N_2 -Strom getrocknet. Der Rückstand wurde in 500 μl n-Hexan/MtBE (98/2, v/m) gelöst (Ultraschallbad) und vor der Analyse mit 14.000 U/min zentrifugiert. Von den gekochten Nudeln wurden 2 g, von den Verdauungsrückständen 3 g in Zentrifugenröhrchen eingewogen. Nach Zugabe von 2 ml Ethanol und 1 ml HPLC-Wasser wurden die Proben etwa 30 s mit dem Ultra-Turrax (Dispergierstab S25N-8G) homogenisiert. Der Stab wurde mit etwa 1,5 ml Ethanol abgespült (Pasteurpipette). Danach erfolgte die Zugabe beider interner Standards und die Extraktion mit MtBE und Petrolether wie für die wässrigen Überstände beschrieben.

Bei allen Verdauungsversuchen wurden die doppelten Mengen an Standard- und Probenlösungen in die HPLC-Apparatur injiziert, d. h. 40 μl für Vitamin E und 100 μl für Carotinoide.

Die Carotinoid-Standards wurden 1:100 verdünnt. Für die Vitamin-E-Analyse wurden nur die Standard-Verdünnungen 1:5000 bis 1:500 gemessen (siehe Anhang A.2).

Bei der **Berechnung** der Resorptionsverfügbarkeit wurde die Wiederfindung (WF) der Carotinoide bzw. Tocochromanole nach der simulierten Verdauung berücksichtigt. Somit wurde die Resorptionsverfügbarkeit (RV) der untersuchten Substanzen auf deren tatsächliche Gehalte im Testansatz und nicht auf den Gesamtgehalt in der Ausgangsprobe bezogen. RV stellt demzufolge den Anteil der Carotinoide und Tocochromanole im verdauten Testansatz dar, der für die Aufnahme in die Enterocyten zur Verfügung steht. Die Berechnungen erfolgten nach folgenden Formeln:

$$\text{WF [\%]} = \text{Gehalt in Rückstand + Überstand} \times 100 / \text{Gehalt in 10 g der unverdauten Probe}$$

$$\text{Verlust [\%]} = 100 - \text{WF}$$

$$\text{RV [\%]} = \text{Gehalt im Überstand} \times 100 / \text{Gehalt in Rückstand + Überstand}$$

3.8 Photometrische Bestimmung der Gelbpigmente

Der Gelbpigmentgehalt wurde nach der ICC-Standardmethode Nr. 152 bestimmt (ICC 1990). Diese ist anwendbar bei Grießen, Mehlen und Teigwaren (mit und ohne Ei). Der Gelbpigmentgehalt ist nach der Internationalen Gesellschaft für Getreidewissenschaft und -technologie (ICC) definiert als der Gehalt an extrahierbaren Carotinoiden des Endosperms. 10 g der gemahlene Probe wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 50 ml wassergesättigtem 1-Butanol klumpenfrei suspendiert. Die Kolben wurden über Nacht im Dunkeln stehen gelassen. Während der ersten Stunde wurden alle Kolben mehrmals geschüttelt. Nach 16-18 h wurde der Kolbeninhalt durch einen Faltenfilter filtriert und die Extinktion des Filtrates im Absorptionsmaximum gemessen. Die photometrische Bestimmung soll laut ICC-Standardmethode bei 440 nm gegen (*all-E*)- β -Carotin als Vergleichsstandard erfolgen. Da mittels HPLC Lutein als Hauptcarotinoid in den untersuchten Hartweizenproben nachgewiesen werden konnte, wurde (*all-E*)- β -Carotin durch (*all-E*)-Lutein als Referenzsubstanz ersetzt und die Extinktionsmessung bei 446 nm durchgeführt. Den der Extinktion des klaren Filtrates entsprechenden Lutein-Wert entnimmt man einer Kalibrierkurve (2,5-12,5 μg Lutein in 10 ml Lösung). Die Berechnung des Gelbpigmentgehaltes nach Formel 1 (ICC 1990) wurde um die Einwaage (EW) erweitert und erfolgte dementsprechend nach Formel 2.

$$(1) \text{ mg } \beta\text{-Carotin}/100 \text{ g TM} = \frac{a \times 5 \times 10}{1000} \times \frac{100}{100 - b} = \frac{a \times 5}{100 - b}$$

$$(2) \text{ mg Lutein}/100 \text{ g TM} = \frac{a \times 5 \times 10}{\text{EW} \times \text{TM}}$$

a = µg β-Carotin bzw. Lutein in 10 ml Extrakt (entspricht 2 g Probe) EW = Einwaage
 b = Feuchtigkeitsgehalt in % TM = Trockenmasse

3.9 Trockenmassebestimmung

Die Bestimmung der Trockenmasse (TM) erfolgte gravimetrisch nach Trocknung der Proben im Trockenschrank. Proben mit einem hohen Wassergehalt (z. B. gekochte Nudeln) wurden nach Vermischen mit Seesand getrocknet. Dafür wurden 30 g Seesand in Schalen eingewogen und 1 h im Trockenschrank vorgetrocknet. Nach dem Abkühlen der Schalen im Exsikkator wurden etwa 2 g der Probe eingewogen und mit dem Seesand verrührt. Trockene Proben (Grieß, rohe Nudeln etc.) wurden direkt in Schalen eingewogen (ohne Seesand). Die Trocknung bei 103 ± 1 °C erfolgte bis zur Massekonstanz. Nach der Abkühlung der Proben im Exsikkator wurde aus dem Rückstand der Trockenmassegehalt durch Differenzwägung ermittelt.

$$TM[\%] = \frac{RW - LG}{EW} \times 100$$

RW = Rückwaage nach dem Trocknen (Schale + Probe) in g
 EW = Einwaage der Probe in g
 LG = Leergewicht der Schale in g

3.10 Photometrische Bestimmung freier Aminosäuren

Aminosäuren in Hartweizen wurden nach Reaktion mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) photometrisch bestimmt. TNBS reagiert mit freien primären Aminogruppen von Aminosäuren und Peptiden unter leicht alkalischen Bedingungen zu Trinitrophenyl-Derivaten (Abb. 16). Die Durchführung erfolgte nach der Methode von SASHIDHAR *et al.* (1994), die die Methode von HABEEB *et al.* (1966) modifizierten, indem sie statt einer 0,1 %igen TNBS-Lösung nur 0,01 % TNBS einsetzten.

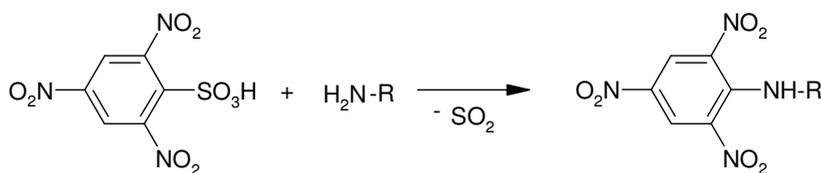


Abb. 16: Reaktion von TNBS mit einer Aminogruppe

Die Extraktion der Aminosäuren mit 3 ml Ethanol/0,1 M HCl (1/1, v/v) aus etwa 1 g Probe erfolgte durch Schütteln auf dem Reagenzglasschüttler. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation mit 5.000 U/min (≈ 3.900 g) wurde der Überstand in einen 10-ml-Maßkolben überführt.

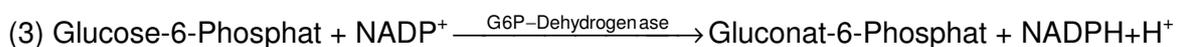
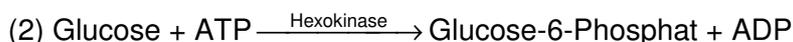
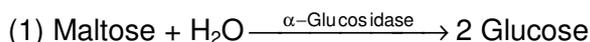
Die Extraktion wurde zweimal wiederholt. Vor der Analyse wurden die Proben nochmals wie vorher beschrieben zentrifugiert und 1:50 mit Ethanol/0,1 M HCl (1/1, v/v) verdünnt.

Als Referenzsubstanz diente L-Glutaminsäure (Glu), da sie die mengenmäßig bedeutendste Aminosäure in Hartweizen ist (TOEPFER *et al.* 1972, ABDEL-AAL und HUCL 2002, GARCIA DEL MORAL *et al.* 2007). Zur Kalibrierung wurden Lösungen von 2-20 µg/ml Ethanol/0,1 M HCl (1/1, v/v) eingesetzt.

Jeweils 1 ml der Probenextrakte, Glu-Standardlösungen sowie des Blindwertes (Extraktionsmittel) wurden mit je 1 ml 4 %iger Natriumcarbonat-Lösung und 0,01 %iger TNBS-Lösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 40 ± 1 °C (Wasserbad) wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M HCl beendet. Um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen und eine Ausfällung zu verhindern, erfolgte außerdem eine Zugabe von 1 ml 10 %iger SDS-Lösung. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, erfolgte die Messung der Extinktion bei 335 nm. Die Summe an freien Aminosäuren wurde über die Kalibriergerade berechnet und als g Glu/100 g TM angegeben.

3.11 Photometrische Zuckerbestimmung

Die photometrische Messung der Maltose- und Glucosekonzentration erfolgte nach der Vorschrift der Boehringer Mannheim GmbH (Boehringer Mannheim GmbH 1984). Die Bestimmungsmethode beruht auf der enzymatischen Spaltung von Maltose in Glucose (1) und anschließender Phosphorylierung unter ATP-Verbrauch (2). Bei der folgenden Oxidationsreaktion entsteht NADPH aus NADP^+ (3). Die gebildete NADPH-Menge ist der halben Maltose-Menge äquivalent und kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden.



Zur Extraktion der Kohlenhydrate wurde 0,5 g Probe mit 3 ml HPLC-Wasser auf dem Reagenzglasschüttler gemischt. Nach einer Zentrifugation von 5 min mit 5.000 U/min (≈ 3.900 g) wurde der Überstand in einen 10-ml-Maßkolben überführt. Nach zwei weiteren Extraktionsschritten wurde dieser auf 10 ml aufgefüllt und die Lösung nochmal zentrifugiert. Zur Analyse wurde der Extrakt 1:2 mit HPLC-Wasser verdünnt.

Die Analyse erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

in Küvetten pipettieren	Leerwert	Glucose-Probe	Maltose-Probe
Acetat-Puffer (pH 6,6)	0,20 ml	-	0,20 ml
Probe	-	0,10 ml	0,10 ml
α -Glucosidase	0,02 ml	-	0,02 ml
mischen, 20 min bei 20-25 °C stehen lassen			
Triethanolamin-Puffer (pH 7,6)	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Wasser	1,58 ml	1,70 ml	1,48 ml
NADP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
ATP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
mischen, nach ca. 3 min Extinktionen (E_1) messen			
HK/G6P-DH	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
mischen, nach ca. 10-15 min (Stillstand der Reaktion) Extinktionen (E_2) messen			

Von den Extinktionsdifferenzen ($E_2 - E_1$) der Proben wurde die Extinktionsdifferenz des Leerwertes abgezogen. $\Delta E_{\text{Maltose}}$ ergibt sich aus der Differenz zwischen $\Delta E_{\text{Gesamtglucose}}$ (aus Maltoseprobe) und $\Delta E_{\text{Glucose}}$ (aus Glucoseprobe). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\text{Maltose: } c \text{ [g/l]} = 5,169 \times \frac{\Delta E_{\text{Maltose}}}{\varepsilon} \qquad \text{Glucose: } c \text{ [g/l]} = 5,441 \times \frac{\Delta E_{\text{Glucose}}}{\varepsilon}$$

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm = $6,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

3.12 Nachweis freier Fettsäuren mittels Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Trennung der Fettextrakte erfolgte als Nachweis der Fettverdauung im *in-vitro*-Modell. Eine reine Hartweizenteigware (gekocht) wurde in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen ($10,00 \pm 0,05 \text{ g}$) und mit 1 g Rapsöl versetzt. Die simulierte Verdauung erfolgte wie in Kapitel 3.7 beschrieben. Parallel dazu wurde zu einer unverdauten Probe (ebenfalls 10 g) 1 g Rapsöl gegeben. Beide Proben wurden gefriergetrocknet (siehe Kapitel 3.1) und gemahlen. Aus jeweils 3 g Probe wurden mit je 140 ml Petrolether die Fette mittels Soxhlet-Apparatur (Soxtherm) extrahiert. Die Soxtherm-Parameter wurden wie folgt eingestellt:

Extraktionstemperatur:	150 °C	Lösungsmittelabsenkung A:	5 x 15 ml
Grenztemperatur:	200 °C	Lösungsmittelabsenkung B:	8 min
Kochzeit:	30 min	Lösungsmittelabsenkung C:	5 min
Extraktionszeit:	90 min	Lösungsmittelabsenkung Intervall:	3 min
		Lösungsmittelabsenkung Impuls:	3 s

Der verbleibende Petrolether wurde im Trockenschrank abgedampft. Nach dem Abkühlen der Extrakte im Exsikkator konnte die resultierende Fettmenge gewogen werden. Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde eine 0,1-%-ige Lösung hergestellt, indem jeweils 25 mg der extrahierten Fette aus beiden Proben in 2,5 ml Chloroform gelöst wurden. Von dieser Lösung wurden 200 µl in einem 5 cm breiten Streifen auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen. Parallel dazu wurden 5 µl eines Mischstandards (60 mg/ml) als Punkt auf die Platte gebracht. Die Trennung erfolgte mit einem Gemisch aus n-Hexan/Diethylether/Eisessig (80/20/1, v/v/v) innerhalb von 30 min. Die Entwicklung der Banden wurde durch das Besprühen der Platte mit 2,7-Dichlorfluoreszein (0,2 % in Ethanol) erreicht. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

3.13 Statistische Datenauswertung

Die Analysen wurden in der Regel mindestens als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Abweichungen hiervon sind an entsprechender Stelle angegeben. Mittelwerte (Mw), Standardabweichungen (SD) und Variationskoeffizienten wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft Office 2000 und Office XP) berechnet. Zur Beurteilung der Streuung innerhalb einer Dreifachbestimmung wurde der Variationskoeffizient herangezogen. Lag dieser deutlich über 10 %, wurde die Analyse wiederholt. In allen Tabellen sind $Mw \pm SD$ angegeben. In Diagrammen sind die Mittelwerte und die dazu gehörigen Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt. Die statistische Datenauswertung wurde mittels SPSS 14.0 und 17.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt. Für die Korrelationsrechnung nach PEARSON lag das Signifikanzniveau (p) bei 0,01. Für den Vergleich von Mittelwerten wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt. Paarweise Vergleiche erfolgten mittels t-Test nach STUDENT. Unabhängige Stichproben ($n > 2$) wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet. Die Ermittlung der Varianzgleichheit erfolgte nach dem LEVENE-Test. Bei einer Inhomogenität der Varianzen wurden die multiplen Vergleiche mit dem Post-hoc-Test nach GAMES-HOWELL durchgeführt. Bei homogenen Varianzen schloss sich an die ANOVA der Post-hoc-Test nach STUDENT-NEWMAN-KEULS (S-N-K) an.

4 ERGEBNISSE

4.1 Isolierung und Aufreinigung von Lutein und Zeaxanthin mittels präparativer HPLC

Für die Isomerisierungsversuche wurden größere Mengen an Standardsubstanzen benötigt. Mit Hilfe einer präparativen YMC-C₃₀-Säule wurden Lutein und Zeaxanthin aus Maismehl vorisoliert (Abb. 17 B). Beide Fraktionen wurden anschließend weiter aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3). Auch die Abtrennung von geringen Zeaxanthinmengen aus kommerziell erhältlichen Lutein-Standards gelang mit reinem Methanol als Fließmittel bei Temperaturen zwischen 20 und 25 °C.

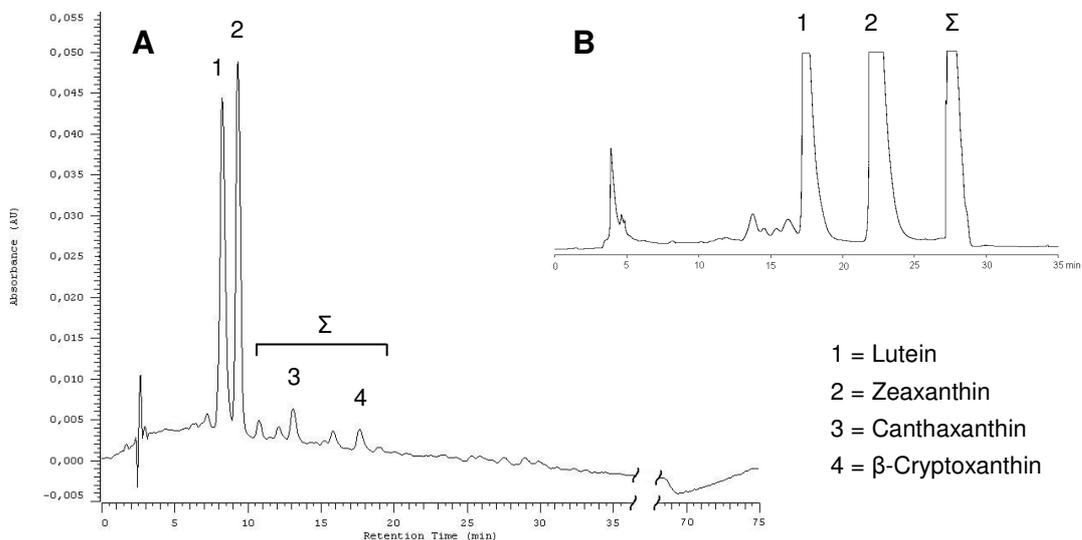


Abb. 17: HPLC-Chromatogramm der Carotinoide in Maismehl (Trentec PEEK-C₃₀-Analysesäule, Gradientenmethode 1) (A) sowie Trennung der Carotinoid-Fractionen mittels präparativer YMC C₃₀-Säule (B)

Die HPLC-Bedingungen sind in den Kapiteln 3.5.2.1 und 3.3 beschrieben.

4.2 Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin

4.2.1 Thermische Isomerisierung

Bei der Isomerisierung im Trockenschrank erwiesen sich beide Carotinoide hinsichtlich Isomerisierungsreaktionen gegenüber einer Temperatur von 100 °C als erstaunlich stabil. Relevante Mengen an (Z)-Isomeren entstanden erst bei einer längeren Temperatureinwirkung von 8 h. Die Abnahme der Gesamtflächeneinheiten für Lutein und Zeaxanthin verringerte sich jedoch kontinuierlich im Laufe der Erhitzungsdauer (Daten nicht gezeigt). Bei einer

Temperatur von 140 °C fand die Bildung von (*Z*)-Isomeren beider Xanthophylle bereits bei einer kürzeren Erhitzung statt. Die Verhältnisse von (*all-E*)- zu (*Z*)-Isomeren verschoben sich mit steigender Dauer der Hitzeeinwirkung immer stärker zugunsten der (*Z*)-Isomere. (Abb. 18). Nach einer 8-stündigen Isomerisierung lagen etwa gleiche Anteile von (*all-E*)-Isomeren und Gesamt-(*Z*)-Isomeren beider Xanthophylle vor (Abb. 19). Bei längerer Isomerisierung waren jedoch auch deutliche Verluste beider Verbindungen zu verzeichnen. Nach 8 h bei 140 °C war der Gehalt an Gesamt-Lutein auf 46 %, der des Gesamt-Zeaxanthins auf 57 % des Ausgangsgehaltes gesunken.

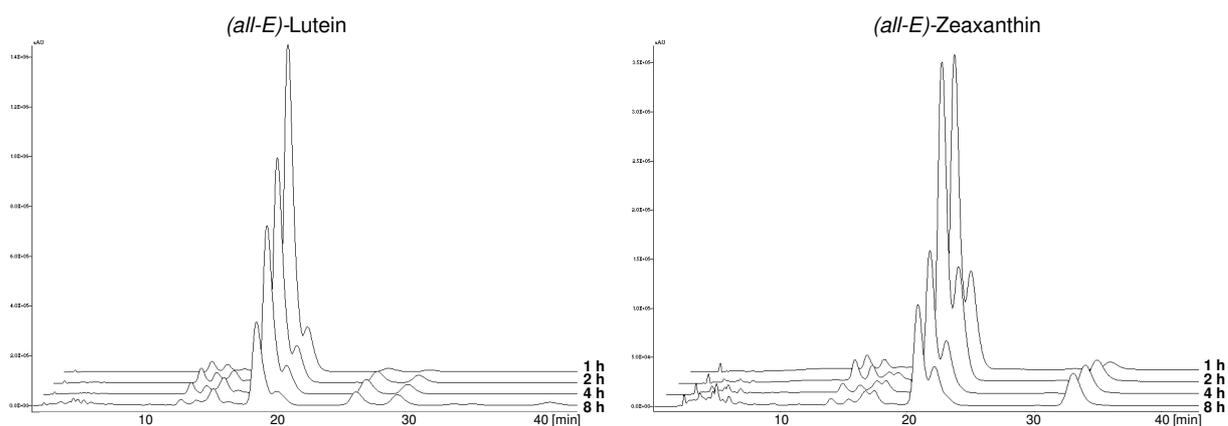


Abb. 18: HPLC-Chromatogramme von isomerisierten Lutein-Standards (links) und Zeaxanthin-Standards (rechts) nach unterschiedlicher Erhitzungsdauer bei 140 °C

Trentec PEEK-C₃₀-Analysensäule, HPLC-Bedingungen sind im Kapitel 3.5.2.2 beschrieben. Hauptpeaks = (*all-E*)-Isomer, kleinere Peaks mit Retentionszeiten > 10 min = (*Z*)-Isomere

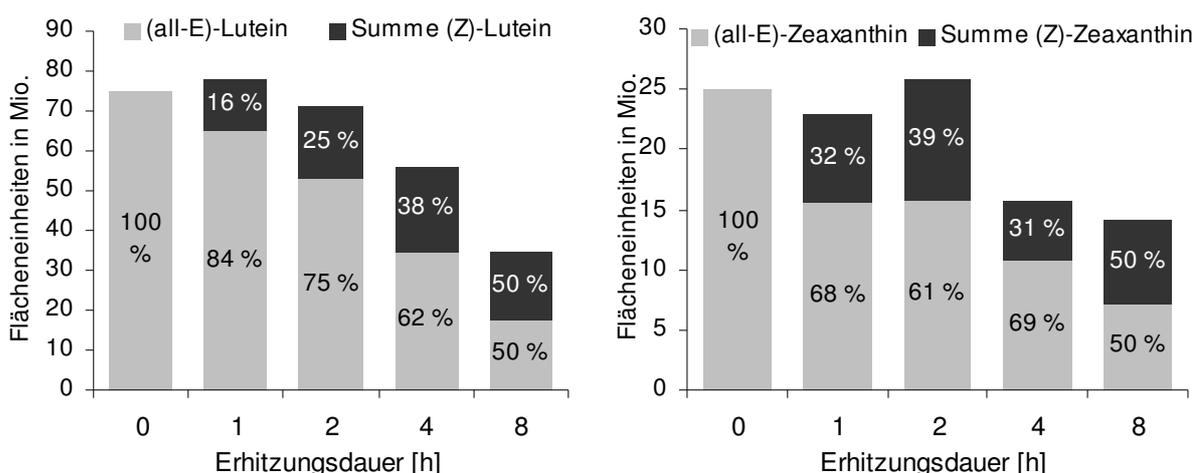


Abb. 19: Veränderung der (*E*)/(*Z*)-Verhältnisse [%] von Lutein (links) und Zeaxanthin (rechts) in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer bei 140 °C im Trockenschrank

4.2.2 Photo-Iod-Isomerisierung

Bei der Isomerisierung von Lutein- und Zeaxanthin-Standards mit Hilfe von Iod und gleichzeitiger Belichtung entstanden prinzipiell die gleichen (*Z*)-Isomere wie bei der thermischen Isomerisierung im Trockenschrank. Mit steigender **Iodmenge** nahmen bei beiden Standardsubstanzen sowohl die Anzahl der gebildeten (*Z*)-Isomere sowie deren Peakflächen zu. Zeaxanthin war gegenüber der Photo-Iod-Isomerisierung wesentlich empfindlicher als Lutein. Beim Einsatz gleicher Mengen (50 µl) an Iodlösung (0,4 mg/ml n-Hexan) wurde ein wesentlich höherer Verlust an Gesamt-Zeaxanthin als an Gesamt-Lutein registriert (Abb. 20). Außerdem traten vermehrt Peaks bei Retentionszeiten < 10 min auf, die anhand ihrer PDA-Absorptionsspektren nicht als (*Z*)-Isomere identifiziert werden konnten. Die Elution von Oxidationsprodukten des Zeaxanthins im vorderen Chromatogrammbereich erschien plausibel. Zur effektiven Isomerisierung von Zeaxanthin reichten wesentlich geringere Iodmengen als für Lutein. Die **Belichtungsdauer** schien einen geringeren Einfluss auf die Isomerisierung zu haben als die Iodmenge. Das Isomerenmuster änderte sich in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer nicht. Die Menge der (*Z*)-Isomere der beiden Xanthophylle nahm jedoch leicht zu, während die Summe der Peakflächen, vor allem für Lutein, abnahm. Hierfür spielt jedoch sicherlich auch die längere Reaktionszeit mit dem Iod eine Rolle. Bereits bei kurzen Reaktionszeiten von 10 min wurden in Abhängigkeit von der Iodmenge hohe Verluste beider Xanthophylle beobachtet. Der Gesamt-Luteingehalt der isomerisierten Lösung sank je nach eingesetzter Iodmenge und Belichtungsdauer auf 35-51 %, der des Gesamt-Zeaxanthins sogar auf 11-72 % des Ausgangsgehaltes.

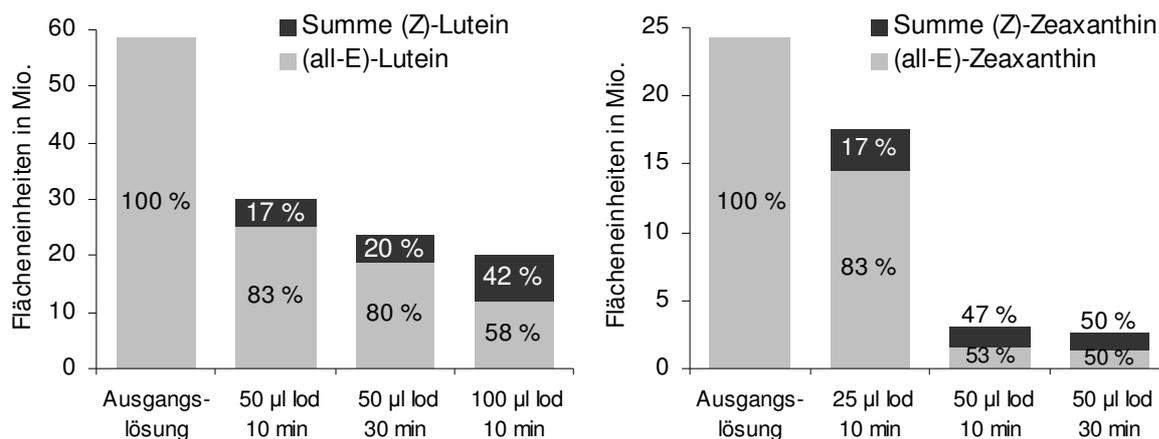


Abb. 20: Veränderung der (*E*)/(*Z*)-Verhältnisse [%] von Lutein (links) und Zeaxanthin (rechts) in Abhängigkeit von der verwendeten Menge einer Iodlösung (0,4 mg/ml) und der Belichtungsdauer

4.3 Charakterisierung von Carotinoiden in Hartweizen

Neben (*all-E*)-Lutein und (*all-E*)-Zeaxanthin wurden in Hartweizen und daraus hergestellten Teigwaren weitere Verbindungen in geringerer Konzentration gefunden (Abb. 21 A). Die Vermutung lag nahe, dass es sich hierbei um (*Z*)-Isomere der beiden Xanthophylle handeln könnte. Daher wurden die HPLC-Chromatogramme der Proben mit denen von isomerisierten Standardsubstanzen verglichen (Abb. 21 B und C).

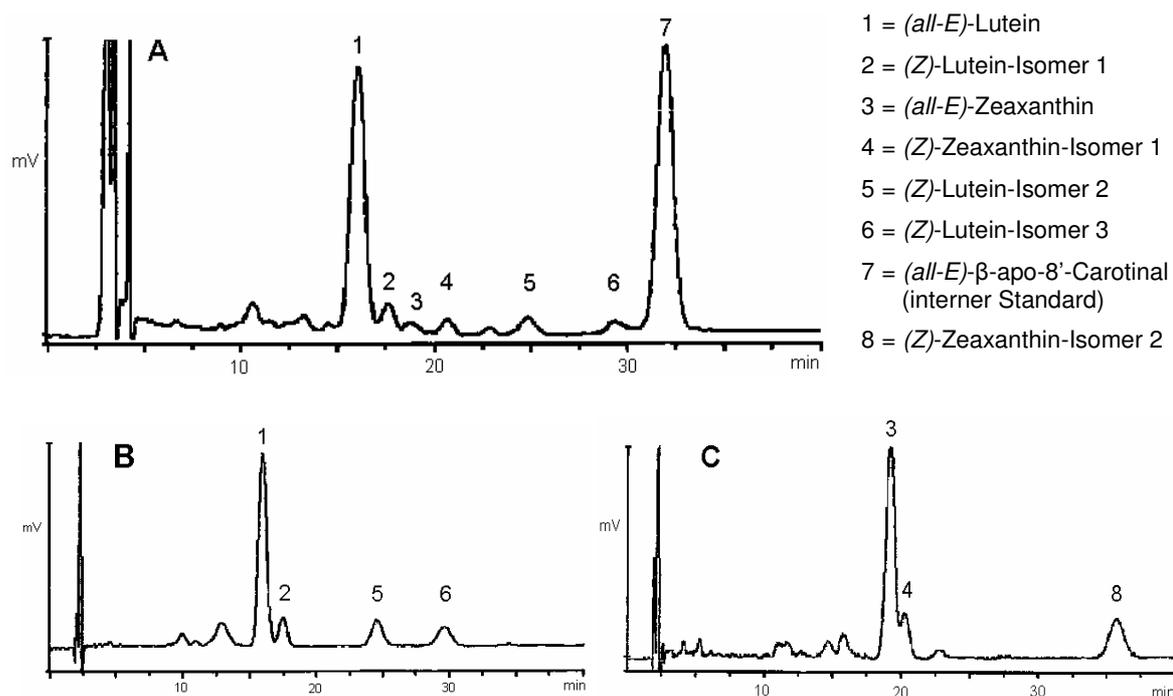


Abb. 21: HPLC-Chromatogramm der Hartweizensorte Prowidur (**A**) im Vergleich zu einem photo-Iod-isomerisierten Lutein-Standard (**B**) und Zeaxanthin-Standard (**C**)

Trentec Vertex-C₃₀-Analysensäule, HPLC-Bedingungen sind im Kapitel 3.5.2.2 beschrieben.

Tatsächlich ergaben sich Übereinstimmungen zwischen den Retentionszeiten (t_R) der unbekannt Verbindungen und denen der (*Z*)-Isomere der isomerisierten Standards. Um Rückschlüsse auf die Identität dieser Verbindungen ziehen zu können, wurden die PDA-Absorptionsspektren der Proben und der isomerisierten Standards verglichen. Des Weiteren wurden massenspektroskopische Messungen von Teigwaren und isomerisierten Standardsubstanzen durchgeführt.

4.3.1 UV-vis-Spektroskopie

Die Absorptionsspektren der einzelnen Verbindungen wurden mittels PDA-Detektor während der HPLC-Analyse Methanol/Wasser (97/3, v/v) aufgezeichnet. Die PDA-Spektren der ther-

misch isomerisierten Lutein- und Zeaxanthin-Standards sind in Abb. 22 und Abb. 23 dargestellt.

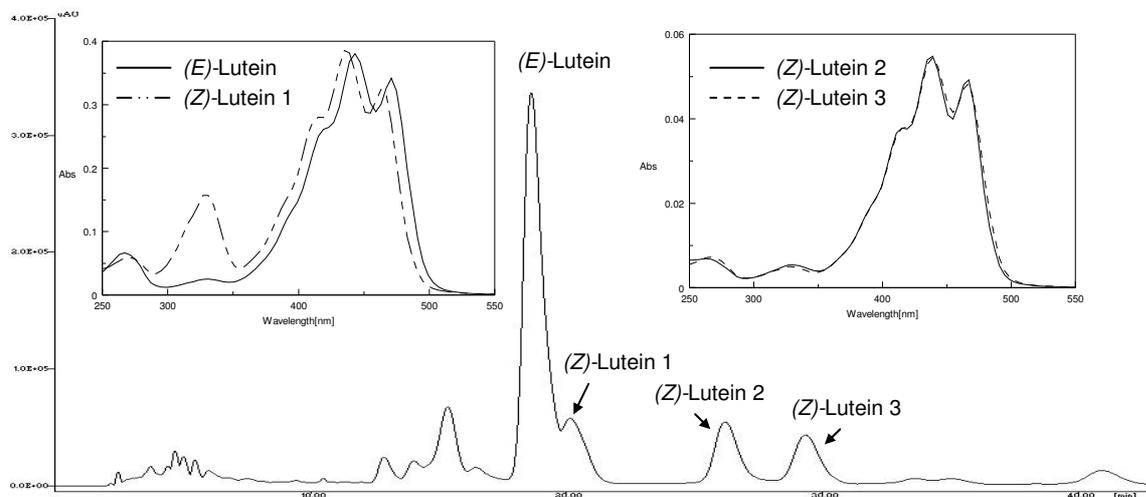


Abb. 22: HPLC-Chromatogramm eines isomerisierten Lutein-Standards (140 °C, 8 h) und PDA-Absorptionsspektren der für Hartweizen und Teigwaren relevanten Isomere Trentec PEEK-C₃₀-Analysensäule, HPLC-Bedingungen sind im Kapitel 3.5.2.2 beschrieben.

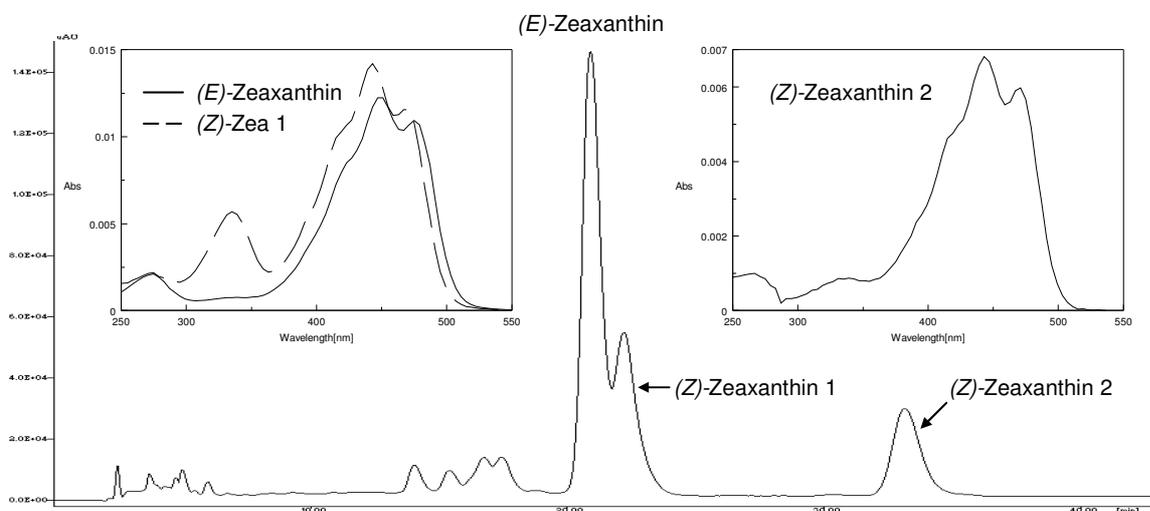


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm eines isomerisierten Zeaxanthin-Standards (140 °C, 4 h) und PDA-Absorptionsspektren ausgewählter Isomere Trentec PEEK-C₃₀-Analysensäule, HPLC-Bedingungen sind im Kapitel 3.5.2.2 beschrieben.

Die Absorptionsspektren der entsprechenden Lutein- und Zeaxanthinisomere einer Teigware ähnelten denen der isomerisierten Standards. Aufgrund der teilweise sehr geringen Gehalte in der Probe und der Effekte der Probenmatrix wiesen jedoch vor allem die Spektren der Zeaxanthin-Isomere eine geringe Feinstruktur auf und waren daher schlecht auszuwerten (Abb. 61).

Zur Identifizierung der einzelnen Verbindungen wurden aus den PDA-Absorptionsspektren der isomerisierten Lutein- und Zeaxanthin-Standards die Wellenlängen der Absorptionsmaxima ermittelt und daraus charakteristische Daten wie das Verhältnis % III/II und ϵ_2/ϵ_1 (siehe Abb. 52, Seite 95) berechnet (Tab. 9).

Tab. 9: UV-vis-spektroskopische Daten zur Identifizierung der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere (im HPLC-Eluenten bestimmt (MeOH/H₂O, 97/3, v/v))

Peak ^A	Bezeichnung	λ_{\max} ^B	% III/II	ϵ_2/ϵ_1	vermutete Konfiguration
1	(<i>all-E</i>)-Lutein	331, 419, 443 , 471	59	0,066	
2	(<i>Z</i>)-Lutein-Isomer 1	331, 415, 435 , 463	38	0,412	(1 <i>Z</i>) u./o. (1' <i>Z</i>)
5	(<i>Z</i>)-Lutein-Isomer 2	327, 415, 439 , 467	63	0,100	(9 <i>Z</i>)
6	(<i>Z</i>)-Lutein-Isomer 3	327, 415, 439 , 467	55	0,092	(9' <i>Z</i>)
3	(<i>all-E</i>)-Zeaxanthin	331, 423, 447 , 475	30	0,061	
4	(<i>Z</i>)-Zeaxanthin-Isomer 1	335, 423, 443 , 467	11	0,401	(1 <i>Z</i>)
8	(<i>Z</i>)-Zeaxanthin-Isomer 2	331, 419, 443 , 471	35	0,126	(9 <i>Z</i>)

^A Nummerierung analog zu Abb. 21

^B Hauptmaximum fett gedruckt

4.3.2 Massenspektroskopie

Lutein- und Zeaxanthinstandards wurden zunächst im Full-Scan-Modus ($m/z = 400-700$) gemessen. In dem Massenspektrum des (*all-E*)-Zeaxanthins dominierte das Quasimolekülion $[M+H]^+$ mit $m/z = 569,5$. Daneben wurde hauptsächlich ein protoniertes Fragment der Masse 551,5 detektiert. Das Massenspektrum von (*all-E*)-Lutein zeigte hauptsächlich das Fragment mit einer Masse von 551,5. Das Quasimolekülion mit einer Masse von 569,5 wurde dagegen nur in sehr geringer Konzentration detektiert (Abb. 24).

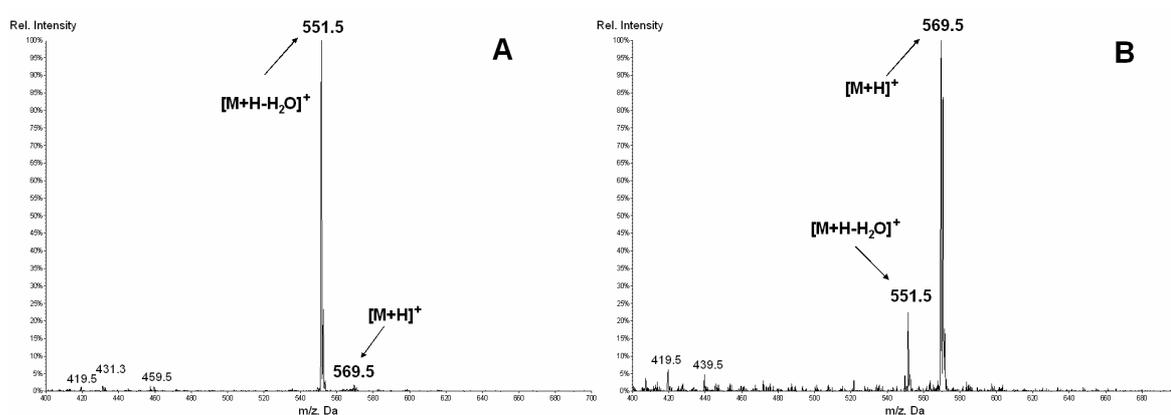


Abb. 24: Massenspektren von (*all-E*)-Lutein (A) und (*all-E*)-Zeaxanthin (B)

Diesen Ergebnissen zufolge wurde für die Identifizierung von Zeaxanthin die Masse von 569,5 und für Lutein die Masse von 551,5 herangezogen. Die vorgenommene Zuordnung der

Probenpeaks zu den jeweiligen Lutein- und Zeaxanthin-Isomeren (siehe Abb. 21) konnte durch die anschließenden MS-Messungen im SIM-Modus bestätigt werden (Abb. 25). Bei den bisher nicht identifizierten Verbindungen mit t_R zwischen 10 und 18 min könnte es sich den MS-Messungen zufolge ebenfalls um (*Z*)-Lutein-Isomere handeln (Abb. 25 A).

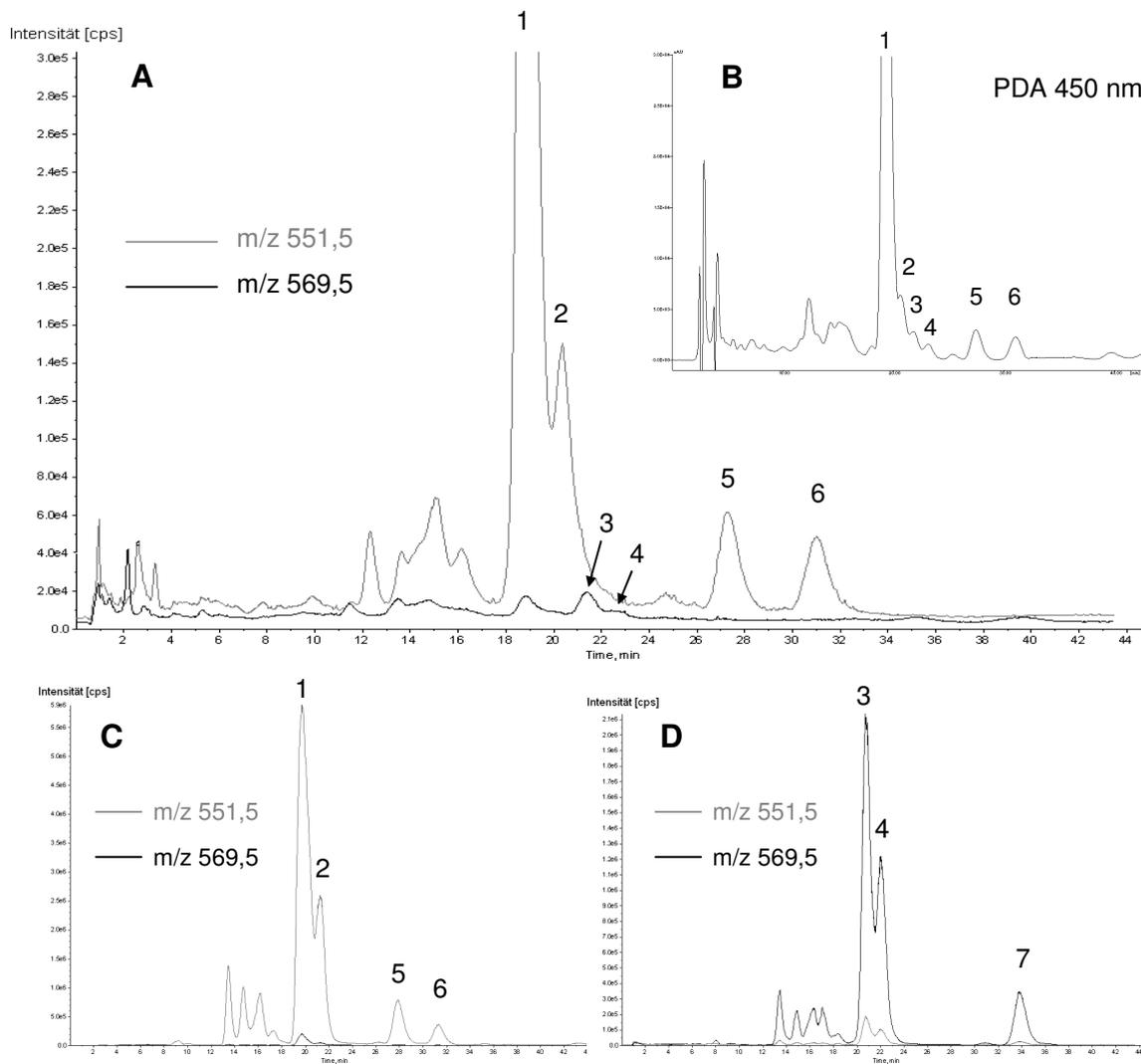


Abb. 25: Extracted Ion Chromatogram (XIC) einer Teigware (A), eines isomerisierten Lutein-Standards (C) und Zeaxanthin-Standards (D) im Vergleich zu einem PDA-Chromatogramm einer Teigware bei 450 nm (B)

Trentec PEEK-C₃₀-Analysensäule, HPLC-Bedingungen sind im Kapitel 3.5.2.2 beschrieben. Die Isomerisierung der Standards erfolgte bei 140 °C im Trockenschrank (3 h).

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 = (<i>all-E</i>)-Lutein | 5 = (<i>Z</i>)-Lutein-Isomer 2 |
| 2 = (<i>Z</i>)-Lutein-Isomer 1 | 6 = (<i>Z</i>)-Lutein-Isomer 3 |
| 3 = (<i>all-E</i>)-Zeaxanthin | 7 = (<i>Z</i>)-Zeaxanthin-Isomer 2 |
| 4 = (<i>Z</i>)-Zeaxanthin-Isomer 1 | |

4.4 Extrahierbarkeit von Carotinoiden

4.4.1 Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen

Die Annahme einer unvollständigen Extraktion von Carotinoiden aus Hartweizen beruhte auf dem deutlichen Unterschied zum photometrisch bestimmten Gelbpigmentgehalt. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide untersucht. Zum Vergleich verschiedener Modifikationen der Extraktion aus Hartweizen wurde in der Regel der Carotinoidgehalt als Summe aus Lutein und Zeaxanthin, inklusive der (Z)-Isomere, betrachtet. Einige Versuche wurden nur als Doppelbestimmungen durchgeführt, welche an entsprechender Stelle gekennzeichnet sind. Die Analysen zur Abhängigkeit der Carotinoidgehalte von der Einweichzeit mit dem Lösungsmittel sind aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit nur Einzelmessungen und konnten somit keiner statistischen Auswertung unterzogen werden.

Die ersten beiden der folgenden Abschnitte zum Einfluss der Einweichens mit Lösungsmittel sowie des Schüttelns enthalten teilweise Ergebnisse der Diplomarbeit der Autorin. Sie sollen in der vorliegenden Arbeit jedoch zur vollständigen Darstellung der Thematik dienen.

Einweichen der Proben mit Lösungsmittel

Für die Hartweizensorte Prowidur aus dem Erntejahr 2001 wurde ein höherer Carotinoidgehalt ermittelt, wenn die Proben einige Stunden mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) stehen gelassen wurden als bei einer sofortigen Extraktion mittels Ultra-Turrax. Daher wurde zunächst der Carotinoidgehalt in Abhängigkeit von der Einweichzeit bestimmt, um Rückschlüsse auf die optimale Standzeit mit dem Extraktionsmittel ziehen zu können. Ein maximaler Luteingehalt im Extrakt war erst nach einer Standzeit von 24 h bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) messbar (Abb. 26). Eine Einweichzeit von 24 h vor der Extraktion am Ultra-Turrax ergab für drei untersuchte Hartweizensorten etwa doppelt so hohe Carotinoidgehalte wie bei einer sofortigen Extraktion (Abb. 27). Derart lange Standzeiten machten den Zusatz von BHT (0,1 %) zum Extraktionsmittel unverzichtbar (Tab. A 10).

Schütteln während des Einweichens mit Lösungsmittel

Ein permanentes Schütteln der Probe mit dem Lösungsmittel während der ersten 4 h vor der Extraktion am Ultra-Turrax brachte keine nennenswerte Verbesserung der Extrahierbarkeit der Carotinoide (Tab. A 11). Aus einer 3-stündigen Einweichzeit im Schüttelwasserbad resultierte ein ähnlicher Carotinoidgehalt im Extrakt (0,205 mg/100 g TM) wie nach der gleichen Standzeit ohne Schütteln (0,197 mg/100 g TM).

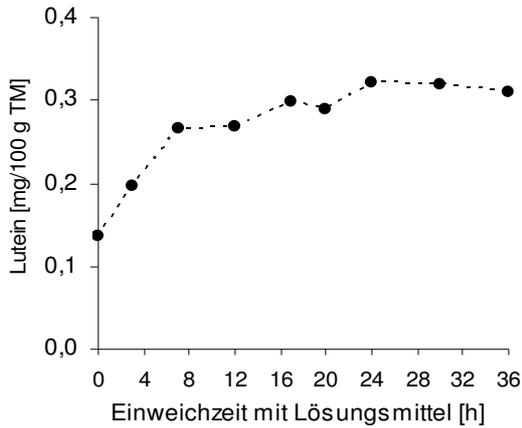


Abb. 26: Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Dauer des Einweichens mit Lösungsmittel bei Raumtemperatur

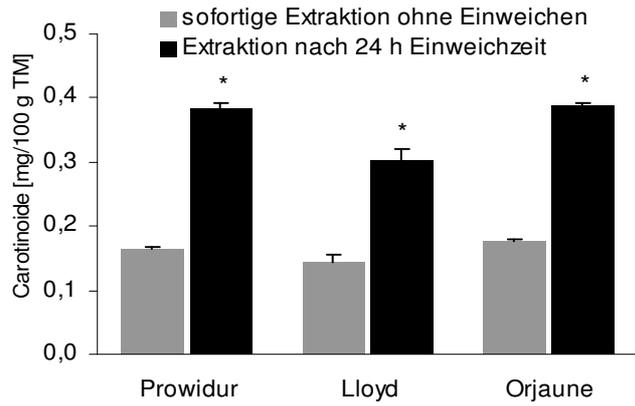


Abb. 27: Carotinoidgehalte von drei Hartweizensorten nach Extraktion ohne und mit vorherigem Einweichen mit Lösungsmittel

* signifikanter Unterschied zwischen den Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test)

Temperatur

Vor der Extraktion mittels Ultra-Turrax wurden die Proben mit dem Lösungsmittelgemisch bei unterschiedlichen Temperaturen eingeweicht. Die Erhöhung der Temperatur auf 30 °C während des 24-stündigen Einweichens mit dem Lösungsmittel erhöhte den Carotinoidgehalt im Extrakt nochmal um etwa 10 % im Vergleich zum Einweichen bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C). Ein Einweichen bei 35 °C hatte keine weitere Steigerung der Extrahierbarkeit der Carotinoide zur Folge (Abb. 29). Bei beiden Temperaturen wurde die maximale Extraktionsausbeute bereits nach 12-16 h erreicht. Eine darüber hinaus gehende Standzeit mit dem Extraktionsmittel hatte keinen Effekt auf den Carotinoidgehalt des Extraktes (Abb. 28).

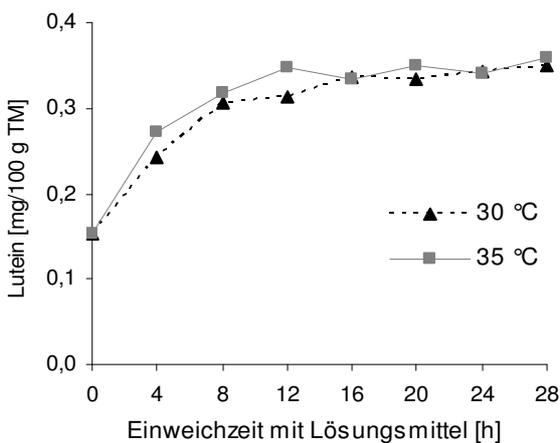


Abb. 28: Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Einweichzeit mit Lösungsmittel bei 30 °C und 35 °C

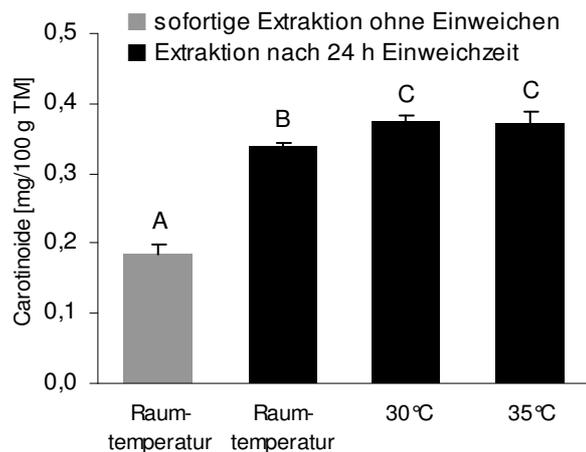


Abb. 29: Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit vom Einweichen mit Lösungsmittel

Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K).

Quellung der Proben mit Wasser vor der Extraktion mit Lösungsmittel

Um die Probenmatrix aufzuquellen und den Hartweizen so besser zugänglich für die organischen Lösungsmittel zu machen, wurden die Proben vor der Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) mit HPLC-Wasser versetzt. Die optimale Wassermenge zur Quellung der Proben (5 g) vor der Lösungsmittelextraktion wurde auf 5 ml festgelegt. Eine geringere Wassermenge (3 ml) reichte für eine vollständige Benetzung nicht aus. Die resultierende Klümpchenbildung machte die Probe schlecht zugänglich für das Lösungsmittelgemisch und führte demzufolge zu einer unvollständigen Extraktion (Tab. 10). Eine höhere Wassermenge reduzierte die Wiederfindungsrate des internen Standards und verursachte eine hohe Streuung der Einzelwerte. Außerdem erschwerte der hohe Wasseranteil das Eindampfen des Extraktionsmittels im Rotationsverdampfer. Bei einer Wassermenge von 10 ml war keine vollständige Trocknung des Extraktes möglich, so dass dieser nicht analysiert werden konnte.

Tab. 10: Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der eingesetzten Wassermenge zur Quellung der Probe (n = 2)

Carotinoidgehalt [mg/100 g TM] nach Quellung mit einer Wassermenge von		
3 ml	5 ml	7 ml
0,314 ± 0,015 ^A	0,371 ± 0,016 ^A	0,399 ± 0,049 ^A

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant (p > 0,05, ANOVA, S-N-K).

In der Praxis hat sich eine Quellung der Proben mit Wasser vor der Lösungsmittelextraktion für 5-30 min bewährt. Für eine **Quellungsdauer** bis 2 h wurde kein signifikanter Unterschied im Carotinoidgehalt des Extraktes gefunden (Tab. 11). Eine Quellung von 4 h resultierte in einem reduzierten Carotinoidgehalt.

Tab. 11: Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Quellungsdauer (n = 2)

Carotinoidgehalt [mg/100 g TM] nach einer Quellungsdauer von				
5 min	30 min	1 h	2 h	4 h
0,392 ± 0,005 ^A	0,404 ± 0,006 ^A	0,379 ± 0,016 ^{A,B}	0,398 ± 0,015 ^A	0,354 ± 0,005 ^B

Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (p < 0,05, ANOVA, S-N-K).

Neben der Quellungsdauer wurde auch der Einfluss der **Temperatur** untersucht. Eine 30-minütige Quellung des Hartweizens mit Wasser bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) ergab tendenziell den höchsten Carotinoidgehalt. Die bei 30 °C und 40 °C ermittelten Gehalte unterschieden sich nicht signifikant von der Quellung bei Raumtemperatur. Durch eine Quellung der Probe bei 60 °C wurde der Carotinoidgehalt im Extrakt hingegen signifikant reduziert (Tab. 12).

Tab. 12: Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Quellungs-
temperatur

Carotinoidgehalt [mg/100 g TM] nach Quellung mit Wasser bei			
RT (22 ± 2 °C)	30 °C	40 °C	60 °C
0,379 ± 0,014 ^A	0,367 ± 0,017 ^{A,B}	0,357 ± 0,006 ^{A,B}	0,346 ± 0,008 ^B

Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K).

Abschließend wurde die Extraktion mit den optimierten Quellungsbedingungen (5 ml Wasser/ 5 g Probe, 5-30 min, RT) hinsichtlich der **Reproduzierbarkeit** der Analysenergebnisse geprüft. Der mittlere Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur aus jeweils sechs Extraktionen an zwei verschiedenen Tagen betrug $0,325 \pm 0,016$ mg/100 g TM und $0,321 \pm 0,007$ mg/100 g TM. Die relative Streuung der Einzelwerte innerhalb eines Analysetages lag demzufolge bei 5,1 % und 2,3 %. Die an zwei Tagen ermittelten Carotinoidgehalte waren nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$, t-Test).

Partikelgröße

Die Carotinoidgehalte (Lutein + Zeaxanthin) wurden in drei unterschiedlichen Mahlfractionen der Hartweizensorte Prowidur bestimmt. Zur Extraktion wurden zum einen ein Dispergierstab (Ultra-Turrax) und zum anderen ein Inkubationsschüttler verwendet. Ein signifikanter Unterschied im Carotinoidgehalt zwischen Ultra-Turrax und Schüttler wurde nur für die Schrotfraktion (Partikel 1-2 mm) gefunden (Tab. 13). Bei der Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) hatten die Partikelgrößen der gemahlten Probe einen signifikanten Einfluss auf den ermittelten Carotinoidgehalt. Die Carotinoide waren aus gröberem Material schlechter extrahierbar als aus fein gemahlenem Hartweizen. Wurden die Proben vor der Lösungsmittelextraktion mit Wasser aufgequollen, so hatten die Partikelgrößen überwiegend keinen Einfluss auf die Gehalte an Carotinoiden im Extrakt. Lediglich bei der Extraktion mittels Schüttler wurden für die beiden feineren Mahlfractionen signifikant höhere Carotinoidgehalte als für die Schrotfraktion ermittelt.

Tab. 13: Einfluss der Partikelgröße von gemahlenem Hartweizen (Prowidur) auf die ermittelten Gehalte an Carotinoiden [mg/100 g TM]

Mahlfraction	Lösungsmittelextraktion		Wasser + Lösungsmittelextraktion	
	Ultra-Turrax	Schüttler	Ultra-Turrax	Schüttler
1,0-2,0 mm	0,063 ± 0,001 ^A *	0,022 ± 0,003 ^A	0,263 ± 0,050 ^A *	0,136 ± 0,015 ^A
0,2-0,5 mm	0,071 ± 0,000 ^B	0,076 ± 0,004 ^B	0,260 ± 0,008 ^A	0,258 ± 0,009 ^B
0,1-0,2 mm	0,106 ± 0,006 ^C	0,118 ± 0,001 ^C	0,266 ± 0,010 ^A	0,268 ± 0,012 ^B

verschiedene Buchstaben in einer Spalte zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K),
* zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Extraktion mit Ultra-Turrax und Schüttler ($p < 0,05$, t-Test)

4.4.2 Untersuchung potenzieller Ursachen für die reduzierte Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Hartweizen

Einfluss des Wassergehaltes der Proben

Um herauszufinden, ob der Wassergehalt einer Probe generell die Extrahierbarkeit von Carotinoiden beeinflusst, wurden verschiedene Gemüse sowohl in frischer als auch in gefriergetrockneter Form analysiert. Die frischen Karotten und Tomaten besaßen mit 87,8 % und 92,4 % sehr hohe Wassergehalte. Als Vergleichsprobe zum Hartweizen wurden aufgrund ihres hohen Stärkegehaltes zusätzlich rohe Kartoffeln ausgewählt. Sie bestanden zu 82,0 % aus Wasser. Keines der detektierten Carotinoide war aus den gefriergetrockneten Proben mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) schlechter extrahierbar als aus den Proben mit hohem Wassergehalt (Abb. 30, Abb. 32 links).

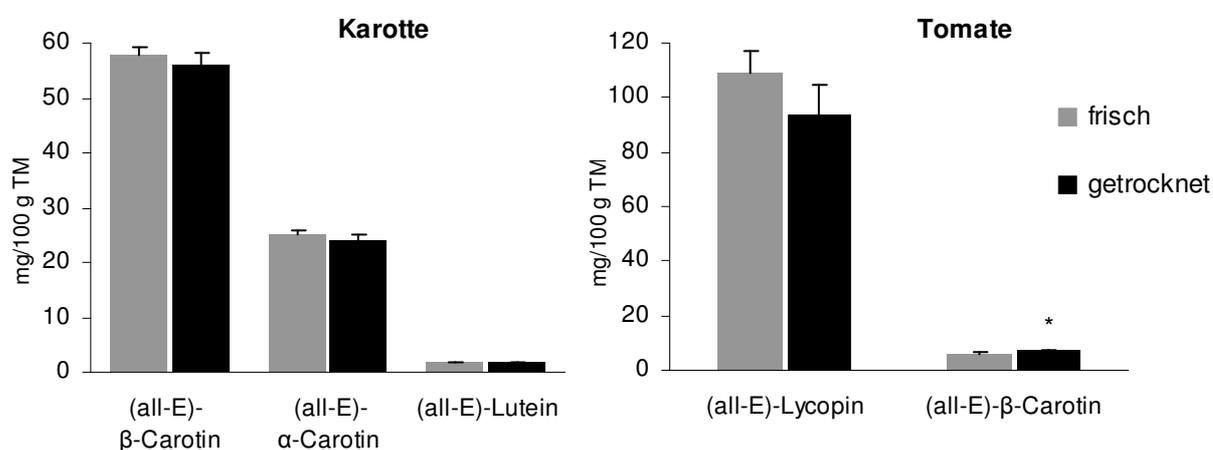


Abb. 30: Gehalte einzelner Carotinoide von frischer und gefriergetrockneter Karotte und Tomate nach direkter Lösungsmittelextraktion

* signifikanter Unterschied zwischen frischer und getrockneter Probe ($p < 0,05$, t-Test)

Nachdem eine Abhängigkeit der Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen von der Einweichzeit mit dem Lösungsmittel festgestellt wurde, sollte dieser Einflussfaktor auch an getrocknetem Gemüse untersucht werden. Hierfür wurden weitere Tomaten gefriergetrocknet und deren Carotinoidgehalte sowohl nach unverzüglicher Extraktion am Ultra-Turrax als auch nach einer vorherigen Einweichzeit von 24 h mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) bestimmt. Beide Extraktionsmethoden lieferten die gleichen Gehalte an (*all-E*)-Lycopin und (*all-E*)-β-Carotin (Abb. 31). Ein Einweichen der getrockneten Tomaten mit dem Lösungsmittelgemisch vor der Extraktion hatte keinen Einfluss auf die Carotinoidgehalte im Extrakt.

Als weiteres Kartoffelprodukt mit geringem Wassergehalt (5 %) wurde ein Instant-Kartoffelpüree (Kartoffelflocken) sowohl ohne als auch mit Quellung mit Wasser vor der Lösungs-

mittelextraktion analysiert. Der Wasserzusatz bewirkte eine signifikante Zunahme der Carotinoidgehalte im Extrakt (Abb. 32 rechts).

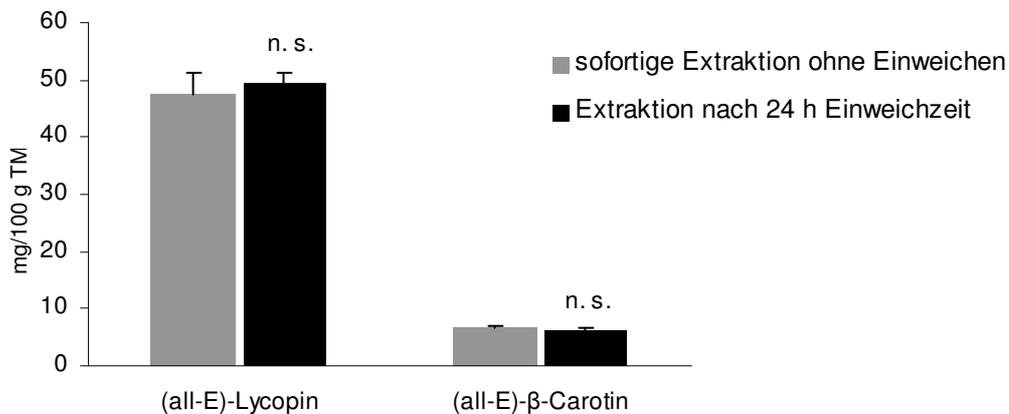


Abb. 31: Gehalt einzelner Carotinoide von gefriergetrockneter Tomate in Abhängigkeit von der Einweichzeit mit dem Lösungsmittel

n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$, t-Test)

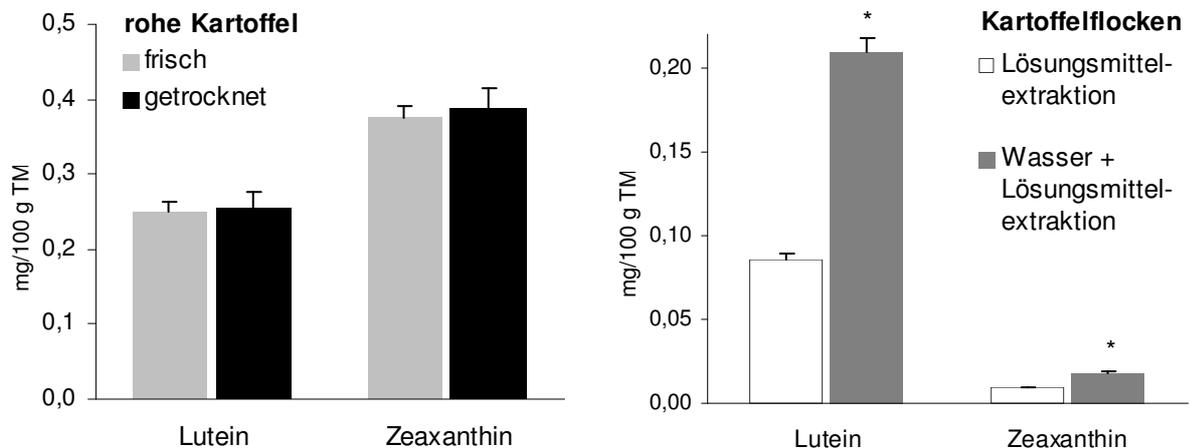


Abb. 32: Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Kartoffeln und Instant-Kartoffelpüree in Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proben sowie von der Extraktionsmethode

* markiert signifikanten Unterschied zwischen den Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test)

Einfluss der Probenmatrix

Die Ursache der positiven Wirkung des Wassers auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen wurde zunächst im Einfluss auf die Getreidestärke vermutet. Folglich wurde der Hartweizen analog zur Quellung mit Wasser für 5 min mit einer Lösung aus α -Amylase und Phosphatpuffer (pH 6,9) versetzt und anschließend mit dem üblichen Lösungsmittelgemisch extrahiert. Parallel dazu wurde die Probe nur mit dem Puffer ohne Enzym versetzt. Sowohl

mittels enzymatischem Aufschluss als auch durch die Wirkung des Puffers allein wurden die gleichen Carotinoidgehalte im Extrakt wie nach der Quellung mit Wasser ermittelt (Tab. 14).

Tab. 14: Carotinoidgehalt des Hartweizens Prowidur nach enzymatischem Aufschluss mit α -Amylase im Vergleich zur Quellung mit Wasser und Phosphatpuffer

Carotinoidgehalt [mg/100 g TM] nach Quellung mit		
Wasser	α -Amylase + Puffer	Puffer (pH 6,9)
$0,371 \pm 0,006^A$	$0,383 \pm 0,020^A$	$0,351 \pm 0,011^A$

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA, S-N-K).

Daraufhin sollte der Einfluss des Wassers bei dem enzymatischen Aufschluss ausgeschlossen werden. Hierfür wurde der Hartweizen zunächst mit Wasser bzw. Amylase- und Pufferlösungen versetzt. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet. Die Extraktion der Carotinoide aus den getrockneten Proben erfolgte mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) mit und ohne vorheriger Quellung mit Wasser. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die Gefrier-trocknung zweier gemahlener Hartweizen keinen Einfluss auf die Gehalte an Carotinoiden hatte (Tab. 15).

Tab. 15: Einfluss der Gefrier-trocknung auf Carotinoidgehalte von Hartweizen

Hartweizensorte	Extraktion	Carotinoide [mg/100 g TM]		
		unbehandelt		gefriergetrocknet
Prowidur	ohne Quellung mit H ₂ O	$0,166 \pm 0,013$	n. s.	$0,165 \pm 0,006$
	mit Quellung mit H ₂ O	$0,365 \pm 0,009$	n. s.	$0,345 \pm 0,015$
Kombo	ohne Quellung mit H ₂ O	$0,277 \pm 0,012$	n. s.	$0,250 \pm 0,012$
	mit Quellung mit H ₂ O	$0,536 \pm 0,009$	n. s.	$0,556 \pm 0,017$

n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$, t-Test)

Die Extrahierbarkeit der Carotinoide durch organische Lösungsmittel wurde sowohl durch die Quellung mit Wasser als auch durch die Wirkung der α -Amylase leicht verbessert. Zwischen beiden Vorbehandlungen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (Abb. 33). Keine der beiden Behandlungen der Probe führte zu einer vollständigen Extraktion der Carotinoide mit Hilfe des Lösungsmittelgemisches. Die Wirkung des Wassers sowie der Amylase-lösung schien größtenteils reversibel zu sein, so dass die Proben nach der Gefrier-trocknung erneut mit Wasser versetzt werden mussten, um die Extraktionsrate zu erhöhen (Abb. 33). Der Stärkeabbau mittels α -Amylase hatte demnach keinen deutlichen Einfluss auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen.

Eine effektive Stärkespaltung während der Behandlung mit α -Amylase konnte durch die Messung der Zunahme an Maltose und Glucose demonstriert werden. Die Vorbehandlung mit Wasser vor der Gefrier-trocknung verursachte ebenfalls eine signifikante, wenn auch wesentlich geringere Zunahme der Zuckergehalte (Abb. 34).

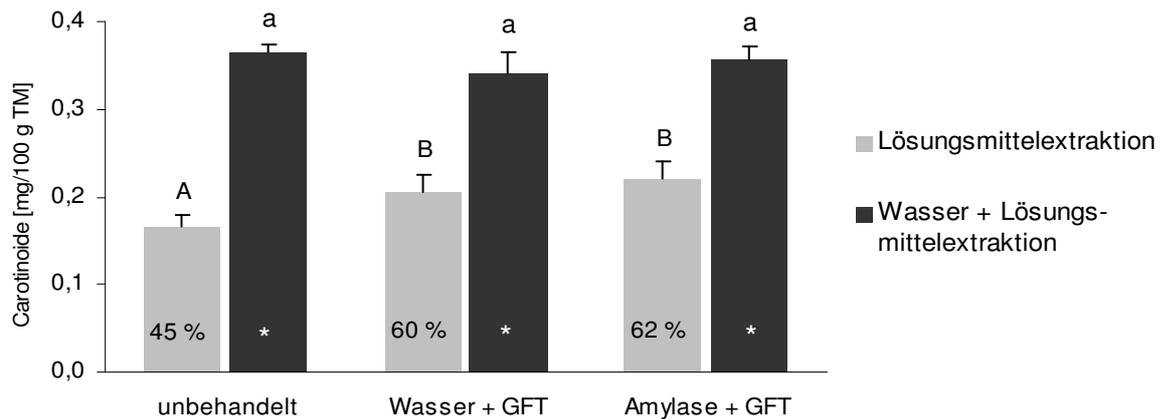


Abb. 33: Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen (Prowidur) nach enzymatischem Aufschluss mittels α -Amylase (n = 5)

GFT = Gefriertrocknung,

Prozente = relative Gehalte bezogen jeweils auf die Extraktion nach Quellung mit Wasser (= 100 %),

* markiert signifikanten Unterschied zwischen den Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test),

Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K).

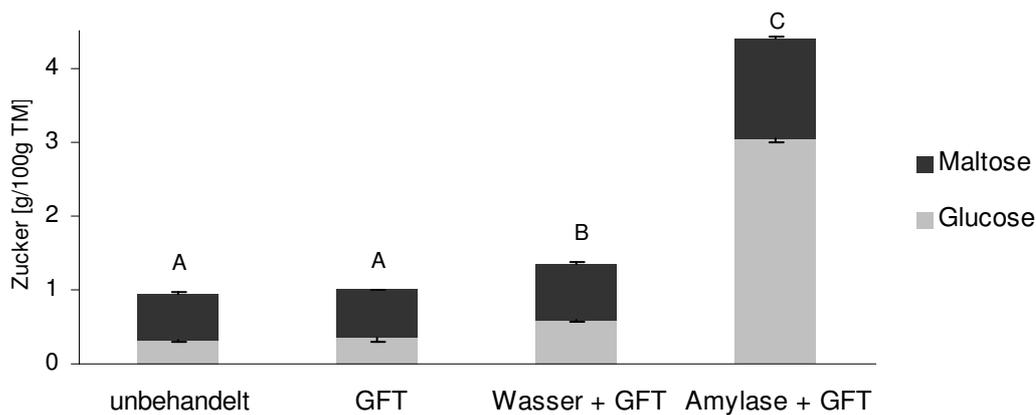


Abb. 34: Gehalte an Maltose und Glucose der Hartweizensorte Prowidur nach Aufschluss mittels α -Amylase

GFT = Gefriertrocknung, Gesamtzuckergerhalte mit verschiedene Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K)

Da durch den enzymatischen Stärkeabbau keine vollständige Extraktion der Carotinoide aus Hartweizen erreicht werden konnte, wurde anschließend der Einfluss eines Proteinabbaus mit Hilfe von Pepsin auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide überprüft. Hierfür wurde der Hartweizen vergleichsweise mit saurer Pepsinlösung sowie mit 0,1 M HCl-Lösung ohne Enzym für 30 min behandelt. Anschließend wurden die Proben mit NaOH-Lösung neutralisiert, eingefroren und lyophilisiert. Die trockenen Proben wurden mit und ohne Quellung mit Wasser vor der Lösungsmittlextraktion analysiert. Die Salzsäure verursachte sowohl in den mit Pepsin als auch in den mit reiner HCl-Lösung behandelten Proben signifikante Verluste an Carotinoiden (Abb. 35). Dennoch wurde nach beiden Behandlungen eine effektive Steigerung der Extrahierbarkeit von Carotinoiden mit organischen Lösungsmitteln sichtbar. Waren in der unbehandelten Probe nur etwa 52 % der Carotinoide mit dem Lösungsmittel-

gemisch, verglichen mit einer Extraktion mit vorheriger Quellung mit Wasser, extrahierbar, so konnten diese Gehalte nach Pepsin- und HCl-Aufschluss um etwa 25-30 % gesteigert werden (Abb. 35). Die Gehalte an Carotinoiden im Extrakt unterschieden sich bei beiden Behandlungen nicht signifikant. Trotz der deutlichen Zunahme der Extrahierbarkeit wurde auch durch die Proteinspaltung keine vollständige Extraktion der Carotinoide mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) erreicht. Zur quantitativen Extraktion mussten die gefriergetrockneten Proben zuvor erneut mit Wasser versetzt werden.

Die Bestimmung der Gehalte freier Aminosäuren in den Proben lieferte ein ähnliches Bild wie das der Zucker. Der enzymatische Aufschluss mittels Pepsin resultierte in etwa doppelt so hohen Gehalten freier Aminosäuren. Die Vorbehandlung mit Wasser führte ebenfalls zu einem signifikanten, wenn auch geringeren Anstieg der Gehalte freier Aminosäuren (Abb. 36).

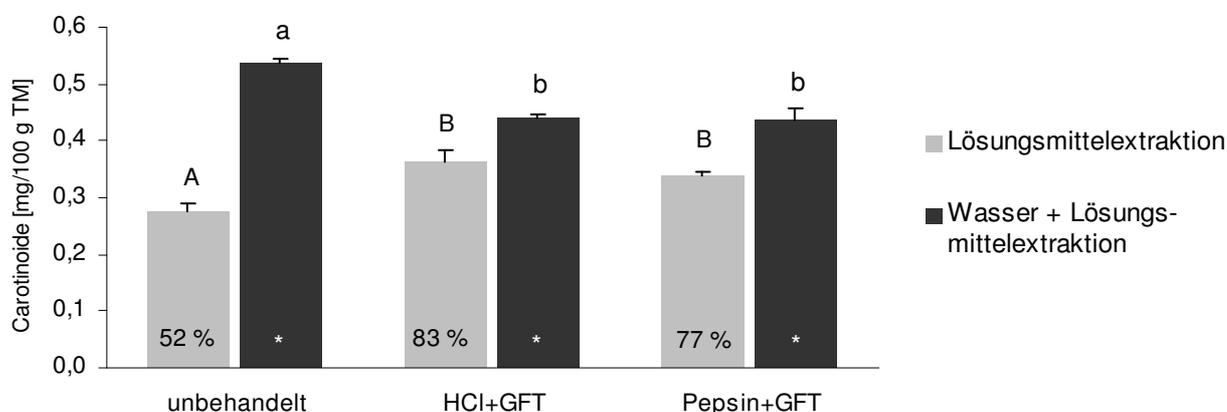


Abb. 35: Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen (Kombo) durch einen sauren sowie enzymatischen Aufschluss mittels Pepsin

GFT = Gefriertrocknung,
 Prozent = relative Gehalte bezogen jeweils auf die Extraktion nach Quellung mit Wasser (= 100 %),
 * markiert signifikanten Unterschied zwischen den Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test),
 Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K).

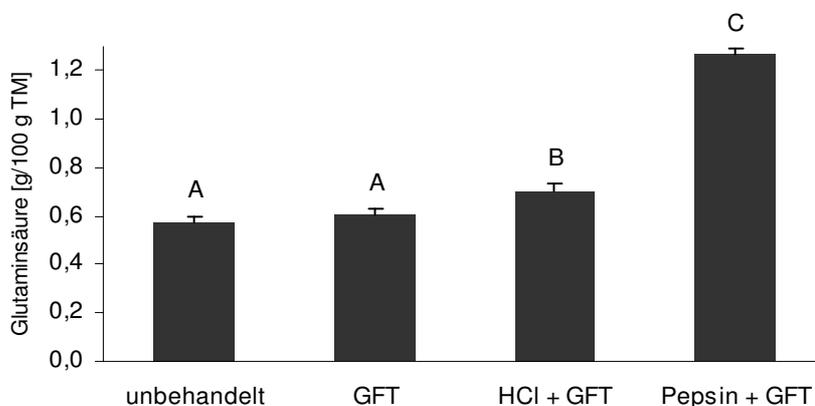


Abb. 36: Gehalt freier Aminosäuren der Hartweizensorte Kombo nach Aufschluss mit Pepsin

GFT = Gefriertrocknung, Werte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K).

4.4.3 Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Carotinoide in Hartweizen und Teigwaren

Die optimierte Extraktionsmethode für Carotinoide aus Hartweizen beinhaltete eine 5 bis 30-minütige Quellung der Proben mit Wasser und eine anschließende Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) unter Nutzung eines Dispergierstabes (Ultra-Turrax). Als Referenzmethode für eine quantitative Extraktion der Carotinoide wurde die Gelbpigment-Bestimmung nach der ICC-Standardmethode Nr. 152 herangezogen. Für den Vergleich beider Methoden wurden 7 Hartweizen, 4 Grieße und 6 Teigwaren (mit und ohne Ei) analysiert (Tab. A 13). Zwischen dem mit der optimierten Extraktionsmethode bestimmten Gehalt an Gesamt-Carotinoiden und dem Gelbpigmentgehalt von Hartweizen, Grieß und Teigwaren bestand ein starker linearer Zusammenhang. Dieser war mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,915 auf dem Niveau von 0,01 signifikant.

Bei der Anwendung der optimierten Extraktionsmethode musste zwischen trockenen Proben (gemahlener Hartweizen, Hartweizengrieß, rohe Teigwaren) und jenen mit einem hohen Wassergehalt (gekochte Teigwaren) unterschieden werden. Die Quellung von gemahlenem Hartweizen (Vollkorn) und Grieß mit Wasser resultierte in etwa doppelt so hohen Carotinoidgehalten im Extrakt (Tab. A 13). Mit Hilfe der optimierten Methode wurden die Carotinoide vollständig aus Hartweizengrieß extrahiert (Abb. 37, Tab. A 13). Bei gekochten Teigwaren trat größtenteils kein signifikanter Unterschied zwischen der Extraktion mit und ohne Quellung mit Wasser auf (Tab. 16). Diese Proben konnten folglich direkt mit dem Lösungsmittelgemisch extrahiert werden.

Tab. 16: Carotinoidgehalte von gekochten Teigwaren in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode

	Carotinoide [mg/100 g TM]	
	Lösungsmittlextraktion	Wasser + Lösungsmittlextraktion
KW2 Charge 4	0,477 ± 0,021	0,493 ± 0,008
Buitoni	0,352 ± 0,030	0,363 ± 0,021
Erfurter	0,428 ± 0,010	0,428 ± 0,025
Alnatura	0,191 ± 0,003	* 0,184 ± 0,003

* signifikanter Unterschied zwischen den Extraktionsmethoden (p = 0,045, t-Test)

Bei verschiedenen Hartweizensorten lag die Extraktionsrate der Carotinoide unter Verwendung der optimierten Methode bei 90-97 % im Vergleich zum Gelbpigmentgehalt (Abb. 37). Der Carotinoidgehalt zweier eifreier Hartweizen-Teigwaren aus dem Handel war um etwa 20 % geringer als ihr Gelbpigmentgehalt. Die Industrieprobe der Produktionslinie 2 (KW2 Charge 4) zeichnete sich mit einem Carotinoidgehalt von 92 % des Gelbpigmentgehaltes durch eine bessere Extrahierbarkeit aus. Im Mittel lag der flüssigchromatographisch

bestimmte Carotinoidgehalt der Teigwaren ohne Ei bei $84 \pm 7\%$ und der der Eierteigwaren bei $83 \pm 4\%$ der jeweiligen Gelbpigmentgehalte. Damit unterschied sich die Extrahierbarkeit der Carotinoide unter Nutzung der optimierten Methode nicht signifikant zwischen Teigwaren mit und ohne Ei ($p > 0,05$, t-Test). Durch die direkte Lösungsmittlextraktion war hingegen aus den eifreien Teigwaren ein wesentlich geringerer Anteil an Carotinoiden als aus den Eierteigwaren und auch als aus den Hartweizen und Grießen extrahierbar (Abb. 37, Tab. A 13). Bei Hartweizen und Grieß lag der durch die Lösungsmittlextraktion bestimmte Carotinoidgehalt bei $47 \pm 10\%$ des Gelbpigmentgehaltes. Ein Unterschied in der Extrahierbarkeit der Carotinoide mit dem Lösungsmittel zeigte sich auch zwischen den Teigwaren der beiden industriellen Produktionslinien. Der Quotient aus den Carotinoidgehalten mit und ohne Quellung mit Wasser lag bei der KW 1 im Mittel bei 4,0 und bei der KW 2 nur bei 2,7 (Tab. A 13).

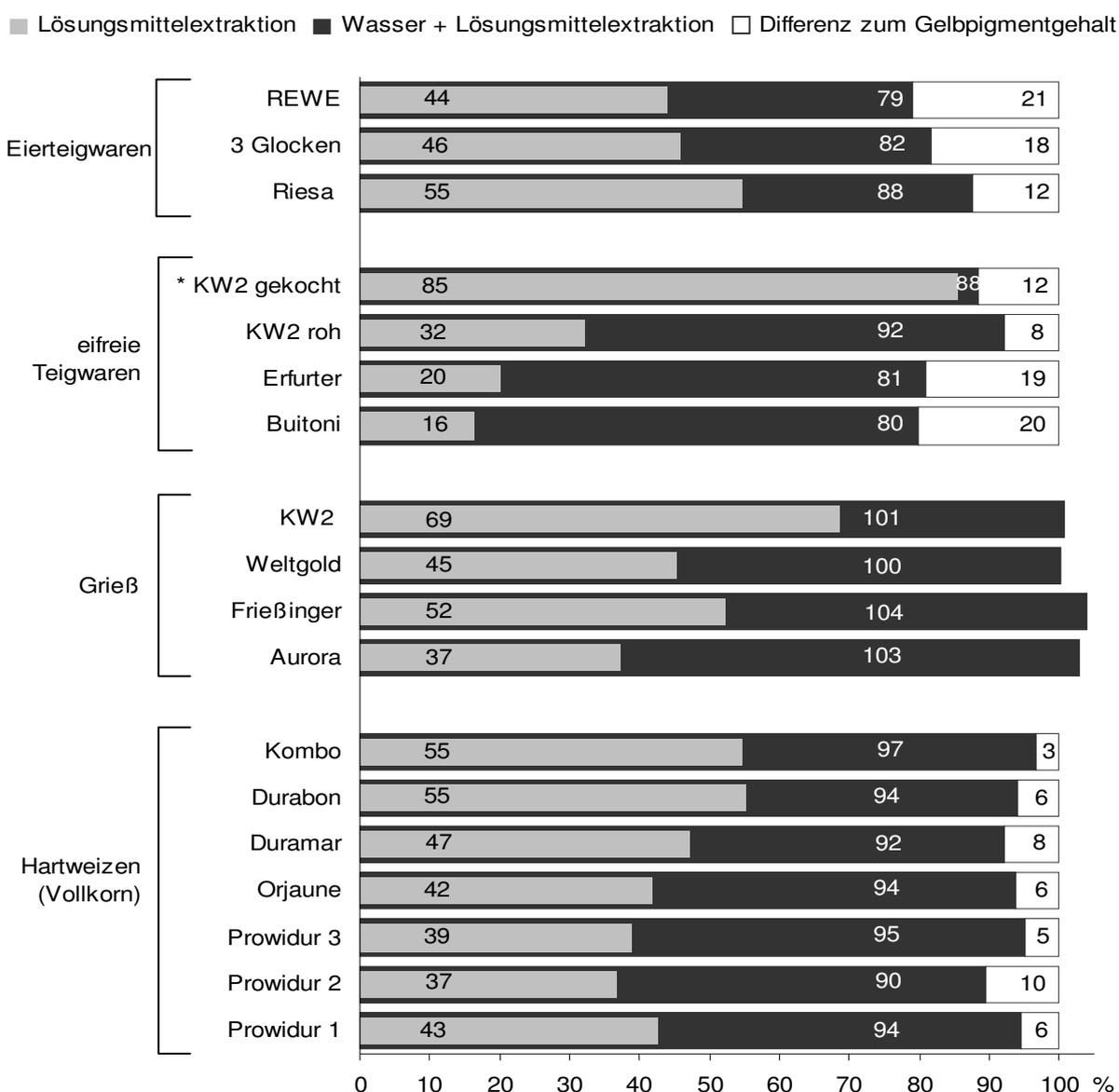


Abb. 37: Relative Gesamt-Carotinoidgehalte von Hartweizen, Grieß und Teigwaren nach Extraktion ohne und mit Quellung mit Wasser im Vergleich zum Gelbpigmentgehalt

* Die gekochte Teigware wurde für die Gelbpigment-Bestimmung gefriergetrocknet.

Zur Beurteilung der optimierten Extraktionsmethode wurde die Wiederfindungsrate des internen Standards β -apo-8'-Carotinal herangezogen. Diese lag im Durchschnitt von 156 einzelnen Bestimmungen bei 97 %. Die Wiederfindungsrate bei direkter Lösungsmittlextraktion fiel etwas höher aus als bei der Extraktion nach vorheriger Quellung mit Wasser (Tab. 17).

Tab. 17: Wiederfindungsraten des internen Standards [%] bei der optimierten Extraktion der Carotinoide aus 26 verschiedenen Proben (Hartweizen, Grieß, Teigwaren)

Wiederfindungsrate des internen Standards [%]		
Lösungsmittlextraktion (n = 78)	Extraktion nach Quellung mit H ₂ O (n = 78)	Summe (n = 156)
99,0 ± 7,1	*	94,8 ± 9,3
		97,0 ± 8,5

* markiert signifikanten Unterschied zwischen den beiden Extraktionsmethoden (p < 0,05, t-Test)

Der Carotinoidgehalt von Hartweizen und Teigwaren setzte sich ausschließlich aus Xanthophyllen zusammen. Lutein war das dominierende Carotinoid (> 90 %). Zeaxanthin wurde nur in geringen Mengen gefunden. Der Anteil der (Z)-Isomere am Gesamt-Luteingehalt von Hartweizen und Grieß betrug knapp 10 %. Eine Verschiebung der Isomerenverhältnisse zugunsten der (Z)-Isomere von Lutein und Zeaxanthin war bei den Teigwaren ohne Ei im Vergleich zum Grieß sichtbar (Abb. 38). Bei den Teigwaren aus dem Handel mit 10 % Ei war der erhöhte Anteil an Zeaxanthin auffällig. Darüber hinaus enthielten alle drei Eierteigwaren Canthaxanthin (Abb. 38). Die Carotinoidgehalte der in Abb. 38 dargestellten Proben sind der Tab. A 14 zu entnehmen. Des Weiteren wurden zwei Auftragsproben mit unbekanntem Eianteil untersucht. Diese sind nicht in Abb. 38 dargestellt, da ihre Carotinoid-Zusammensetzung stark differierte und demzufolge auf die Bildung von Mittelwerten verzichtet wurde. Beide Eierteigwaren enthielten neben Lutein, Zeaxanthin und Canthaxanthin auch große Anteile an β -apo-8'-Carotinsäureethylester (49 bzw. 17 %), wodurch der Luteingehalt nur bei 41 bzw. 74 % des Gesamt-Carotinoidgehaltes lag (Tab. A 15).

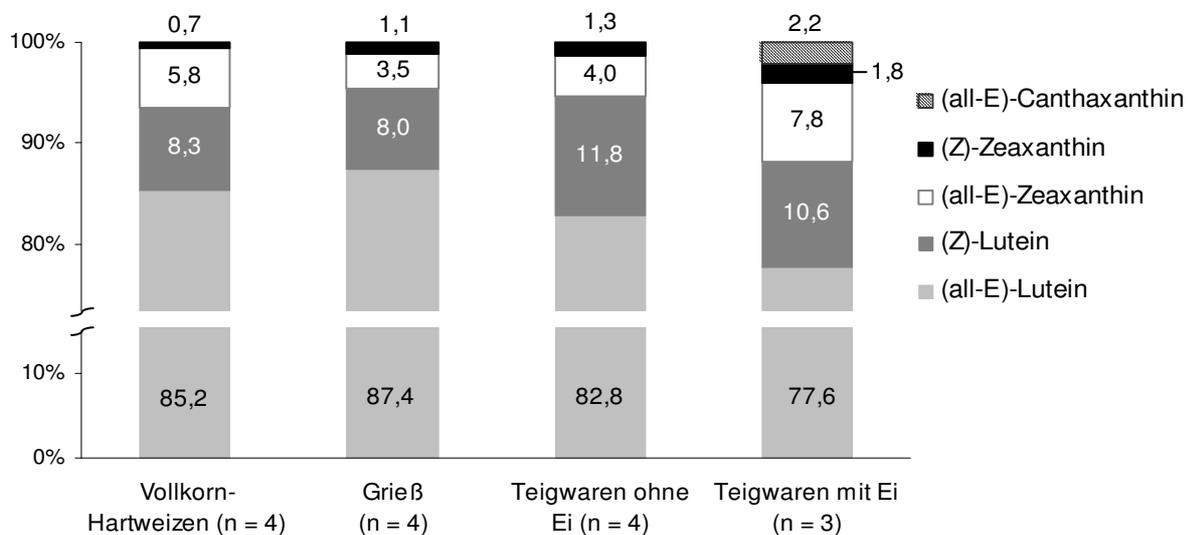


Abb. 38: Zusammensetzung der Carotinoid-Fraktion in Hartweizen, Grieß und Teigwaren

4.4.4 Extraktion von Carotinoiden aus anderen Weizen- und Getreidearten

Neben Hartweizen und Teigwaren wurden mehrere Weichweizen, inklusive Purpur- und Gelbweizen, auf ihre Gehalte an Carotinoiden untersucht. Hierfür wurde wiederum die Lösungsmittlextraktion mit der Extraktion nach Quellung der Proben mit Wasser verglichen. Dabei fiel auf, dass der Gesamt-Carotinoidgehalt bei kaum einer dieser Proben nach der Quellung mit Wasser signifikant höher war als nach direkter Lösungsmittlextraktion (Tab. A 12). Aus der Gattung *Triticum* wurden weiterhin Dinkel, Einkorn und Emmer analysiert. Nur bei Emmer trat eine signifikante Zunahme der Carotinoidgehalte im Extrakt durch die Quellung der Proben mit Wasser auf. Der Quotient aus den Carotinoidgehalten mit und ohne Quellung lag bei den vier Proben zwischen 1,6 und 1,8. Damit war der Effekt des Wassers auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide etwas geringer als beim Hartweizen (siehe Tab. A 13). Auch bei anderen Getreidearten wie Hafer und Roggen wurde kein Einfluss des Wassers auf die Extrahierbarkeit gefunden. Die Quellung von Vollkorn-Mais, Maisgrieß und Maismehl hatte hingegen eine signifikante Erhöhung der Carotinoidgehalte im Extrakt zur Folge (Tab. A 12). Die Gehalte waren etwa doppelt so hoch wie nach direkter Lösungsmittlextraktion (Quotient 1,8-2,5).

Im Gegensatz zum Hartweizen setzte sich der Carotinoidgehalt bei den anderen Weizenspezies sowie bei Roggen und Hafer neben Lutein und Zeaxanthin auch aus verschiedenen β -Carotin-Isomeren zusammen. Die β -Carotin-Fraktion bestand aus (*all-E*)- β -Carotin und teils beträchtlichen Anteilen an (*15Z*)-, (*13Z*), und/oder (*9Z*)- β -Carotin. Eine Ausnahme war hierbei der Emmer, dessen Carotinoidgehalt sich analog zum Hartweizen nur aus Lutein und Zeaxanthin zusammensetzte (Abb. 39). Neben dem Carotinoidspektrum war auch der Gehalt der Gesamt-Carotinoide im Hartweizen wesentlich höher als in den meisten anderen Weizenarten und sonstigen Getreidearten. Ausnahmen davon waren Gelbmehl-Weizen und Einkorn (Abb. 39, Tab. A 12). Im Purpurweizen wurden neben Lutein, Zeaxanthin und β -Carotin zusätzlich Luteinester detektiert. Der Luteingehalt erhöhte sich nach einer 30-minütigen Verseifung des Extraktes mit KOH-Lösung (10 %) bei Raumtemperatur signifikant (Daten nicht gezeigt). Dennoch unterschieden sich die beiden Purpurweizen deutlich im Carotinoidgehalt. Der Purpurweizen 1 war weißmehlig, der Purpurweizen 2 gelbmehlig. Die beiden Proben wurden demzufolge in Abb. 39 nicht einzeln dargestellt, sondern den Weißmehl-Weizen bzw. Gelbmehl-Weizen zugeordnet. Mais zeichnete sich durch den höchsten Gesamt-Carotinoidgehalt aller analysierten Getreide aus. Neben einem sehr hohen Anteil an Zeaxanthin, verglichen mit den restlichen Getreidearten, wurde auch (*all-E*)- β -Cryptoxanthin detektiert (Abb. 39).

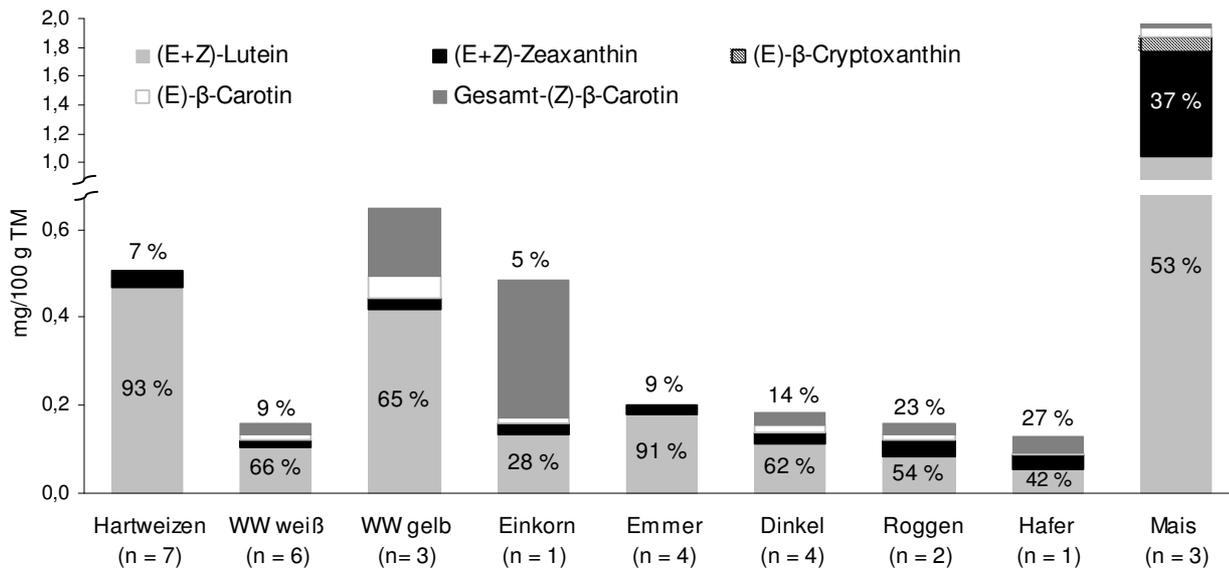


Abb. 39: Vergleich der Carotinoid-Zusammensetzung von verschiedenen Getreidearten nach Extraktion mit vorheriger Quellung der Proben mit Wasser

WW weiß = Weißmehl-Weichweizen, WW gelb = Gelbmehl-Weichweizen

Prozente in den Balken sind Anteile an (E+Z)-Lutein, über den Balken an (E+Z)-Zeaxanthin

4.5 Extrahierbarkeit von Tocopherolen und Tocotrienolen

4.5.1 Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Hartweizen und Teigwaren

Eine Übersicht über alle 15 getesteten Extraktionsmethoden für Vitamin E aus Hartweizengrieß sowie aus rohen und gekochten Teigwaren (KW2 Charge 4) zeigt Abb. 40. Die **Kaltextraktion** von Hartweizengrieß durch einfaches **Schütteln** der Proben lieferte für alle getesteten Lösungsmittel und -gemische die gleichen Vitamin-E-Gehalte. Ein ähnliches Bild ergab sich für die gekochten Teigwaren. Eine Ausnahme bildeten dabei die Extraktionen mit n-Hexan und mit n-Hexan/Ethylacetat (9/1, v/v). Mit n-Hexan war keine Extraktion möglich, da sich die klebrigen Nudeln nicht mit dem unpolaren Lösungsmittel mischen ließen. Durch die Zugabe eines polarerer Lösungsmittels wie Ethylacetat konnte die Probe zwar extrahiert werden, die ermittelten Vitamin-E-Gehalte waren jedoch außerordentlich gering. Für die rohe Teigware wurden mit den verschiedenen Lösungsmitteln sehr unterschiedliche Vitamin-E-Gehalte bestimmt. Methanol war in der Extraktion der Tocochromanole effektiver als Ethanol. Die Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln wie n-Hexan oder Cyclohexan resultierte in niedrigeren Vitamin-E-Gehalten im Vergleich zu den polarerer Lösungsmitteln. Die Zugabe von Ethylacetat zu n-Hexan bewirkte keine Verbesserung der Extrahierbarkeit. Eine deutliche Erhöhung der Extrahierbarkeit der Tocochromanole aus rohen Teigwaren wurde durch eine Quellung der Proben mit Wasser vor der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln erreicht. Die Extraktion nach der von BALZ *et al.* (1993) publizierten Methode, welche eben-

falls Wasser im ersten Extraktionsschritt vorschreibt, lieferte den gleichen Vitamin-E-Gehalt wie die Aufarbeitung mit der Quellung mit Wasser und anschließender Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v) und n-Hexan. Für Grieß und gekochte Teigwaren hatte das Wasser hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Extrahierbarkeit von Vitamin E.

Die Zerkleinerung und Homogenisierung von Grieß und gekochter Teigware mittels **Ultra-Turrax** zeigte keinen deutlichen Effekt auf die Extraktionsrate. Lediglich für die rohe Teigware wurde mit dieser Methode ein signifikant höherer Vitamin-E-Gehalt ermittelt. Die Quellung mit Wasser vor der Extraktion am Ultra-Turrax hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Extrahierbarkeit bei Grieß und gekochter Teigware. Für die rohe Teigware wurde mit Hilfe der Quellung vor der Lösungsmittelextraktion ein mehr als doppelt so hoher Vitamin-E-Gehalt als ohne Wasser bestimmt. Dieser war zudem auch signifikant höher als mit der Extraktion nach BALZ.

Die **Heißextraktion** mit Ethanol/Cyclohexan (1/1, v/v) mit Hilfe der **Soxhlet-Apparatur** bei 150 °C brachte für alle drei untersuchten Proben ähnliche Ergebnisse wie die Kaltextraktionen mit verschiedenen Lösungsmitteln (ohne Wasser).

Für den **alkalischen Aufschluss mit KOH-Lösung** war α -Tocopherolacetat als interner Standard ungeeignet, da daraus bei der Verseifung α -Tocopherol entstand. Demzufolge wurde es durch δ -Tocopherol ersetzt, da dieses Vitamin-E-Isomer in keiner der untersuchten Proben detektiert wurde. Zudem waren die Wiederfindungsraten von δ -Tocopherol in Vorversuchen mit denen von α -Tocopherolacetat vergleichbar. Der alkalische Aufschluss mit 60 %iger KOH-Lösung bei 70 °C (PANFILI *et al.* 2003) lieferte für alle drei Produkte unterschiedliche Vitamin-E-Gehalte an verschiedenen Analysetagen. Die Wiederfindungsraten des internen Standards schwankten im Mittel der Dreifachbestimmungen zwischen 67 und 94 %. Geringe Wiederfindungsraten resultierten teilweise in sehr hohen Vitamin-E-Gehalten. Die relative Streuung der Einzelwerte der Dreifachbestimmungen war mit 0,5-23 % sehr variabel. Der Variationskoeffizient aus allen 9 Einzelbestimmungen lag sogar bei 53 % (Abb. 41 A). Der alkalische Aufschluss mit 10 %iger KOH-Lösung bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) lieferte an verschiedenen Analysetagen reproduzierbare Vitamin-E-Gehalte für Grieß und gekochte Teigwaren. Lediglich bei der rohen Teigware unterschied sich der Gehalt an Vitamin E zwischen beiden Analysetagen signifikant (Abb. 41 B). Die Wiederfindungsraten für δ -Tocopherol waren jedoch mit größtenteils unter 80 % nicht zufrieden stellend. Dennoch bewegte sich die Streuung der Einzelwerte der Dreifachbestimmungen mit einem Variationskoeffizienten zwischen 2 % und 6 % in einem akzeptablen Bereich.

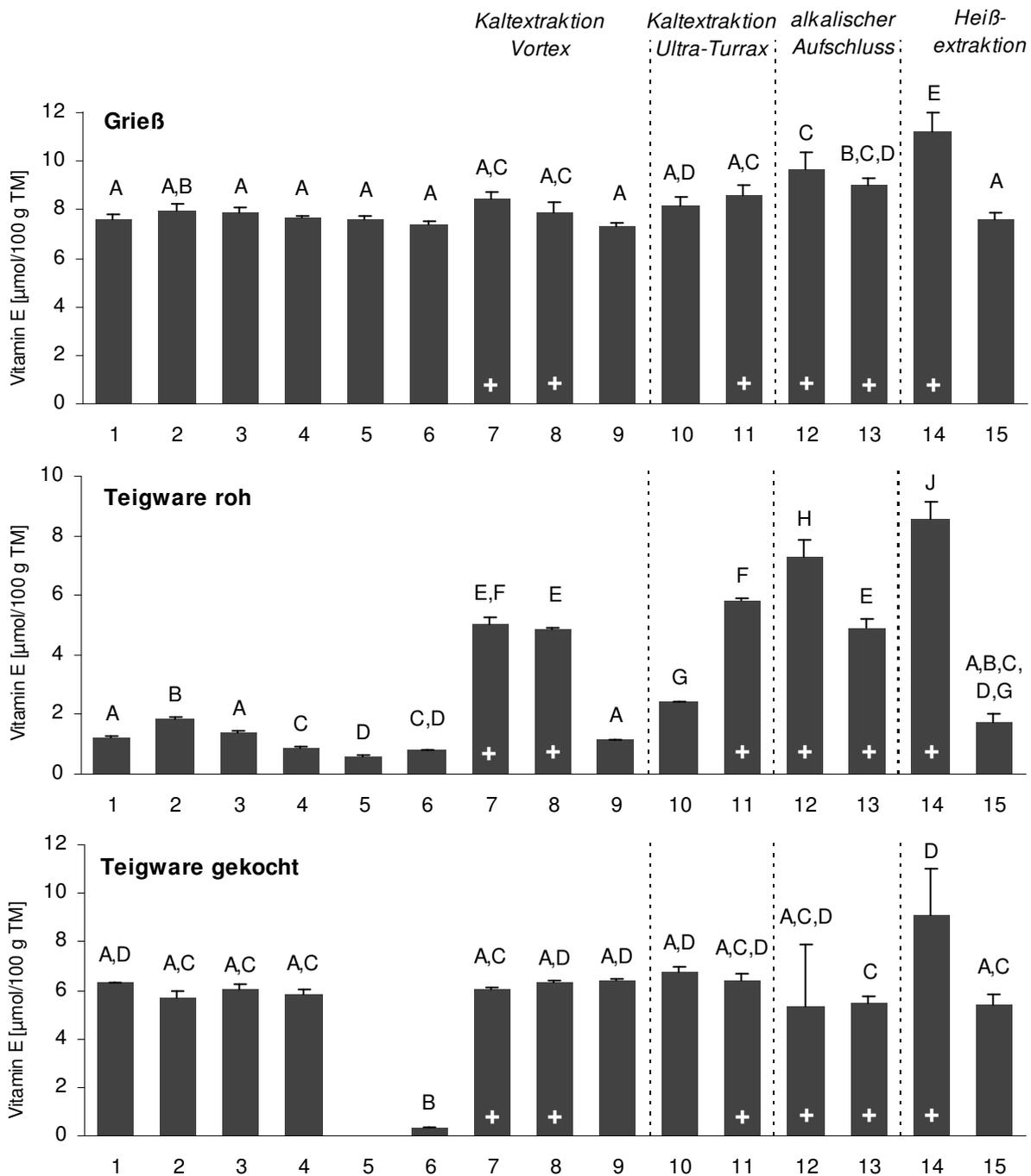


Abb. 40: Mit Hilfe verschiedener Extraktionsmethoden ermittelte Vitamin-E-Gehalte von Grieß und Teigwaren (Mittelwerte aus mindestens drei Bestimmungen)

- | | |
|---|---|
| 1 Ethanol (EtOH) | 9 EtOH, Petrolether, MtBE |
| 2 Methanol (MeOH) | 10 MeOH/THF (1/1), Ultra-Turrax |
| 3 MeOH/THF (1/1) | 11 Quellung mit H ₂ O; MeOH/THF (1/1),
Ultra-Turrax |
| 4 EtOH/Cyclohexan (1/1) | 12 60 % KOH, 70 °C, 45 min [n = 9] |
| 5 n-Hexan | 13 10 % KOH, Raumtemperatur, 45 min [n = 6] |
| 6 n-Hexan/Ethylacetat (9/1) | 14 ohne KOH, 70 °C, 45 min [n = 9] |
| 7 Quellung mit H ₂ O; MeOH/THF, n-Hexan | 15 Soxhlet-Extraktion, 150 °C |
| 8 Wasser, EtOH, Petrolether, MtBE
(Extraktion nach BALZ) | |

verschiedene Buchstaben innerhalb eines Diagramms zeigen signifikante Unterschiede (p < 0,05, ANOVA, Games-Howell),
 + Extraktionsmittel enthielt Wasser bzw. Proben wurden vor der Extraktion eingeweicht.

Die **Heißextraktion im Wasserbad bei 70 °C** für 45 min wurde ebenfalls in Anlehnung an die Methode von PANFILI *et al.* (2003) durchgeführt. Hierbei wurde lediglich die KOH-Lösung durch Wasser ersetzt. Mit dieser Methode wurden für alle drei analysierten Produkte die jeweils höchsten Gehalte an Vitamin E bestimmt (Abb. 41 C). Nur bei der gekochten Teigware wurde die Signifikanz aufgrund der hohen Streuung von 21 % zwischen den 9 Einzelbestimmungen verfehlt ($p > 0,05$). Bei der gekochten Teigware lagen die Variationskoeffizienten der Dreifachbestimmung selbst an einem Analysentag zwischen 6 % und 27 %. Bedingt durch diese teils sehr hohe Streuung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Vitamin-E-Gehalten an den drei Analysentagen. Für Grieß und rohe Teigwaren waren die Ergebnisse an unterschiedlichen Tagen hingegen nicht reproduzierbar ($p < 0,05$). Die Wiederfindungsraten des internen Standards lagen im Mittel bei nur 27-76 %.

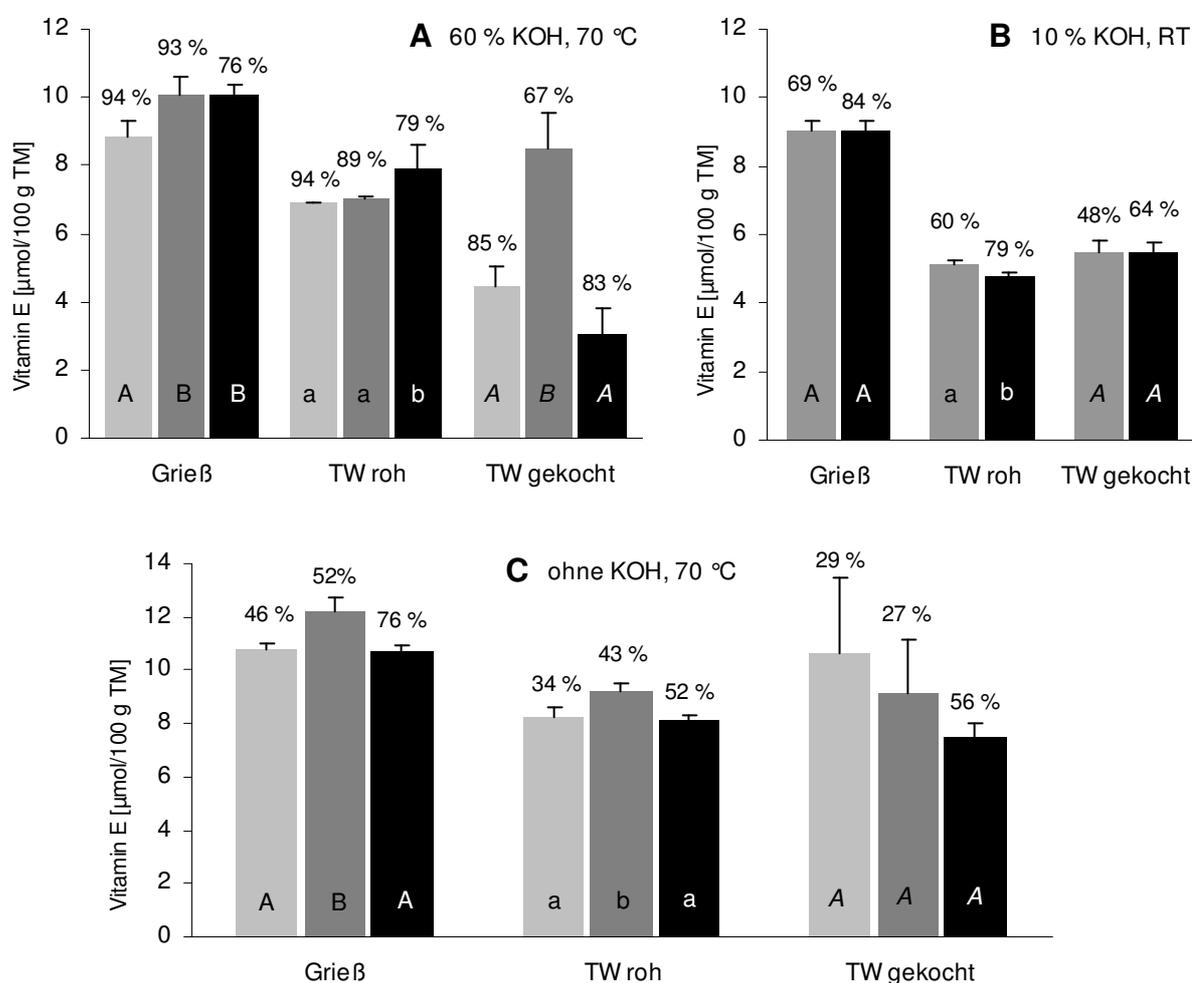


Abb. 41: Reproduzierbarkeit der Ermittlung der Vitamin-E-Gehalte von Grieß und Teigwaren (TW) bei verschiedenen Extraktionsmethoden (Dreifachbestimmungen an zwei bzw. drei Analysentagen)

Prozente über den Balken = Mittelwerte der Wiederfindungsraten des internen Standards, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Probe markieren signifikante Unterschiede zwischen den Analysentagen ($p < 0,05$; ANOVA, S-N-K bzw. t-Test).

Der enzymatische Aufschluss mittels **Pepsin** diene weniger der Optimierung der Extraktionsmethode, sondern sollte Aufschluss über die Ursachen der teils verbesserten Extrahierbarkeit von Vitamin E durch das Einweichen der Proben mit Wasser geben. Um die direkte Wirkung des Enzyms beurteilen zu können und einen Effekt des Wassers auszuschließen, wurde die Hartweizensorte Kombo gefriergetrocknet. Für die folgenden Untersuchungen wurde zunächst der Vitamin-E-Gehalt der unbehandelten Probe mit dem Gehalt nach der Gefriertrocknung verglichen. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied (Tab. 18).

Tab. 18: Einfluss der Gefriertrocknung auf Vitamin-E-Gehalte der Hartweizensorte Kombo

	Vitamin E [$\mu\text{mol}/100 \text{ g TM}$]	
	unbehandelt	gefriergetrocknet
Extraktion ohne Quellung mit H_2O	$12,93 \pm 0,28$	n. s. $12,44 \pm 0,23$
Extraktion mit Quellung mit H_2O	$14,63 \pm 0,34$	n. s. $14,74 \pm 0,32$

n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$, t-Test)

Durch den Aufschluss mit der sauren Pepsinlösung und auch mit der HCl-Lösung allein verringerte sich der Vitamin-E-Gehalt der Hartweizenprobe deutlich. Dennoch war eine Verbesserung der Extrahierbarkeit mit MeOH/THF (1/1, v/v) durch den sauren und enzymatischen Aufschluss sichtbar. Während aus der unbehandelten Probe nur 88 % des Vitamins E durch die Lösungsmittelextraktion herausgelöst werden konnte, unterschieden sich die mit den beiden Extraktionsmethoden ermittelten Vitamin-E-Gehalte nach der Behandlung mit Pepsin und auch mit HCl allein nicht signifikant voneinander (Abb. 42). Durch den Aufschluss mit HCl nahm der Gehalt freier Aminosäuren leicht zu. Die Behandlung mit Pepsin resultierte in etwa doppelt so hohen Gehalten an freien Aminosäuren (Abb. 36, Seite 67).

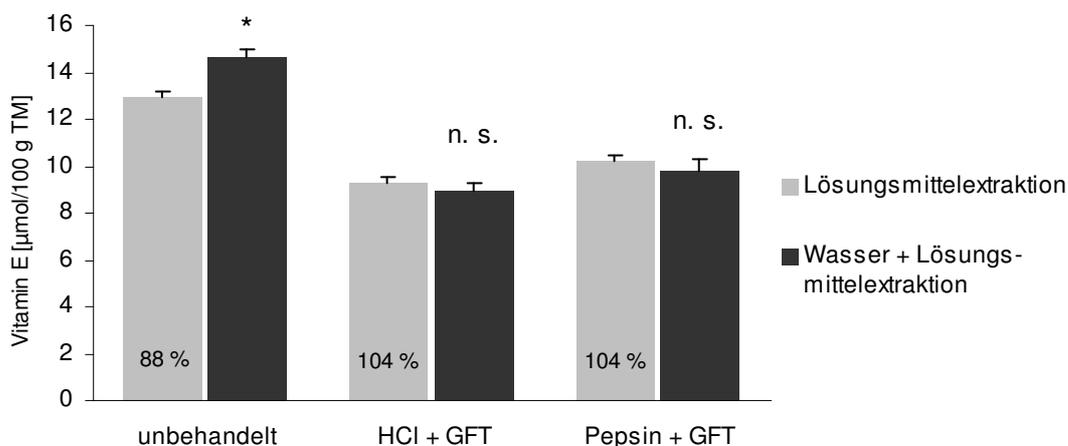


Abb. 42: Extrahierbarkeit von Vitamin E aus Hartweizen (Kombo) durch einen sauren sowie enzymatischen Aufschluss mittels Pepsin

Prozente = relative Gehalte bezogen jeweils auf die Extraktion nach Quellung mit Wasser (= 100 %), n. s. = nicht signifikant, GFT = Gefriertrocknung, * markiert signifikanten Unterschied zwischen den Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test).

4.5.2 Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Tocopherole und Tocotrienole in Hartweizen und Teigwaren

Als Schlussfolgerung aus den dargestellten Ergebnissen und aufgrund der Möglichkeit, die Extraktion der Tocochochromanole mit der der Carotinoide zu kombinieren, wurde die Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) unter gleichzeitiger Homogenisierung mittels Ultra-Turrax als geeignete Extraktionsmethode für Vitamin E betrachtet. Daraufhin sollte diese Extraktionsmethode an einer größeren Probenanzahl getestet und die Notwendigkeit der Quellung von trockenen Proben mit Wasser nochmals überprüft werden. Hierfür wurden 9 Hartweizensorten unterschiedlicher Erntejahre, 5 Grieße und 5 Teigwaren sowohl ohne als auch mit Wasserzugabe vor der Lösungsmittelextraktion analysiert. Zur Beurteilung der Extraktionsmethode wurde u. a. die Wiederfindungsrate des internen Standards α -Tocopherolacetat herangezogen. Diese lag im Mittel aller 114 Bestimmungen bei rund 93 % (Tab. 19). Dabei war die Wiederfindungsrate bei direkter Lösungsmittelextraktion etwas höher als bei der Extraktion mit vorheriger Quellung mit Wasser ($p < 0,05$, t-Test).

Tab. 19: Wiederfindungsraten des internen Standards [%] bei der optimierten Extraktion von Vitamin E aus 19 verschiedenen Proben (Hartweizen, Grieß, Teigwaren)

Wiederfindungsrate des internen Standards [%]			
Lösungsmittelextraktion (n = 57)		Extraktion nach Quellung mit H ₂ O (n = 57)	Summe (n = 114)
95,8 ± 7,3	*	90,5 ± 8,8	93,1 ± 8,5

* markiert signifikanten Unterschied zwischen den beiden Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test)

Die bereits gezeigte Bedeutung der Quellung von Teigwaren mit Wasser für die quantitative Extraktion von Vitamin E wurde durch die Analyse von 5 eifreien Teigwaren bestätigt (Abb. 43). Die Extrahierbarkeit von Vitamin E mit dem Lösungsmittelgemisch war aus den Teigwaren der industriellen Produktionslinie 2 etwas höher als aus denen der PL1. Durch die Quellung der Proben der PL1 mit Wasser wurde der Vitamin-E-Gehalt im Extrakt mehr als verdreifacht. Bei den Teigwaren der PL2 wurde nach der Quellung mit Wasser ein mehr als doppelt so hoher Vitamin-E-Gehalt im Extrakt gemessen (Tab. A 16). Der Einfluss des Wassers auf die Extrahierbarkeit der Tocochochromanole aus Hartweizen und Grieß war nicht so eindeutig. Bei dem Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Vitamin E wurde für die Extraktion mittels Ultra-Turrax kein signifikanter Effekt des Quellens von Grieß mit Wasser gefunden (Abb. 40). Bei 10 der 14 anschließend analysierten Hartweizen und Grieße führte eine Quellung vor der Extraktion zu einer geringen, aber signifikanten Zunahme der Vitamin-E-Gehalte im Extrakt (Tab. A 16). Daher muss eine Quellung der Proben mit Wasser für mindestens 5 min vor der Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) auch für Vollkorn-Hartweizen und Grieß empfohlen werden.

Der Vitamin-E-Gehalt von Hartweizen, Grieß und eifreien Teigwaren setzte sich hauptsächlich aus β -Tocotrienol, α -Tocotrienol, α -Tocopherol und β -Tocopherol zusammen (Abb. 44). In einigen Proben wurde zusätzlich γ -Tocotrienol detektiert ($< 0,018 \text{ mg}/100 \text{ g}$). Teigwaren mit Ei verfügten über einen höheren Gehalt an α -Tocopherol sowie einen geringeren β -Tocotrienol-Gehalt. Zusätzlich wurde in den drei Eierteigwaren γ -Tocopherol in geringen Mengen bestimmt. In den Hartweizen, bei denen das ganze Korn analysiert wurde, war das Verhältnis der Tocotrienole zu den Tocopherolen, verglichen mit den Hartweizengrießen, ebenfalls zugunsten von α - und β -Tocopherol verschoben (Abb. 44). Obwohl die Tocotrienole in allen analysierten Hartweizen den Hauptteil der Vitamin-E-wirksamen Verbindungen ausmachten, schwankte das Verhältnis von Tocotrienolen zu Tocopherolen (T3/T) zwischen 1,7 und 5,9 (Tab. A 17). Dennoch bestand zwischen den Vitamin-E-Gehalten und den berechneten Vitamin-E-Aktivitäten der 9 Hartweizen, 5 Grieße und 5 Teigwaren eine signifikante Korrelation ($r = 0,835, p = 0,01$).

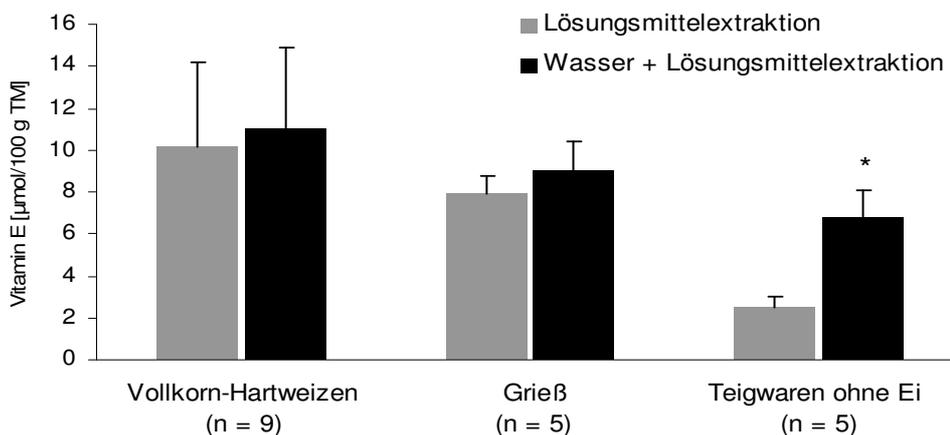


Abb. 43: Mittelwerte der Vitamin-E-Gehalte von mehreren Hartweizen, Grießen und Teigwaren nach Extraktion mit und ohne vorherige Quellung mit Wasser

* markiert signifikanten Unterschied im Vitamin-E-Gehalt zwischen den Extraktionsmethoden

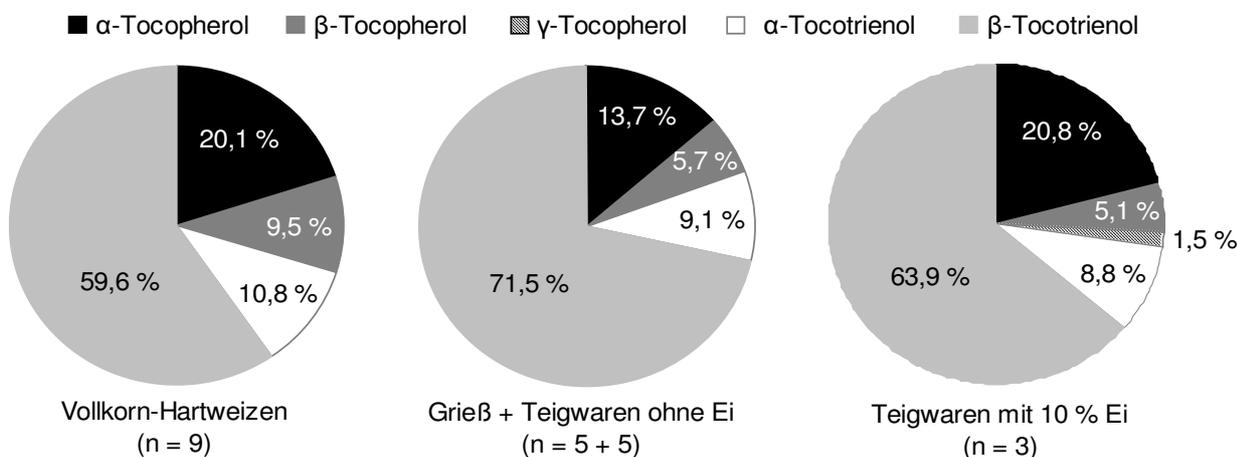


Abb. 44: Zusammensetzung der Vitamin-E-Fraktion in Hartweizen, Grieß und Teigwaren

4.6 Veränderungen der Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E während der Teigwarenherstellung und -zubereitung

4.6.1 Vorversuche mit Produktionszwischenstufen

Im Rahmen zweier Diplomarbeiten wurden mehrere Zwischenstufen der Teigwarenherstellung auf ihre Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E untersucht (KNETSCH 2007, KALANTARI 2009). Hierbei ergab sich das Problem der unterschiedlichen Extrahierbarkeit der verschiedenen Proben. Analog zu den in Kapitel 4.5.1 dargestellten Ergebnissen aus den Extraktionsversuchen erwies sich die Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v) unter gleichzeitiger Homogenisierung mittels Ultra-Turrax als geeignet. Proben mit einem Wassergehalt $\leq 20\%$ (GR, VT, ET, EPK) mussten vor der Lösungsmittelextraktion mit Wasser eingeweicht werden. Proben mit einem Wassergehalt über 20% (TG, PW, SVT) konnten direkt mit MeOH/THF (1/1, v/v) extrahiert werden. Einige der Zwischenprodukte der PL2 mit den höchsten Wassergehalten (PW, SVT) zeichneten sich gleichzeitig durch die geringsten Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E aus. Eine Ausnahme war der Teig. Dieser besaß zwar die höchsten Wassergehalte, jedoch auch wesentlich höhere Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E als die Proben PW und SVT. Ab der Stufe der Vortrocknung wurde eine Zunahme der Gehalte beobachtet (Abb. 45).

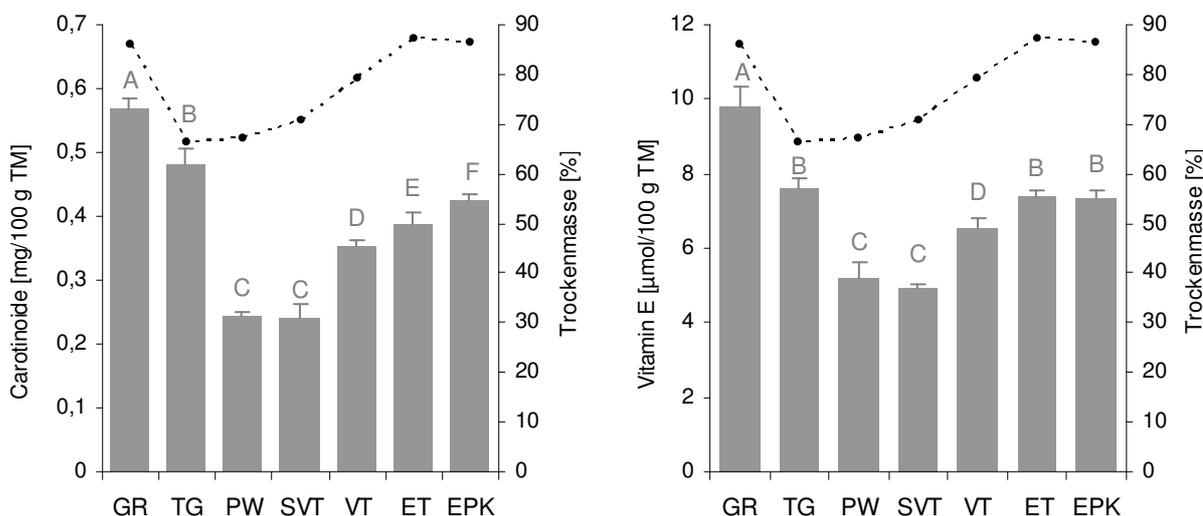


Abb. 45: Gehalte an Carotinoiden (links) und Vitamin E (rechts) der einzelnen Produktionsstufen der PL2 (Balken) im Vergleich zu deren Trockenmassen (Punkte)

verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K)
 GR = Grieß, TG = Teig, PW = Pressware, SVT = Schüttelvortrocknungsprodukt, VT = vortrocknetes Produkt, ET = Produkt nach Endtrocknung, EPK = Endprodukt nach Kühlung

Sowohl für Carotinoide als auch für Vitamin E wurden hohe Verluste während des Mischvorgangs beobachtet. Die Abnahme der Gesamt-Carotinoidgehalte vom Grieß zum Teig betrug 15 % und bis zum Endprodukt weitere 10 %. Der Verlust an Vitamin E während der Teigbildung belief sich auf 22 %. Bis zum Endprodukt nahm der Vitamin-E-Gehalt nicht signifikant ($p > 0,05$) um weitere 3 % ab.

Als eine Ursache für die geringeren Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E bei den Proben mit einem höheren Wassergehalt wurde deren geringere **Lagerstabilität** vermutet. Diese war maßgeblich von der Lagertemperatur bestimmt. Eine Lagerung von trockenen Proben (Grieß, Endprodukt) der Produktionslinie 1 (KW1 Charge 5) bei -30 °C führte zu keiner signifikanten Änderung der Vitamin-E-Gehalte innerhalb von drei Monaten. Die Lagerung von Pressteig und dem Schüttelvortrocknungsprodukt bei -30 °C hatte jedoch einen signifikanten Vitamin-E-Verlust zur Folge. Während einer Lagerung der KW2 (Charge 3) bei -80 °C wurde hingegen keine signifikante Abnahme der Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte für trockene und feuchte Proben innerhalb von 15 Wochen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die in Abb. 45 dargestellten Proben der Produktionslinie 2 (KW2 Charge 3) wurden vor der Analyse bei -80 °C gelagert. Nach der Probenentnahme aus der Produktionsstrecke wurden die feuchten Zwischenstufen jedoch bis zur Abholung am darauf folgenden Tag in einem haushaltsüblichen Tiefkühlschrank aufbewahrt. Abbaureaktionen der untersuchten Inhaltsstoffe in dem Zeitraum zwischen Probenentnahme und der Einlagerung bei -80 °C können nicht ausgeschlossen werden.

Als weitere Ursache der geringeren Gehalte einiger Zwischenprodukte der PL2 wurde eine schlechtere **Extrahierbarkeit** dieser Proben gegenüber den restlichen Mustern vermutet. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Zwischenstufen TG, PW, SVT und VT mit mehreren bereits in Kapitel 4.5.1 beschriebenen Extraktionsmethoden analysiert. Hierzu gehörte die Heißextraktion nach Soxhlet, die Heißextraktion bei 70 °C im Wasserbad, der alkalische Aufschluss mit 60 %iger KOH bei 70 °C bzw. 10 %iger KOH bei Raumtemperatur ($22 \pm 2\text{ °C}$). Während einige der getesteten Extraktionsmethoden für die Produkte nach der Pressung, der Schüttelvortrocknung und der Vortrocknung durchaus höhere Gehalte an Carotinoiden (Tab. 20) und Vitamin E (Tab. 21) erzielten, wurden für den Teig mit keiner der gewählten Extraktionsmethoden höhere Gehalte der untersuchten Substanzklassen gefunden. Die mittels MeOH/THF-Extraktion erhaltenen Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte schienen demzufolge realistisch zu sein. Dennoch kann auch beim Teig eine geringere Lagerstabilität aufgrund des höheren Wassergehaltes angenommen werden. Die Werte sind demzufolge unter Vorbehalt zu betrachten.

Tab. 20: Gehalte an Carotinoiden einzelner Produktionszwischenstufen in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode

Extraktionsmethode	Gesamt-Carotinoide [mg/100 g TM]*			
	TG	PW	SVT	VT
MeOH/THF, Ultra-Turrax	0,481 ± 0,026	0,245 ± 0,006	0,242 ± 0,019	0,355 ± 0,009
Heißextraktion Soxhlet	-	0,390	0,354	0,312
Heißextraktion 70 °C	0,256	0,280	0,307	0,383
60 % KOH, 70 °C, 45 min	0,316	0,208	0,237	0,290
10 % KOH, RT, 45 min	0,257	0,218	0,250	0,296

* Werte ohne Standardabweichung entstammen einer Einfachbestimmung.

Tab. 21: Gehalte an Vitamin E einzelner Produktionszwischenstufen in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode

Extraktionsmethode	Vitamin E [µmol/100 g TM]*			
	TG	PW	SVT	VT
MeOH/THF, Ultra-Turrax	7,61 ± 0,26	5,20 ± 0,42	4,92 ± 0,11	6,55 ± 0,26
Heißextraktion Soxhlet	-	4,63	3,96	3,14
Heißextraktion 70 °C	6,28	5,93	6,31	7,16
60 % KOH, 70 °C, 45 min	5,95	6,02	6,35	6,80
10 % KOH, RT, 45 min	5,02	4,81	5,48	5,72

* Werte ohne Standardabweichung entstammen einer Einfachbestimmung

4.6.2 Veränderungen während der Teigwarenherstellung

Zur eindeutigen Beurteilung des Einflusses der Teigwarenherstellung auf Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E sowie zum Vergleich von zwei industriellen Produktionslinien wurden den vorangestellten Ergebnissen zufolge nur die Rohware (Grieß) und die fertige Teigware betrachtet. Bei den untersuchten Kurzwaren (KW) handelte es sich um Teigwaren, welche im Pressverfahren hergestellt wurden. Die beiden Produktionslinien (PL1 und PL2) unterschieden sich im Mischprozess, in der Presstechnik und in der Trocknung der Teigwaren hinsichtlich der angewandten Temperaturen, Drücke und Zeitintervalle (siehe Kapitel 3.1). Von beiden Produktionslinien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mehrere Chargen analysiert. Um eine vergleichbare Extrahierbarkeit von Grieß und Endprodukt zu gewährleisten, wurden von sämtlichen Proben Mahlfractionen mit Partikelgrößen unter 0,5 mm verwendet.

Bei beiden Produktionsprozessen wurden signifikante **Verluste** an Carotinoiden und Vitamin E im Laufe der Verarbeitung von Grieß zu Teigwaren registriert (Tab. A 18). Für **Vitamin E** ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Produktionslinien hinsichtlich der Abnahme während des Verarbeitungsprozesses. Die Prozessbedingungen der PL1 erwiesen sich dabei als wesentlich schonender als die der PL2 (Tab. 22). Die Betrachtung der einzelnen Tocochromanole ergab kein einheitliches Bild. Während bei

beiden Chargen der PL1 sowie bei der Charge 1 der PL2 die Gesamt-Tocotrienolgehalte stärker abnahmen als die Gesamt-Tocopherolgehalte, waren die Chargen 2 und 3 der PL2 durch höhere Verluste an Tocopherolen im Vergleich zu Tocotrienolen gekennzeichnet. Der Produktionsprozess verursachte bei einem Großteil der untersuchten Proben sowohl für die Tocopherole als auch für die Tocotrienole eine stärkere Reduzierung der α -Vitamerie im Vergleich zu den β -Vitamerie. Lediglich bei den beiden Chargen der PL1 übertraf der Verlust an β -Tocopherol den des α -Tocopherols (Daten nicht gezeigt). Die Abnahme des Carotinoidgehaltes während der Teigwarenherstellung unterschied sich im Vergleich zum Vitamin E zwischen der PL1 und der PL2 nicht so deutlich. Die PL2 verursachte aber auch für die **Carotinoide** höhere Verluste im Vergleich zur PL1 (Tab. 22). Von einigen Chargen aus beiden Produktionslinien wurden außerdem die Gehalte an **Gelbpigmenten** in Grieß und fertiger Teigware bestimmt. Bei der Charge 3 nahm der Gelbpigmentgehalt durch die PL1 um 12 % und durch die PL2 um 22 % ab. Im Rahmen von Vorversuchen (KW1 und KW2 Charge 4) trat ein Verlust der Gelbpigmente von 13 % bei der PL1 und 26 % bei der PL2 auf.

Tab. 22: Vergleich der Produktionslinien 1 und 2 hinsichtlich der relativen Veränderung [%] der Gehalte an Gesamt-Carotinoiden und Vitamin E von Rohware und Endprodukt

	Abnahme Carotinoide		Abnahme Vitamin E	
	PL1	PL2	PL1	PL2
Charge 1	-	29 %	-	32 %
Charge 2	21 %	14 %	8 %	33 %
Charge 3	19 %	25 %	16 %	25 %
	Ø 20 %	Ø 23 % (27 % ^A)	Ø 12 %	Ø 30 %

^A Mittelwert in Klammern unter Ausschluss des Ausreißers von 14 % berechnet

Des Weiteren verursachte die Teigwarenproduktion eine signifikante **Isomerisierung** von (*all-E*)-Lutein. Dabei war die Zunahme des Gesamt-(*Z*)-Luteins bei der PL1 tendenziell höher als bei der PL2 (Tab. 24). Bei der Verarbeitung von Hartweizengrieß (wie auch beim Kochen der Teigwaren) entstanden keine anderen (*Z*)-Lutein-Isomere als bei den Isomerisierungsversuchen mit der reinen Standardsubstanz (siehe Kapitel 4.2). Vielmehr war eine Zunahme der bereits im Grieß vorhandenen (*Z*)-Isomere zu verzeichnen (siehe Kapitel 4.3). Lediglich das bei der iod- und hitzeinduzierten Isomerisierung entstandene (*Z*)-Zeaxanthin-Isomer 2 (vermutlich (*9Z*)-Zeaxanthin) war weder in den Rohmaterialien noch in den rohen oder gekochten Teigwaren zu finden.

4.6.3 Veränderungen während des Kochens von Teigwaren

Neben mehreren Chargen der beiden industriellen Produktionslinien wurden drei eifreie Teigwaren aus dem Handel je nach Produkt entsprechend den Herstellerangaben gekocht

(zwischen 5 min und 9 min) und anschließend auf ihre Gehalte an **Carotinoiden** untersucht. Während der auf die Trockenmasse bezogene Carotinoidgehalt bei zwei der Teigwaren sank, wurden bei den restlichen fünf gekochten Teigwaren zum Teil signifikant höhere Gehalte als bei den rohen Teigwaren bestimmt (Tab. 23). Bei drei Teigwaren wurde das Gewicht der Proben vor und nach dem Kochen berücksichtigt und die Retention der Carotinoide nach dem Kochen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Retention [\%]} = \frac{\text{Gehalt/g gekochtes Lebensmittel} \times \text{Gewicht nach dem Kochen}}{\text{Gehalt/g rohes Lebensmittel} \times \text{Gewicht vor dem Kochen}}$$

Tab. 23: Veränderungen des Carotinoidgehaltes von Teigwaren während des Kochens

	Carotinoide [mg/100 g TM]		relative Veränderung	Retention
	Teigware roh	gekocht		
KW1 Charge 2	0,337 ± 0,023	0,331 ± 0,008	- 2 %	92 %
KW2 Charge 1	0,270 ± 0,004	0,305 ± 0,008*	+13 %	104 %
Charge 2	0,260 ± 0,002	0,299 ± 0,012*	+15 %	110 %
Charge 3	0,424 ± 0,009	0,482 ± 0,020*	+14 %	-
Buitoni	0,327 ± 0,007	0,352 ± 0,030	+ 7 %	-
Erfurter	0,379 ± 0,023	0,428 ± 0,010	+ 8 %	-
Alnatura	0,211 ± 0,010	0,191 ± 0,003*	- 9 %	-

* markiert signifikanten Unterschied zur ungekochten Teigware (p < 0,05, t-Test)

Das Kochen der Teigwaren hatte auch einen Einfluss auf das Verhältnis der (*all-E*)- und (*Z*)-**Isomere** des Luteins. So war bei drei der vier gekochten Teigwaren ein signifikant höherer Anteil der (*Z*)-Isomere am Gesamt-Lutein zu verzeichnen (Tab. 24).

Tab. 24: Zunahme der (*Z*)-Isomere des Luteins während der Teigwarenherstellung und des Kochens

	Anteil der (<i>Z</i>)-Isomere am Gesamt-Lutein		
	Grieß	Teigware roh	Teigware gekocht
KW1 Charge 2	8,6 ± 0,1 % ^A	14,1 ± 1,2 % ^B	13,1 ± 0,8 % ^B
Charge 3	6,4 ± 1,1 % ^A	12,3 ± 0,5 % ^B	-
KW2 Charge 1	9,3 ± 0,2 % ^A	11,2 ± 0,5 % ^B	13,8 ± 1,3 % ^C
Charge 2	9,7 ± 0,6 % ^A	12,6 ± 0,2 % ^B	15,3 ± 1,7 % ^C
Charge 3	5,6 ± 0,3 % ^A	10,5 ± 0,1 % ^B	12,8 ± 0,2 % ^C

Werte mit verschiedenen Buchstaben in einer Zeile unterscheiden sich signifikant (p < 0,05, ANOVA, S-N-K)

Auf ihren Gehalt an **Vitamin E** wurden nur die gekochten Teigwaren der beiden industriellen Produktionslinien untersucht. Lediglich bei zwei der fünf untersuchten Proben war eine signifikante Zunahme des auf die Trockenmasse bezogenen Vitamin-E-Gehaltes ersichtlich. Die restlichen Proben zeigten keine signifikante Änderung. Tendenziell wurden jedoch bei den

gekochten Teigwaren höhere Vitamin-E-Gehalte als bei den rohen Nudeln gefunden (Tab. 25). Unter Berücksichtigung der Gewichtsveränderungen während des Kochens ergab sich eine ähnliche Retention des Vitamins E wie für die Carotinoide.

Tab. 25: Veränderungen des Vitamin-E-Gehaltes von Teigwaren während des Kochens

	Vitamin E [$\mu\text{mol}/100 \text{ g TM}$]		relative Veränderung	Retention
	Teigware roh	gekocht		
KW1 Charge 2	7,33 \pm 0,19	7,20 \pm 0,18	- 2 %	92 %
KW2 Charge 1	7,39 \pm 0,33	8,13 \pm 0,13*	+10 %	104 %
Charge 2	5,20 \pm 0,13	5,47 \pm 0,29	+ 5 %	101 %
Charge 3	7,36 \pm 0,19	8,75 \pm 0,81	+19 %	-
Charge 4	5,83 \pm 0,08	6,18 \pm 0,16*	+ 6 %	-

* markiert signifikanten Unterschied zur ungekochten Teigware ($p < 0,05$, t-Test)

Bei der Berechnung der Mittelwerte aus allen untersuchten Teigwaren konnte kein signifikanter Einfluss des Kochens auf die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E ermittelt werden. Tendenziell wurde jedoch nach dem Kochen ein leicht erhöhter Gehalt an Carotinoiden und Vitamin E (auf TM bezogen) gefunden (Abb. 46).

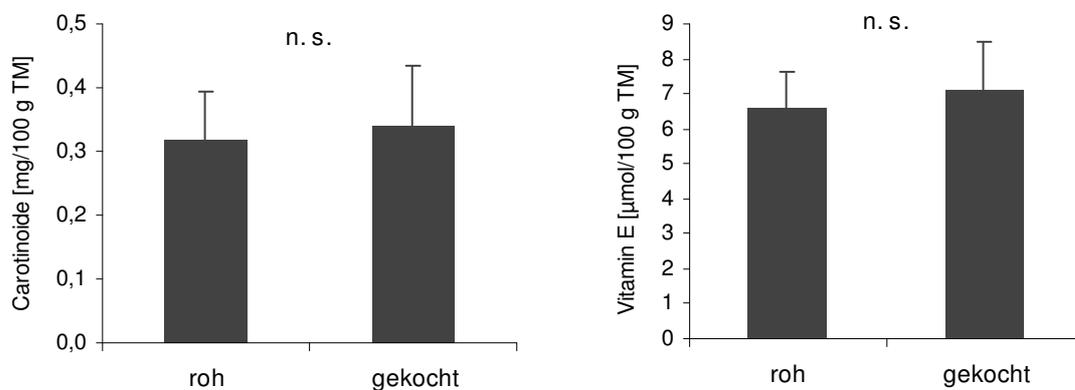


Abb. 46: Mittelwerte der Gehalte an Carotinoiden (links, $n = 7$) und Vitamin E (rechts, $n = 5$) von rohen und gekochten Teigwaren
n. s. = nicht signifikant ($p > 0,05$, t-Test)

4.7 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit mittels *in-vitro*-Verdauung

4.7.1 Beurteilung der *in-vitro*-Verdauung anhand von freien Fettsäuren, Aminosäuren und Zuckern

Zur Beurteilung der Verdauungsmethode wurden die Gehalte an Spaltprodukten von Triglyceriden, Proteinen und Stärke im Überstand einer verdauten Teigware mit denen einer un-

verdauten Teigware verglichen. Zur Verdauung wurde die Ausgangsmethode ohne die von REBOUL *et al.* (2006b) beschriebene Erhöhung der Gallekonzentration durchgeführt, da die Modifikationen der Verdauungsmethode erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgten.

Freie Fettsäuren

Die nach Soxhlet-Extraktion aus 3 g gekochter, gefriergetrockneter Teigware erhaltene Fettmenge ($\approx 1\text{-}5\text{ mg}$) reichte für die Dünnschichtchromatographie nicht aus. Daher wurde nur der Fettextrakt der Teigware mit Ölzusatz genutzt. Hierfür wurde eine gekochte Teigware mit 10 % Rapsöl versetzt und gefriergetrocknet. Parallel dazu wurde der gleiche Ansatz verdaut (siehe Kapitel 3.7) und ebenfalls gefriergetrocknet. Aus beiden Proben wurden die Fette extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Die Dünnschichtchromatographie wurde als semiquantitative Methode angewandt. Die Breite der aufgetrennten Banden galt als Anhaltspunkt für die Menge der Substanzen. Das Standardgemisch konnte mit der verwendeten DC-Methode vollständig getrennt werden (siehe Abb. 59, Seite 137). Wie zu erwarten war, zeigte sich in der unverdauten Teigware eine sehr breite Bande für die Triglyceride. Freie Fettsäuren wurden in der unverdauten Probe nicht detektiert. Nach der Verdauung machten die Triglyceride immer noch den Hauptteil der detektierten Substanzen aus. Schmale Banden zeigten sich für Cholesterin und freie Fettsäuren. Da jedoch in der reinen Hartweizenteigware, versetzt mit 10 % Rapsöl, kein Cholesterin zu erwarten war, wird von einer Coelution anderer Fettbestandteile mit Cholesterin ausgegangen.

Freie Aminosäuren

Für die Bestimmung freier Aminosäuren wurde die *in-vitro*-Verdauung einer Handelsware ohne Ei wie in Kapitel 3.7 beschrieben durchgeführt. Parallel dazu wurde ein Ansatz mit pyrogallolhaltiger Kochsalzlösung, jedoch ohne Enzyme, mitgeführt. Dieser Ansatz diente als Kontrolle und wurde mit „unverdaut“ gekennzeichnet. Im Überstand der verdauten Probe wurde ein signifikant höherer Aminosäuren-Gehalt festgestellt als in der unverdauten Teigware (Abb. 47).

Zucker

Analog zur Bestimmung der freien Aminosäuren wurde der Gehalt an Glucose und Maltose im Überstand nach der *in-vitro*-Verdauung mit der Kontrollprobe (unverdaut) verglichen. Hierbei war eine signifikante Zunahme des Gesamtzuckergehaltes zu verzeichnen (Abb. 47).

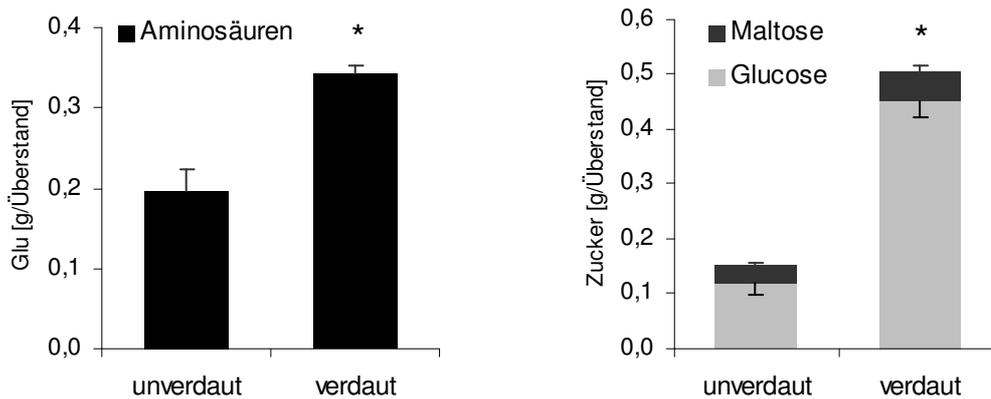


Abb. 47: Zunahme von freien Aminosäuren (links) und Zuckern (rechts) nach simulierter Verdauung im Vergleich zur unverdauten Teigware

* kennzeichnet signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$, t-Test)

4.7.2 Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide aus Teigwaren

Die Resorptionsverfügbarkeit beschreibt den Anteil der Carotinoide, die nach der simulierten Verdauung im wässrigen Überstand in gemischten Mizellen vorliegen und somit theoretisch für die Aufnahme in Enterocyten zur Verfügung stünden.

Zur Bestimmung der Resorptionsverfügbarkeit musste die Extraktionsmethode den Proben angepasst werden. Die gekochten Teigwaren, Verdauungsrückstände und wässrigen Überstände sollten möglichst mit der gleichen Methode extrahiert werden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Da die in Kapitel 3.5.1.2 beschriebene Extraktionsmethode einen relativ hohen Zeitaufwand voraussetzt und zur Ermittlung der Resorptionsverfügbarkeit für jede einzelne Probe insgesamt 9 Extraktionen notwendig waren (Teigwaren unverdaut, Rückstände und Überstände jeweils als Dreifachbestimmung), wurde geprüft, ob die Methode von BALZ *et al.* (1993) für die Extraktion der Carotinoide und Tocochromanole verwendet werden konnte. Wie bereits in Kapitel 4.5.1 beschrieben, eignete sich die Methode nach BALZ für die Extraktion von Vitamin E aus gekochten Teigwaren (Abb. 40, Seite 74). Damit war diese Extraktionsmethode auch für die Verdauungsversuche nutzbar. Vorversuche zur Extraktion der Carotinoide haben jedoch gezeigt, dass die Methode nach BALZ für die gekochten Nudeln geringere Carotinoidgehalte lieferte als die Extraktion am Ultra-Turrax (Daten nicht gezeigt). Demzufolge wurden die gekochten, unverdauten Teigwaren und die festen Rückstände der *in-vitro*-Verdauung vor der Extraktion nach BALZ *et al.* (1993) mit dem Dispergierstab homogenisiert (siehe Kapitel 3.7).

Die Wiederfindungsraten des internen Standards (*all-E*)- β -apo-8'-Carotinal lagen bei allen untersuchten Proben (jeweils 20 Teigwaren, Rückstände und Überstände) im Mittel zwischen

80 % und 90 %. Zwischen den drei verschiedenen Probenmatrixes war hinsichtlich der Wiederfindung des internen Standards kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen (Tab. 26). Die relative Standardabweichung der Resorptionsverfügbarkeit aus einer Dreifachbestimmung an einem Tag betrug bei 20 Proben im Mittel $4,5 \pm 3,0$ %. Die Resorptionsverfügbarkeit der Gesamt-Carotinoide von jeweils drei Verdauungsansätzen an drei verschiedenen Tagen betrug $29,7 \pm 3,2$ %, $33,1 \pm 2,1$ % und $31,6 \pm 1,9$ %. Die Streuung der Messungen zwischen den Tagen war mit einem Variationskoeffizienten von 5,5 % ähnlich gering wie zwischen den Mehrfachbestimmungen an einem Tag. Die durchschnittliche Resorptionsverfügbarkeit von $31,5 \pm 1,7$ % wurde als Referenzwert für die untersuchten Modifikationen der Verdauungsmethode herangezogen.

Tab. 26: Wiederfindungsrate des internen Standards [%] bei Extraktion der Carotinoide aus jeweils 20 Proben (entspricht jeweils 60 Bestimmungen)

unverdaute Teigware	Verdauungsrückstand	Verdauungsüberstand
$85,5 \pm 13,1^A$	$87,1 \pm 6,8^A$	$87,0 \pm 7,7^A$

Werte mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$, ANOVA)

Für die Vorversuche wurde eine Handelsware ohne Ei verwendet. Zur Abtrennung der wässrigen Phase vom Verdauungsrückstand wurden unterschiedliche Verfahren der **Zentrifugation** getestet. Diese erfolgte 20 min bei 10 °C mit 4.500 U/min (≈ 3.900 g), 5 min bei Raumtemperatur mit 14.000 U/min (≈ 15.800 g), 18 h bei 10 °C mit 20.000 U/min (≈ 43.000 g) und 95 min bei 4 °C mit 40.000 U/min (≈ 167.000 g). Die Zentrifugationsmethoden unterschieden sich in erster Linie in der Effektivität der Klärung des Überstandes. Die Zentrifugation mit 4.500 U/min lieferte einen trüben Überstand, der sich nicht durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,22 μm filtrieren ließ. Diese Methode war zur Isolierung der Mizellenfraktion demzufolge allein nicht geeignet und wurde anschließend mit der Zentrifugation bei 14.000 U/min kombiniert. Diese lieferte einen klareren Überstand, der sich gut filtrieren ließ. Mit der Ultrazentrifugation bei 20.000 U/min (REBOUL *et al.* 2006b) und 40.000 U/min (GARRETT *et al.* 1999) wurden sehr klare Überstände erhalten. Die Gehalte an Carotinoiden im filtrierten Überstand nahmen jedoch mit zunehmender Geschwindigkeit der Zentrifugation ab (Daten nicht gezeigt). Die **Filtration** des wässrigen Überstandes durch einen Membranfilter im Anschluss an die Zentrifugation hatte keinen Einfluss auf die Resorptionsverfügbarkeit der Xanthophylle (Daten nicht gezeigt). Die Carotinoid-Gehalte im Überstand unterschieden sich vor und nach Filtration nicht signifikant ($p > 0,05$, t-Test). Die **Absenkung des pH-Wertes** während der simulierten Magenpassage von pH 4 auf pH 2 hatte eine tendenziell geringere Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide zur Folge ($p = 0,087$, t-Test; Tab. 27). Während der *in-vitro*-Verdauung bei pH 2 waren etwas höhere Verluste an Carotinoiden im Vergleich zur Ausgangsmethode zu verzeichnen (Abb. 48). Die

Verlängerung der **Verdauzeit** auf insgesamt 2 h (Magen und Darm jeweils 1 h) hatte eine signifikant erhöhte Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide zur Folge (Tab. 27). Die Zugabe von **10 % Öl** vor der *in-vitro*-Verdauung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Mizellenbildung (Tab. 27). Hierfür wurde ein raffiniertes Rapsöl verwendet, in dem keine Carotinoide nachgewiesen werden konnten (FRANKE 2008). Die zusätzliche **Menge an Galleextrakt**, die von REBOUL *et al.* (2006) für den Einbau des sehr unpolaren Carotins Lycopin in die gemischten Mizellen als erforderlich erachtet wurde, zeigte in den vorliegenden Untersuchungen auch für die Xanthophylle eine deutliche Zunahme der Resorptionsverfügbarkeit (Tab. 27). Diese erhöhte sich im Vergleich zur Ausgangsmethode um etwa 147 %. Folglich wurde die von REBOUL *et al.* beschriebene Methode, inklusive der zusätzlichen Menge an Galleextrakt, für die weiteren Untersuchungen angewandt.

Tab. 27: Resorptionsverfügbarkeit [%] der Gesamt-Carotinoide aus einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode

Ausgangsmethode	Magen pH 2	Verdauung 2 h	Zugabe 10 % Öl	erhöhte Gallemenge
31,5 ± 1,7	26,9 ± 2,4	39,5 ± 2,4 *	27,8 ± 4,2	77,7 ± 0,7 *

* markiert signifikanten Unterschied zur Ausgangsmethode ($p < 0,05$, t-Test)

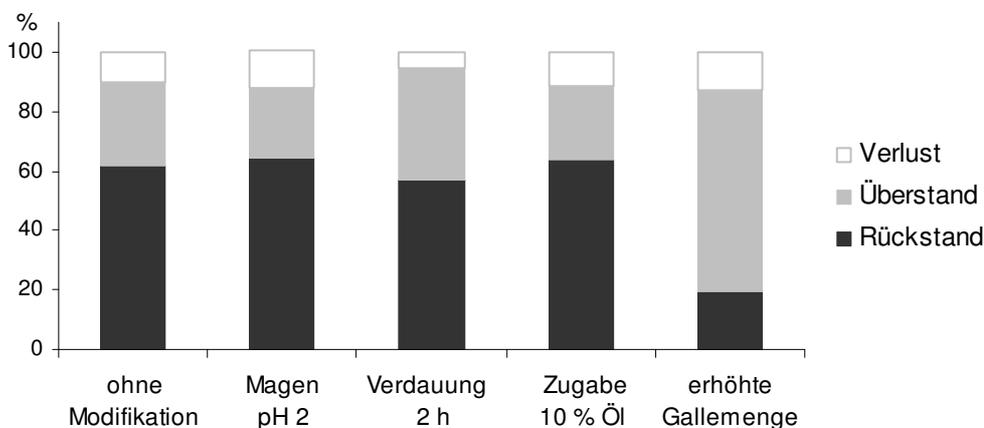


Abb. 48: Prozentuale Verteilung der Gesamt-Carotinoide in Rückstand und Überstand einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode

Aus den Teigwaren der Produktionslinie 1 (KW1) waren im Mittel $67,8 \pm 6,4$ %, aus denen der Produktionslinie 2 (KW2) $71,4 \pm 0,9$ % der Gesamt-Carotinoide zur Resorption verfügbar. Zwischen den Teigwaren der beiden Produktionslinien war hinsichtlich der Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p > 0,05$, t-Test).

Mit einem Mittelwert von $71,2 \pm 5,2$ % wiesen die Teigwaren ohne Eizusatz ($n = 5$) eine signifikant höhere Resorptionsverfügbarkeit der Gesamt-Carotinoide auf als die Eierteigwaren ($n = 3$), aus denen im Mittel nur $57,3 \pm 1,0$ % resorptionsverfügbar waren ($p < 0,05$, t-Test).

Bei einzelner Betrachtung der beiden Messtage fällt jedoch der Unterschied der Verteilungsmuster vor allem bei den Eierteigwaren auf. Während die Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide für die Teigware „Riesa“ an beiden Messtagen vergleichbar war, unterschieden sich die der beiden anderen Eierteigwaren erheblich, so dass die Verteilung der Carotinoide zwischen Rückstand und Überstand am zweiten Messtag durchaus mit denen der eifreien Teigwaren vergleichbar war (Abb. 49). Die Verluste der Gesamt-Carotinoide während der *in-vitro*-Verdauung lagen zwischen 0 % und 17 %.

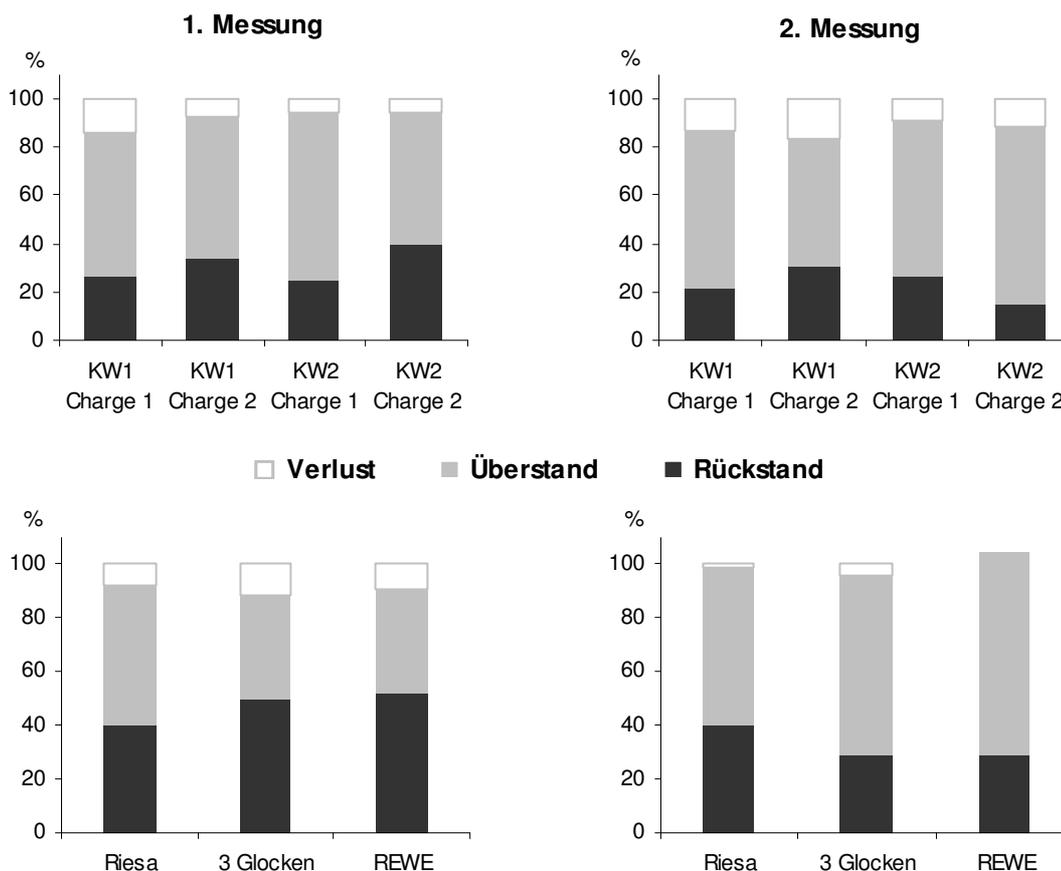


Abb. 49: Vergleich der prozentualen Verteilung der Gesamt-Carotinoide in Rückstand und Überstand von eifreien Teigwaren (oben) und Eierteigwaren (unten) nach simulierter Verdauung an zwei verschiedenen Tagen mit jeweils drei Verdauungsansätzen

Eine Zusammenstellung der Resorptionsverfügbarkeit der einzelnen Xanthophylle erfolgte in Tab. 28. Bis auf eine Ausnahme waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den (*all-E*)-Isomeren von Lutein, Zeaxanthin und Canthaxanthin zu verzeichnen. Auch zwischen (*all-E*)- und (*Z*)-Lutein gab es hinsichtlich ihrer Resorptionsverfügbarkeit bis auf eine Ausnahme keinen signifikanten Unterschied. Während der *in-vitro*-Verdauung wurde keine *trans-cis*-Isomerisierung der Carotinoide beobachtet.

Tab. 28: Resorptionsverfügbarkeit [%] der einzelnen Xanthophylle und Gesamt-Carotinoide aus Teigwaren (Mittelwerte aus allen Verdauungsansätzen)

Teigware	(<i>all-E</i>)-Lutein	(<i>Z</i>)-Lutein	(<i>all-E</i>)- Zeaxanthin	(<i>all-E</i>)- Canthaxanthin	Carotinoide
eifreie Teigwaren					
Handelsware	77,9 ± 0,8 ^a	73,2 ± 2,4*	n. n.	87,9 ± 1,6 ^b	77,7 ± 0,7^A
KW1 Charge 1	72,3 ± 3,2 ^a	73,3 ± 3,9	n. n.	71,7 ± 9,0 ^a	72,3 ± 3,5^{A,C}
KW1 Charge 2	63,0 ± 4,4 ^a	65,3 ± 2,6	n. n.	62,6 ± 2,0 ^a	63,3 ± 4,0^B
KW2 Charge 1	73,2 ± 2,7 ^a	70,7 ± 4,1	n. n.	68,3 ± 13,8 ^a	72,0 ± 2,2^C
KW2 Charge 2	70,7 ± 14,7 ^a	70,5 ± 11,2	n. n.	71,9 ± 9,5 ^a	70,8 ± 14,0^{A,B,C}
Eierteigwaren					
Riesa	58,5 ± 3,2 ^a	57,9 ± 7,3	48,1 ± 21,7 ^a	47,7 ± 8,5 ^a	57,9 ± 2,2^B
3 Glocken	55,7 ± 16,8 ^a	60,0 ± 8,0	59,1 ± 8,6 ^a	52,7 ± 1,5 ^a	56,5 ± 14,5^{A,B,C}
REWE	57,3 ± 17,9 ^a	59,1 ± 13,0	59,2 ± 11,1 ^a	52,3 ± 5,2 ^a	57,6 ± 16,5^{A,B,C}

n. n.: nicht nachweisbar,

^{a-b} verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zw. den (*all-E*)-Isomeren (p<0,05, ANOVA),

^{A-C} verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05, ANOVA, Games-Howell),

* markiert signifikanten Unterschied zwischen (*all-E*)- und (*Z*)-Lutein (p<0,05, t-Test)

4.7.3 Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin E aus Teigwaren

Die Resorptionsverfügbarkeit beschreibt den Anteil der Tocopherole und Tocotrienole im verdauten Probenmaterial, welche im wässrigen Überstand in gemischten Mizellen vorliegen und somit theoretisch für die Aufnahme in Enterozyten zur Verfügung stünden.

Die Extraktion von Vitamin E erfolgte gemeinsam mit der der Carotinoide in Anlehnung an die Methode von BALZ *et al.* (1993). Die wässrigen Überstände wurden direkt mit Lösungsmittel extrahiert. Die gekochten Teigwaren und die Verdauungsrückstände wurden vorher mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Die Wiederfindungsraten des internen Standards α -Tocopherolacetat lagen bei jeweils 20 Teigwaren, Rückständen und Überständen durchschnittlich über 90 %. Die gekochten Nudeln waren aufgrund ihrer Klebrigkeit schwer zu extrahieren, was sich auch in der geringeren Wiederfindungsrate des internen Standards widerspiegelte (Tab. 29). Die relative Standardabweichung der Resorptionsverfügbarkeit aus einer Dreifachbestimmung an einem Tag betrug bei 20 Proben im Mittel $3,6 \pm 3,0$ %. An drei verschiedenen Tagen wurden Resorptionsverfügbarkeiten von Vitamin E aus jeweils drei Verdauungsansätzen einer Probe von $47,8 \pm 2,0$ %, $40,4 \pm 1,4$ % und $40,2 \pm 4,2$ % ermittelt. Die Abweichung zwischen den verschiedenen Tagen war mit einem Variationskoeffizienten von 10,1 % somit deutlich höher. Die durchschnittliche Resorptionsverfügbarkeit von $42,8 \pm 4,3$ % wurde als Referenzwert für die untersuchten Modifikationen der Verdauungsmethode herangezogen.

Tab. 29: Wiederfindungsrate des internen Standards [%] bei Extraktion von Vitamin E aus jeweils 20 Proben (entspricht jeweils 60 Bestimmungen)

unverdaute Teigware	Verdauungsrückstand	Verdauungsüberstand
90,8 ± 11,1 ^A	98,3 ± 7,6 ^B	98,5 ± 8,3 ^B

Unterschiedliche Buchstaben markieren signifikante Unterschiede (p < 0,05, ANOVA, S-N-K).

Für die Vorversuche wurde eine Handelsware ohne Ei verwendet. Der Vergleich unterschiedlicher Verfahren der **Zentrifugation** zur Trennung von wässrigem Überstand und Verdauungsrückstand lieferte die gleichen Ergebnisse wie für die Carotinoide. Eine Zentrifugation bei 4.500 U/min war nicht ausreichend, da sich der daraus resultierende Überstand kaum durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm filtrieren ließ. Die Gehalte an Vitamin E im Überstand lagen bei der Zentrifugation mit 14.000 U/min bei 0,44 µg/ml. Mit steigenden Drehzahlen reduzierten sich die Gehalte bei 20.000 U/min auf 0,25 µg/ml und bei 40.000 U/min auf 0,11 µg/ml. Die **Filtration** der wässrigen Verdauungsüberstände hatte einen nicht signifikanten Verlust von etwa 15 % des Vitamins-E-Gehaltes zur Folge (p = 0,069, t-Test). Nach der simulierten Verdauung im Magen bei einem **pH-Wert** von 2 anstelle von pH 4 wurden nur 32,4 ± 2,3 % des Vitamins E in gemischte Mizellen eingebunden. Der erniedrigte pH-Wert hatte jedoch keine Vitamin-E-Verluste während der Verdauung zur Folge (Abb. 50). Die Verlängerung der **Verdauzeit** auf insgesamt 2 h (Magen und Darm jeweils 1 h) zeigte keinen signifikanten Unterschied der Resorptionsverfügbarkeit zur Ausgangsmethode mit einer Verdauzeit von 1 h (Tab. 30). Während der verlängerten Verdauung waren jedoch höhere Verluste an Vitamin E zu verzeichnen (Abb. 50). Die Zugabe von **Öl** vor der simulierten Verdauung wurde für die Vitamin-E-Bestimmung nicht durchgeführt, da das Rapsöl selbst 161 µmol Vitamin E/100 g enthielt (FRANKE 2008). Die zusätzliche **Menge an Galleextrakt** zeigte außer für die Carotinoide auch für Vitamin E eine deutliche Zunahme der Resorptionsverfügbarkeit (Tab. 30). Diese erhöhte sich im Vergleich zur Ausgangsmethode um etwa 77 %. Folglich wurde die von REBOUL *et al.* beschriebene Methode, inklusive der zusätzlichen Menge an Galleextrakt, für die weiteren Untersuchungen angewandt.

Tab. 30: Resorptionsverfügbarkeit [%] von Vitamin E aus einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode

Ausgangsmethode	Magen pH 2	Verdauung 2 h	erhöhte Gallenmenge
42,8 ± 4,3	32,4 ± 2,3 *	44,6 ± 0,2	75,7 ± 0,7 *

* markiert signifikanten Unterschied zur Ausgangsmethode (p < 0,05, t-Test)

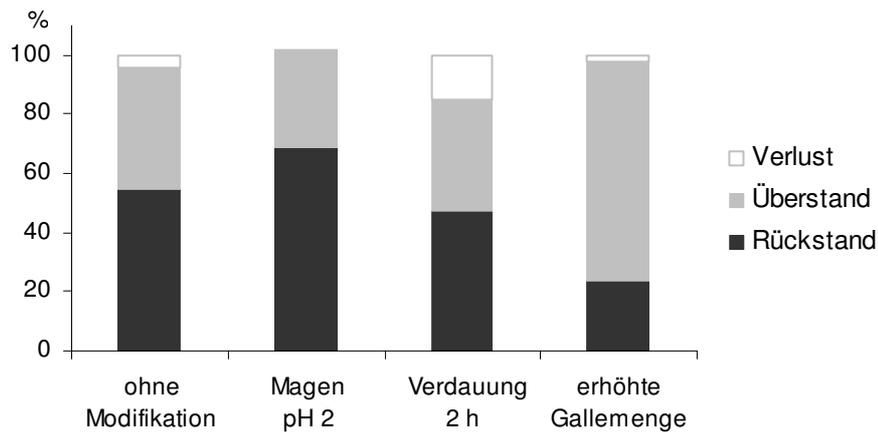


Abb. 50: Prozentuale Verteilung von Vitamin E in Rückstand und Überstand einer Handelsware in Abhängigkeit von der Verdauungsmethode

Aus den Teigwaren der Produktionslinie 1 waren im Mittel $68,2 \pm 5,3$ %, aus denen der Produktionslinie 2 $68,9 \pm 0,9$ % des Vitamins E zur Resorption verfügbar. Zwischen den Teigwaren der beiden industriellen Produktionslinien war hinsichtlich der Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin E kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p > 0,05$, t-Test).

Mit einem Mittelwert von $70,0 \pm 4,2$ % wiesen die Teigwaren ohne Eizusatz ($n = 5$) eine deutlich höhere Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin E auf als die Eierteigwaren ($n = 3$), aus denen im Mittel nur $49,4 \pm 5,1$ % resorptionsverfügbar war ($p < 0,05$, t-Test). Nach simulierter Verdauung verblieb bei den Eierteigwaren ein größerer Anteil an Vitamin E im Verdauungsrückstand als bei den eifreien Teigwaren. Die Verluste an Vitamin E während der *in-vitro*-Verdauung lagen zwischen 0 % und 22 % (Abb. 51).

Unter Berücksichtigung aller Verdauungsansätze waren kaum signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tocopherolen und Tocotrienolen hinsichtlich ihrer Resorptionsverfügbarkeit aus Teigwaren festzustellen (Tab. 31). Ursache hierfür war die relativ hohe Streuung der Mittelwerte (aus $n = 6$), die wiederum aus den abweichenden Ergebnissen an zwei verschiedenen Tagen resultierte (siehe auch Abb. 51). Bei getrennter Betrachtung beider Datensätze (jeweils $n = 3$), zeigten sich mehrere signifikante Unterschiede in der Resorptionsverfügbarkeit der einzelnen Vitamin-E-Isomere (Tab. A 19). Die unterschiedliche Resorptionsverfügbarkeit folgte bei den Eierteigwaren dem gleichen Muster wie bei den eifreien Teigwaren. Bis auf wenige Ausnahmen war α -Tocopherol besser verfügbar als β -Tocopherol. Dieser Unterschied war jedoch nur bei der Hälfte der Daten signifikant ($p < 0,05$). Die Resorptionsverfügbarkeit von γ -Tocopherol unterschied sich in den meisten Fällen nicht signifikant ($p > 0,05$) von der der anderen Tocopherole, war jedoch tendenziell meist höher als die des β -Tocopherols und geringer als die des α -Tocopherols. Die Resorptionsverfügbarkeit von β -Tocotrienol war tendenziell etwas höher als die des α -Tocotrienols.

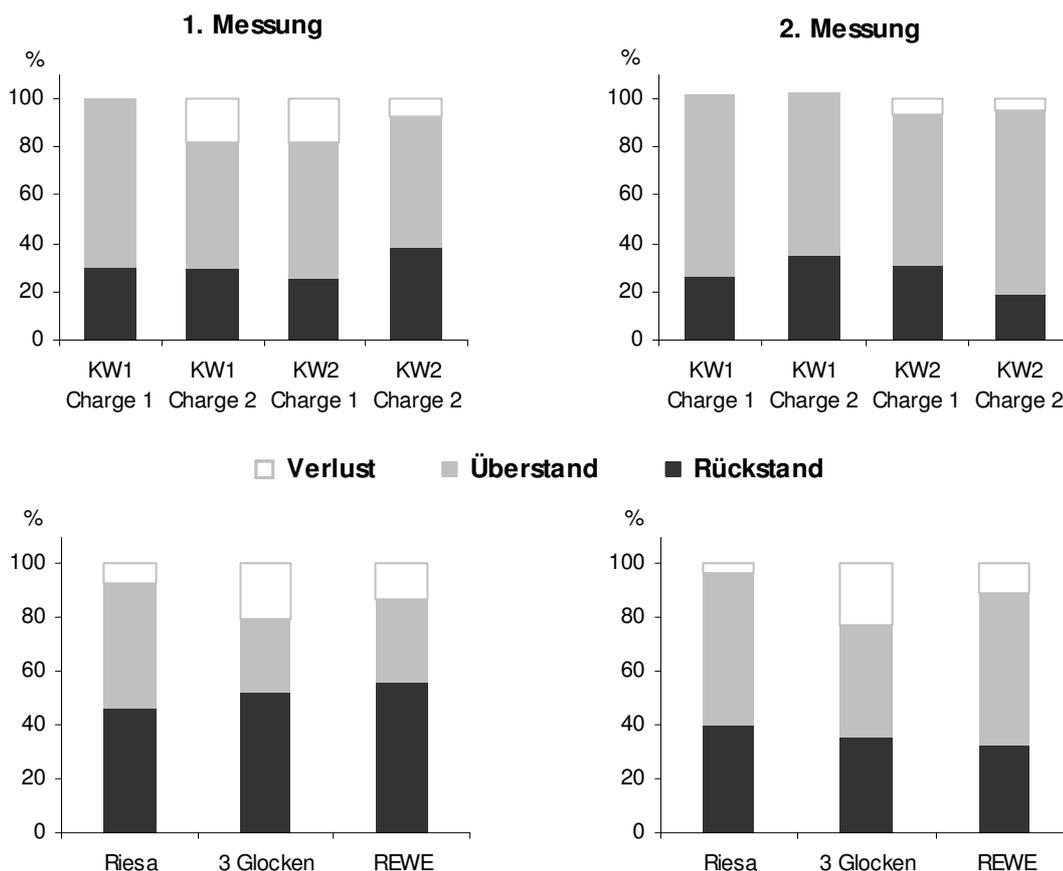


Abb. 51: Vergleich der prozentualen Verteilung von Vitamin E in Rückstand und Überstand von eifreien Teigwaren (oben) und Eierteigwaren (unten) nach simulierter Verdauung an zwei verschiedenen Tagen mit jeweils drei Verdauungsansätzen

Tab. 31: Resorptionsverfügbarkeit [%] der einzelnen Tocopherole (T), Tocotrienole (T3) und Vitamin E (T+T3) aus Teigwaren (Mittelwerte aus allen Verdauungsansätzen)

Teigware	α-T	β-T	γ-T	α-T3	β-T3	Vitamin E
eifreie Teigwaren						
Handelsware	80,6 ± 0,5 ^a	85,1 ± 1,9 ^b	n. n.	69,0 ± 0,0 ^c	73,7 ± 0,7 ^d	75,7 ± 0,7 ^{A,C}
KW1 Charge 1	75,8 ± 2,8 ^a	69,1 ± 3,7 ^b	n. n.	68,5 ± 3,8 ^b	71,4 ± 3,1 ^b	71,9 ± 3,0 ^{A,B}
KW1 Charge 2	65,9 ± 3,0 ^a	64,3 ± 4,9 ^a	n. n.	59,7 ± 3,5 ^a	64,5 ± 5,3 ^a	64,5 ± 4,2 ^B
KW2 Charge 1	70,3 ± 1,5 ^a	65,5 ± 6,2 ^a	n. n.	64,6 ± 2,6 ^a	68,3 ± 1,8 ^a	68,2 ± 1,4 ^B
KW2 Charge 2	73,0 ± 10,6 ^a	64,1 ± 15,9 ^a	n. n.	66,1 ± 14,3 ^a	69,3 ± 12,6 ^a	69,5 ± 12,5 ^{B,C,D}
Eierteigwaren						
Riesa	60,0 ± 5,0 ^a	39,5 ± 4,4 ^b	48,0 ± 8,5 ^c	50,5 ± 5,1 ^c	53,4 ± 4,4 ^{a,c}	54,3 ± 4,4 ^D
3 Glocken	45,8 ± 10,1 ^a	36,9 ± 13,0 ^a	40,4 ± 7,9 ^a	41,7 ± 8,3 ^a	44,6 ± 11,7 ^a	44,2 ± 10,9 ^D
REWE	52,0 ± 14,4 ^a	42,0 ± 19,9 ^a	45,6 ± 17,9 ^a	48,3 ± 13,2 ^a	49,8 ± 15,6 ^a	49,8 ± 15,2 ^{B,C,D}

n. n.: nicht nachweisbar,

^{a-d} verschiedene Buchstaben in einer Zeile markieren signifikante Unterschiede (p < 0,05, ANOVA, S-N-K),

^{A-D} verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede (p < 0,05, ANOVA, Games-Howell)

5 DISKUSSION

5.1 Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin

Die (*all-E*)-Konfiguration von Carotinoiden ist nur im kristallinen Zustand stabil (ZECHMEISTER 1944). Eine *trans-cis*-Isomerisierung einer Carotinoidlösung kann bereits bei Raumtemperatur stattfinden, auch wenn es sich dabei um einen sehr langsamen Prozess handelt. Um größere Mengen an (*Z*)-Isomeren herzustellen, eignen sich eine thermische Isomerisierung von Carotinoiden in Lösung oder im kristallinen Zustand (durch Einschmelzen der Kristalle), die Isomerisierung durch Iodkatalyse oder durch Säurekatalyse sowie die Photo-Isomerisierung (ZECHMEISTER 1944). Die Bildung von Stereoisomeren unter Iodkatalyse wird durch Licht begünstigt (ZECHMEISTER 1944) und demzufolge häufig als kombinierte Photo-Iod-Isomerisierung durchgeführt. Sichtbares Licht scheint für eine Isomerisierung von Carotinoiden wesentlich effektiver zu sein als UV-Licht (ZECHMEISTER 1944). Daraufhin wurde in den vorliegenden Untersuchungen normales Laborlicht verwendet. Die Belichtungsdauer schien jedoch einen weitaus geringeren Einfluss als die Iodmenge auszuüben. Bereits ein kurzer Lichtimpuls reicht zur Bildung von (*Z*)-Isomeren aus (ZECHMEISTER 1944). Die Ergebnisse aus den Isomerisierungsversuchen unter Iodkatalyse waren schlecht reproduzierbar, wahrscheinlich auch weil eine vollständige Entfernung des Iods aus der Lösung zur Unterbindung der Reaktion recht schwierig war. Die thermische Isomerisierung lieferte die gleichen Stereoisomere der beiden Xanthophylle wie die Iodkatalyse, war jedoch praktisch einfacher durchzuführen.

Wird ein (*all-E*)-Carotinoid einer Isomerisierung unterzogen, so wird die Bildung von (*mono-Z*)-Isomeren favorisiert (ZECHMEISTER 1944). Die Iod-induzierte Isomerisierung von Lutein und Zeaxanthin lieferte demzufolge nur (*mono-Z*)-Isomere (KHACHIK *et al.* 1992a). (*9Z*)- und (*13Z*)-Isomere waren die Hauptformen sowohl unter Iodkatalyse (UPDIKE und SCHWARTZ 2003, AMAN *et al.* 2005a, LI und HAN 2008) als auch unter Hitzeeinwirkung (SUBAGIO *et al.* 1998, AMAN *et al.* 2005b). Diese Beobachtung deckt sich mit den eigenen Ergebnissen der Erhitzung bei 140 °C. Nach einer Stunde waren die als (*13Z*) oder (*13'Z*) vermuteten Isomere die dominierenden (*Z*)-Isomere. Die als (*9Z*) und (*9'Z*) angenommenen Isomere entstanden in größeren Mengen erst bei längerer Erhitzung. AMAN *et al.* (2005a) fanden nach Isomerisierung von (*all-E*)-Lutein fünf dominante Peaks, von (*all-E*)-Zeaxanthin nur drei. Die eigenen Isomerisierungsversuche ergaben sowohl nach Iodkatalyse als auch nach Erhitzung bei 140 °C ebenfalls drei charakteristische Peaks für Zeaxanthin. Bei Lutein traten nur vier größere Peaks auf, was auf eine Coelution von (*13Z*)- und (*13'Z*)-Lutein oder auch auf eine Coelution eines der beiden Isomere mit (*all-E*)-Lutein schließen lässt. Vor

beiden (*all-E*)-Isomeren der Xanthophylle eluierten jeweils 3-4 kleinere Peaks, die mengenmäßig variierten (z. B. in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer, siehe Abb. 18, Seite 53) und aufgrund ihrer Absorptionsspektren nicht zu identifizieren waren.

5.2 Charakterisierung von Carotinoiden in Hartweizen

Eine vorläufige Identifizierung der (*Z*)-Isomere der Carotinoide in Hartweizen und Teigwaren erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten der Probenpeaks mit denen von isomerisierten Standards (siehe Abb. 21, Seite 55), den Vergleich mit publizierten Trennungen mit Hilfe von C_{30} -Säulen und isokratischer Elution, die Auswertung der PDA-Absorptionsspektren und Berechnung charakteristischer Kenngrößen sowie durch massenspektroskopische Analysen.

5.2.1 UV-vis-Spektroskopie

Das für Carotinoide typische dreigipflige Absorptionsspektrum weist einige Charakteristika auf, die zur Identifizierung herangezogen werden können. (*Z*)-Carotinoid-Isomere sind in der Regel charakterisiert durch eine hypsochrome Verschiebung ihres Absorptionsmaximums, eine Verringerung der Absorptionsintensität und demzufolge der Farbintensität (hypochromer Effekt), eine Reduzierung der Feinstruktur zwischen 400 und 500 nm, das Auftreten eines zusätzlichen Absorptionsmaximums etwa 142 ± 2 nm unter dem Maximum der höchsten Wellenlänge, dem so genannten „*cis*-Peak“ (Abb. 52) sowie einer höheren Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln (ZECHMEISTER 1944, BRITTON *et al.* 2004, SCHIEBER und CARLE 2008).

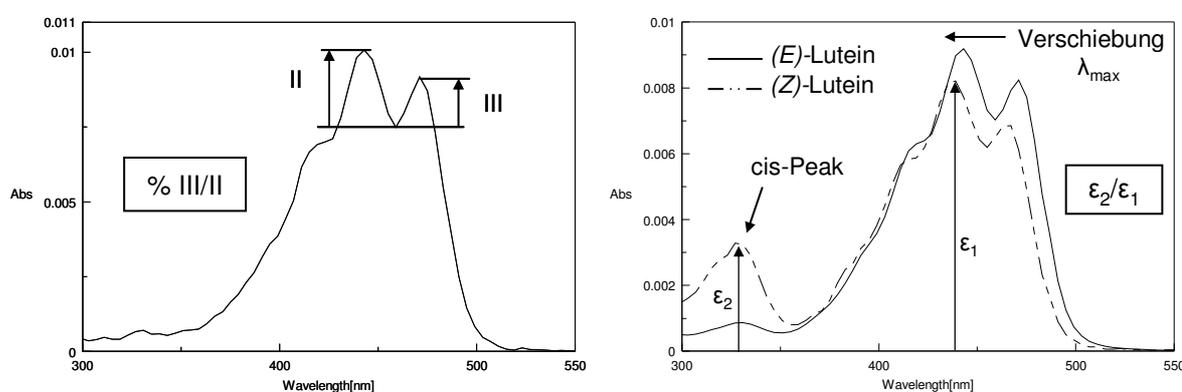


Abb. 52: Charakteristische Merkmale von UV-vis-Absorptionsspektren zur Identifizierung von (*all-E*)- und (*Z*)-Isomeren der Carotinoide am Beispiel des Luteins

In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine **Wellenlänge des Hauptmaximums (λ_{\max})** von 443 nm für (*all-E*)-Lutein und 447 nm für (*all-E*)-Zeaxanthin im HPLC-Eluenten ermittelt. Dieses Absorptionsmaximum war bei dem (*Z*)-Lutein-Isomer 1 um 8 nm und bei den (*Z*)-Lutein-Isomeren 2 und 3 jeweils um 4 nm verschoben. Die beiden (*Z*)-Zeaxanthin-Isomere zeichneten sich durch eine Verschiebung von λ_{\max} um 4 nm gegenüber dem (*all-E*)-Zeaxanthin aus. Eine so geringe hypsochrome Verschiebung deutet auf (*mono-Z*)-Isomere hin (BRITTON 1995b), was sich mit den Ergebnissen aus Isomerisierungsversuchen anderer Autoren deckt (siehe Kapitel 5.1). Die Verschiebung des Absorptionsmaximums steigt mit der Anzahl der (*Z*)-Bindungen (ENGLERT *et al.* 1991). Bei einer Verschiebung von mehr als 10 nm ist von einem (*di-Z*)-Isomer auszugehen (ZECHMEISTER 1944). So zeigte beispielsweise ein (*di-Z*)-Lutein-Isomer eine hypsochrome Verschiebung um 16 nm (KHACHIK *et al.* 1999). Das Ausmaß der hypsochromen Verschiebung lässt ebenso Rückschlüsse auf die Lage der (*Z*)-Bindung zu. So beobachteten AMAN *et al.* (2005a) eine Verschiebung von 4-5 nm bei (*9Z*)- und (*9'Z*)-Lutein und von 6-8 nm bei (*13Z*)- und (*13'Z*)-Lutein. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch KHACHIK *et al.* (1992a) für Lutein- und Zeaxanthin-Isomere. In beiden Studien war im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen eine Unterscheidung zwischen (*9Z*)- und (*9'Z*)-Lutein anhand der hypsochromen Verschiebung möglich.

Eine Kenngröße für die **Feinstruktur des Spektrums** ist der Wert % III/II, der das prozentuale Verhältnis der Extinktion des Maximums der höchsten Wellenlänge zu der des Hauptmaximums widerspiegelt (Abb. 52). Mit Hilfe dieses Wertes lassen sich die einzelnen Isomere von Lutein und Zeaxanthin gut unterscheiden. Für (*all-E*)-Lutein ist dieses Verhältnis etwa doppelt so hoch wie für (*all-E*)-Zeaxanthin. Da Lutein kein symmetrisches Carotinoid ist, existieren Paare geometrischer Isomere, z. B. (*13Z*) und (*13'Z*). Die (*9Z*)- bzw. (*9'Z*)-Isomere beider Xanthophylle besitzen ähnliche % III/II-Werte wie ihre (*all-E*)-Analoge, die (*13Z*)- bzw. (*13'Z*)-Isomere zeichnen sich hingegen durch wesentlich geringere Verhältnisse aus (Tab. 32).

Ein Maß für die **Intensität des *cis*-Peaks** ist der ϵ_2/ϵ_1 -Wert als der Quotient aus der Höhe des *cis*-Peaks und der Höhe des Hauptmaximums (Abb. 52). Dessen reziproker Wert, also der Quotient aus Hauptmaximum und *cis*-Peak, wird in der Literatur gelegentlich auch als Q-Verhältnis bezeichnet (SALEH und TAN 1991, ABDEL-AAL und AKHTAR 2006). (*Z*)-Isomere zeichnen sich durch hohe ϵ_2/ϵ_1 -Werte und geringe Q-Werte im Vergleich zu den (*all-E*)-Isomeren aus. Zentrale (*Z*)-Bindungen verursachen einen ausgeprägten *cis*-Peak und eine verringerte Absorption im Maximum. Bei peripheren (*Z*)-Bindungen tritt lediglich ein schwacher *cis*-Peak im Spektrum auf (BRITTON 1995b).

Tab. 32: Vergleich der ermittelten UV-vis-spektroskopischen Daten mit publizierten Werten

Carotinoid	% III/II-Werte		ϵ_2/ϵ_1 -Werte	
	eigene*	publizierte	eigene*	publizierte
(<i>all-E</i>)-Lutein	59	65 ^A / 65 ^B / 60 ^C / 55 ^D	0,066	0,049 ^A / 0,047-0,127 ^E / 0,051 ^F / 0,17 ^G
(13 <i>Z</i>)-Lutein	38	31 ^A / 30 ^B	0,412	0,441 ^A / 0,44 ^B / 0,336-0,455 ^E / 0,412 ^F / 0,49 ^G
(13' <i>Z</i>)-Lutein		43 ^A / 42 ^B		0,412 ^A / 0,41 ^B / 0,336-0,455 ^E / 0,412 ^F / 0,40 ^G
(9 <i>Z</i>)-Lutein	63	67 ^A	0,100	0,109 ^A / 0,117-0,140 ^E / 0,304 ^F
(9' <i>Z</i>)-Lutein	55	50 ^A	0,092	0,141 ^A / 0,116-0,162 ^E / 0,300 ^F
(<i>all-E</i>)-Zeaxanthin	30	33 ^A / 34 ^B / 25 ^C / 31 ^D	0,061	0,059 ^A / 0,066-0,085 ^E / 0,053 ^H / 0,000 ^J
(13 <i>Z</i>)-Zeaxanthin	11	10 ^A / 11 ^B	0,401	0,490 ^A / 0,48 ^B / 0,455-0,475 ^E / 0,233 ^H / 0,440 ^J
(9 <i>Z</i>)-Zeaxanthin	35	32 ^A	0,126	0,140 ^A / 0,175-0,266 ^E / 0,112 ^H / 0,097 ^J

* mittels PDA-Detektor in Methanol/Wasser (97/3) ermittelt

^A AMAN *et al.* 2005a: MtBE/Methanol/Wasser (Gradient)

^B LI und HAN 2008: Methanol/Aceton (Gradient)

^C BRITTON 1995b: Ethanol

^D CORTES *et al.* 2004: Methanol/Wasser/MtBE (Gradient)

^E KHACHIK *et al.* 1992a: Hexan, Ethanol, Aceton und Dichlormethan, Coelution (13*Z*)- und (13'*Z*)-Lutein

^F SUBAGIO *et al.* 1998: Benzol, Coelution (13*Z*)- und (13'*Z*)-Lutein

^G SALEH und TAN 1991: Acetonitril/Methanol/Dichlormethan (80/18/2)

^H ENGLERT *et al.* 1991: Diethylether/Isopentan/Ethanol (5/5/2)

^J BÖHM *et al.* 2002: Methanol/MtBE (Gradient)

Die Auswertung der Absorptionsspektren und der Vergleich mit Literaturwerten (Tab. 32) ließ die Vermutung zu, dass es sich bei dem (*Z*)-Lutein-Isomer 1 um (13*Z*)- oder (13'*Z*)-Lutein handelt. Eine Coelution beider Verbindungen kann nicht ausgeschlossen werden. Das Isomer 2 könnte (9*Z*)-Lutein und das Isomer 3 (9'*Z*)-Lutein sein. Die beiden Isomere waren zwar nicht mit Hilfe ihrer UV-vis-spektroskopischen Daten zu unterscheiden, ein Vergleich mit publizierten Trennungen an C₃₀-Säulen (DACHTLER *et al.* 1998, UPDIKE und SCHWARTZ 2003, AMAN *et al.* 2005a) ließ dennoch diese Schlussfolgerung zu (Abb. 53). Das (*Z*)-Zeaxanthin-Isomer 1 ist vermutlich (13*Z*)-Zeaxanthin, das Isomer 2 (9*Z*)-Zeaxanthin. Letzteres wurde nur bei den Isomerisierungsversuchen, nicht jedoch in Hartweizen und Teigwaren gefunden. Die eindeutige Identifizierung der einzelnen Verbindungen anhand ihrer Absorptionsspektren ist nicht möglich. Zudem wird der Vergleich mit Literaturdaten erschwert, da sämtliche Eigenschaften der Absorptionsspektren und die daraus berechneten Kenngrößen von den verwendeten Lösungsmitteln abhängen.

ABDEL-AAL *et al.* (2007) detektierten in Hartweizen neben (*all-E*)-Lutein und (*all-E*)-Zeaxanthin ebenfalls (13*Z*)-, (13'*Z*)- und (9*Z*)-Lutein. Zusätzlich zu den genannten Isomeren wurden in Weizen und Teigwaren auch (9'*Z*)-Lutein, (13*Z*,13'*Z*)-Lutein sowie (13*Z*)- und (9*Z*)-Zeaxanthin gefunden (HUMPHRIES und KHACHIK 2003).

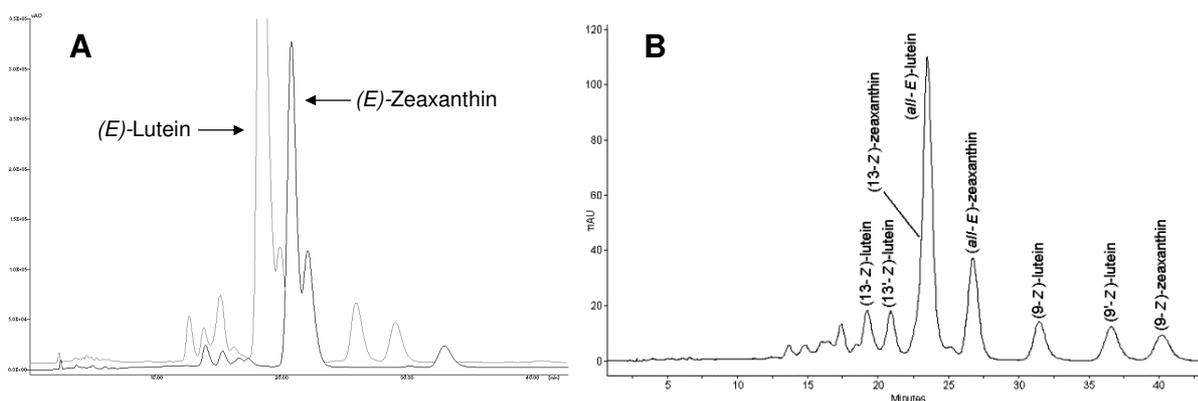


Abb. 53: HPLC-Trennung isomerisierter Lutein- (grau) und Zeaxanthin-Standards (schwarz) (A) im Vergleich zu einer von AMAN *et al.* (2005a) publizierten Methode (B)

A: Trentec PEEK-C₃₀-Säule, MeOH/H₂O (97/3, v/v), 1,3 ml/min, 20 ± 1 °C

B: YMC C₃₀-Säule, Aceton/H₂O (82/18, v/v), 1,0 ml/min, 20 °C

5.2.2 Massenspektroskopie

Die Massenspektroskopie ist ein wichtiges Verfahren zur Identifizierung von Substanzen anhand ihrer Molekülmassen. Obwohl Lutein und Zeaxanthin die gleiche Molekülmasse besitzen, war aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Struktur eine eindeutige Unterscheidung mittels Massenspektroskopie möglich. Lutein und Zeaxanthin haben unterschiedliche Iononringe. Während Zeaxanthin symmetrisch ist, besitzt Lutein einen Iononring in β - und einen in ε -Konfiguration. Die allylische Hydroxylgruppe an der C3'-Position wird leicht eliminiert, wodurch Anhydrolutein bzw. Dehydrolutein entsteht (Abb. 54). Die Dehydrierung von Lutein geschieht in der APCI-Quelle bei Temperaturen über 450 °C vor der Ionisierung an der Koronaentladungsnadel (HAO *et al.* 2005). Die für Lutein charakteristische Wasserabspaltung führt zur Bildung eines Tochterions mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis von 551, welches zur Identifizierung von Lutein herangezogen werden kann (VAN BREEMEN *et al.* 1996, DACTLER *et al.* 2001, BREITHAUPT und BAMEDI 2002, LIENAU *et al.* 2003, AMAN *et al.* 2005a, HAO *et al.* 2005, SCHLATTERER und BREITHAUPT 2006, DE ROSSO und MERCADANTE 2007, LAKSHMINARAYANA *et al.* 2007, 2008). Zeaxanthin wird in wesentlich geringerem Ausmaß dehydriert und demzufolge über das Quasimolekülion (m/z 569) identifiziert.

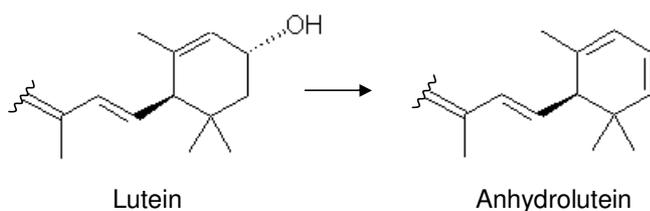


Abb. 54: Bildung von Anhydrolutein aus Lutein

Eine Unterscheidung zwischen (*all-E*)- und (*Z*)-Isomeren der Carotinoide ist mittels Massenspektroskopie nicht möglich. Auch über die genaue Identität der verschiedenen (*Z*)-Isomere kann keine Aussage getroffen werden. Die MS-Messungen sollten jedoch Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den als (*Z*)-Isomere der beiden Xanthophylle angenommen Peaks tatsächlich um Konfigurationsisomere von Lutein und Zeaxanthin handelt oder ob eventuell weitere Carotinoide oder deren Metabolite mit abweichenden Massen detektiert werden können. Sämtliche Peaks der untersuchten Teigware wiesen die charakteristischen Massen von 551 bzw. 569 auf. Damit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den in Hartweizen und eifreien Teigwaren vorliegenden Carotinoiden ausschließlich um Lutein- und Zeaxanthin-Isomere handelt.

5.3 Extrahierbarkeit von Carotinoiden

5.3.1 Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen

Lösungsmittlextraktion

Die Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Lebensmitteln hängt in erster Linie vom verwendeten Lösungsmittel ab. Zur Bestimmung der **Gelbpigmente** in Hartweizen und daraus hergestellten Produkten (Grieß, Teigwaren) existieren seit langem Standardmethoden, die auf einer Extraktion mit wassergesättigtem 1-Butanol (wBuOH) bei Raumtemperatur innerhalb von 16-18 h beruhen (AACC 1961, ICC 1990). Dieses Lösungsmittelgemisch wurde in einem Vergleich von 60 organischen Lösungsmitteln als das Beste zur Extraktion von Weizenpigmenten ermittelt (BINNINGTON *et al.* 1938). Auch bei der Extraktion von Carotinoiden aus Weizen schien wBuOH effektiver zu sein als THF (HIDALGO *et al.* 2006, ABDEL-AAL *et al.* 2007), MtBE, 80 % Ethanol und 80 % Methanol (ABDEL-AAL *et al.* 2007). Vorausgegangene Untersuchungen im Rahmen der Diplomarbeit der Autorin haben ebenfalls eine effektivere Extrahierbarkeit der Gelbpigmente mit wBuOH im Vergleich zu Lösungsmittelgemischen wie Methanol/THF (1/1, v/v) und Methanol/MtBE (1/1, v/v) ergeben (BURKHARDT 2003).

HENTSCHEL *et al.* (2002) zogen erstmalig einen Vergleich zwischen dem photometrisch bestimmten Gelbpigmentgehalt und dem flüssigchromatographisch ermittelten Gehalt an Lutein und Zeaxanthin. Dabei entfielen nur zwischen 30 und 50 % des Gelbpigmentgehaltes auf die Carotinoide. Obwohl der Carotinoidgehalt von Hartweizen zu über 90 % aus Lutein bestand (Abb. 39, Seite 72) und (*all-E*)-Lutein demzufolge als Referenzsubstanz für die Bestimmung der Gelbpigmente verwendet wurde, ergaben die eigenen Analysen ähnlich hohe Unterschiede zwischen Carotinoid- und Gelbpigmentgehalt (Abb. 37, Seite 69). HENTSCHEL *et al.* (2002) vermuteten eine Beteiligung weiterer Substanzen am Pigmentgehalt

von Hartweizen. Diese Hypothese wurde auch durch Untersuchungen von LEENHARDT *et al.* (2006a) und ABDEL-AAL *et al.* (2007) gestützt. Letztere fanden einen um etwa 20 % höheren Gehalt an Gelbpigmenten im Vergleich zum Carotinoidgehalt bei verschiedenen Weizenarten. Für Routineanalysen an Rohmaterialien, Grießen und Teigwaren haben in der industriellen Praxis präzisere Analysen der Pigmentzusammensetzung wahrscheinlich keine Relevanz. Da sekundäre Pflanzenstoffe wie z. B. Carotinoide durch ihre funktionellen Eigenschaften zunehmend als gesundheitsfördernd diskutiert werden, ist die Aufklärung der Pigmentzusammensetzung von Hartweizen jedoch eine wichtige Aufgabe (LINDHAUER 2001). Im Hinblick auf die Stabilität der farbgebenden Verbindungen während der Verarbeitung von Hartweizengrieß zu Teigwaren ist die exakte Kenntnis der Identität der Gelbpigmente die Voraussetzung zur Anwendung optimaler Prozessbedingungen zum Erhalt dieser wertgebenden Inhaltsstoffe.

Eigene Analysen ließen eine unvollständige Extraktion der Carotinoide mit Hilfe organischer Lösungsmittel vermuten. Demzufolge musste die Extraktionsmethode optimiert werden. Hierfür wurden einige Einflussfaktoren auf die Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Hartweizen untersucht. Aufgrund der bereits genannten Ergebnisse und Literaturdaten sowie der weitläufig angewandten Standardmethoden konnte von einer quantitativen Extraktion von Gelbpigmenten aus Weizen mittels wBuOH ausgegangen werden. Daher wurde die ICC-Standardmethode Nr. 152 als Referenzmethode für die Optimierungsversuche zur Extraktion von Carotinoiden herangezogen. Die Butanol-Extrakte selbst waren zur Carotinoid-Analyse mittels HPLC nicht geeignet, da das Lösungsmittel etwa 16 % Wasser enthielt. Damit war es schlecht abzdampfen und auch nicht kompatibel zur mobilen Phase. Außerdem war es durch eine relativ hohe Viskosität (im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln) sowie durch einen unangenehmen Geruch gekennzeichnet, was seinen Einsatz für Routineanalysen beschränkte.

Für die Extraktion der **Carotinoide** existieren keine Standardmethoden. Das Spektrum der in der Praxis verwendeten Lösungsmittel bzw. -gemische ist groß. Die unterschiedliche Polarität von Xanthophyllen und Carotinen erschwert die Auswahl eines geeigneten Extraktionsmittels. Lutein war schlecht löslich in Hexan, während sich β -Carotin am wenigsten in Methanol und Acetonitril löste. Die Löslichkeit beider Carotinoide war bei dem Vergleich von 18 organischen Lösungsmitteln in Tetrahydrofuran (THF) am höchsten (CRAFT und SOARES 1992). SCOTT (1992) verglich einige Lösungsmittel hinsichtlich der Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse. Methanol war am besten zur Extraktion trockener Materialien geeignet, während THF für flüssige Lebensmittel am effektivsten erschien. Demzufolge war eine Mischung aus Methanol und THF zur Extraktion und zum Lösen der Carotinoide am besten geeignet. Diese Methode wurde von HART und SCOTT (1995) weiterentwickelt und an einer

Reihe von pflanzlichen Materialien getestet. In einer Vergleichsstudie zwischen 17 europäischen Laboratorien konnte die Überlegenheit dieser Extraktionsmethode bezüglich Extraktionsausbeute (speziell von Xanthophyllen) und Präzision gegenüber anderen Analysemethoden demonstriert werden (SCOTT *et al.* 1996). Die Wahl eines geeigneten Extraktionsmittels für Carotinoide fiel demzufolge auf Methanol/THF (1/1, v/v) mit Zusatz von 0,1 % BHT als Stabilisator für die oxidationsempfindlichen Verbindungen.

Zwischen Hartweizengrieß und eifreien Teigwaren bestanden erhebliche Unterschiede in der Extrahierbarkeit der Carotinoide mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT), wobei die Grieße besser extrahierbar waren als die Teigwaren. Ein Unterschied in den Gehalten freier und gebundener Lipide wurde für Hartweizengrieß und Teigwaren beschrieben (BARNES *et al.* 1981). Bindungen mit Proteinen oder Stärke könnten die schlechtere Extrahierbarkeit der Lipide mit unpolaren Lösungsmitteln verursacht haben. Auch ein mechanischer Einschluss in die dehydrierte Protein- und Stärkematrix wurde diskutiert. Die gleichen Effekte erschienen auch für Fettbegleitstoffe wie Carotinoide plausibel. Eine weitere Ursache für die verschiedenen Extraktionsraten könnten auch unterschiedliche Partikelgrößen bei Grieß und gemahlene Teigwaren sein. Vor allem der Grieß, der für die industrielle Teigwarenproduktion verwendet wurde, war mit Partikelgrößen unter 0,5 mm sehr fein. Dieser Grieß zeichnete sich durch eine bessere Extrahierbarkeit der Carotinoide mit dem Lösungsmittelgemisch im Vergleich zu den Grießen aus dem Handel aus (Abb. 37, Seite 69). Zum Schutz der hitzeempfindlichen Substanzen wurden die Teigwaren so kurz wie möglich vermahlen. Dabei waren vermutlich nicht derartig feine Mahlprodukte entstanden wie beim Grieß. Der Vermahlungsgrad der Produkte kann jedoch die Extraktionsrate der Carotinoide signifikant beeinflussen (siehe Abschnitt „Partikelgröße“, Seite 105).

Auffällig war der Unterschied in der Extrahierbarkeit der Carotinoide mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) aus den Teigwaren der beiden industriellen Produktionslinien. Mit der direkten Lösungsmittlextraktion wurden bei der KW1 durchschnittlich ein Viertel der mittels Quellung mit Wasser und anschließender Lösungsmittlextraktion bestimmten Carotinoidgehalte ermittelt. Bei der KW2 lag der mittels Lösungsmittel extrahierbare Carotinoidgehalt bei knapp einem Drittel des Gehaltes nach Extraktion mit vorheriger Quellung mit Wasser (Tab. A 13). Die Ursachen sind in dem unterschiedlichen Produktionsprozess und dem damit verbundenen Einfluss auf die Teigwarenmatrix zu suchen. Die Polymatik[®]-Presse der PL 1 produzierte einen stark verdichteten Teig. Die hohen Trocknungstemperaturen könnten ebenfalls für eine schlechtere Extrahierbarkeit der Carotinoide verantwortlich sein. Diese führen zur Ausbildung eines festeren und kompakteren Proteinnetzwerks verglichen mit niedrigeren Trocknungstemperaturen (FARDET *et al.* 1999).

Zwischen eifreien Teigwaren und solchen mit Eizusatz fiel ebenfalls ein Unterschied in der Extrahierbarkeit der Carotinoide mit dem Lösungsmittelgemisch auf. Die direkte Lösungsmittelextraktion lieferte bei Eierteigwaren zum Teil deutlich höhere Gehalte an Carotinoiden als bei reinen Hartweizenteigwaren (Abb. 37, Seite 69). Die Carotinoide in Eierteigwaren stammten nicht ausschließlich aus dem Getreide, sondern gelangten außerdem durch den Eizusatz in die Produkte. CHUNG *et al.* (2004) beschrieben eine hohe Bioverfügbarkeit der Carotinoide aus der gut zugänglichen Fettmatrix des Eidotters, welche sicherlich auch auf die chemische Extrahierbarkeit dieser Verbindungen übertragen werden kann. Während der Verarbeitung von Grieß und Eiern wurden die Ei-Carotinoide vermutlich weniger fest in die Teigwarenmatrix eingebunden, so dass sie mit Lösungsmitteln besser extrahierbar waren als die Carotinoide aus dem Getreide. Möglicherweise könnte diese Beobachtung auch für die Bioverfügbarkeit der Carotinoide aus Eierteigwaren eine Rolle spielen.

Einweichen der Proben mit Lösungsmittel

Wie bereits für den Gelbpigmentgehalt beschrieben, schien die Einweichzeit der Proben mit dem Lösungsmittel für die Carotinoidgehalte im Extrakt eine Rolle zu spielen. Die ICC-Standardmethode Nr. 152 schreibt eine Extraktionszeit von 16-18 h vor. In Anlehnung an diese Standardmethode wurde die Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Hartweizen in Abhängigkeit von der Standzeit mit dem Lösungsmittel untersucht. Erwartungsgemäß erhöhte sich der Carotinoidgehalt im Extrakt mit zunehmender Einweichzeit. Nach etwa 24 h bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) war die maximale Extraktionsausbeute erreicht (Abb. 26, Seite 60). Gerade für solche langen Extraktionszeiten ist der Zusatz von BHT als Antioxidans notwendig (CRAFT und SOARES 1992). Auch getrocknetes Grünfutter (Gras, Luzerne) war schwer zu extrahieren und wurde zur vollständigen Extraktion der Carotinoide über Nacht (16 h) mit n-Hexan/Aceton (7/3, v/v) eingeweicht (KÖHLER *et al.* 1967). Meist wird in der Literatur jedoch eine schonende und rasche Extraktion von Carotinoiden empfohlen, da Licht, hohe Temperaturen und Sauerstoff zu Abbau, strukturellen Umformungen, Bildung von Stereoisomeren und anderen physikalisch-chemischen Reaktionen während der Analyse führen können (HART und SCOTT 1995). RODRIGUEZ-AMAYA (2001) empfahl ebenfalls ein Einweichen von schwer extrahierbaren Proben mit dem Extraktionsmittel, um die Zellwände aufzuweichen. Eine zu lange Standzeit (> 15 min) sollte aber vermieden werden. Während des langen Einweichens der Proben mit dem Lösungsmittel überlagerten sich möglicherweise zwei Prozesse. Ein Verlust von Carotinoiden könnte durch die zunehmende Extraktionsrate überdeckt worden sein. Die weiterführenden Untersuchungen erfolgten daher mit dem Bestreben, die Einweichzeit zu verkürzen und die Extraktionsrate weiter zu erhöhen.

Schütteln während des Einweichens mit Lösungsmittel

Das permanente Schütteln im Schüttelwasserbad während des Einweichens mit dem Lösungsmittel konnte entgegen der Erwartungen die Extraktion nicht verbessern oder beschleunigen. Ein permanentes Schütteln schien auch für die Extraktion der Gelbpigmente nicht notwendig zu sein. Die ICC-Standardmethode schrieb lediglich ein mehrmaliges Schütteln der Erlenmeyerkolben während der ersten Stunde der Extraktion vor (ICC 1990). BORRELLI *et al.* (2003) ermittelten mit Hilfe einer 5-stündigen Extraktion unter permanentem Schütteln von Grieß mit n-Hexan/Ethanol (3/4, v/v) im Dunkeln bei Raumtemperatur recht hohe Luteingehalte (Tab. 34, Seite 109).

Temperatur

Durch die Erhöhung der Temperatur während des Einweichens der Proben mit dem Lösungsmittel auf 30 °C konnte die Standzeit etwas verkürzt werden. Der Luteingehalt im Extrakt erreichte bereits nach etwa 12-16 h ein Plateau (Abb. 28, Seite 60). Im Hinblick auf die praktische Durchführbarkeit erschien zu diesem Zeitpunkt das Einweichen über Nacht (16-18 h) bei 30 °C als geeignete Methode. Eine Temperaturerhöhung auf 35 °C hatte keinen weiteren Effekt (Abb. 28, Abb. 29). Wie bereits angedeutet, könnte die verbesserte Extrahierbarkeit gerade bei höheren Temperaturen von Abbauprozessen der Carotinoide begleitet werden. Die Extraktion von Carotinoiden aus Mais mit Ethanol bei 30 °C resultierte in einem Anstieg der Luteinkonzentration über einen Beobachtungszeitraum von 5 h. Bei der Extraktion mit Ethyllactat bei 30 °C fand bereits nach 2 h keine weitere Erhöhung der Luteingehalte im Extrakt statt. Eine Extraktion bei 45 und 60 °C hatte geringere Luteinkonzentrationen im Extrakt zur Folge (ISHIDA und CHAPMAN 2009). Temperaturen über 40 °C sollten bei der Carotinoid-Analytik generell vermieden werden (RODRIGUEZ-AMAYA 2001). Eine Erhitzung von Carotinoid-Lösungen verursachte oftmals eine Abnahme der Konzentration in Abhängigkeit von der Erhitzungsdauer und der Temperatur (SHI und CHEN 1997, SUBAGIO *et al.* 1999, AMAN *et al.* 2005b). Vor allem Xanthophylle schienen besonders empfindlich gegenüber höheren Temperaturen zu sein (KHACHIK *et al.* 1986, CHEN und CHEN 1993).

Quellung der Proben mit Wasser

Bei Betrachtung der ICC- und AACC-Standardmethoden für Gelbpigmente fiel der relativ hohe Anteil an Wasser im Extraktionsmittel auf. Bei Raumtemperatur ist 1-Butanol theoretisch in der Lage, bis zu 20 % Wasser aufzunehmen. Ein Vorteil für die Extrahierbarkeit schien für lipophile Substanzen auf den ersten Blick nicht gegeben. Tatsächlich diente die Sättigung von 1-Butanol mit Wasser ursprünglich zur Klärung der Lösungen, da der Alkohol allein trübe Extrakte lieferte. Diese konnten auch mittels Zentrifugation nicht geklärt werden (BINNINGTON *et al.* 1938). Die eigenen Untersuchungen zeigten hingegen, dass Wasser eine

entscheidende Bedeutung für die quantitative Extraktion von Carotinoiden aus einigen Getreidearten hat. Für eine vollständige Extraktion von trockenen Hartweizenproben wie Grieß und rohen Teigwaren erwies sich eine 5-minütige Quellung mit Wasser (1 ml/g Probe) bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) vor der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln als ausreichend. Bei höheren Temperaturen wird die Diffusion des Wassers erleichtert und so die Wasseraufnahme des Hartweizens beschleunigt (HÉBRARD *et al.* 2003). Die Quellung bei 30 °C bzw. 40 °C hatte dennoch keinen signifikanten Effekt auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide aus dem Hartweizen (Tab. 12, Seite 62). In einem Temperaturbereich von 25-45 °C wurden keine Veränderungen der Interaktionen von Grießkomponenten mit Wasser beobachtet (HÉBRARD *et al.* 2003). Die signifikant geringeren Carotinoidgehalte im Extrakt nach einer Quellung mit Wasser bei 60 °C im Vergleich zur Raumtemperatur war sicher teilweise auf die Hitzeempfindlichkeit der Carotinoide zurückzuführen. Andererseits entstand bei dieser Temperatur durch die beginnende Stärkeverkleisterung ein klebriger Teig, der nur schwer mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar war.

Die Zugabe geringer Wassermengen zum Extraktionsmittel erhöhte ebenfalls die Extraktion polarer Xanthophylle aus getrocknetem Grünfutter (LIVINGSTON *et al.* 1971). KNOWLES *et al.* (1972) verglichen das Einweichen getrockneter Futtermittel mit n-Hexan/Aceton (7/3, v/v) über Nacht (16 h) mit einer maximal einstündigen Extraktion mit dem gleichen Lösungsmittel unter Addition von 250 µl Wasser/g Probe und ermittelten dabei übereinstimmende Carotinoidkonzentrationen. QUACKENBUSH *et al.* (1970) führten eine Lösungsmittlextraktion von Carotinoiden aus getrockneten Futtermitteln (Luzerne, Mais) durch, nachdem sie die Proben 16 h mit Wasser (500 µl/g Probe) im Dunkeln stehen gelassen hatten. RODRIGUEZ-AMAYA (2001) empfahl, ohne Gründe zu nennen, generell eine Benetzung von Trockenprodukten mit Wasser vor der Extraktion mit Lösungsmitteln, welche mit Wasser mischbar sind.

Durch die genannten Maßnahmen konnte die Extrahierbarkeit der Carotinoide schrittweise erhöht werden (Abb. 55). Letztlich wurde die Quellung mit Wasser und anschließender Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) als geeignete Extraktionsmethode für die Carotinoid-Analytik ausgewählt.

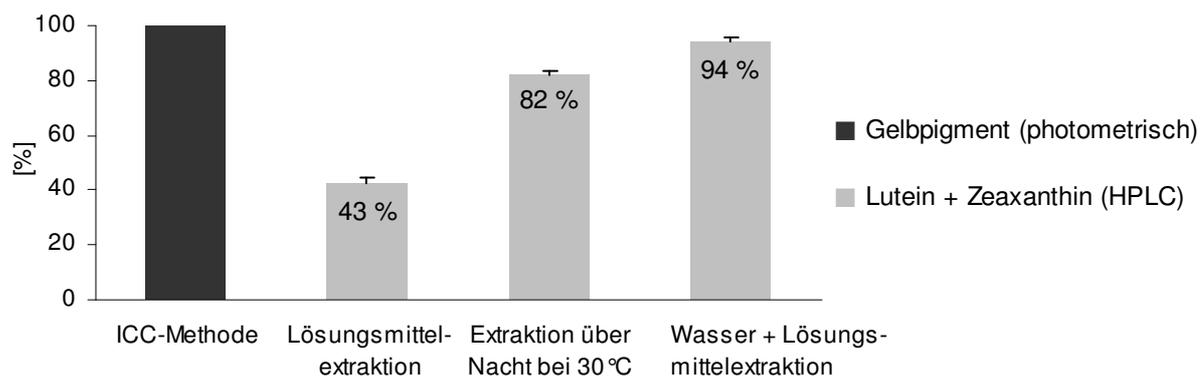


Abb. 55: Vergleich zwischen Gelbpigment- und Carotinoidgehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der verwendeten Extraktionsmethode

Partikelgrößen der Mahlprodukte

Ein nicht zu unterschätzender Parameter mit Einfluss auf die Extraktionsrate von Carotinoiden aus Hartweizen waren die Partikelgrößen der gemahlten Probe. Die unterschiedlichen Partikelgrößen wurden durch mehrstufige Vermahlung mit anschließendem Aussieben der einzelnen Fraktionen erhalten. Dabei sollten die Partikelgrößen typischer Mahlfractionen berücksichtigt werden (Tab. 33).

Tab. 33: Vergleich der untersuchten Partikelgrößen mit typischen Hartweizen-Mahlfractionen

Mahlfraction	Partikelgröße [μm] ^A	untersuchte Fraktionen	Partikelgröße [μm]
Schrot	> 1000	1	1000-2000
Grieß (grob)	600-1000	2	200-500
Grieß (fein)	300-600	3	100-200
Dunst	180-300		
Mehl	< 180		

^A nach AUFHAMMER 2003d

Bei Anwendung einer reinen Lösungsmittel-extraktion erhöhte sich der Carotinoidgehalt im Extrakt erwartungsgemäß mit abnehmender Partikelgröße sowohl bei Verwendung eines Schüttlers (250 U/min) als auch bei einer Homogenisierung der Probe mittels Ultra-Turrax. Letzterer war offensichtlich nicht geeignet, um das Probenmaterial während der Extraktion mit Lösungsmittel so zu zerkleinern, dass eine quantitative Extraktion erreicht werden konnte. Jedoch bei sehr grob zerkleinerten Proben (Partikel > 1 mm) war der Ultra-Turrax dem Schüttler überlegen (Tab. 13, Seite 62). Die Quellung der Proben mit Wasser vor der Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) veränderte den Einfluss der Partikelgröße auf die Extrahierbarkeit. Bei Verwendung des Ultra-Turrax zur Extraktion war nach der Quellung kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den untersuchten Fraktionen zu erkennen. Durch die Quellung wurden die Proben weicher, so dass bei der anschließenden Extraktion auch größere Partikel durch den Ultra-Turrax zerkleinert werden konnten. Bei der

Extraktion unter Verwendung eines Schüttlers wurden die Carotinoide hingegen auch durch die vorherige Quellung mit Wasser nicht vollständig aus sehr groben Partikeln (> 1 mm) heraus gelöst. Die Ursache ist in der unterschiedlichen Wasseraufnahme von Mehl und Schrot zu sehen (HÉBRARD *et al.* 2003). Feinere Mahlfractionen können aufgrund ihrer größeren Oberfläche bezogen auf ihr Volumen mehr Wasser aufnehmen als Fractionen mit größeren Partikeln. Die höhere Wasserbindungskapazität kann ebenfalls auf die höheren Anteile geschädigter Stärkekörner in feineren Mahlfractionen zurückgeführt werden. Zudem dauert die Diffusion der Wassermoleküle von der Oberfläche zum Kern der Weizenpartikel bei Schrotfractionen wesentlich länger als bei feinerem Grieß oder Mehl. Daher kann bei größeren Mahlfractionen unter Umständen eine längere Quellungsdauer als 5 min erforderlich sein. Für die praktische Anwendung der Ergebnisse lassen sich folgende Aussagen treffen. Die Partikelgrößen der gemahlten Probe haben keine entscheidende Bedeutung, wenn diese vor der Extraktion mit Wasser aufgequollen wird. Erfolgt die Extraktion ausschließlich durch Schütteln, sollte auf Partikelgrößen < 0,5 mm vermahlen werden. Diese Partikelgröße wird auch in der ICC-Standardmethode Nr. 152 empfohlen (ICC 1990). Da eine starke Vermahlung von Hartweizen aufgrund der Härte der Getreidekörner meist mit einer mehr oder weniger starken Erhitzung der Probe einhergeht, können bei dieser Probenvorbereitung Isomerisierungsreaktionen oder Verluste an Carotinoiden nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse haben jedoch gezeigt, dass bei Verwendung eines Ultra-Turrax und des Quellens der Probe mit Wasser vor der Extraktion auch größere Partikel quantitativ extrahiert werden können. Somit können die Proben unter einem geringeren Energieeintrag vermahlen werden.

5.3.2 Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Carotinoide in Hartweizen und Teigwaren

Die Extrahierbarkeit der Carotinoide unter Nutzung der optimierten Extraktionsmethode wurde an zahlreichen Hartweizensorten (Vollkorn), Grießen und Teigwaren untersucht. Die flüssigchromatographisch ermittelten Carotinoidgehalte wurden mit den photometrisch bestimmten Gelbpigmentgehalten verglichen. Unter Verwendung der optimierten Methode betragen die Carotinoidgehalte verschiedener **Hartweizen** zwischen 90 % und 97 % der jeweiligen Gelbpigmentgehalte. Der mittels ICC-Methode bestimmte Gelbpigmentgehalt von Vollkornmehl kann durch Pigmente in den Getreideschalen fälschlicherweise erhöht sein (FRATIANNI *et al.* 2005). Die Randschichten des Hartweizenkorns enthielten mehr Gelbpigmente als die inneren Schichten. Die Gehalte an Lutein und Zeaxanthin waren hingegen in den Randschichten geringer (HENTSCHEL *et al.* 2002). Bei Hartweizengrieß, der keine Getreideschalen enthielt, lag der Carotinoidgehalt bei 100-104 % der jeweiligen Gelbpigmentgehalte (Abb. 37, Seite 69). Der Gelbpigmentgehalt von Hartweizen setzte sich demzufolge ausschließlich aus Carotinoiden zusammen. Eine von anderen Autoren vermutete Bettei-

gung weiterer Farbstoffgruppen am Gelbpigmentgehalt (HENTSCHEL *et al.* 2002, LEENHARDT *et al.* 2006a, ABDEL-AAL *et al.* 2007) konnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Erwartungsgemäß wurde Lutein als das Hauptpigment in Hartweizen identifiziert. Die Summe aus (*all-E*)- und (*Z*)-Lutein machte mehr als 90 % des gesamten Carotinoidgehaltes von Hartweizen und Grieß aus (Abb. 38, Seite 70). Die Gehalte an Zeaxanthin waren außerordentlich gering. Weitere Xanthophylle, Xanthophyllester oder Carotine wurden nicht detektiert. Die Veresterung von Lutein mit freien Fettsäuren findet meist während der Kornalterung statt und kann demzufolge aus der Getreidelagerung resultieren (KANEKO *et al.* 1995). Andere Autoren bestimmten in Hartweizen auch α -Carotin und/oder β -Carotin (WILDFEUER und ACKER 1968, JAHN-DEESBACH *et al.* 2004, PANFILI *et al.* 2004, FRATIANNI *et al.* 2005, ABDEL-AAL *et al.* 2007). JAHN-DEESBACH *et al.* (2004) detektierten in zwei Hartweizen Violaxanthin und Neoxanthin, jedoch kein Zeaxanthin. Unterschiede zu den Literaturangaben beruhen auf der Analyse verschiedener Sorten sowie der variierenden Nachweisempfindlichkeit der verwendeten HPLC-Systeme.

Der Carotinoidgehalt im Extrakt wurde auch bei **rohen Teigwaren** durch die Quellung der Proben mit Wasser signifikant erhöht (Tab. A 13). DEXTER *et al.* (1978) stellten durch das Einweichen roher Spaghetti (15 min bei 22 °C) eine Umwandlung der kompakten Proteinmatrix in eine diskontinuierlichen Phase fest. Dieser Prozess könnte die verbesserte Extrahierbarkeit der Carotinoide nach der Quellung mit Wasser erklären. Dennoch bestand bei allen untersuchten Teigwaren ein signifikanter Unterschied zum Gelbpigmentgehalt.

Proben mit einem höheren Wassergehalt wie z. B. **gekochte Nudeln** waren nach einer Quellung mit Wasser nicht besser extrahierbar als bei direkter Lösungsmittlextraktion (Tab. 16, Seite 68). Bei diesen Proben wurde die Extrahierbarkeit bereits durch den Kochvorgang gesteigert. Eine erhöhte Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus gegartem Gemüse im Vergleich zum rohen Lebensmittel wurde mehrfach beschrieben (GRANADO *et al.* 1992, KHACHIK *et al.* 1992b, RODRIGUEZ-AMAYA 1999, RICH *et al.* 2003b). Als Ursachen hierfür wurden Veränderungen in den Zellstrukturen der Gemüse sowie die Spaltung von Carotinoid-Protein-Komplexen diskutiert (siehe auch Kapitel 5.6.3). Das Kochen und Dämpfen von Karotten reduzierte außerdem den Anteil der Carotinoide, die an unlösliche Ballaststoffe gebunden waren (BOROWSKA *et al.* 2003).

Bezüglich der Carotinoid-Zusammensetzung unterschieden sich reine Hartweizen-Teigwaren von solchen mit Eizusatz. Die **Eierteigwaren** aus dem Handel enthielten höhere Anteile an Zeaxanthin als die eifreien Teigwaren. Außerdem wurde in den Eierteigwaren auch Canthaxanthin detektiert (Abb. 38, Seite 70). Daher war bei diesen Proben eine geringere Vergleich-

barkeit mit dem Gelbpigmentgehalt gegeben. Zudem lässt der Gesamt-Carotinoidgehalt berechnet in mg/100 g die verschiedenen Molmassen der Einzelverbindungen unberücksichtigt. Da jedoch der Anteil von Canthaxanthin am Gesamt-Carotinoidgehalt nur etwa 2 % betrug, wurde diese Ungenauigkeit für die Vergleichbarkeit zum Gelbpigmentgehalt hingenommen. Bei den beiden Auftragsproben mit unbekanntem Eizusatz reduzierte sich der Anteil an Lutein am Gesamt-Carotinoidgehalt auf nur 41-74 %. Ursache hierfür waren die hohen Gehalte an β -apo-8'-Carotinsäureethylester. Aufgrund dieser komplexen Zusammensetzung der beiden Auftragsproben wurde auf den Vergleich zum photometrisch ermittelten Gelbpigmentgehalt verzichtet, da dieser die Carotinoidgehalte nicht widerspiegeln könnte. Der Gesamt-Carotinoidgehalt dieser Proben in mg/100 g TM wurde nur für den Vergleich der Extraktion mit und ohne vorherige Quellung mit Wasser herangezogen (Tab. A 13), nicht jedoch zum Vergleich mit anderen Proben oder Literaturdaten. Die Eierteigwaren zeichneten sich gegenüber den eifreien Varianten generell durch höhere Carotinoid- bzw. Gelbpigmentgehalte aus. Auch HUMPHRIES und KHACHIK (2003) ermittelten in Eiernudeln höhere Gehalte an Lutein und Zeaxanthin als in Lasagne (ohne Ei). Der Carotinoidgehalt in Eierteigwaren setzte sich aus den Carotinoidgehalten der verwendeten Hartweizengrieße sowie der Eizusätze zusammen. Lutein und Zeaxanthin sind in der Regel die Hauptpigmente im Eigelb (OLLILAINEN *et al.* 1989). Durch den Zusatz synthetischer Carotinoide zum Hühnerfutter kann die Zusammensetzung der Carotinoid-Fraktion im Ei erheblich beeinflusst werden. WENZEL *et al.* (2010) bestimmten beispielsweise Canthaxanthin als Hauptpigment im Eigelb. Während in Hühnereiern aus ökologischer Tierhaltung hauptsächlich Lutein und Zeaxanthin neben Spuren von β -Cryptoxanthin detektiert wurden, enthielten Eier aus Freiland-, Boden- und Käfighaltung zusätzlich futtermittelbedingte Carotinoide wie Canthaxanthin, Citranaxanthin und β -apo-8'-Carotinsäureethylester (SCHLATTERER und BREITHAUPT 2006).

Die vorliegenden Ergebnisse zur unvollständigen Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Hartweizen und daraus hergestellten Teigwaren lassen die Vermutung zu, dass die Carotinoidgehalte dieser Lebensmittel in der Literatur oft unterschätzt wurden. Die in dieser Arbeit ermittelten Gehalte an Lutein und Zeaxanthin liegen zum Teil deutlich über bereits publizierten Carotinoidgehalten in Hartweizen und Teigwaren (Tab. 34). Zu geringe Carotinoidgehalte können das Resultat einer unvollständigen Extraktion, aber auch von Carotinoidverlusten bei der Verwendung bestimmter Extraktionsmethoden sein, wie z. B. der Verseifung mit konzentrierter Kaliumhydroxid-Lösung bei hohen Temperaturen. Der Vergleich von Literaturdaten setzt demzufolge eine kritische Betrachtung der verwendeten Extraktionsmethoden voraus. Für Teigwaren wurden nur wenige Vergleichswerte zum flüssigchromatographisch ermittelten Carotinoidgehalt gefunden, da die meisten Literaturdaten zur Teigwarenfarbe auf der photometrischen Bestimmung der Gelbpigmente oder einer colorimetrischen Messung nach dem L*a*b*-Farbsystem basieren.

Ähnliche Luteingehalte wie in Teigwaren sind auch in Kiwi, grüner Paprika und Karotten zu finden. Wesentlich höhere Luteingehalte besitzen grüne Blattgemüse wie Grünkohl, Spinat und Blattsalat (PELZ *et al.* 1998). Grünkohl verfügt über die wohl höchsten Luteingehalte aller Gemüse. Neben den absoluten Gehalten in Lebensmitteln müssen aber auch die Verzehrsmengen berücksichtigt werden. So hat Grünkohl einen Anteil von nur 8 % an der Lutein- und Zeaxanthinzufuhr (PELZ *et al.* 1998). Unter diesem Aspekt können auch Teigwaren einen Beitrag zur Luteinversorgung leisten. Immerhin verzehrt mehr als die Hälfte der Deutschen mindestens ein Nudelgericht pro Woche. Dabei sind Eierteigwaren in Deutschland besonders beliebt.

Tab. 34: Publierte Lutein- bzw. Gesamt-Carotinoidgehalte [mg/100 g] von Hartweizen, Grieß und Teigwaren

Quelle	Vollkorn-Hartweizen	Grieß	Teigwaren ohne Ei	Eierteigwaren
eigene Daten ^A	0,34-0,71	0,30-0,63	0,21-0,43	0,49-0,55
HUMPHRIES und KHACHIK 2003			0,03	0,19
BORRELLI <i>et al.</i> 2003 ^{A,B}		0,36-0,72	0,07-0,22	
HENTSCHEL <i>et al.</i> 2000 ^{A,B}			0,06-0,07	
PANFILI <i>et al.</i> 2004 ^A	0,31	0,27		
FRATIANNI <i>et al.</i> 2005 ^A	0,30-0,35	0,30-0,32		
ATIENZA <i>et al.</i> 2007	0,07-0,18			
GALLESCHI <i>et al.</i> 2002 ^B	0,26			
HENTSCHEL <i>et al.</i> 2002 ^A	0,15-0,40			
LEENHARDT <i>et al.</i> 2006b ^A	0,33			
PINZINO <i>et al.</i> 1999 ^B	0,32			
ZANDOMENEGHI <i>et al.</i> 2000	0,21-0,34			

^A Gehalte bezogen auf die Trockenmasse der Proben,

^B nur Luteingehalt angegeben

Fehler in der Bestimmung von Carotinoidgehalten resultieren weniger aus der chromatographischen Messung, sondern wie bereits erwähnt eher aus der Verwendung ungeeigneter Extraktionsmethoden (HOWE und TANUMIHARDJO 2006). Dennoch sollte auf die quantitative Extraktion eine adäquate Messung der Carotinoidgehalte in den Extrakten folgen. Hiefür haben sich **HPLC**-Techniken als Mittel der Wahl erwiesen. Zur Trennung von Carotinoiden werden überwiegend RP-Säulen verwendet. C₃₀-Materialien bieten im Vergleich zu C₁₈-Säulen eine bessere Auflösung vor allem für Proben, die Carotinoide mit sehr ähnlicher molekularer Struktur und Konfiguration enthalten. Beispiele hierfür sind Lutein und Zeaxanthin in Getreideprodukten (ABDEL-AAL und AKHTAR 2006). Aber auch Stereoisomere von Carotinoiden werden mittels C₃₀-Säulen besser getrennt (EMENHISER *et al.* 1995, 1996, SANDER *et al.* 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine isokratische Trennmethode mit Hilfe verschiedener C₃₀-Säulen zur Analyse einer Vielzahl von Xanthophyllen (Abb. 12 C, Seite 38), aber auch zur Trennung mehrerer Stereoisomere von Lutein und Zeaxanthin aus

Hartweizen und Teigwaren entwickelt (Abb. 21, Seite 55). Hierfür wurde Methanol mit geringen Wasseranteilen (je nach HPLC-Säule) als Fließmittel verwendet.

5.3.3 Extraktion von Carotinoiden aus anderen Weizen- und Getreidearten

Bei dem Vergleich der direkten Lösungsmittelextraktion mit der vorherigen Quellung der Getreideproben mit Wasser fiel die unterschiedliche **Extrahierbarkeit** der Carotinoide aus verschiedenen Getreidearten und sogar aus unterschiedlichen Weizenarten auf. Die Notwendigkeit der Quellung von Hartweizen mit Wasser zur quantitativen Extraktion der Carotinoide wurde bereits ausführlich erläutert. Für die Extraktion von Carotinoiden aus Weichweizen hatte die Quellung der Proben hingegen größtenteils keinen Effekt auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide (Tab. A 12). Auch Einkorn, Dinkel, Roggen und Hafer benötigten keine Quellung mit Wasser, um die Carotinoide vollständig aus den Mahlprodukten zu extrahieren. Die mittels Lösungsmittelextraktion bestimmten Gesamt-Carotinoidgehalte in Emmer lagen nur zwischen 56 % und 64 % der Gehalte nach Extraktion mit vorheriger Quellung mit Wasser. Verglichen mit der Extraktion nach Quellung mit Wasser wurden aus verschiedenen Maisproben mittels MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) nur 41-55 % der Carotinoide extrahiert. Das Wasser hatte demzufolge bei Emmer und Mais einen signifikanten Einfluss auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide. Die Zugabe von Wasser zum Extraktionsmittel wurde bereits in den 60er und 70er Jahren praktiziert (siehe Seite 104). Eine Extraktion von Carotinoiden aus Mais mit n-Hexan/Aceton/Wasser (15/75/10, v/v/v) führte im Vergleich mit anderen Extraktionsmethoden zu den höchsten Pigmentgehalten im Extrakt (QUACKENBUSH *et al.* 1961).

Aufgrund der erschwerten Extrahierbarkeit der Carotinoide wurden für Mais zudem häufig Verseifungsmethoden, teilweise mit Temperaturen bis 85 °C, verwendet (HOWE und TANUMIHARDJO 2006). Dabei lag die Wiederfindungsrate des internen Standards β -apo-8'-Carotinal nur zwischen 48 und 88 %, was die Instabilität von Carotinoiden gegenüber alkalischen Bedingungen und hohen Temperaturen verdeutlicht. Durch die Zugabe des internen Standards nach der Erhitzung wurden Wiederfindungsraten über 90 % erzielt. Die Autoren begründeten diese Vorgehensweise mit der höheren Stabilität der Carotinoide in der Maismatrix im Vergleich zu der des internen Standards in der Lösung. Die Effizienz der Extraktion und die tatsächliche Stabilität der Carotinoide kann mit dieser Methodik jedoch nicht beurteilt werden. Eine Verseifung nach der Extraktion der Carotinoide aus der Lebensmittelmatrix hatte geringere Carotinoidkonzentrationen zur Folge als bei der Verseifung des intakten Lebensmittels (HOWE und TANUMIHARDJO 2006). Bei der Verseifung von Carotinoidextrakten war der Verlust von Xanthophyllen im Vergleich zu Carotinen besonders hoch (KHACHIK *et al.* 1986, KIMURA *et al.* 1990). Eigenen Erfahrungen zufolge sollte auf einen alkalischen Auf-

schluss nur zurückgegriffen werden, wenn eine Spaltung von Carotinoidestern zwingend notwendig ist oder ein hoher Fettgehalt und die Anwesenheit von Chlorophyllen die chromatographische Trennung stark beeinträchtigen würden. In diesem Fall sollten die Verseifungsbedingungen so schonend wie möglich gewählt werden. Für die Spaltung von Luteinestern im Purpurweizen wurde beispielsweise eine Verseifung mit 10 % methanolischer KOH-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur angewandt. KIMURA *et al.* (1990) empfahlen ebenfalls eine Verseifung von Extrakten mit 10 % methanolischer KOH bei Raumtemperatur, jedoch über Nacht und unter Zugabe von Antioxidantien oder in einer Stickstoff-Atmosphäre.

Der höchste **Carotinoidgehalt** aller untersuchten Getreidearten wurde in Übereinstimmung mit Literaturdaten (PANFILI *et al.* 2004) im Mais bestimmt. Für Weichweizen publizierte Gesamt-Carotinoidgehalte in Höhe von 0,23-0,30 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ (MOORE *et al.* 2005) waren mit den eigenen Analysendaten vergleichbar (Tab. A 12). Auch andere Autoren publizierten für Weichweizen ähnliche Gehalte an Lutein bzw. an Gesamt-Carotinoiden (Tab. 35). Gesamt-Carotinoidgehalte werden in der Literatur meist in $\text{mg}/100\text{ g}$ angegeben. Dies ist jedoch nur korrekt, wenn ausschließlich Lutein und Zeaxanthin detektiert wurden, welche die gleichen molaren Massen besitzen. Die meisten der Getreidearten enthielten jedoch auch nennenswerte Mengen an β -Carotin, so dass der Vergleich der Luteingehalte aussagekräftiger erscheint als der Vergleich von Gesamt-Carotinoidgehalten. Weichweizen, Emmer, Dinkel, Roggen und Hafer besaßen in der Regel deutlich geringere Gesamt-Carotinoidgehalte als Hartweizen. Verglichen mit den eigenen Analysedaten (Tab. A 12) ermittelten SERPEN *et al.* (2008) für Emmer deutlich höhere Luteingehalte (0,33-0,41 $\text{mg}/100\text{ g}$). Unter den Weizenarten gab es hinsichtlich der Carotinoidgehalte zwei Ausnahmen. Einige Züchtungen des Weichweizens, so genannte Gelbmehl-Weizen, zeichneten sich durch 4-6-mal so hohe Gelbpigmentgehalte wie die weißmehligen Weichweizenarten aus (JAHN-DEESBACH und SCHIPPER 2009). Die eigenen Analysen ergaben für Gelbweizen sogar höhere Carotinoidgehalte als für Hartweizen. Ähnlich hohe Carotinoidgehalte wie Hartweizen besaß auch Einkorn. Die in dieser Arbeit bestimmten Carotinoidgehalte sind jedoch aufgrund der Analyse von nur einer Einkorn-Probe nicht als repräsentativ für diese Getreideart zu betrachten. Laut Literaturdaten verfügt Einkorn über den höchsten Gelbpigmentgehalt aller Weizenarten (KLING *et al.* 2006). Durch die mitunter recht komplexe Zusammensetzung der Carotinoide-Fraktion in verschiedenen Getreidearten, ist der photometrisch bestimmte Gelbpigmentgehalt aber kaum mit der Summe der chromatographisch ermittelten Gehalte an Carotinoiden vergleichbar. LEENHARDT *et al.* (2006b, 2006a) ermittelten für Einkorn bis zu doppelt so hohe Luteingehalte wie für Hartweizen. Die von SERPEN *et al.* (2008) angegebenen Luteingehalte in Einkorn lagen mit 0,32-1,00 $\text{mg}/100\text{ g}$ ebenfalls deutlich über den eigenen Ergebnissen (Tab. A 12).

Was die **Carotinoid-Zusammensetzung** betraf, ähnelten sich Emmer und Hartweizen mit einem Anteil von Lutein am Gesamt-Carotinoidgehalt von über 90 %. Der restliche Anteil entfiel auf Zeaxanthin. In anderen Getreidearten wurden neben Lutein und Zeaxanthin meist auch (*all-E*)- β -Carotin sowie mehrere (*Z*)-Isomere des β -Carotins detektiert. Der Anteil des Luteins am gesamten Carotinoidgehalt lag hierbei zwischen 42 % und 66 % (Abb. 39, Seite 72). Andere Autoren gaben den Luteingehalt in Weichweizen mit 71-83 % (KONOPKA *et al.* 2004) und 95 % (KONOPKA *et al.* 2006) des Gesamt-Carotinoidgehaltes an. Einkorn war auch diesbezüglich eine Ausnahme. Der Carotinoidgehalt von Einkorn bestand überwiegend aus β -Carotin-Isomeren. Die Einzelprobe war jedoch auch diesbezüglich nicht repräsentativ für diese Getreideart. HIDALGO und BRANDOLINI (2008) fanden in Einkorn überwiegend Lutein neben geringen Mengen an α - und β -Carotin sowie β -Cryptoxanthin. Mais unterschied sich von den restlichen Getreidearten durch den höheren Anteil von Zeaxanthin am Gesamt-Carotinoidgehalt sowie das Vorkommen von β -Cryptoxanthin (Abb. 39), was mit Literaturdaten übereinstimmte (MOROS *et al.* 2002, PANFILI *et al.* 2004).

Tab. 35: Publierte Gehalte an Gesamt-Carotinoiden und Lutein [mg/100 g] in Weichweizen

Quelle	Gesamt-Carotinoide	Lutein	weitere Carotinoide
eigene Daten ^A	0,106-0,127 ^B	0,072-0,145 ^C	Zeaxanthin, (β -Carotin)
HEINONEN <i>et al.</i> 1989		0,220	β -Carotin
HIDALGO und BRANDOLINI 2008 ^A	0,101	0,090	Zeaxanthin
JAHN-DEESBACH u. SCHIPPER 2009 ^A		0,055	
KONOPKA <i>et al.</i> 2004 ^A	0,174-0,215	0,148-0,180	β -Carotin
KONOPKA <i>et al.</i> 2006	0,164-0,481	kein Gehalt angegeben	Zeaxanthin, α -, β -Carotin
LEENHARDT <i>et al.</i> 2006b ^A	0,124	kein Gehalt angegeben	Zeaxanthin
LEENHARDT <i>et al.</i> 2006a ^A		0,124	Zeaxanthin
MOORE <i>et al.</i> 2005		0,082-0,114	Zeaxanthin, β -Carotin
PANFILI <i>et al.</i> 2004 ^A	0,150	0,131	Zeaxanthin, α -, β -Carotin
SERPEN <i>et al.</i> 2008		0,019-0,031	

^A Gehalte bezogen auf die Trockenmasse der Proben,

^B nur Weichweizen berücksichtigt, die ausschließlich Lutein und Zeaxanthin enthielten (n = 3),

^C n = 5

Die **HPLC**-Analyse der Getreideextrakte erfolgte mit Hilfe einer C₃₀-Säule und einer Gradientenelution mit MeOH/Wasser (98/2, v/v) und MtBE. Diese Methode gewährleistete eine gute Trennung von Xanthophyllen mit Hilfe des Methanol-Wasser-Gemisches und eine anschließende Elution von (*all-E*)- α -Carotin sowie mehreren Stereoisomeren des β -Carotins durch die Erhöhung des Anteils an MtBE in der mobilen Phase (Abb. 12 B, Seite 38). NP-Säulen eigneten sich zwar auch zur Trennung von Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomeren in Getreideprodukten, erreichten jedoch keine Trennung von α - und β -Carotin (PANFILI *et al.* 2004).

5.4 Extrahierbarkeit von Tocopherolen und Tocotrienolen

5.4.1 Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Hartweizen und Teigwaren

Die Extraktion von Tocopherolen und Tocotrienolen geschieht meist mittels **direkter Lösungsmittelextraktion** oder durch eine alkalische Hydrolyse (Verseifung). Zur effektiven Extraktion von Vitamin E eignen sich viele organische Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische. Für eine quantitative Bestimmung von Vitamin E ist auf eine vollständige Fettextraktion aus der Lebensmittelmatrix zu achten (EITENMILLER und LEE 2004a). Die Auswahl der getesteten Lösungsmittel und -gemische orientierte sich an publizierten Extraktionsmethoden. n-Hexan war zur vollständigen Extraktion von α -Tocopherol ungeeignet. Die Mischung von n-Hexan mit 10 % Ethylacetat erwies sich als besseres Extraktionsmittel. Die eigenen Analysen konnten diese Beobachtungen nur zum Teil bestätigen. Die Extraktion von Hartweizengrieß mit einer Reihe unterschiedlich polarer Extraktionsmittel ergab keine signifikanten Unterschiede der Vitamin-E-Gehalte in den einzelnen Extrakten (Abb. 40, Seite 74). Rohe Teigwaren waren hingegen mit polareren Lösungsmitteln und vor allem durch die Zugabe von Wasser deutlich besser extrahierbar als mit unpolaren Lösungsmitteln. Für die Vitamin-E-Extraktion aus gekochten Teigwaren spielte die Wahl des Lösungsmittels wiederum keine entscheidende Rolle. Lediglich stark unpolare Lösungsmittel waren aufgrund der mangelnden Mischbarkeit mit der klebrigen Probe ungeeignet. LEE *et al.* (1998) erhielten bei einer direkten Lösungsmittelextraktion von Nüssen um 20 % bzw. 36 % höhere Vitamin-E-Gehalte als durch eine Soxhlet-Extraktion bzw. als durch die Verseifung der Proben. Die Soxhlet-Extraktion wurde mit n-Hexan, die Verseifung mit 60 % KOH bei 70 °C durchgeführt. Die Lösungsmittelextraktion mittels n-Hexan/Ethylacetat (90/10, v/v, + 0,01 % BHT) erfolgte nach Vermischung der Proben mit heißem, entionisiertem Wasser und Isopropanol. Der Zusatz von Wasser hatte also auch bei diesen Proben einen entscheidenden Vorteil für die Extrahierbarkeit von Vitamin E.

Die **Soxhlet-Extraktion** ist eine geeignete und einfache Methode zur Vitamin-E-Bestimmung. Die Soxhlet-Apparatur sollte während der mitunter sehr langen Extraktionszeit vor einem Lichteinfall geschützt werden (EITENMILLER und LEE 2004a), was bei den eigenen Analysen nicht gewährleistet war. Die insgesamt ca. zweistündige Extraktion mit Ethanol/Cyclohexan (1/1, v/v) resultierte bei Grieß und gekochten Teigwaren in ähnlichen, jedoch tendenziell etwas geringeren, Vitamin-E-Gehalten wie die Kaltextraktionen mittels Vortex bzw. Ultra-Turrax (Abb. 40). Laut HAKANSSON *et al.* (1987) reichte eine zweistündige Extraktion nicht aus, um alle Tocochromanole aus Weizenmehl zu extrahieren. Sie verwendeten jedoch n-Hexan für die Soxhlet-Extraktion. Bei rohen Teigwaren war die Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) unter Verwendung des Ultra-Turrax nach vorheriger

Quellung mit Wasser der Soxhlet-Extraktion deutlich überlegen. Diese Methode wurde daher, und auch aufgrund der gleichzeitigen Extrahierbarkeit von Carotinoiden, für die Extraktion von Vitamin E aus Hartweizen und Teigwaren ausgewählt.

Zum Teil höhere Vitamin-E-Gehalte in den Extrakten lieferten nur eine 45-minütige Heißextraktion bei 70 °C sowie ein **alkalischer Aufschluss** mit 60 % KOH (Abb. 40). FRATIANNI *et al.* (2002) nutzten zur Extraktion von Tocochromanolen aus Gerste ebenfalls die von PANFILI *et al.* (2003) publizierte Verseifungsmethode. Auch sie erhielten höhere Vitamin-E-Gehalte im Extrakt als mit anderen Extraktionsmethoden wie z. B. der Soxhlet-Extraktion. Die Autoren führten diese Tatsache auf die Hydrolyse von Tocochromanolestern mit Hilfe der 60-%-igen KOH-Lösung zurück. Eine Verseifung führt im Allgemeinen zur Spaltung von Protein-, Lipid- und Kohlenhydrat-Komplexen, zur Hydrolyse von Triglyceriden, Phospholipiden sowie Tocopherol- und Tocotrienolestern und zur Entfernung von Pigmenten und anderen Substanzen mit negativem Einfluss auf die Chromatographie. Außerdem wird die Probenmatrix zerstört und dadurch die Vitamin-E-Extraktion erleichtert (EITENMILLER und LEE 2004a).

In den untersuchten Hartweizen und Teigwaren wurden keine Tocopherol- oder Tocotrienolester detektiert. Die genannten Methoden waren durch schwankende, teils sehr geringe Wiederfindungsraten des internen Standards (δ -Tocopherol) und demzufolge durch hohe Streuungen der Vitamin-E-Gehalte aus Mehrfachbestimmungen gekennzeichnet (Abb. 41, Seite 75). Die publizierten Wiederfindungen einzelner Vitamin-E-Derivate schwankten beträchtlich. Die geringsten Wiederfindungen wurden für δ -Tocopherol ermittelt (EITENMILLER und LEE 2004a). Diese verringerten sich außerdem drastisch mit der Zunahme der Fettgehalte. Nur die Extraktionsrate von α -Tocopherol nach der Verseifung wurde nicht vom Fettgehalt der Proben beeinflusst (UEDA und IGARASHI 1987, 1990). Eine Mischung von n-Hexan mit 10 % Ethylacetat konnte die Wiederfindungen von β -, γ - und δ -Tocopherol aufgrund der erhöhten Affinität der polareren Vitamere zu dem polaren Lösungsmittel verbessern (UEDA und IGARASHI 1990). Ein Gemisch aus n-Hexan/Ethylacetat im Verhältnis 9:1 diente auch bei den eigenen Verseifungsversuchen zur Extraktion der Tocochromanole. Die Ergebnisse der Verseifungsmethoden und der Heißextraktion im Wasserbad bei 70 °C waren an unterschiedlichen Analysetagen nicht reproduzierbar (Abb. 41). Analog zu den eigenen Erkenntnissen lieferte die Verseifung von Weißbrot (Baguette) höhere Vitamin-E-Gehalte als die Soxhlet-Extraktion, verursachte aber auch hohe Standardabweichungen (WENNERMARK und JÄGERSTAD 1992). Auf einen alkalischen Aufschluss sollte daher nach Möglichkeit verzichtet werden. In angereicherten Lebensmitteln kann Vitamin E jedoch in Form von α -Tocopherolsuccinat oder α -Tocopherolacetat vorliegen. In diesen Fällen ist eine Verseifung der Ester zur quantitativen Vitamin-E-Bestimmung unumgänglich. Dabei sollten

die Bedingungen so schonend wie möglich gewählt werden, um keine Verluste der Tocochromanole zu verursachen. Ein Zusatz von Antioxidantien vor der Zugabe der KOH-Lösung ist aufgrund der Instabilität der Tocochromanole im alkalischen Medium anzuraten (UEDA und IGARASHI 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde Pyrogallol verwendet. Darüber hinaus sollte die Verseifungstemperatur unter 70 °C gehalten werden (UEDA und IGARASHI 1990). Eine 45-minütige Hydrolyse mit 10 % KOH bei Raumtemperatur (22 ± 2 °C) führte bei einigen Proben dennoch zu teils signifikanten, teils nur tendenziell geringeren Vitamin-E-Gehalten im Vergleich zu den anderen Extraktionsmethoden (Abb. 41).

In der Literatur wurden zur Extraktion von Getreideprodukten oft n-Hexan verwendet (FRANKE *et al.* 2007, MØLLER NIELSEN und HANSEN 2008) oder diverse alkalische Aufschlüsse vorgeschlagen (PIIRONEN *et al.* 1986, SHIN und GODBER 1994, PANFILI *et al.* 2003, EHRENBERGEROVA *et al.* 2006). Auch nach der Verseifung der Probenmatrix wurden die Tocochromanole häufig mit n-Hexan extrahiert. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse können derartige Extraktionsmethoden jedoch nicht empfohlen werden.

Die Extrahierbarkeit von Vitamin E nach dem Aufschluss mit Salzsäure bzw. saurer Pepsinlösung wird im Kapitel 5.5 diskutiert.

5.4.2 Anwendung der optimierten Extraktionsmethode für Tocopherole und Tocotrienole in Hartweizen und Teigwaren

Die Quellung mit Wasser hatte bei verschiedenen Hartweizenprodukten eine differenzierte Wirkung auf die **Extrahierbarkeit** von Vitamin E. Beim Grieß erhöhte sich die Extraktionsrate durch die Quellung nur leicht. Die Tocochromanole waren aus rohen Teigwaren mit der optimierten Methode jedoch wesentlich besser extrahierbar. Eine quantitative Extraktion dieser Inhaltsstoffe aus unterschiedlichen Probenmatrices ist von großer Bedeutung für zahlreiche Anwendungen der Vitamin-E-Analytik. Eine reine Lösungsmittlextraktion könnte beispielsweise bei der Betrachtung von Veränderungen während der Teigwarenherstellung zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen. Gekochte Teigwaren mussten für eine vollständige Extraktion mit Hilfe von Lösungsmitteln nicht nochmal mit Wasser versetzt werden (Abb. 40, Seite 74). Die Teigwaren der beiden industriellen Produktionslinien unterschieden sich in der Extrahierbarkeit ihrer Tocochromanole. Bei der KW1 wurde der Vitamin-E-Gehalt im Extrakt durch die Quellung mit Wasser im Vergleich zur direkten Lösungsmittlextraktion etwa verdreifacht, bei der KW2 nur verdoppelt. Diese Erkenntnisse trafen größtenteils auch auf die Carotinoide zu und wurden bereits im Kapitel 5.3.2 diskutiert.

In der Literatur findet man Angaben zum **Vitamin-E-Gehalt** in Weichweizen, aber auch in anderen Getreidearten. Hartweizen wurde eher selten auf seinen Vitamin-E-Gehalt hin

untersucht. Ein Vergleich mit Literaturdaten war außerdem durch die variierenden Angaben der Vitamin-E-Gehalte erschwert. Während einige Autoren nur die Gehalte für die einzelnen Tocochromanole in mg/100 g oder ppm angaben, fanden sich in anderen Arbeiten Daten zur Vitamin-E-Aktivität (berechnet als α -Tocopherol-Äquivalente) oder zu Gesamt-Vitamin-E-Gehalten in ppm, bei denen die unterschiedlichen Molmassen der einzelnen Vitamere nicht berücksichtigt wurden. LAMPI *et al.* (2008) gaben beispielsweise Vitamin-E-Gehalte in Hartweizen zwischen 40 und 63 $\mu\text{g/g}$ TM und PANFILI *et al.* (2003) von 61 ± 7 mg/kg TM an. Die Summe der einzelnen Tocopherole und Tocotrienole der 9 analysierten Hartweizen lag mit Werten zwischen 27 und 70 $\mu\text{g/g}$ TM im selben Bereich wie die publizierten Gehalte. Die Vitamin-E-Aktivität von Hartweizen glich mit $14,7 \pm 2,2$ mg α -TÄ/kg TM (PANFILI *et al.* 2003) bzw. 17 μg α -TÄ/g TM (LEENHARDT *et al.* 2006b) durchaus den in dieser Arbeit ermittelten Aktivitäten (Tab. A 17). Für Weichweizen wurden ähnliche Vitamin-E-Gehalte wie für Hartweizen publiziert (SLOVER *et al.* 1969, BALZ *et al.* 1992, SHEPPARD *et al.* 1993, PANFILI *et al.* 2003, LAMPI *et al.* 2008, MØLLER NIELSEN und HANSEN 2008).

Die Vitamin-E-Aktivitäten von rohen Teigwaren der beiden industriellen Produktionslinien lagen zwischen 0,39 und 0,72 mg α -TÄ/100 g FM (Tab. A 17). Publierte Gehalte an Tocopherolen und Tocotrienolen in Makkaroni ähnelten den eigenen Ergebnissen (SLOVER *et al.* 1969). SHEPPARD *et al.* (1993) ermittelten für Makkaroni eine Vitamin-E-Aktivität von 0,6 mg α -TÄ/100 g. Bei dem Vergleich mit Literaturdaten ist die geringe Extrahierbarkeit von Vitamin E aus Teigwaren zu bedenken. Da die optimierte Extraktionsmethode eine mehr als doppelt so große Menge an Tocochromanolen aus den rohen Teigwaren extrahieren konnte als die direkte Lösungsmittelextraktion, war die Übereinstimmung der ermittelten Gehalte mit publizierten Werten überraschend. Die Angabe der Gehalte pro 100 g „*edible portion*“ von SHEPPARD *et al.* (1993) lässt jedoch auf eine Analyse gekochter Makkaroni schließen. Diese wären wesentlich besser mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar als rohe Teigwaren. Zur Extraktionsmethode wurden jedoch keine Angaben gemacht. Bei gekochten Teigwaren würde sich der Bezug auf die Trockenmasse ebenso drastisch auf die Vitamin-E-Aktivität auswirken und einen Vergleich zwischen verschiedenen Literaturdaten erschweren.

Die Vitamin-E-Aktivität von Teigwaren war in etwa genauso hoch wie die Vitamin-E-Aktivität von Tomaten, aber zum Teil deutlich geringer als die von einigen Nüssen (0,4-45,6 mg α -TÄ/100 g) (SHEPPARD *et al.* 1993). Die meisten der nördlichen Früchte und Gemüse enthalten weniger als 1 mg α -TÄ/100 g FM, wobei in der Regel α -Tocopherol das dominierende Vitamer ist. Grüne Blattgemüse gehören zu den besseren Vitamin-E-Quellen (BALL 2006).

Die **Zusammensetzung der Vitamin-E-Fraktion** ergab die gleiche mengenmäßige Reihenfolge der Vitamere wie bei anderen Untersuchungen an Hartweizen (SLOVER *et al.*

1969, PANFILI *et al.* 2003, LAMPI *et al.* 2008) und Weichweizen (HORVATH *et al.* 2006). Der Hauptanteil des Vitamin-E-Gehaltes bestand aus β -Tocotrienol, gefolgt von α -Tocopherol, α -Tocotrienol und β -Tocopherol (Abb. 44, Seite 78). Meist wurden für Weichweizen jedoch höhere Gehalte an β -Tocopherol als an α -Tocotrienol ermittelt (SLOVER *et al.* 1969, THOMPSON und HATINA 1979, BALZ *et al.* 1992, SHEPPARD *et al.* 1993, LEENHARDT *et al.* 2006b, LAMPI *et al.* 2008, MØLLER NIELSEN und HANSEN 2008). Die Tocotrienole hatten einen Anteil von 62-75 % des gesamten Vitamin-E-Gehaltes von Hartweizen (LAMPI *et al.* 2008), was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmte (Abb. 44). Aufgrund der spezifischen Wirkungen der Tocotrienole besitzen Getreideprodukte wie z. B. Teigwaren eine besondere Bedeutung für die menschliche Ernährung. Vitamin E in Eierteigwaren stammt nur zum Teil aus dem Hartweizengrieß. Eier können durch eine Supplementierung des Hühnerfutters zum Teil beträchtliche Mengen an Vitamin E enthalten. Gehalte von 0,5-2 mg α -Tocopherol/100 g Ei wurden berichtet (BALL 2006). Die Dominanz der Tocopherole im Ei, insbesondere von α -Tocopherol (GUINAZI *et al.* 2009), verursachte einer Verschiebung des Verhältnisses T3/T in Eierteigwaren zugunsten der Tocopherole (Abb. 44). Außerdem konnte in Eierteigwaren im Gegensatz zu reinen Hartweizenteigwaren auch γ -Tocopherol bestimmt werden, was ebenfalls auf die Vitamin-E-Zusammensetzung von Eiern zurückzuführen ist.

Die exakte Bestimmung der Vitamin-E-Gehalte in Lebensmitteln setzt eine ausreichende Trennung der einzelnen Vitamere mittels **HPLC** voraus. Eine ausschließliche Messung von α -Tocopherol für die Prognose der Vitamin-E-Aktivität eines Lebensmittels ist nicht ausreichend. Andere Tocopherole und Tocotrienole, wie beispielsweise γ -Tocopherol in Pflanzenölen oder β -Tocotrienol in Weizenmehl, können aufgrund der hohen Gehalte zur Vitamin-E-Aktivität beitragen (HAKANSSON *et al.* 1987). Viele HPLC-Methoden, vor allem mit RP-Säulen, messen jedoch die β - und γ -Isomere der Tocopherole und Tocotrienole als kombinierte Fraktionen (HAKANSSON *et al.* 1987). NP-HPLC vermag hingegen diese Positionsisomere zu trennen (ABIDI 2000, EITENMILLER und LEE 2004a). Binäre Lösungsmittelgemische aus n-Hexan und polaren Modifikatoren werden standardmäßig für die NP-HPLC genutzt (ABIDI 2000). Bei der Verwendung von Diol-Säulen hat sich ein Zusatz von schwach polaren Lösungsmitteln wie Ethylacetat oder MtBE zur unpolaren mobilen Phase gegenüber einem Zusatz polarer Alkohole oder Ether wie Dioxan als Vorteil für die Trennung von β - und γ -Tocopherol erwiesen (ABIDI und MOUNTS 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle 8 Vitamin-E-Derivate sowie der interne Standard α -Tocopherolacetat an einer Diol-Säule in Anlehnung an eine von Balz *et al.* (1992) publizierte Methode getrennt (Abb. 14, Seite 44). Hierfür wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase (n-Hexan/MtBE, 98/2, v/m) an die Säulentemperatur von 35 °C angepasst. Die Elution der Tocochochromanole erfolgte unter isokratischen Bedingungen.

5.5 Potenzielle Ursachen für die reduzierte Extrahierbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Hartweizen

Hypothese 1: Der geringe Wassergehalt der Proben bedingt die schlechte Extrahierbarkeit

Die Annahme, Trockenprodukte seien generell ohne Wasserzugabe nicht quantitativ zu extrahieren, konnte nicht bestätigt werden. Einen Beleg hierfür lieferte der Vergleich frischer und gefriergetrockneter Tomaten, Karotten und Kartoffeln. Aus den getrockneten Proben waren die Carotinoide mittels MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) nicht schlechter extrahierbar als aus den frischen Materialien (Abb. 30, Seite 63; Abb. 32, Seite 64). Eine Verlängerung der Extraktionszeit auf 24 h hatte demzufolge keinen Einfluss auf die Extraktionsrate bei gefriergetrockneten Tomaten (Abb. 31, Seite 64). Die Analyse weiterer Getreidearten wie Weichweizen, Roggen, Hafer, Dinkel und Einkorn zeigte ebenfalls, dass die Carotinoide auch aus Proben mit einem ähnlichen Wassergehalt wie dem der Hartweizenprodukte vollständig mit dem Lösungsmittelgemisch ohne vorherige Quellung mit Wasser zu extrahieren waren. Demnach war der geringe Wassergehalt der Proben selbst nicht der Grund für die erschwerte Extraktion. Vielmehr schienen die Lebensmittelmatrix und die Einbettung der Carotinoide darin von entscheidender Bedeutung für deren Extrahierbarkeit aus Trockenprodukten zu sein. Im Gegensatz zu gefriergetrockneten, rohen Kartoffeln waren die Carotinoide aus Instant-Kartoffelpüree nicht vollständig mit dem Lösungsmittelgemisch extrahierbar. Erst die Quellung der Kartoffelflocken mit Wasser brachte etwa eine Verdopplung der Carotinidgehalte im MeOH/THF-Extrakt (Abb. 32). Die Verarbeitung der Kartoffeln schien demnach Veränderungen der Produktmatrix zu verursachen, die wiederum eine reduzierte Extrahierbarkeit der Carotinoide bedingten.

Hypothese 2: Bindungen mit anderen Getreideinhaltsstoffen reduzieren die Extrahierbarkeit

Carotinoide können sowohl mit löslichen als auch mit unlöslichen **Ballaststoffen** Interaktionen eingehen. Bindungen mit Pektin wurden z. B. für Carotinoide in Karotten mehrfach beschrieben (ZHOU *et al.* 1996, BOROWSKA *et al.* 2003). Eine Hitzebehandlung wie auch das Kochen von Lebensmitteln kann die Affinität von Ballaststoffen für Bindungen mit Carotinoiden verändern. Die hydrothermische Behandlung von Karotten führte beispielsweise zur vermehrten Bildung von Carotinoid-Pektin-Komplexen (BOROWSKA *et al.* 2003). Derartige Bindungen haben einen negativen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Carotinoide (ZHOU *et al.* 1996) und können demzufolge auch für die chemische Extrahierbarkeit der Pigmente von Bedeutung sein.

Eine verbesserte Extrahierbarkeit von Carotinoiden aus Gemüse wurde u. a. durch die Denaturierung von **Carotinoid-Protein-Komplexen** während des Kochvorgangs vermutet (KHACHIK *et al.* 1992b, RODRIGUEZ-AMAYA 1999, RICH *et al.* 2003b). Derartige Komplexe

existieren in grünen Pflanzenteilen, in denen Carotinoide in den Chloroplasten Komplexe mit Membranproteinen und Chlorophyll bilden (BRITTON 1995a, VISHNEVETSKY *et al.* 1999). Carotinoid-Protein-Komplexe wurden in geringen Konzentrationen auch aus Karotten, Tomaten und Kürbis isoliert. Außerdem wurden für Früchte, wie z. B. Mango Interaktionen von Carotinoiden mit Proteinen, Lipiden und Zuckern beschrieben (RAMAKRISHNAN und FRANCIS 1980). Da die Carotinoide, hauptsächlich β -Carotin, mit polaren Lösungsmitteln (Methanol, Aceton) leicht aus diesen Komplexen herauszulösen waren, vermuteten die Autoren weder kovalente Bindungen zu Proteinen noch glycosidische Bindungen an Zuckermoleküle. Zu Bindungen der Carotinoide an andere Getreideinhaltsstoffe sind kaum Literaturdaten verfügbar. MOROS *et al.* (2002) vermuteten eine Bindung der Carotinoide an die Prolamine (Zeine) im Mais. Während der Teigwarenherstellung nahm der Anteil gebundener Lipide am Gesamt-Lipidgehalt zu (BARNES *et al.* 1981). Die Autoren machten hydrophobe Interaktionen von polaren Lipiden mit Proteinen und Stärke für deren reduzierte Extrahierbarkeit mit unpolaren Lösungsmitteln, z. B. n-Hexan, verantwortlich. Auch Vitamin E war mit n-Hexan wesentlich schlechter aus rohen Teigwaren zu extrahieren als mit polareren Lösungsmitteln (Abb. 40, Seite 74). Laut WENNERMARK und JÄGERSTAD (1992) nahm die Extrahierbarkeit von Vitamin E ebenso durch den Prozess des Brotbackens ab. Als Ursache wurde eine Bildung von Komplexen mit Proteinen und/oder Stärke vorgeschlagen.

Um den Einfluss einer Stärkespaltung auf die Extrahierbarkeit der lipophilen Verbindungen zu untersuchen, wurde gemahlener Hartweizen zunächst mit **α -Amylase** behandelt. Ob die verbesserte Extrahierbarkeit der Carotinoide auf eine direkte enzymatische Wirkung oder aber nur auf die Quellung der Proben durch den Wassergehalt der Amylaselösung zurückzuführen war, konnte anhand der ersten Versuche nicht geklärt werden (Tab. 14, Seite 65). Um einen Effekt des Wassers auszuschließen, wurden die enzymatisch behandelten Proben vor der Extraktion mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) ohne und mit vorheriger Quellung mit Wasser gefriergetrocknet. Die Gefrier Trocknung ist ein schonendes Trocknungsverfahren, bei dem auch empfindliche Inhaltsstoffe wie z. B. Carotinoide und Tocochromanole vollständig erhalten bleiben (Tab. 15, Seite 65; Tab. 18, Seite 76). Die enzymatische Stärkespaltung konnte den Anteil der Carotinoide, die mit dem Lösungsmittelgemisch extrahierbar waren, leicht erhöhen. Sie führte aber nicht zu einer vollständigen Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hartweizen. Für eine quantitative Extraktion musste die gefriergetrocknete Probe erneut mit Wasser versetzt werden. (Abb. 33, Seite 66). Die Quellung mit Wasser hatte den gleichen Effekt auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide wie die enzymatische Behandlung. Ein Einfluss des Wassers auf die Stärkekörner schien jedoch unwahrscheinlich, da Stärke in kaltem Wasser unlöslich ist. Der Kern der Stärkekörner bleibt praktisch unzugänglich für Wasser. Erst bei höheren Temperaturen führt die Interaktion mit Wasser zu Modifikationen wie dem Verlust von kristallinen Strukturen (D'EGIDIO 2001). Eine vollständige Stärke-

verkleisterung, d. h. die Ausbildung einer Gelphase, geschieht erst bei Temperaturen von 60-70 °C (HERMANSSON und SVEGMARK 1996). Die Zugänglichkeit der α -Amylase ist bei wenig gequollener Stärke wesentlich geringer als bei vollständig verkleisteter Stärke (FARDET *et al.* 1998). Die Wirkung der α -Amylase wurde daher durch die Bestimmung von Maltose und Glucose überprüft. Die Behandlung des Hartweizens mit α -Amylase führte zu einer deutlichen Erhöhung der Gehalte an Glucose und Maltose (Abb. 34, Seite 66), was als Zeichen für einen effektiven Stärkeabbau gewertet wurde. Die leichte Zunahme der Zuckergehalte durch die Quellung mit Wasser kann auf die Aktivierung getreideeigener Enzyme zurückgeführt werden.

Nachdem durch den Stärkeabbau keine vollständige Extrahierbarkeit der Carotinoide mit dem Lösungsmittel erreicht wurde, sollte der Einfluss einer Proteinspaltung mit Hilfe von **Pepsin** untersucht werden. Hierfür wurde der gleiche Versuchsaufbau wie bei der Behandlung mit α -Amylase gewählt. Da das Wirkungsoptimum von Pepsin im sauren pH-Bereich liegt, wurde das Enzym in 0,1 M Salzsäure gelöst. Neben der sauren Pepsinlösung wurden die Proben vergleichsweise mit der HCl-Lösung ohne Enzym versetzt und anschließend gefriergetrocknet. Die Behandlung mit Pepsin führte zu einer wesentlich stärkeren Zunahme der freien Aminosäuren als die Behandlung mit Salzsäure (Abb. 36, Seite 67). Daher kann bei der enzymatischen Behandlung von einer effektiven Proteinspaltung ausgegangen werden, während die Salzsäure hauptsächlich nur Veränderungen der Proteinstruktur, aber kaum eine Proteinhydrolyse verursachte. Beide Behandlungen reichten jedoch zu einer vergleichbaren Erhöhung der Extrahierbarkeit der Carotinoide mit dem Lösungsmittelgemisch aus. Dennoch wurde keine quantitative Extraktion der Carotinoide erzielt. Durch die Quellung der getrockneten Proben mit Wasser wurden etwa 20 % mehr Carotinoide extrahiert (Abb. 35, Seite 67).

Aufgrund des deutlichen Einflusses der Behandlungen mit Pepsin und Salzsäure auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide, wurden diese Versuche auch für Vitamin E durchgeführt. Die Veränderungen der Proteinmatrix von Hartweizen mit Salzsäure und mit einer sauren Pepsinlösung führten dabei zu einer vollständigen Extraktion der Tocopherole und Tocotrienole mit MeOH/THF (1/1, v/v, + 0,1 % BHT). Zum Vitamin-E-Gehalt im Extrakt nach vorheriger Quellung mit Wasser bestand kein signifikanter Unterschied mehr (Abb. 42, Seite 76). Beide Vorbehandlungen (Pepsin, HCl) führten zu geringeren Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalten in den Extrakten nach Quellung mit Wasser im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Diese Beobachtung ist jedoch nicht mit einer Verschlechterung der Extrahierbarkeit dieser Verbindungen zu begründen. Vielmehr verursachten die niedrigeren pH-Werte während der 30-minütigen Einwirkzeit signifikante Verluste an Carotinoiden und Vitamin E.

Hypothese 3: Die Lokalisation der Verbindungen im Getreidekorn verhindert eine quantitative Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Über die Lokalisation von Carotinoiden und Tocochromanolen innerhalb der Zellen des Endosperms ist wenig bekannt. HOWITT und POGSON (2006) postulierten eine Speicherung von Carotinoiden in Amyloplasten, den spezialisierten Plastiden zur Speicherung der Stärkekörner. Diese Vermutung scheint plausibel, da Carotinoide auch in anderen Pflanzen in Plastiden angereichert werden. Wie bereits erwähnt sind Carotinoide in Chloroplasten vorwiegend mit Proteinen in den photosynthetischen Membranen in Form von Chlorophyll-Carotinoid-Protein-Komplexen assoziiert (BRITTON 1995a, VISHNEVETSKY *et al.* 1999). In Chromoplasten vieler Früchte und Gemüse liegen Carotinoide in kristalliner Form oder gelöst in Öltröpfchen vor (RODRIGUEZ-AMAYA 1999, VISHNEVETSKY *et al.* 1999). Tocochromanole werden ebenfalls in Plastiden synthetisiert und akkumuliert (SCHULTZ *et al.* 1991 zitiert nach FALK *et al.* 2004, HORVATH *et al.* 2006). Während Tocopherole in den Chloroplasten von grünen Pflanzenteilen gespeichert werden, sind Tocotrienole ausschließlich in nicht photosynthetisch aktiven Geweben und Organellen lokalisiert, wie beispielsweise in Elaioplasten von Ölsaaten (HORVATH *et al.* 2006).

Spezielle Fettspeicherorganellen, die Lipidkörper, sind überwiegend in Aleuron- und Subaleuronzellen, aber auch im Endosperm von Hartweizen und Weichweizen zu finden (HARGIN und MORRISON 1980). Neben cytosolischen Lipidkörpern existieren auch in Plastiden entsprechende Lipidkörper, welche Plastoglobuli genannt werden. Diese speichern neben Triglyceriden ebenso Carotinoide und andere Fettbegleitstoffe (MURPHY und VANCE 1999, MURPHY 2001). Die Lipidkörper in Mais (Abb. 3, Seite 7) erwiesen sich als äußerst stabile Organellen, die sich durch eine Behandlung mit Phospholipase A₂ nicht veränderten. Ursache hierfür waren die Oleosine, die einen Kontakt zwischen dem Enzym und den Phospholipiden verhinderten. Durch ihre hydrophile Oberfläche werden die Lipidkörper stabilisiert und eine Koaleszenz verhindert (TZEN und HUANG 1992). Eine Extraktion der im Kern der intakten Lipidkörper befindlichen Triglyceride mit stark unpolaren Lösungsmitteln wie n-Hexan, Benzol oder Cyclohexan war nicht möglich. Nur Diethylether und Aceton waren in der Lage, die hydrophile Oberfläche zu überwinden. Eine enzymatische Behandlung mit Trypsin vermochte die Oberflächenproteine abzubauen und die Lipidkörper aufzubrechen, was die Extraktion der Fettmatrix begünstigte. WHITE *et al.* (2006) registrierten eine relative Erhöhung der Vitamin-E-Konzentration mit der Entfernung der äußeren Proteinschicht der Lipidkörper aus Hafer. Hier scheinen Parallelen zur eigenen Arbeit vorzuliegen. Für Carotinoide in Weizenmehl wurde eine positive Korrelation ($r = 0,87$) mit dem Gehalt an Phospholipiden gefunden. Diese Pigmente befinden sich daher vermutlich im Getreidekorn in der Umgebung von Phospholipiden (KONOPKA *et al.* 2004). Phospholipide zählen zu den Stärkelipiden. Diese liegen innerhalb der Stärkekörner überwiegend im Komplex mit Amylose

vor (ANJUM und WALKER 1991) und wurden mehrfach als sehr schwer extrahierbar beschrieben (GUNSTONE *et al.* 2007). Die Vermutung lag nahe, dass auch Carotinoide und eventuell Tocochromanole an diesem Komplex beteiligt sein könnten. Dagegen sprach jedoch die Unlöslichkeit des Amylose-Lipid-Komplexes in Wasser, und dass eine Dissoziation dieses Komplexes erst bei Temperaturen über 90 °C erreicht wurde (TESTER und MORRISON 1990).

MORRISON *et al.* (1975) extrahierten Nichtstärkelipide mit Ethanol/Diethylether/Wasser (2/2/1, v/v/v), Benzol/Ethanol/Wasser (10/10/1, v/v/v) bzw. wBuOH bei 20 °C. Lipide im Inneren von Stärkekörnern waren anschließend nach einer mehrstündigen Extraktion mittels wBuOH oder 75 % n-Propanol bei 90-100 °C bestimmbar (MORRISON *et al.* 1975, MORRISON und COVENTRY 1985). Offensichtlich war sowohl Wasser als auch Hitze notwendig, um die Stärkekörner aufzuquellen und kristalline Strukturen zu spalten und so eine Extraktion der Lipide durch den Alkohol zu gewährleisten. Lösungsmittel mit zu geringen Wasseranteilen ergaben eine unzureichende Quellung der Stärkekörner und dadurch niedrige Extraktionsraten für die Lipide (MORRISON *et al.* 1975). Geringe Anteile der Stärkelipide waren jedoch auch bei Raumtemperatur aus mechanisch geschädigten Stärkekörnern extrahierbar (MORRISON 1981). Durch den festen Zusammenhalt von Proteinen und Stärke beim Hartweizen entstehen während der Vermahlung leicht Brüche durch die Stärkekörner. Hartweizenmehle besitzen daher höhere Anteile geschädigter Stärkekörner als Weichweizenmehle (BOYACIOGLU und D'APPOLONIA 1994), was für die Extrahierbarkeit der Lipidfraktion von Bedeutung sein könnte. In einer anderen Studie konnten die Carotinoide aus Weizenmehl vollständig mit wBuOH innerhalb von 5 min bei 20 °C extrahiert werden und lagen demzufolge nicht in Stärkekörnern vor (MORRISON *et al.* 1975). Dabei bleibt zu bedenken, dass sämtliche Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe um MORRISON aus Untersuchungen von Weichweizen stammen. Auch Tocopherole wurden zu den Nichtstärkelipiden gezählt (MORRISON 1981). Andere Autoren fanden Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Anreicherung von Stärke und Tocotrienolen im Endosperm verschiedener Getreidearten (FALK *et al.* 2004). In Gerste schienen die Tocotrienole Teil der Lipidfraktion innerhalb der Stärkekörner zu sein (KAUKOVIRTA-NORJA *et al.* 1997).

Zur Lokalisation von Carotinoiden und Vitamin E auf zellulärer Ebene war die Datenlage also nicht eindeutig. Inwieweit die zellulären und subzellulären Strukturen die erschwerte Extrahierbarkeit von Carotinoiden und teilweise auch von Vitamin E bedingen, konnte nicht abschließend beantwortet werden. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass die Extrahierbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Teigwaren teilweise noch geringer war als aus den Vollkorn-Hartweizen bzw. Grießen. Während der Teigwarenproduktion gehen zelluläre Strukturen des Weizens weitestgehend verloren. Teigwaren bestehen aus einem kontinuier-

lichen, dichten Proteinnetzwerk, in das die Stärkekörner eingebettet sind (MATSUO *et al.* 1978).

Andererseits wurden zwischen verschiedenen Getreidearten, insbesondere zwischen Weich- und Hartweizen, teils deutliche Unterschiede in der Extrahierbarkeit der Carotinoide mit organischen Lösungsmitteln festgestellt. Diese Beobachtung würde eine völlig unterschiedliche Lokalisation der Substanzen in verschiedenen Getreidearten voraussetzen. Hierzu waren jedoch wenige Literaturdaten verfügbar. Bekannt ist die Verteilung der Carotinoide in verschiedenen Mahlfractionen bzw. Schichten des Getreidekorns. Die Literaturdaten sind jedoch widersprüchlich. PINZINO *et al.* (1999) beschrieben eine gleichmäßige Verteilung von Lutein in Endosperm, Kleie und Keimling von Hartweizen. HENTSCHEL *et al.* (2002) stellten hingegen eine Abnahme der Luteinkonzentration in den Randschichten des Hartweizenkorns fest. ADOM *et al.* (2005) fanden in der Kleie/Keimling-Fraktion von Weichweizen viermal mehr Lutein, zwölfmal mehr Zeaxanthin und doppelt so viel β -Cryptoxanthin wie im Endosperm. Für die eigenen Analysen wurden die Getreidekörner vollständig vermahlen. Unter der Annahme, dass die Carotinoide aus den verschiedenen Kompartimenten des Getreidekorns (Endosperm, Keimling, Schale) unterschiedlich extrahierbar sind, könnte auch die differenzierte Verteilung der Carotinoide im Getreidekorn eine Rolle spielen. Diese selektive Verteilung könnte ebenso die zum Teil unterschiedliche Extrahierbarkeit einzelner Carotinoide begründen. Als Beispiel seien die vier analysierten Emmer zu nennen. Während die Quellung der Proben mit Wasser die Luteingehalte in den Extrakten etwa verdoppelten, war Zeaxanthin auch ohne diese Vorbehandlung vollständig extrahierbar (Tab. A 12). Zur Verteilung der Carotinoide auf die verschiedenen Kompartimente bzw. Mahlfractionen des Emmers waren keine Literaturdaten verfügbar. Auch die einzelnen Tocochromanole sind nicht gleichmäßig im Getreidekorn verteilt. Bei Weizen, Mais und Gerste befinden sich die Tocopherole überwiegend im Keimling, die Tocotrienole dagegen im Endosperm (BALZ *et al.* 1992, FALK *et al.* 2004). Zwischen Carotinoiden und Vitamin E gab es ebenfalls große Unterschiede in der Extrahierbarkeit aus Hartweizen, was eine unterschiedliche Lokalisation dieser Substanzklassen im Weizenkorn vermuten lässt.

Hypothese 4: Die erschwerte Extrahierbarkeit beruht auf einem physikalischen Einschluss in die Protein-Stärke-Matrix des Hartweizens

Obwohl die Spaltung von Stärke und Proteinen teilweise zur erheblichen Verbesserung der Extrahierbarkeit der untersuchten Verbindungen mit organischen Lösungsmitteln führte, sind zumindest kovalente Bindungen mit diesen Getreideinhaltsstoffen unwahrscheinlich. Eine Quellung der Proben mit Wasser, welche bei Hartweizen, Mais und Emmer zu annähernd doppelt so hohen Carotinoidgehalten in den MeOH/THF-Extrakten führte, kann keine Spaltung von Bindungen zu Proteinen oder Stärke verursacht haben. Die Grießkomponenten

schwellen beim Kontakt mit Wasser an. Die Wasseraufnahme der Grießpartikel verursacht jedoch weder irreversible strukturelle noch biochemische Veränderungen (HÉBRARD *et al.* 2003). Die Wasserabsorption von Grieß ist demzufolge als rein physikalischer Vorgang zu betrachten. Außerdem schien die Wirkung des Wassers auf die Hartweizenmatrix reversibel zu sein. Nach der Quellung der Proben mit Wasser und anschließender Gefriertrocknung, war für eine quantitative Extraktion der Carotinoide eine erneute Wasserzugabe erforderlich (Abb. 33, Seite 66). Unter der Annahme, dass es sich beim Getreide um einen rein mechanisch-physikalischen Einschluss der Carotinoide und Tocochromanole in die Protein-Stärke-Matrix handelt, könnte eine Quellung dieses Netzwerkes eine verbesserte Extrahierbarkeit der lipophilen Verbindungen mit organischen Lösungsmitteln verursachen. Durch das Einweichen roher Spaghetti mit Wasser wurde das kontinuierliche Proteinnetzwerk ebenfalls in eine diskontinuierliche Proteinmatrix überführt (DEXTER *et al.* 1978). BARNES *et al.* (1981) vermuteten einen mechanischen Einschluss von Lipiden in die dehydrierte Protein- und Stärkematrix von Teigwaren als Ursache für deren schlechte Extrahierbarkeit mit unpolaren Lösungsmitteln. Polare Lösungsmittelgemische mit Wasseranteilen waren in der Lage, die Matrix zu rehydrieren und damit die Lipide zu extrahieren. Eine vollständige Fettextraktion wird auch für die quantitative Bestimmung von Vitamin E vorausgesetzt (EITENMILLER und LEE 2004a).

Unter Annahme dieser Hypothese kann die uneinheitliche Extrahierbarkeit der Carotinoide aus verschiedenen Getreidearten mit deren unterschiedlichen Texturen erklärt werden. Hartweizengrieß lässt unter dem Rasterelektronenmikroskop eine feste Struktur aus einer kontinuierlichen Proteinmatrix mit eingebetteten Stärkekörnern ohne jegliche Lufteinschlüsse erkennen (AALAMI *et al.* 2007). Das Endosperm von Weichweizen besteht aus einer diskontinuierlichen Proteinmatrix (D'EGIDIO 2001). Bei der Vermahlung von harten Körnern entstehen Brüche entlang der Zellwände. Die Zellen bleiben größtenteils intakt. Gemahlener Weichweizen besitzt keine derart kompakte Struktur (AALAMI *et al.* 2007). Durch den festen Zusammenhalt von Proteinen und Stärke beim Hartweizen, entstehen während der Vermahlung leicht Brüche durch die Stärkekörner. Hartweizenmehle besitzen daher höhere Anteile geschädigter Stärkekörner als Weichweizenmehle und verfügen demzufolge über ein höheres Wasserbindungspotential (BOYACIOGLU und D'APPOLONIA 1994). Außerdem entsteht bei der Vermahlung von Weichweizen unter dem gleichen Energieeintrag ein feineres Mehl als beim Hartweizen. Die Partikelgröße der Mahlprodukte kann, wie bereits gezeigt, die Extrahierbarkeit der Carotinoide mit unpolaren Lösungsmitteln maßgeblich beeinflussen.

Für den Härtegrad von Weizenkörnern sind bestimmte Proteine, die Puroindoline (PIN), verantwortlich. Das Fehlen dieser Proteine verursacht eine harte Korntextur (siehe auch Kapitel 2.1.2). Zwischen dem Vorkommen der Puroindoline bzw. PIN-Gene und dem Effekt des

Wassers auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide bestand offensichtlich ein Zusammenhang (Tab. 36). Wenn die exakten Ursachen für diesen Effekt auch nicht bekannt sind, so scheint doch eine Aussage möglich, welche Getreidearten schlecht mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar sind und demzufolge eine vorherige Quellung mit Wasser benötigen. Um diese Theorie zu erhärten, sind weitere Analysen beispielsweise von Gerste, Hirse und Reis zu empfehlen.

Tab. 36: Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Textur bestimmenden Proteinen und dem Einfluss von Wasser auf die Extrahierbarkeit der Carotinoide

Getreideart	PIN bzw. PIN-Gene ^A	Quellung mit Wasser notwendig?
Weichweizen (<i>Triticum aestivum</i>)	+	nein
Einkorn (<i>Triticum monococcum</i>)	+	nein
Dinkel (<i>Triticum spelta</i>)	+	nein
Hartweizen (<i>Triticum durum</i>)	–	ja
Emmer (<i>Triticum dicoccum</i>)	–	ja
Roggen (<i>Secale cereale</i>)	+	nein
Hafer (<i>Avena sativa</i>)	+	nein
Mais (<i>Zea mays</i>)	–	ja

^A Puroindolin (PIN)-ähnliche Proteine werden je nach Getreideart z. B. auch als Secalindoline oder Avenoindoline bezeichnet

Letztendlich konnten über die Ursachen der erschwerten Extraktion von Carotinoiden und Vitamin E aus Hartweizen und rohen Teigwaren sowie aus einigen anderen Getreidearten nur Vermutungen angestellt werden. Eine Kombination mehrerer der genannten Einflussfaktoren ist wahrscheinlich.

5.6 Veränderungen der Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E während der Teigwarenherstellung und -zubereitung

5.6.1 Vorversuche mit Produktionszwischenstufen

Ziel der Untersuchungen der einzelnen Produktionszwischenstufen war ursprünglich die Identifizierung der Prozessstufen, die einen entscheidenden Einfluss auf die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E während der Teigwarenherstellung ausüben. Die Analysen ergaben jedoch ein unerwartetes Muster sowohl für die Gehalte an Carotinoiden als auch für Vitamin E. Während des Mischvorgangs sowie beim Pressen und Ausformen der Nudeln sanken die Gehalte der untersuchten Substanzklassen deutlich ab und nahmen mit Beginn der Trocknungsprozesse bis hin zum Endprodukt wieder zu. Dabei schien ein gewisser Zusammenhang zur Trockenmasse bzw. zum Wassergehalt der Proben zu bestehen (siehe Abb. 45, Seite 79).

Eine Ursache für die niedrigeren Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte der Proben mit einem höheren Wassergehalt wurde in deren geringerer **Lagerstabilität** vermutet. Neben dem Wassergehalt spielt auch die Wasseraktivität (a_w) als Maß für die Menge an frei verfügbarem Wasser eine Rolle für die Stabilität. Mit Erhöhung des a_w -Wertes nehmen mikrobiologische, enzymatische und biochemische Reaktionen zu (Abb. 56). Vor allem die Enzymaktivität steigt ab einem a_w -Wert von etwa 0,8 sprunghaft an, was zu enzymatischen Abbaureaktionen von Carotinoiden und Vitamin E bei den Zwischenstufen der Teigwarenherstellung geführt haben könnte. Der Vitamin-E-Abbau während der Lagerung hängt in der Regel von der Lipidperoxidation und der damit verbundenen Interaktion von Vitamin E als Antioxidans ab (EITENMILLER und LEE 2004b). Ein Enzym, welches sowohl für den oxidativen Abbau von Carotinoiden als auch von Vitamin E verantwortlich gemacht wird, ist die Lipoxygenase (LOX), auch Lipoxidase genannt. LOX spielt eine entscheidende Rolle bei der Hydroperoxidation von ungesättigten Fettsäuren (v. a. Linolsäure). Die resultierenden freien Radikale und reaktiven Sauerstoffverbindungen verursachen wiederum die Cooxidation von Carotinoiden und Vitamin E (BORRELLI *et al.* 2003). Dabei stehen die Hydroperoxidaseaktivität und die Bleichungsaktivität der Lipoxygenase in keinem direkten Zusammenhang (BEN-AZIZ *et al.* 1971, BORRELLI *et al.* 2003). Vielmehr handelt es sich dabei um konkurrierende Reaktionen (BORRELLI *et al.* 2003). Während der Teigwarentrocknung findet eine Enzyminaktivierung statt, die in einer verbesserten Lagerstabilität der Produkte resultiert. Diese Tatsache kann als Begründung für die vermeintliche Zunahme der Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte mit Beginn der Vortrocknung gesehen werden. Beim Grieß mit einem Wassergehalt $\leq 13\%$ und einem a_w -Wert unter 0,65 sollten enzymatisch bedingte Abbaureaktionen ebenfalls vermindert stattfinden. WIDICUS *et al.* (1980, 1981) fanden eine Abhängigkeit des Abbaus von α -Tocopherol von der Wasseraktivität eines fettfreien Modell-Lebensmittels als auch in einem Modell unter Zusatz von ungesättigten Fettsäuren. Auch andere Autoren vermuteten eine direkte Beziehung der Vitamin-E-Abbaurrate zum Feuchtigkeitsgehalt (ELMADFA und BOSSE 1985). Niedrige Temperaturen können Abbauprozesse verlangsamen bzw. verhindern. Tiefkühlen beispielsweise verringert die Wasseraktivität deutlich und damit auch enzymatische Abbauprozesse der Carotinoide und Tocochromanole. So wurde für Produkte, die Lutein enthalten, eine Lagerung in einem herkömmlichen Tiefkühlschrank bei Temperaturen zwischen -12 und -20 °C empfohlen (SHI und CHEN 1997). Gleichzeitig stellten die Autoren jedoch auch einen Lutein-Verlust von 20% innerhalb von 75 Tagen aus einem Methanol-Wasser-Gemisch (5% Wasser) bei -30 °C fest. Tocopherole scheinen in einem Lebensmittel während des Gefrierprozesses stabil zu sein. Eine zeitliche Ausdehnung der Gefrierlagerung kann jedoch zu erheblichen Tocopherolverlusten führen (ELMADFA und BOSSE 1985). Die eigenen Ergebnisse sowie Literaturdaten lassen einen Verlust von Carotinoiden und Vitamin E in dem Zeitraum von der Probenentnahme aus den industriellen Produktionslinien bis

zur Tiefkühlagerung im Labor (-80 °C), aber auch durch eine zwischenzeitliche Lagerung bei höheren Temperaturen vermuten.

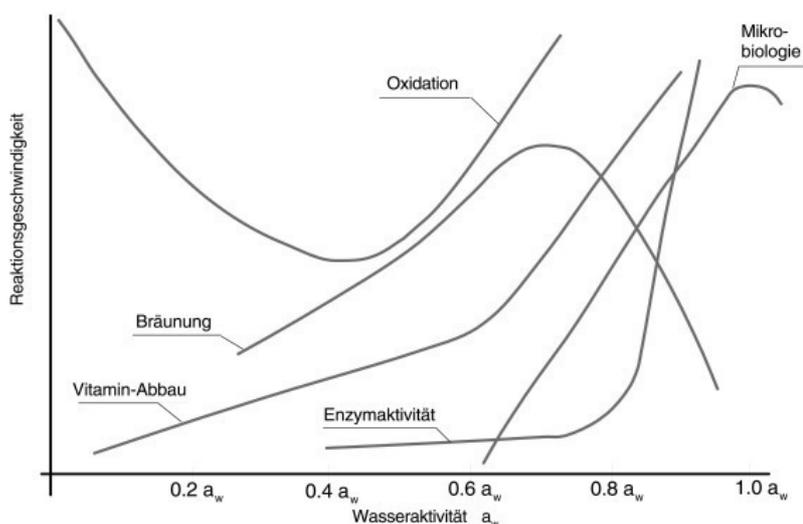


Abb. 56: Abhängigkeit von Oxidation, Bräunung, Enzymaktivität, Vitaminabbau und mikrobiologischer Aktivität von der Wasseraktivität (ZIGERLIG 2006)

Als weitere Ursache für die geringeren Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E der feuchteren Proben wurde eine geringere **Extrahierbarkeit** der lipophilen Substanzen vermutet. Das Mischen von Mehl bzw. Grieß mit Wasser führt zu strukturellen Veränderungen. Während der Teig ein verhältnismäßig lockeres, krümeliges Gemisch war, besaßen die Produktionsmuster nach der Pressung eine sehr feste, kompakte Struktur. Allein diese Tatsache könnte schon zu unterschiedlichen Extraktionsraten geführt haben. Die chemisch-physikalischen Veränderungen der Hauptnährstoffe und die damit verbundene Änderung ihrer Extrahierbarkeit wurden in einigen Studien untersucht. Zur Extrahierbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Grieß und Teigwaren existieren keine Literaturdaten. Unter der Annahme, dass Carotinoide und Vitamin E als Fettbegleitstoffe ähnlichen Veränderungen während der Teigwarenproduktion wie die Lipide unterliegen, lassen sich einige Rückschlüsse auf deren Extrahierbarkeit ziehen. Der Lipidgehalt in Weizenmehl resultiert aus Rückständen des endoplasmatischen Retikulums, aus Amyloplastenmembranen sowie anderen Zellorganellen des Getreidekorns. Außerdem kommt es während des Mahlens möglicherweise zu Vermischungen des Endosperms mit Aleurongewebe, welches Lipide in Form von Spherosomen speichert (SIMMONDS 1972). Im Grieß liegen freie und gebundene Lipide in etwa gleichen Anteilen vor (BARNES *et al.* 1981). Während der Teigbildung werden Lipide freigesetzt und bilden Einschlüsse in Form von Lipidtröpfchen. Diese freien Lipide können mit Proteinen interagieren und werden fest gebunden, was ihre Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln wie z. B. Petrolether verhinderte. Erst eine 48-stündige Extraktion mit wassergesättigtem

1-Butanol konnte einen nennenswerten Anteil der Fette freisetzen (SIMMONDS 1972). BARNES *et al.* (1981) stellten die Vortrocknung, als den Prozessschritt heraus, bei dem ein Großteil der Lipide gebunden wurde. Unter der Annahme, dass Carotinoide und Vitamin E ebenso Interaktionen mit Proteinen eingehen könnten, sind die genannten Beobachtungen eine mögliche Ursache für eine schlechtere Extrahierbarkeit der lipophilen Verbindungen aus einigen der Produktionszwischenstufen.

Die Untersuchungen der Proben der PL2 konnten letztendlich keinen exakten Aufschluss über die einzelnen Produktionsschritte bei der Teigwarenherstellung geben. Unter der Annahme, dass sich die Extrahierbarkeit des Teiges nicht von der des Grießes und des Endproduktes unterschied (siehe Abschnitt „Extrahierbarkeit“ im Kapitel 4.6.1) und der Teig keinen Verlusten durch die Lagerung unterlag, betrug die Abnahme des Carotinoidgehaltes vom Grieß zum Teig 15 % und beim Vitamin E sogar 22 %. Der Mischvorgang schien die größten Verluste der lipophilen Inhaltsstoffe zu verursachen. ICARD-VERNIERE und FEILLET (1999) stellten Gelbpigment-Verluste von 25 % zwischen Hartweizengrieß und Teig fest. Zu der gleichen Schlussfolgerung gelangten auch WENNERMARK und JÄGERSTAD (1992) bei ihrer Untersuchung der Weißbrotherstellung. Demnach sei der Verlust an Vitamin E eher durch enzymatisch bedingte Oxidationen nach Zugabe von Wasser zum Mehl als durch eine veränderte Extrahierbarkeit verursacht. Die Autoren begründeten ihre Vermutung mit der Tatsache, dass die Extraktion des Teiges mit zwei verschiedenen Methoden die gleichen Ergebnisse lieferte. HENTSCHEL *et al.* (2000) sahen ebenfalls im Extrusionsprozess bei der Teigwarenherstellung einen größeren Einfluss auf den Verlust von Lutein als im Trocknungsverfahren. Da eine verminderte Extrahierbarkeit des Teiges gegenüber Grieß und Endprodukt sowie ein Verlust von Carotinoiden und Vitamin E während der Lagerung bei den Zwischenstufen mit höherem Wassergehalt jedoch nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde die Analyse weiterer Teigwaren-Chargen der PL1 und PL2 lediglich mit den Rohstoffen und Endprodukten durchgeführt.

5.6.2 Veränderungen während der Teigwarenherstellung

Der Einfluss der Teigwarenherstellung auf die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E wurde anhand von Mustern zweier verschiedener industrieller Produktionslinien untersucht. Die PL1 war mit einem Polymatik®-Doppelschnecken-Mischer/Kneter ausgestattet, welcher unter Vakuum einen homogenen Teig innerhalb weniger Sekunden erzeugt. Hierbei entstanden jedoch im Vergleich zur PL2 höhere Temperaturen und Drücke. Demgegenüber steht eine Mischzeit von etwa 20 min bei der PL2. Die Trocknung bestand bei der PL2 aus Vortrocknung und Haupttrocknung bei Temperaturen zwischen 60 und 70 °C (HT) innerhalb von ins-

gesamt 4 h und 20 min. Bei der PL1 dauerte die Trocknung bei maximal 90 °C (VHT) nur 3 h (Abb. 57).

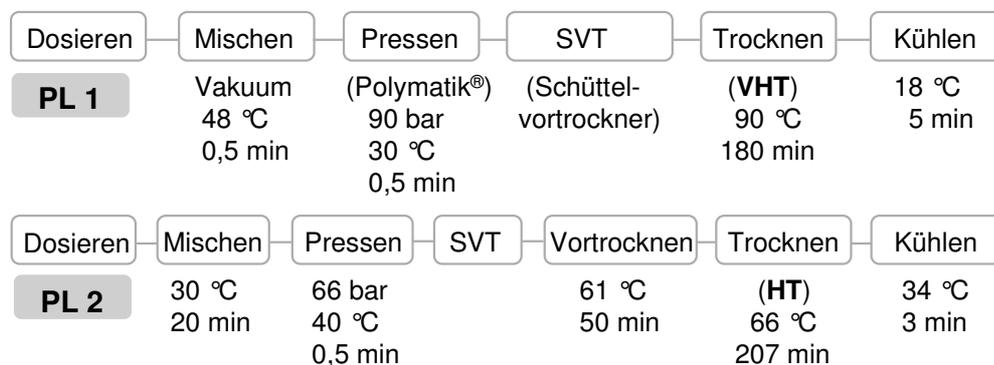


Abb. 57: Zusammenfassende Gegenüberstellung der Prozessparameter der beiden untersuchten Produktionslinien

Die Prozessbedingungen beider Produktionslinien verursachten bei allen untersuchten Teigwaren-Chargen signifikante **Verluste** an Carotinoiden und Vitamin E in Höhe von 8-33 %. Der Gelbpigmentgehalt, der in engem Zusammenhang zum Carotinoidgehalt gesehen werden muss, sank um 12-26 % in Abhängigkeit von den Produktionsbedingungen. Bei der PL2 war eine stärkere Abnahme der Gehalte der untersuchten Verbindungen zu verzeichnen als bei der PL1. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied für Vitamin E. Des Weiteren wurde eine Erhöhung des Anteils der (*Z*)-Isomere am Gesamt-Lutein festgestellt, welche vermutlich temperaturbedingt ist. Die höheren Trocknungstemperaturen der PL1 resultierten in einer stärkeren Zunahme der (*Z*)-Lutein-Isomere als bei der PL2. Offensichtlich schien die höhere Temperatur einen stärkeren Einfluss auf die Isomerenbildung auszuüben als die Trocknungsdauer. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Isomerisierungsversuche im Trockenschrank gestützt.

Der Vergleich mit publizierten Verlusten lipophiler Inhaltsstoffe während der Teigwarenherstellung erwies sich als schwierig. Publikationen zu Veränderungen von Inhaltsstoffen während der Teigwarenherstellung betreffen vorwiegend jene Nährstoffe mit Einfluss auf die Kocheigenschaften der Teigwaren (Stärke und Proteine). Viele Untersuchungen zu Farbveränderungen, photometrisch als Gelbpigment oder colorimetrisch bestimmt, sind weit mehr als 20 Jahre alt (Tab. 37). Neuere Untersuchungen mit Hilfe moderner Analysetechniken wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie sind selten. BORRELLI *et al.* (2003) berichteten von Verlusten an Lutein von mehr als 70 % unter Verwendung einer LT-Trocknungsmethode (18 h, 50 °C). Die Gelbpigmentverluste unterlagen großen Schwankungen in Abhängigkeit von den Prozessbedingungen, aber auch von den Gelbpigmentgehalten und Enzymaktivitäten in den verwendeten Grießen (Tab. 37). Für Vitamin E wurden in der Literatur keine Ver-

gleichswerte für die Teigwarenherstellung gefunden. Lediglich der Prozess des Brotbackens wurde in einigen Studien hinsichtlich seines Einflusses auf Vitamin-E-Gehalte untersucht. WENNERMARK und JÄGERSTAD (1992) verzeichneten Verluste der Vitamin-E-Aktivität zwischen 20 und 60 % bei der Herstellung von Baguette, Roggen- und Mischbrot, die überwiegend durch die Teigbereitung verursacht wurden. Beim Brotbacken aus Hartweizen gingen etwa 80 % der Carotinoide und etwas mehr als 30 % der Tocochromanole verloren (LEENHARDT *et al.* 2006b).

Tab. 37: Publierte Verluste an Gelbpigmenten [%] während der Teigwarenherstellung

Quelle	Prozessparameter ^A	Probenanzahl	Verlust an Gelbpigmenten ^B
eigene Daten	PL1	2	12-13 %
	PL2	2	22-26 %
IRVINE und WINKLER 1950	k. A.	k. A.	20-60 %
IRVINE und ANDERSON 1953	k. A.	7	21-63 %
MENGER 1964	k. A.	k. A.	bis zu 57 %
MATSUO <i>et al.</i> 1970	LT-Trocknung (29 h)	1	20 %
WALSH <i>et al.</i> 1970	k. A.	5	21-61 % ^C
DEXTER und MATSUO 1977	Vakuum, LT (29 h, 39 °C)	3	17-20 %
MCDONALD 1979	k. A.	9	19-34 %
TAHA und SAGI 1987	HT-Trocknung	6	1-15 %
SEIBEL und ZWINGELBERG 1989	LT-Trocknung	10	30 %
SEIBEL und ZWINGELBERG 1997	Trocknung bei max. 70 °C	4	5-48 %
BORRELLI <i>et al.</i> 1999	LT-Trocknung (18 h, 50 °C)	12	5-43 %
TRONO <i>et al.</i> 1999	LT-Trocknung (12 h, 50 °C)	12	0-34 % ^C

^A HT-Trocknung erst 1974 eingeführt

^B Bestimmung nach ICC- oder AACC-Methode

^C in Abhängigkeit der Lipoxygenase-Aktivität der Grieße

k. A.: keine Angaben

LT: low temperature

HT: high temperature

Beide untersuchten Substanzklassen unterliegen ähnlichen Mechanismen, die zu signifikanten Verlusten während der Teigwarenherstellung führten. Carotinoide sind empfindlich gegenüber Licht, hohen Temperaturen und Sauerstoff, was zur Bildung von Stereoisomeren und zu chemischen Abbaureaktionen führen kann (HART und SCOTT 1995). Die Hauptursachen für Carotinoidverluste sind enzymatische und nicht-enzymatische Oxidationen. Der erste Schritt beinhaltet eine Epoxidation und die Spaltung zu Apocarotinalen. Im weiteren Reaktionsverlauf entstehen Fragmente mit geringer Molekülmasse (RODRIGUEZ-AMAYA 1993, 2002). Tocopherole reagieren unter Anwesenheit von Sauerstoff zu Dimeren, Trimeren und Chinonen. Ihre Oxidation wird beschleunigt durch Hitze, Licht, alkalische Medien, peroxidierbare ungesättigte Fettsäuren sowie Metallionen (Fe^{3+} , Cu^{3+}) (ELMADFA und BOSSE 1985). Vitamin-E-Verluste während der Getreideverarbeitung werden überwiegend durch die Lipidperoxidation verursacht (EITENMILLER und LEE 2004b). Auch Farbverluste während der Teigwarenherstellung sind hauptsächlich auf die bereits erläuterte Wirkung der Lipoxygenase zurückzuführen (MCDONALD 1979, BORRELLI *et al.* 1999).

Eine generelle Aussage darüber, welche Substanzklasse einer stärkeren Abnahme durch die Teigwarenproduktion unterliegt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht getroffen werden. Während bei der PL1 der Verlust an Carotinoiden höher schien, wurden bei der PL2 mehr Tocochromanole abgebaut. Beim Backen von Brot stellten LEENHARDT *et al.* (2006b) höhere Verluste an Carotinoiden als an Vitamin E fest und begründeten ihre Beobachtung mit der Vermutung, dass Carotinoide als bessere Elektronendonatoren dienen und daher die Vitamin-E-Moleküle vor Oxidation durch LOX schützen. Umgekehrt kann die Hydroperoxidation von Fettsäuren sowie die daran gekoppelte Oxidation von Carotinoiden durch α -Tocopherol auch gehemmt werden (BEN-AZIZ *et al.* 1971, PASTORE *et al.* 2000), was höhere Vitamin-E-Verluste wie z. B. in der PL2 zur Folge hätte. Diese Theorie erscheint plausibel, da Vitamin E bzw. α -Tocopherol als wichtigstes Antioxidans im lipophilen Medium betrachtet wird. Die Abnahme der einzelnen Tocopherole und Tocotrienole unterlag ebenfalls keinem einheitlichen Muster. β -Tocotrienol erwies sich generell stabiler als das entsprechende α -Vitamer. Bei den Tocopherolen bestand eine Abhängigkeit von den Produktionsbedingungen. Die PL1 verursachte höhere β -Tocopherol-Verluste, die PL2 hingegen höhere Verluste an α -Tocopherol. Bei der Brotherstellung waren ebenfalls α -Tocopherol und α -Tocotrienol labiler als ihre entsprechenden β -Isomere (WENNERMARK und JÄGERSTAD 1992). Diese Beobachtungen können im Zusammenhang mit der antioxidativen Aktivität der verschiedenen Vitamere gesehen werden. Diese ist u. a. abhängig von der Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanring. Für α -Tocopherol wurde eine höhere Aktivität gegenüber Lipidperoxidationen festgestellt als für β -Tocopherol (BURTON und TRABER 1990, KAMAL-ELDIN und APPELQVIST 1996).

Die einzelnen Prozessschritte der Teigwarenproduktion haben einen ganz unterschiedlichen Einfluss auf die lipophilen Inhaltsstoffe. Der Gelbpigmentgehalt kann durch den Mischprozess um bis zu 41 % reduziert werden. Beim Pressen der Teigwaren gingen nochmals bis zu 16 % der Pigmente verloren. Die Trocknung bewirkte geringe bis keine weiteren Veränderungen im Gelbpigmentgehalt (MENGER 1964). Der **Mischvorgang** von Grieß mit Wasser wurde von mehreren Autoren als der Prozessschritt mit den höchsten LOX-bedingten Carotinoid-Verlusten identifiziert. (IRVINE und WINKLER 1950, MATSUO *et al.* 1970, BORRELLI *et al.* 1999), was sich mit den eigenen Untersuchungen deckt (siehe Kapitel 5.6.1). Auch enzymatisch bedingte Verluste an Vitamin E traten während des Mischens von Mehl mit Wasser auf (HÅKANSSON und JÄGERSTAD 1990). Bei der Brotherstellung war ebenfalls der Prozess des Teigknetens verantwortlich für die höchsten Verluste an Carotinoiden (LEENHARDT *et al.* 2006b) und Vitamin E (WENNERMARK und JÄGERSTAD 1992, LEENHARDT *et al.* 2006b). Während des Mischens wurde die hydrophobe Oberfläche von Gluteninmolekülen, an die das Enzym gebunden ist, verändert und demzufolge die Freisetzung und Aktivierung von LOX verursacht. Zusätzlich stieg die Hydroperoxidaseaktivität durch den Eintrag von Sauerstoff

mit der Wasserzugabe und durch mechanische Einflüsse, welche den Kontakt von LOX mit Sauerstoff und den Substraten begünstigen (BORRELLI *et al.* 2003). Letzteres geschieht durch eine Emulsionsbildung aus wässriger und lipophiler Phase bedingt durch die Scherkräfte im Teigmischer (IRVINE und WINKLER 1950). Auch die Temperaturbedingungen haben einen Einfluss auf die Pigmentverluste während des Mischvorgangs, indem höhere Temperaturen auch in höheren Abbauraten resultieren. So war im Pigmentgehalt eines Teiges ein deutlicher Unterschied bei Temperaturen von 30 °C und 45 °C sichtbar (IRVINE und WINKLER 1950). Eine Temperatur im Teigmischer von 40 °C entspricht der optimalen Temperatur für die Hydroperoxidaseaktivität (BARONE *et al.* 1999). Im anschließenden Extrusionsprozess sank die Aktivität der Lipoxygenase durch die verminderte Sauerstoffverfügbarkeit unter Vakuum. Physikalische und chemische Proteinmodifikationen könnten zudem zur Denaturierung von LOX geführt haben (BORRELLI *et al.* 2003). IRVINE und WINKLER (1950) fanden keine Pigmentverluste während des Mischvorgangs unter Sauerstoffausschluss sowie eine Zunahme der Abbaureaktionen mit steigender Sauerstoffkonzentration. Spätere Untersuchungen zeigten bei der Herstellung unter Vakuum jedoch kaum Effekte auf die Pigmentoxidation. Die Autoren führten die verbesserte Teigwarenfarbe eher auf eine verbesserte Nudeloberfläche und verminderte Luft einschüsse zurück (IRVINE und ANDERSON 1955). Sämtliche Einflussfaktoren auf die Abbaureaktionen während der Teigbereitung müssen im gegenseitigen Zusammenhang gesehen werden. Der Mischvorgang unter Vakuum mit Hilfe der Polymatik[®]-Presse wirkte sich den eigenen Ergebnissen zufolge trotz höherer Scherbelastungen und Temperaturen positiv auf den Erhalt der untersuchten Substanzen aus, was vermutlich in der wesentlich kürzeren Reaktionszeit begründet liegt. Außerdem vermag ein Sauerstoffausschluss Tocopherole gegenüber Licht- und Hitzeeinflüssen zu stabilisieren (ELMADFA und BOSSE 1985). DEBBOUZ und DOETKOTT (1996) fanden übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen einen höheren Farberhalt bei einer kürzeren Mischzeit und höheren Temperaturen im Teigmischer. Bereits 1972 verglichen FREIMUTH *et al.* (1972) die Lipoxygenase-Aktivität in Teigen, die mittels „Normalknetung“ (5 min) und „Schnellknetung“ (1 min) hergestellt wurden. Durch die höhere Knetintensität bei der „Schnellknetung“ wurde das Enzym stärker geschädigt und somit in seiner Aktivität stärker gehemmt als bei der längeren Teigbereitung.

Bei der **Trocknung** der Teigwaren spielten sowohl die Trocknungsdauer als auch die verwendeten Temperaturen eine Rolle. Die Retention von Carotinoiden verringert sich in der Regel mit zunehmender Verarbeitungszeit und höheren Temperaturen. Der Erhalt von Carotinoiden kann daher durch die Anwendung kurzer Verarbeitungszeiten bei niedrigen Temperaturen signifikant verbessert werden. Jedoch sind auch high temperature - short time (HT-ST)-Prozesse eine gute Alternative (MATSUO 1987, RODRIGUEZ-AMAYA 1999). Die Anwendung hoher Trocknungstemperaturen verringert die Lipoxygenaseaktivität und begünstigt damit den Farberhalt von Teigwaren (TAHA und SAGI 1987). Dennoch finden auch während

der Trocknung weitere Verluste an Carotinoiden (BORRELLI *et al.* 2003) und Vitamin E statt, da eine nicht-enzymatisch induzierte Lipidperoxidation auch nach der Hitzeinaktivierung von Enzymen ablaufen kann (HÅKANSSON und JÄGERSTAD 1990, EITENMILLER und LEE 2004b). Der Vorteil der Inaktivierung von Enzymen durch hohe Trocknungstemperaturen erscheint relativ unbedeutend, da die Hauptverluste durch enzymatisch bedingte Oxidationen bereits während der Teigbildung auftreten.

Der beste Schutz vor Abbaureaktionen scheint demnach die Auswahl von Hartweizengrieß mit geringer LOX-Aktivität zu sein (BORRELLI *et al.* 1999). Die Vermutung wird gestützt durch Untersuchungen von McDONALD (1979), der höhere Pigmentverluste bei Hartweizensorten mit höherer LOX-Aktivität feststellte. Eine weitere Möglichkeit besteht auch in der Verwendung von Grießen mit sehr hohen Gelbpigmentgehalten. In diesem Fall scheint ein Verlust von bis zu 30 % keine Auswirkungen auf die Teigwarenfarbe zu haben (MATSUO 1987). Auch die Ausgangskonzentration von Vitamin E hat einen Einfluss auf dessen Abbaurate, wobei in einem Modell-Lebensmittel mit höherer α -Tocopherol-Konzentration ein höherer Verlust als bei einer geringeren Ausgangskonzentration festgestellt wurde (WIDICUS und KIRK 1981). Des Weiteren bestand eine Abhängigkeit der Stabilität von α -Tocopherol von der Lipidzusammensetzung des Lebensmittels. Die Abbaurate war größer unter gleichzeitiger Anwesenheit von ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu einem fettfreien Modell-Lebensmittel. Der oxidative Abbau von Carotinoiden steht ebenso in Verbindung mit dem Gehalt an freien Fettsäuren (v. a. Linolsäure) (DAHLE 1965). Neben den Prozessparametern üben demzufolge die Ausgangsgehalte an Carotinoiden und Vitamin E, die Konzentration an peroxidierbaren ungesättigten Fettsäuren und die Lipoxygenase-Aktivität im Rohmaterial einen Einfluss auf die Verluste während der Teigwarenherstellung aus. Diese vielschichtige Beeinflussung der resultierenden Vitamin-E- und Carotinoidgehalte in den fertigen Teigwaren kann als Ursache für die teilweise unterschiedlichen Verluste der untersuchten Inhaltsstoffe bei mehreren Chargen einer Produktionslinie gesehen werden. Um exaktere Rückschlüsse auf die Ursachen der Verluste ziehen zu können, wäre die Betrachtung weiterer Faktoren wie z. B. des Lipidgehaltes, des Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren und der LOX-Aktivität der Rohstoffe aber auch deren Veränderungen während der Teigwarenherstellung notwendig.

5.6.3 Veränderungen während des Kochens von Teigwaren

Carotinoide und Vitamin E sind im Gegensatz zu wasserlöslichen Vitaminen und Mineralstoffen nicht vom Auslaugen durch das Kochwasser betroffen, können aber dennoch durch den Hitzeeinfluss während des Kochvorgangs Veränderungen unterliegen. Die thermische Verarbeitung von Gemüse kann einen Verlust von Carotinoiden verursachen (KHACHIK *et al.* 1986, CHEN und CHEN 1993, BOROWSKA *et al.* 2003, AMAN *et al.* 2005a). Xanthophylle wie

Lutein scheinen besonders empfindlich gegenüber hohen Temperaturen zu sein (KHACHIK *et al.* 1986, CHEN und CHEN 1993). Die Stabilität von Carotinoiden variiert sowohl bei der Verwendung von gleichen Verarbeitungsbedingungen in verschiedenen Lebensmitteln, als auch bei verschiedenen Garmethoden für ein Lebensmittel (RODRIGUEZ-AMAYA 1999, RYAN *et al.* 2008). KHACHIK *et al.* (1992b) fanden keine Veränderung der Carotinoidgehalte bei verschiedenen Gemüseproben unter milden Kochbedingungen (Mikrowellen-, Dampfgaren). Während des Kochens von Gemüse stellte sich insbesondere Lutein als erstaunlich stabil heraus (DE SA und RODRIGUEZ-AMAYA 2004). Der Vitamin-E-Gehalt von Gemüse scheint während des Kochvorgangs schwankenden Verlusten zu unterliegen. Diese betragen unter 10 % bei Kohl, Karotten und Lauch, jedoch mehr als 20 % bei Kartoffeln und Bohnen (EITENMILLER und LEE 2004b). Beim Kochen verschiedener Hülsenfrüchte traten hingegen Verluste von Vitamin E (α -T + γ -T) zwischen 9 % und 59 % auf. Ähnlich hohe Verluste (22-55 %) wurden durch das Kochen von Reis-, Mais-, Hafer- und Weizenkörnern verursacht (WYATT *et al.* 1998). Einige Studien berichten hingegen von erhöhten Carotinoidgehalten in gekochtem Gemüse gegenüber der Rohware (GRANADO *et al.* 1992, HART und SCOTT 1995, UPDIKE und SCHWARTZ 2003, HOWE und TANUMIHARDJO 2006). Meist wird diese Beobachtung mit einer erhöhten Extrahierbarkeit nach dem Garen erklärt, welche auf die Zerstörung von zellulären und subzellulären Strukturen und die Denaturierung von Carotinoid-Protein-Komplexen zurückgeführt wird (KHACHIK *et al.* 1992b, RODRIGUEZ-AMAYA 1999, RICH *et al.* 2003b). Andere Autoren stellten eine durch den Kochvorgang verursachte Zellseparation, jedoch keine Zerstörung von Pflanzenzellen fest (TYDEMAN *et al.* 2001). Die Ursache dieser Zellisolierung beim Kochen ist in dem Aufweichen des Pflanzengewebes, dem Quellen von Zellwänden und dem damit verbundenen Auflösen des Pektins zu suchen. Die Zerstörung der Zellen geschieht demnach erst durch den Kauvorgang im Mund (HORNERO-MÉNDEZ und MÍNGUEZ-MOSQUERA 2007).

Bei dem Vergleich von Gehalten in rohen und gekochten Lebensmitteln blieben der begünstigte enzymatische Carotinoidabbau in rohen Lebensmitteln, die Veränderung des Wassergehaltes und der Verlust von Feststoffen ins Kochwasser meist unberücksichtigt (RODRIGUEZ-AMAYA 1999). Höhere Vitamin-E-Gehalte von blanchiertem Gemüse im Vergleich zu den rohen Produkten wurden ebenfalls auf das Auslaugen wasserlöslicher Inhaltsstoffe während des Blanchierens zurückgeführt (EITENMILLER und LEE 2004b). DEXTER und MATSUO (1979) stellten beim Kochen von Spaghetti eine zeitabhängige Zunahme des Gewichtes und des Übergangs von Feststoffen ins Kochwasser fest. Auch Hülsenfrüchte gehören zu der Kategorie Lebensmittel, die während des Kochens Wasser aufnehmen und Feststoffe verlieren (MURPHY *et al.* 1975). Die Berechnung der Gehalte bezogen auf die Trockenmasse der rohen und gekochten Produkte berücksichtigt zwar die Aufnahme von Wasser, der Verlust von Feststoffen ins Kochwasser wird jedoch vernachlässigt. Diese auf

Basis der Trockenmasse berechnete „scheinbare Retention“ von Nährstoffen liegt in der Regel deutlich über der „wahren Retention“. Die Unterschiede zwischen beiden Berechnungsmethoden betragen nach MURPHY *et al.* (1975) zwischen 6 % und 11 % für 12 untersuchte Nährstoffe. Die Berechnung der Retention sollte daher die Gewichtsveränderungen des Lebensmittels während des Kochens berücksichtigen (MURPHY *et al.* 1975, RODRIGUEZ-AMAYA 2001, DE SA und RODRIGUEZ-AMAYA 2004). Tatsächlich ergaben die eigenen Untersuchungen in den meisten Fällen eine zum Teil signifikante Zunahme der auf die Trockenmasse bezogenen Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E während des Kochens der Teigwaren. Die Kochverluste konnten bei der Berechnung der Retention nur bei drei Teigwaren berücksichtigt werden, da die restlichen Proben vor und nach dem Kochen nicht gewogen wurden. Als Beispiel für eine oft falsch interpretierte „Zunahme“ der Carotinoidgehalte durch den Kochvorgang sei die Charge 1 der PL2 genannt. Die gekochte Teigware wies laut Berechnung auf Basis der Trockenmasse einen Carotinoidgehalt von 113 % des Gehaltes der rohen Teigware auf. Diese scheinbare Zunahme, die als Resultat einer verbesserten Extrahierbarkeit interpretiert werden könnte, erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Berechnung unter Berücksichtigung der Gewichtsveränderungen während des Kochens ergab jedoch eine Retention von 104 % (siehe Tab. 23, Seite 83). Die Retention der Carotinoide lag im Mittel der drei untersuchten Teigwaren bei 102 % und die des Vitamins E bei 99 %. Das Kochen der Teigwaren hatte somit keinen nennenswerten Einfluss auf die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E. Eine verbesserte Extrahierbarkeit der gekochten Teigware könnte jedoch Verluste an Carotinoiden und Vitamin E überdecken. SEIBEL und ZWINGELBERG (1989, 1997) fanden keinen nennenswerten Unterschied im Gelbpigmentgehalt (bezogen auf TM) zwischen rohen und gekochten Teigwaren. Die gekochten Proben wurden vor der Analyse getrocknet.

Des Weiteren wurde wie auch bei der Teigwarenherstellung eine leichte Verschiebung des Verhältnisses von (*all-E*)- und (*Z*)-Lutein zugunsten der (*Z*)-Isomere festgestellt, was auf die Temperatureinwirkung während des Kochens zurückgeführt werden könnte. Die Hauptvertreter der (*Z*)-Isomere wurden, wie auch in rohen Teigwaren und Hartweizengrieß, mit Hilfe von UV/vis- und MS-Daten (nicht zweifelsfrei) als (*13Z*)- oder (*13'Z*)-Lutein, (*9Z*)-Lutein, (*9'Z*)-Lutein und (*13Z*)-Zeaxanthin identifiziert (siehe Kapitel 4.3). Auf quantitative Angaben zum (*Z*)-Zeaxanthin wurde aufgrund der Konzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze verzichtet. Bei der Herstellung von Gemüse-Konserven wie auch beim Garen von Brokkoli trat ebenfalls eine Bildung oder Zunahme von (*13Z*)-, (*9Z*)- und (*9'Z*)-Lutein auf (UPDIKE und SCHWARTZ 2003).

5.7 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit mittels *in-vitro*-Verdauung

5.7.1 Beurteilung der *in-vitro*-Verdauung anhand von freien Fettsäuren, Aminosäuren und Zuckern

Fettsäuren

Die Fettextrakte einer unverdauten und einer verdauten Teigware wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit einem Standardgemisch verglichen. Die Zuordnung der Banden der verdauten Teigware zu den Referenzsubstanzen warf einige Fragen auf (Abb. 58). Die Bande für Cholesterin in den verdauten Teigwaren war nicht zu erwarten, da dieses nur in tierischen Produkten zu finden ist. Inwieweit Phytosterine aus der Teigware oder dem zugesetzten Rapsöl mit dem Cholesterin-Standard coelulieren könnten, ist nicht bekannt. Der Vergleich der Trennung mit einer von CHRISTIE (1989) publizierten Methode ließ eine andere Vermutung zu. Mit dem leicht modifizierten Elutionsmittel wurden die einzelnen Fettbestandteile deutlich weiter aufgetrennt (Abb. 59). Zwischen den Phospholipiden und dem Cholesterin eluierten zusätzlich Mono- und Diacylglyceride. Um diese Verbindungen könnte es sich auch bei der Bande 2 der verdauten Teigware handeln, da diese Zwischenprodukte der Lipolyse sind und demzufolge zusammen mit freien Fettsäuren (Bande 3) in dem Verdauungsansatz vorliegen könnten. Dennoch waren die Triglyceride in der verdauten Teigware der Hauptbestandteil, was auf eine unzureichende Lipolyse mit der verwendeten Verdauungsmethode schließen ließ.

Das in der vorgestellten *in-vitro*-Verdauung eingesetzte Pankreatin war ein Wirkstoffkomplex aus dem Schweinepankreas und enthielt laut Herstellerangaben eine Vielzahl von Enzymen wie Amylase, Trypsin, Lipase, Ribonuklease und Protease. Die Lipaseaktivität des Pankreatins reichte in den eigenen Untersuchungen für eine effektive Fettverdauung, vor allem bei niedrigen Gallensalzkonzentrationen nicht aus (siehe auch Abschnitt „Zugabe von Pflanzenöl“ im Kapitel 5.7.1, Seite 142). Aus diesem Grund ist die Erhöhung der Pankreatinkonzentration bzw. eine Erweiterung der Verdauungsmethode um weitere Lipasen zu empfehlen. Einige Autoren verwendeten für die simulierte Verdauung zusätzlich zum Pankreatin Pankreaslipase, Colipase, Phospholipase A₂, Cholesterinesterase bzw. Carboxylesterlipase (Tab. 38, Seite 146).

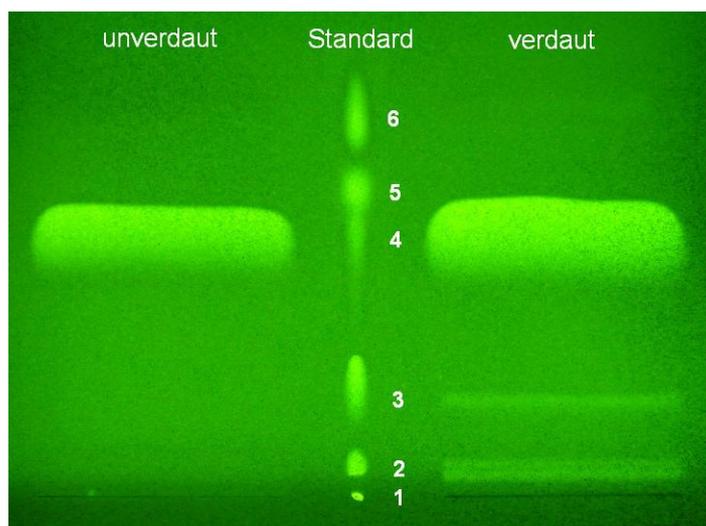


Abb. 58: DC-Trennung einer Teigware vor und nach simulierter Verdauung mittels n-Hexan/Diethylether/Essigsäure (80/20/1, v/v/v) im Vergleich zu einem Standardgemisch

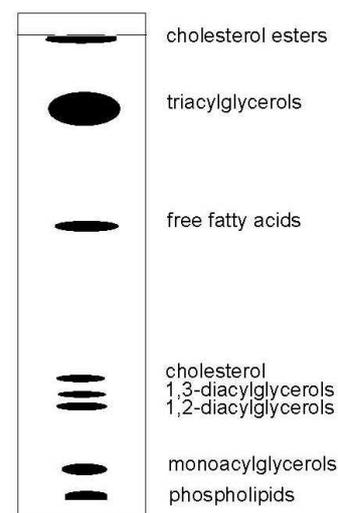


Abb. 59: DC-Trennung eines Fettgemisches mit Hexan/Diethylether/ Ameisensäure (80/20/2, v/v/v) (CHRISTIE 1989)

1 = Phospholipide, 2 = Cholesterin, 3 = freie FS, 4 = Triacylglyceride, 5 = FS-Methylester, 6 = Cholesterinester

Aminosäuren

Seit ihrer Einführung im Jahr 1960 (OKUYAMA und SATAKE 1960, SATAKE *et al.* 1960) fand die TNBS-Methode zahlreiche Anwendungen zur Bestimmung freier Aminogruppen in Aminosäuren, Peptiden und Proteinen. Bezüglich der Nachweisempfindlichkeit ist sie der Analyse mit Ninhydrin ebenbürtig. Sie ist im Gegensatz zur Ninhydrin-Methode unempfindlich gegenüber Ammoniak. Es muss jedoch erwähnt werden, dass TNBS ebenso wie Ninhydrin nicht mit sekundären Aminogruppen reagiert und demzufolge Prolin im Getreide nicht erfasst wird. Da die Messung der Aminosäuren nur zur Kontrolle der Proteinhydrolyse herangezogen wurde, konnte auf eine quantitative Analyse verzichtet werden.

Die verwendete Verdauungsmethode zeichnete sich durch einen deutlichen Eiweißabbau mittels Pepsin aus. Die freien Aminosäuren, gemessen als L-Glutaminsäure-Äquivalente, nahmen durch die *in-vitro*-Verdauung um 73 % zu (Abb. 47, Seite 86).

Zucker

Die Verdauung der Stärke, dem Hauptbestandteil von Getreide, sollte mittels simulierter Verdauung im Mund mit α -Amylase erfolgen. Hierfür musste die Methode von REBOUL *et al.* (2006) um eine orale Phase erweitert werden. Die meisten Autoren begannen die *in-vitro*-Verdauung mit der Simulation des Magenmilieus (Tab. 38, Seite 146). Für stärkereiche Lebensmittel ist eine Verdauung mit Hilfe von α -Amylase jedoch anzuraten. AURA *et al.* (1999) stellten mit einer Amylaseaktivität von 10-40 U/1,5 g Probe keine nennenswerte

Stärkehydrolyse in Weizen- und Roggenbrot fest und erhöhten daher die Enzymaktivität auf 50 U/1,5 g Probe. Andere Autoren setzten für die Verdauung von Süßkartoffeln bzw. Maniok mit 1000 U/g (BENGTSSON *et al.* 2009) und 3000 U/g (THAKKAR *et al.* 2007) wesentlich höhere Amylasekonzentrationen ein. Die Ursache der geringen Stärkehydrolyse mit Hilfe einer humanen α -Amylase aus Speichelflüssigkeit sahen AURA *et al.* (1999) in der Struktur des Getreideendosperms. Die Stärkekörner waren durch die Einbettung in eine Proteinmatrix für amylytische Enzyme nicht verfügbar, was auch bei Teigwaren der Fall sein könnte. Die vorliegenden Untersuchungen führten mit einer Enzymaktivität von 168 U/g Teigware zu einer Verdreifachung von Glucose- und Maltosegehalten im Verdauungsansatz (Abb. 47, Seite 86). Da das eingesetzte Pankreatin eine Amylaseaktivität besaß, kann von der Fortführung der Stärkehydrolyse während der simulierten Duodenalphase ausgegangen werden. Hierfür spielten sowohl Pepsin als auch Gallensalze eine entscheidende Rolle. Durch den Abbau der Proteinmatrix mit Hilfe von Pepsin wurde die Stärkehydrolyse erhöht (FARDET *et al.* 1998, AURA *et al.* 1999). Gallensalze wirkten sich ebenfalls positiv auf das Ausmaß des Stärkeabbaus aus, indem sie als Emulgatoren die Interaktion zwischen Stärke und Pankreatin förderten (AURA *et al.* 1999).

5.7.2 Methodische Voruntersuchungen zur *in-vitro*-Verdauung

Zentrifugation

Eine 20-minütige Zentrifugation mit 4.500 U/min (\approx 3.900 g) reichte zur Klärung der Lösungen, um eine anschließende Mikrofiltration der Überstände zu ermöglichen, nicht aus. Die beiden Ultrazentrifugationen mit 20.000 U/min (\approx 43.000 g) und 40.000 U/min (\approx 167.000 g) erfolgten nach den Vorschriften von REBOUL *et al.* (2006) bzw. GARRETT *et al.* (1999). Beide Verfahren resultierten in geringeren Gehalten an Carotinoiden und Vitamin E im Filtrat nach simulierter Verdauung im Vergleich zur Zentrifugation bei 14.000 U/min (\approx 15.800 g). Der Verlust der Inhaltsstoffe könnte in der Instabilität der Mizellen bei der Ultrazentrifugation und die anschließende Abtrennung der freigesetzten Substanzen durch die Filtration begründet sein (LIU *et al.* 2004). Demgegenüber steht eine Studie von FAILLA *et al.* (2008), in der zwischen der Ultrazentrifugation bei 167.000 g und einer Zentrifugation bei 5.000 g hinsichtlich der Resorptionsverfügbarkeit von Lutein, α - und β -Carotin sowie Lycopin kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. GRANADO-LORENCIO *et al.* (2007a) verglichen verschiedene Zentrifugationsmethoden (5.000-25.000 U/min) mit der Sedimentation über Nacht. Letztere lieferte die besten Ergebnisse und reflektierte nach Aussage der Autoren die physiologischen Ereignisse im Verdauungstrakt. Diese Methode wurde auch von HERRERO-BARBUDO *et al.* (2009) zur Bestimmung der Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin A und Vitamin E aus angereicherter Milch genutzt. Unter den Zentrifugationsmethoden zeigte die

Zentrifugation mit 5000 U/min für 20 min bei Raumtemperatur die höchsten Wiederfindungsraten und war in der praktischen Durchführung am besten geeignet (GRANADO-LORENCIO *et al.* 2007a). Zahlreiche andere Arbeitsgruppen ersetzen die Ultrazentrifugation ebenfalls durch Zentrifugationen mit 3.000-5.000 g.

Filtration

Die Mizellenfraktion ist ein Zwei- oder Multiphasensystem mit Flüssigkristallen, die in einer Mizellenlösung suspendiert sind (HERNELL *et al.* 1990). Durch die Mikrofiltration (0,22 µm) werden kristalline Verbindungen, größere Vesikel und Öltröpfchen aus dem wässrigen Überstand nach der Zentrifugation abgetrennt (HERNELL *et al.* 1990, GARRETT *et al.* 1999). Die gemischten Mizellen mit einer Größe von wenigen Nanometern verbleiben im Filtrat. Während GARRETT *et al.* (1999) signifikant niedrigere Gehalte an Lycopin, nicht jedoch an Lutein, α-Carotin und β-Carotin, im wässrigen Überstand nach der Filtration fanden, stellten BENGSSON *et al.* (2009) auch für β-Carotin einen signifikanten Verlust durch die Mikrofiltration fest. Den eigenen Ergebnissen zufolge hatte die Filtration des wässrigen Überstandes keine signifikanten Verluste an Carotinoiden verursacht. Für Vitamin E wurde die Signifikanz nur knapp verfehlt ($p = 0,069$, t-Test). Da jedoch bei beiden untersuchten Stoffklassen Verluste von bis zu 20 % auftraten, kann die Filtration als eine Ursache hierfür angenommen werden. Des Weiteren könnten Oxidationsreaktionen den Abbau der Inhaltsstoffe verursacht haben, obwohl zu Beginn der *in-vitro*-Verdauung Pyrogallol als Antioxidans zugegeben wurde. Die Instabilität von Pyrogallol in Lösung kann eventuell als Ursache für die stark schwankenden Verluste an Carotinoiden und Vitamin E betrachtet werden. Aus diesem Grund sollte die Lösung immer erst unmittelbar vor der *in-vitro*-Verdauung hergestellt werden.

pH-Wert

Drei *in-vivo*-Studien zur Untersuchung von Parametern des oberen Gastrointestinaltraktes lieferten nützliche Ergebnisse für *in-vitro*-Verdauungsmodelle. Der Nüchtern-pH-Wert des **Magens** war mit 1,7 (KALANTZI *et al.* 2006), 1,8 (TYSSANDIER *et al.* 2003) und 1,9 (BOREL *et al.* 2001) in allen 3 Studien sehr ähnlich. Nach der Nahrungsaufnahme wurden pH-Werte von etwa 6,4 (KALANTZI *et al.* 2006), 5,4-6,2 (TYSSANDIER *et al.* 2003) und 6,1 (BOREL *et al.* 2001) gemessen. Innerhalb von 3-3,5 h sanken die pH-Werte auf etwa 2,7 (KALANTZI *et al.* 2006), 2,9-1,8 (TYSSANDIER *et al.* 2003) bzw. erreichten etwa den Ausgangswert (BOREL *et al.* 2001). In der Studie von KALANTZI *et al.* (2006) schwankte der pH-Wert des Magens im nüchternen Zustand zwischen den einzelnen Probanden deutlich stärker als nach Nahrungsaufnahme. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der stark saure pH-Wert in der Originalmethode (GARRETT *et al.* 1999) durch einen pH-Wert von 4,0 für die simulierte Verdauung im

Magen ersetzt (REBOUL *et al.* 2006b). Eigene Untersuchungen zeigten einen Anstieg des pH-Wertes während der 30-minütigen Inkubationszeit mit Pepsin, was eine genaue Einstellung auf pH 4,0 ausschloss. Der pH-Wert schwankte während der simulierten Verdauung im Magen folglich zwischen 3,5 und 4,5. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus *in-vitro*-Studien mit unterschiedlichen pH-Werten in der Magenphase scheint fraglich.

Die Verdauung im Magen hat die Freisetzung lipophiler Substanzen aus der Nahrung und deren Lösung in die Ölphase zur Folge. Ein niedriger pH-Wert im Magen beeinflusst die Oberflächenladung von Fetttröpfchen, was wiederum die Aggregation dieser mit der Lebensmittelmatrix und somit den Übertritt der lipophilen Inhaltsstoffe in die Ölphase begünstigt. Ein niedriger pH-Wert hemmte außerdem den Einfluss möglicher Inhibitoren des Transfers von Carotinoiden in die Ölphase, wie z. B. lösliche Proteine (RICH *et al.* 2003a) und Pektin (RICH *et al.* 1998). Des Weiteren beeinflusste der pH-Wert die Ionisierung von Xanthophyllen, die Lipaseaktivität und die Löslichkeit von Mizellen (TYSSANDIER *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit hatte die Absenkung des pH-Wertes während der simulierten Magenpassage von pH 4 auf pH 2 keinen positiven Effekt auf die Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E. Verglichen zur Ausgangsmethode war für Vitamin E eine Abnahme der Verfügbarkeit um 24 % zu verzeichnen. Diese war jedoch nicht auf höhere Verluste während der *in-vitro*-Verdauung zurückzuführen.

In-vivo-Untersuchungen zufolge herrschte im **Duodenum** im nüchternen Zustand ein pH-Wert von 6,2 (KALANTZI *et al.* 2006) bzw. 5,0 (TYSSANDIER *et al.* 2003). Nach der Nahrungsaufnahme stieg der pH-Wert auf 6,6 (KALANTZI *et al.* 2006) bzw. 6,1-6,6 (TYSSANDIER *et al.* 2003). Innerhalb von 1,5 h war ein Absinken auf einen pH-Wert von 5,2 zu verzeichnen (KALANTZI *et al.* 2006). In der Studie von TYSSANDIER *et al.* (2001) blieb der pH-Wert bis 2 h nach Nahrungsaufnahme konstant. Die Ergebnisse von BOREL *et al.* (2001) bezüglich des pH-Wertes im Duodenum während einer 4-stündigen Verdauzeit schlossen die der beiden vorangestellten Studien ein (pH 5,2-6,7). Diese Erkenntnisse verursachten ebenfalls eine Anpassung der Verdauungsmethode. Anstelle von pH 7,5 in der Originalmethode von GARRETT *et al.* (1999) wurde ein pH-Wert von 6,0 für die Simulation der Verdauung im Duodenum vorgeschlagen (REBOUL *et al.* 2006b). In den hier vorgestellten Untersuchungen lag der pH-Wert etwas höher (6,5-6,9), da auch hier ein leichter Anstieg während der Verdauung zu verzeichnen war. Im Vergleich mit den genannten *in-vivo*-Studien lag der pH-Wert dennoch im physiologischen Bereich.

Während in einer sauren Lösung der Übertritt der lipophilen Substanzen aus der Lebensmittelmatrix in die Ölphase des Magens begünstigt wurde, schien ein niedriger pH-Wert auf den Transfer von Carotinoiden aus der Emulsion in gemischte Mizellen im Duodenum einen gegenteiligen Effekt zu haben. TYSSANDIER *et al.* (2001) stellten einen geringen Transfer bei

pH-Werten zwischen 2 und 5 sowie einen maximalen Transfer unter schwach sauren Bedingungen (pH 5-7) fest. Der pH-Wert im Duodenum spielte für den Transfer von β -Carotin aus der Ölphase in die wässrige Phase unter postprandialen Pankreatin- und Gallekonzentrationen eine untergeordnete Rolle. Zwischen pH 5,0 und pH 9,5 wurde kein signifikanter Unterschied gefunden (WRIGHT *et al.* 2008). Lediglich bei einem pH-Wert von 3,5 wurde deutlich weniger β -Carotin in gemischte Mizellen eingebunden. Derart geringe pH-Werte sind jedoch nur in der Pylorus-Region zu erwarten. Demzufolge sollten die Ergebnisse aus *in-vitro*-Studien mit unterschiedlichen pH-Werten in der Duodenalphase durchaus vergleichbar sein. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass Pankreatin- und Gallekonzentrationen verwendet wurden, die den Bedingungen nach einer Nahrungsaufnahme entsprechen. Im nüchternen Zustand wurde die größte Differenz im β -Carotin-Transfer bei pH-Werten zwischen 6,5 und 8,5 festgestellt (WRIGHT *et al.* 2008).

Inkubationszeiten

Die Entleerung des Magens in den Darm ist unter anderem abhängig vom kalorischen Gehalt der Mahlzeit und findet zwischen 30 min und 5 h nach der Nahrungsaufnahme statt (VERSANTVOORT *et al.* 2005). Die Autoren legten für ihr *in-vitro*-Verdauungsmodell eine Inkubationszeit für die **Magen**passage von 2 h fest. Die am häufigsten verwendete Inkubationszeit lag bei 1 h (Tab. 38, Seite 146). BOREL *et al.* (2001) stellten jedoch fest, dass bereits während der ersten 30 min ein Großteil der Triglyceride und fettlöslichen Vitamine (> 75 % der Vitamine A und E) aus dem Magen verschwunden war. Danach geschah die Magenentleerung wesentlich langsamer und relativ konstant über einen Zeitraum von 4 h. Eine Verdauzeit von 30 min erschien demzufolge den physiologischen Bedingungen gegenüber als angemessen.

Die Inkubationszeit für die simulierte Verdauung im **Duodenum** lag bei den meisten Methoden bei 2 h (Tab. 38, Seite 146). Die eigenen Ergebnisse resultieren aus einer Verdauzeit im Duodenum von jeweils 30 min. Diese kurze Inkubationszeit sollte der physiologischen Transitzeit im Duodenum näher kommen (REBOUL *et al.* 2006b). Eine Verlängerung der Inkubationszeiten auf jeweils 1 h Magen- und Darmphase hatte für die Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden einen signifikanten Anstieg zur Folge, beeinflusste den Transfer von Vitamin E in die Mizellenfraktion jedoch nicht signifikant. Der fehlende Unterschied zur Ausgangsmethode könnte auch in dem höheren Verlust an Vitamin E liegen, der während der verlängerten *in-vitro*-Verdauung beobachtet wurde. Dieser beruhte vermutlich auf der längeren Kontaktzeit der Verdauungslösung mit Oxidantien wie z. B. Luftsauerstoff. Trotz Überschichtung der Testansätze mit Stickstoff konnte der Kontakt mit Sauerstoff nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Verlängerung der Inkubationszeit schien zwei Effekte zu haben, welche sich eventuell überlagerten. Zum einen könnte die Resorptionsverfügbarkeit

durch den längeren Kontakt der Lebensmittelmatrix mit Enzymen und Gallensalzen zur Freisetzung der lipophilen Substanzen und deren Einschluss in gemischte Mizellen verbessert werden. Zum anderen könnten auch höhere Verluste resultieren. GRANADO-LORENCIO *et al.* (2007a) erhielten durch die von 1 h auf 2 h verlängerte Mageninkubation eine geringere Wiederfindung an β -Cryptoxanthin. Auch Epoxycarotinoide wie Neoxanthin und Violaxanthin unterlagen hohen Verlusten während der simulierten Magenpassage.

Zugabe von Pflanzenöl

Fett beeinflusst die Bioverfügbarkeit von lipophilen Vitaminen durch verschiedene Mechanismen. Es kann die Freisetzung aus der Lebensmittelmatrix fördern, die Gallesekretion und demzufolge die Mizellenbildung stimulieren, die Löslichkeit von lipophilen Substanzen in den gemischten Mizellen erhöhen und auch den Transport außerhalb der Enterocyten fördern, indem es die Chylomikronensynthese induziert (BOREL 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Pflanzenöl nur auf die Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide aus Teigwaren untersucht, da das Rapsöl selbst einen hohen Vitamin-E-Gehalt aufwies. Entgegen der Erwartungen hatte die Zugabe von 10 % Öl keinen Einfluss auf die Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide. FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.* (2007) beobachteten ebenfalls keinen Unterschied im Anteil an Lutein in Mizellen mit und ohne Ölzusatz. Im Falle der eigenen Ergebnisse wurde die unzureichende Hydrolyse des Fettes mit der verwendeten Verdauungsmethode als Ursache vermutet. Der limitierende Faktor für die Lösung von Carotinoiden in der wässrigen Phase ist die Menge an gebildeten Mizellen, welche wiederum von der Menge der Lipolyseprodukte abhängt (BOREL *et al.* 1996). Die Versuche zum Zusatz von Pflanzenöl wurden mit Gallekonzentrationen von etwa 2,5 mg/ml Testansatz durchgeführt, was einem nüchternen Zustand entspricht. Unter diesen Bedingungen werden weniger Mizellen gebildet als bei höheren Gallensalzkonzentrationen. Diese können jedoch durch Lipolyseprodukte anschwellen und dadurch mehr Carotinoide lösen (WRIGHT *et al.* 2008). Unter den genannten Bedingungen wäre demzufolge eine höhere Lipaseaktivität für einen effektiveren Transfer der Carotinoide nötig gewesen. BOREL *et al.* (1996) fanden jedoch auch heraus, dass Xanthophylle zum Teil spontan aus der Fett-emulsion in die wässrige Phase übertreten können, während die unpolare Carotine auf die Lipolyse mittels Pankreaslipase angewiesen waren. Ursache hierfür schien die unterschiedliche Lokalisation der beiden Carotinoidklassen in den Fetttröpfchen zu sein. Fett erhöht die Resorptionsverfügbarkeit von sehr lipophilen Substanzen stärker als von polaren Verbindungen wie den Xanthophyllen (YONEKURA und NAGAO 2007). So fanden HUO *et al.* (2007) einen stärkeren Einfluss von Öl auf die Resorptionsverfügbarkeit von α -Carotin, β -Carotin und Lycopin als auf die von Lutein. Ein Maß für die Polarität bzw. Fettlöslichkeit einer Verbindung ist der n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{OW}). Durch die Angabe

des dekadischen Logarithmus des K_{OW} bedeutet ein Unterschied von 1 eine 10-fache Differenz in der Lipophilie. Der $\log K_{OW}$ für Lutein beträgt 14,8 und für Zeaxanthin 15,0 (COOPER *et al.* 1997). Mit einem $\log K_{OW}$ von 12,2 ist α -Tocopherol polarer als die beiden Xanthophylle. Daher wird vermutet, dass die Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin E aus Teigwaren durch den Zusatz von Öl ebenfalls nicht verändert wurde.

Demgegenüber stehen zahlreiche ***in-vitro*-Studien**, die eine Beeinflussung der Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden durch die Zugabe von Fett zeigen konnten. Öl erhöhte die Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide aus Karotten (HEDREN *et al.* 2002, HORNERO-MÉNDEZ und MÍNGUEZ-MOSQUERA 2007), Mango (ORNELAS-PAZ *et al.* 2008) und einer Gemüsemischung (HUO *et al.* 2007). Die Zugabe von 5 % Fett steigerte die Resorptionsverfügbarkeit von Lutein sogar stärker als die von β -Carotin (PULLAKHANDAM und FAILLA 2007). Neben der Fettmenge kann auch die Art des Fettes eine Rolle für die Mizellenbildung spielen. Laut HUO *et al.* (2007) wurde die Mizellenbildung von der Kettenlänge der Fettsäuren, nicht jedoch von deren Sättigung beeinflusst. Fettsäuren spielen eine Rolle für die Größe der Mizellen und somit für die Transportgeschwindigkeit dieser durch die Enterozyten, was die Effektivität der Resorption beeinflusst (LAKSHMINARAYANA *et al.* 2007). Die Resorptionsverfügbarkeit von Lutein aus einer Testmahlzeit mit verschiedenen Fettquellen (Hühnchen, Schinken, Rindfleisch und Pflanzenöl) unterschied sich bei einem vergleichbaren Fettgehalt von 3 % signifikant (GARRETT *et al.* 1999). Angaben zu den enthaltenen Fettsäuren fehlten jedoch. Der Austausch von Hühnchen durch Pflanzenöl bewirkte eine Verdopplung der Resorptionsverfügbarkeit von Lutein. Die Carotine wurden von der Art des Fettes kaum beeinflusst. Anderen Autoren zufolge spielte die Art der Triglyceride keine signifikante Rolle beim Transfer von Carotinoiden in gemischte Mizellen (TYSSANDIER *et al.* 2001).

Der Einfluss von Fett auf die Resorption von Carotinoiden wurde in zahlreichen ***in-vivo*-Studien** belegt. Zur Beeinflussung der Vitamin-E-Absorption durch Fett existieren nur wenige Humanstudien. Tierstudien lieferten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse (ROODENBURG *et al.* 2000). DIMITROV *et al.* (1991) verglichen die Plasmagehalte von α -Tocopherol nach Supplementation und gleichzeitigem Verzehr von 65 g oder 6 g Fett pro Tag und fanden eine höhere Bioverfügbarkeit für Vitamin E bei einem höheren Fettgehalt der Nahrung. Auch die Aufnahme von supplementiertem Lutein war bei gleichzeitigem Verzehr einer Mahlzeit mit hohem Fettanteil (36 g) höher als bei geringer Fettzufuhr (3 g) (RISO *et al.* 2003). Zu dem gleichen Ergebnis gelangten auch ROODENBURG *et al.* (2000). Während der Fettgehalt (3 g oder 36 g) keinen signifikanten Effekt auf die Plasmagehalte von α -Carotin, β -Carotin und α -Tocopherol hatte, wurde die Bioverfügbarkeit von Luteinestern durch einen höheren Fettverzehr gesteigert. Dass der Fettgehalt der Nahrung für die Bioverfügbarkeit von Tocopherol- und Xanthophyllestern von entscheidender Bedeutung ist, vermuteten auch

andere Autoren. Ein höherer Fettgehalt der Nahrung ist für die Lösung dieser stark hydrophoben Verbindungen notwendig und stimuliert gleichzeitig die Ausschüttung und die Aktivität von Lipasen und Esterasen (VAN HET HOF *et al.* 2000). Die Esterspaltung ist ein wichtiger Schritt vor der Resorption (VAN HET HOF *et al.* 2000, CHITCHUMROONCHOKCHAI und FAILLA 2006). In den untersuchten Teigwaren lagen die Carotinoide und Tocochromanole jedoch unverestert vor. Ein höherer Fettbedarf wurde auch für die Resorption aus rohem Gemüse im Vergleich zu gekochtem oder homogenisiertem Gemüse festgestellt (YONEKURA und NAGAO 2007).

Konzentration an Gallensalzen

Eine Konzentration von 2,4 mg/ml, wie sie in der Originalmethode beschrieben wurde, repräsentiert die Verhältnisse im nüchternen Zustand (GARRETT *et al.* 1999). WRIGHT *et al.* (2008) legten eine Gallekonzentration von etwa 5 mg/ml im nüchternen Zustand und 20 mg/ml nach Nahrungsaufnahme fest.

Die eigenen Versuche haben eine deutliche Abhängigkeit der Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin E und Carotinoiden aus Teigwaren von der verwendeten Gallekonzentration gezeigt. Bei der Ausgangsmethode wurde eine Gallekonzentration von etwa 2,5 mg/ml Testansatz und bei der Verwendung der zusätzlichen Gallenmenge eine Konzentration von etwa 11 mg/ml erreicht. Während REBOUL *et al.* (2006b) die Erhöhung der Gallekonzentration als Voraussetzung zum effektiven Einbau des Lycopins in gemischte Mizellen sahen, stellten GARRETT *et al.* (2000) eine signifikante Zunahme der Resorptionsverfügbarkeit bei Erhöhung der Gallekonzentration von 2,4 mg/ml Testansatz auf 3,6 mg/ml nur für Lutein, nicht jedoch für α - und β -Carotin sowie Lycopin fest. In einer früheren Publikation fanden die Autoren jedoch für keines der genannten Carotinoide signifikante Unterschiede bei dieser Erhöhung der Gallekonzentration (GARRETT *et al.* 1999). Laut WRIGHT *et al.* (2008) hatte eine Zunahme der Gallekonzentration im Verdauungsansatz bis auf 10 mg/ml eine signifikante Verbesserung des β -Carotin-Transfers in Mizellen zur Folge. Zwischen 10 und 20 mg/ml fanden die Autoren keinen signifikanten Unterschied. Auch eine weitere Studie zeigte keinen Unterschied bei der Verdopplung der Gallensalzkonzentration (HEDREN *et al.* 2002). Die bereits hohe Ausgangskonzentration von 25 mg/ml war demnach ausreichend für die Mizellenbildung. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Gallekonzentration von 11 mg/ml Testansatz schien demzufolge optimal für ein *in-vitro*-Verdauungsmodell zu sein und repräsentierte die Bedingungen im Duodenum nach Nahrungsaufnahme.

Während der Großteil der *in-vitro*-Verdauungsmethoden die Verwendung eines komplexen Extraktes aus Schweinegalle vorsieht, setzten einzelne Arbeitsgruppen spezielle Gallensalze ein (siehe Tab. 38, Seite 146). Die Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden aus Spinat

erhöhte sich von 27 % bei Verwendung von Galleextrakt auf 49 % beim Einsatz einzelner Gallensalze wie Glycodeoxycholol, Taurodeoxycholol und Taurocholol (CHITCHUMROONCHOKCHAI *et al.* 2004). WHITE *et al.* (2009) fanden eine höhere Resorptionsverfügbarkeit für Vitamin E aus Sonnenblumenkernen bei Verwendung von Natriumdeoxycholol anstelle von Galleextrakt.

Neben den Gallensalzen spielt auch die Konzentration an **Pankreatin** eine Rolle. Diese beträgt nüchtern etwa 0,4 mg/ml und nach der Nahrungsaufnahme 2,4 mg/ml (WRIGHT *et al.* 2008). Bei einer Gallekonzentration von 5 mg/ml Verdauungsansatz (entspricht nüchtern) stellten die Autoren eine ähnliche Resorptionsverfügbarkeit für β -Carotin bei Pankreatinkonzentrationen zwischen 0 und 1,2 mg/ml fest. Eine deutliche Erhöhung ergab sich bei 2,4 und 4,8 mg/ml, wobei zwischen diesen beiden Konzentrationen kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Bei einer Gallekonzentration von 20 mg/ml (entspricht nicht nüchtern) war ein signifikanter Anstieg des Transfers von β -Carotin in gemischte Mizellen bei Erhöhung der Pankreatinkonzentration von 0,1 auf 0,2 mg/ml zu verzeichnen. Konzentrationen über 0,2 mg/ml zeigten keinen weiteren Effekt. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch GARRETT *et al.* (1999), die bei Pankreatinkonzentrationen zwischen 0 und 0,4 mg/ml eine Zunahme des Transfers von α - und β -Carotin in die Mizellenfraktion fanden, bei einer weiteren Erhöhung auf 0,6 mg/ml jedoch keinen signifikanten Unterschied ausmachen konnten. Auf die Resorptionsverfügbarkeit von Lutein hatten sämtliche getestete Konzentrationen keinen Einfluss. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration an Pankreatin nicht variiert. Sie lag bei etwa 2,5 mg/ml Testansatz, was einem nüchternen Zustand entspricht. Da der Einsatz der erhöhten Gallekonzentration in der verwendeten Verdauungsmethode eher einen Zustand nach Nahrungsaufnahme repräsentiert, wird für nachfolgende Untersuchungen ebenfalls eine Erhöhung der Pankreatinkonzentration vorgeschlagen. Dadurch könnte auch eine gesteigerte Lipolyse erreicht werden (siehe Abschnitt „Fettsäuren“ im Kapitel 5.7.1).

Tab. 38: Gegenüberstellung verschiedener *in-vitro*-Verdauungsmethoden

Quelle	MUND			MAGEN			DARM		
	Bestandteile	pH	Dauer	Bestandteile	pH	Dauer	Bestandteile	pH	Dauer
AURA <i>et al.</i> 1999	α -Amylase, PO ₄ -Puffer	6,9	5 min	Pepsin, HCl	2,5	2 h	Galleextrakt, Pankreatin, Mucin, NaHCO ₃	6,5-7,5	3 h
BENGTSSON <i>et al.</i> 2009	α -Amylase, Salze, PO ₄ -Puffer	6,7	15 min	Pepsin, HCl, Salze, Puffer	2,0/4,0	je 0,5 h	Galleextrakt, Pankreatin, NaHCO ₃	6,9	2 h
CHITCHUMROONCHOKCHAI <i>et al.</i> 2004 ^A	-	-	-	Pepsin, HCl	2,0	1 h	einzelne Gallensalze, Pankreatin, NaHCO ₃ , NaOH	7,5	2 h
FERNÁNDEZ-GARCÍA <i>et al.</i> 2007	-	-	-	-	-	-	Galleextrakt, Pankreaslipase, PO ₄ -Puffer, Salze	7,4	2,5h
FAILLA <i>et al.</i> 2008	α -Amylase, synthetischer Speichel	6,8	10 min	Pepsin, HCl	2,5	1 h	Galleextrakt, Pankreatin, Lipase, Carboxylesterlipase, NaHCO ₃	6,5	2 h
FERRUZZI <i>et al.</i> 2001 ^B	-	-	-	Pepsin, HCl	2,0	1 h	Galleextrakt, Pankreatin, Pankreaslipase, NaHCO ₃ , NaOH	7,0	2 h
GALLARDO-GUERRERO <i>et al.</i> 2008	-	-	-	Pepsin, HCl, Salze	2,0	1 h	Galleextrakt, Pankreatin, NaHCO ₃	neutral	2 h
GARRETT <i>et al.</i> 1999 ^C	-	-	-	Pepsin, HCl	2,0	1 h	Galleextrakt, Pankreatin, NaHCO ₃ , NaOH	7,5	2 h
GRANADO <i>et al.</i> 2006 ^D	α -Amylase, organische, anorganische Verbindungen	6,5	5 min	Pepsin, Mucin, BSA, organ. + anorgan. Stoffe	1,1	1 h	Galle, Pankreatin, Lipase, Colipase, Phospholipase A ₂ , Cholesterinesterase, Taurocholat	7,8	2 h
HEDREN <i>et al.</i> 2002 ^E	-	-	-	Pepsin, HCl, PO ₄ , Salze	2,0	1 h	Gallensalz, Pankreatin, NaHCO ₃ , NaOH, α -Toc.	7,5	0,5 h
HORNERO-MÉNDEZ und MINGUEZ-MOSQUERA 2007	-	-	-	Pepsin, HCl, Salze	2,0	1 h	Gallensalz, Pankreatin, NaHCO ₃	7,5	2 h
HUO <i>et al.</i> 2007	-	-	-	Pepsin, HCl, NaCl	3,0	1 h	Galleextrakt, Pankreatin, Pankreaslipase	7,5	2 h
LEBET <i>et al.</i> 1998	α -Amylase, Salze, PO ₄ -Puffer	6,9	15 min	Pepsin, HCl, NaCl	2,0	0,5 h	Pankreatin, NaOH, Phosphatpuffer	6,9	1,5 h
LIU <i>et al.</i> 2004	-	-	-	Pepsin, HCl, Salze, BHT	2,0	1 h	Galleextrakt, Pankreatin, NaHCO ₃	6,9	2 h
MANDALARI <i>et al.</i> 2008	-	-	-	Pepsin, Magenlipase, HCl	2,5	2 h	Gallensalze, α -Chymotrypsin, Trypsin, NaOH, Pankreaslipase, Colipase, Salze, Bis-Tris-Puffer	6,5	1 h
O'CONNELL <i>et al.</i> 2007 ^F	-	-	-	Pepsin, HCl, Salze	2,0	1 h	Gallensalze, Pankreatin, Cholesterinesterase	7,4	2,5 h
OOMEN <i>et al.</i> 2003	α -Amylase, Harnstoff, anorganische Verbindungen, Mucin	6,5	5 min	Pepsin, BSA, Mucin, organ. + anorgan. Stoffe	1,2	2 h	Galle, Pankreatin, Lipase, BSA, Harnstoff, anorganische Verbindungen	> 5,5	2 h
ORNELAS-PAZ <i>et al.</i> 2008	-	-	-	Pepsin, NaCl	3,0	1 h	Galleextrakt, Pankreatin	7,0	2 h
REBOUL <i>et al.</i> 2006b ^G	NaCl, Pyrogallol	k. A.	10 min	Pepsin, HCl	4,0	0,5 h	Galleextrakt, Pankreatin, Natriumcitrat, NaHCO ₃	6,0	0,5 h
SAURA-CALIXTO <i>et al.</i> 2000 ^H	-	-	-	Pepsin, HCl, KCl	1,5	1 h	Galleextrakt, Pankreatin, Lipase, α -Amylase, α -Amyloglucosidase, mehrere Puffer	6,9-7,5	6-16 h
TESORIERE <i>et al.</i> 2008	NaCl, Speichel	7,4	10 x kauen	Pepsin, HCl	2,0	2 h	Galleextrakt, Pankreatin, Enzymmischung, NaHCO ₃	7,5	2 h
THAKKAR <i>et al.</i> 2007 ^J	α -Amylase	6,5	10 min	Pepsin, Salze	2,5	1 h	Galle, Pankreatin, Pankreaslipase, Salze	6,5	2 h
VERSANTVOORT <i>et al.</i> 2005 ^K	α -Amylase, Harnstoff, anorganische Stoffe, Mucin	6,8	5 min	Pepsin, BSA, Mucin, organ. + anorgan. Stoffe	2-3	2 h	Galle, Pankreatin, Lipase, BSA, Harnstoff, anorganische Verbindungen	6,5-7,0	2 h
WRIGHT <i>et al.</i> 2008	-	-	-	-	-	-	Galleextrakt, Pankreatin, NaHCO ₃ , HCl, NaOH, NaCl, BHT	5,0-6,5 ^L	2 h

- ^A ähnliche Methode: CHITCHUMROONCHOKCHAI und FAILLA 2006; zusätzlich Cholesterinesterlipase
^B selbe Methode: FERRUZZI *et al.* 2006
^C selbe Methode: GARRETT *et al.* 2000, PULLAKHANDAM und FAILLA 2007
^D ähnlich: GRANADO-LORENCIO *et al.* 2007a, 2007b, HERRERO-BARBUDO *et al.* 2009
^E selbe Methode: MULOKOZI *et al.* 2004
^F selbe Methode: RYAN *et al.* 2008
^G selbe Methode: DHUIQUE-MAYER *et al.* 2007, REBOUL *et al.* 2005b
^H ähnliche Methode: PEREZ-JIMENEZ und SAURA-CALIXTO 2005, GONI *et al.* 2006, SERRANO *et al.* 2005
^J selbe Methode: THAKKAR und FAILLA 2008, FAILLA *et al.* 2009, THAKKAR *et al.* 2009; ähnlich: KEAN *et al.* 2008
^K selbe Methode: GOICOECHEA *et al.* 2008
^L pH 5,0 entspricht nüchtern; pH 6,5 entspricht nicht nüchtern
k. A. keine Angabe

5.7.3 Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Teigwaren

Eine Zusammenfassung der Untersuchungen zur Resorptionsverfügbarkeit von Vitamin E und Carotinoiden aus Teigwaren zeigt Abb. 60.

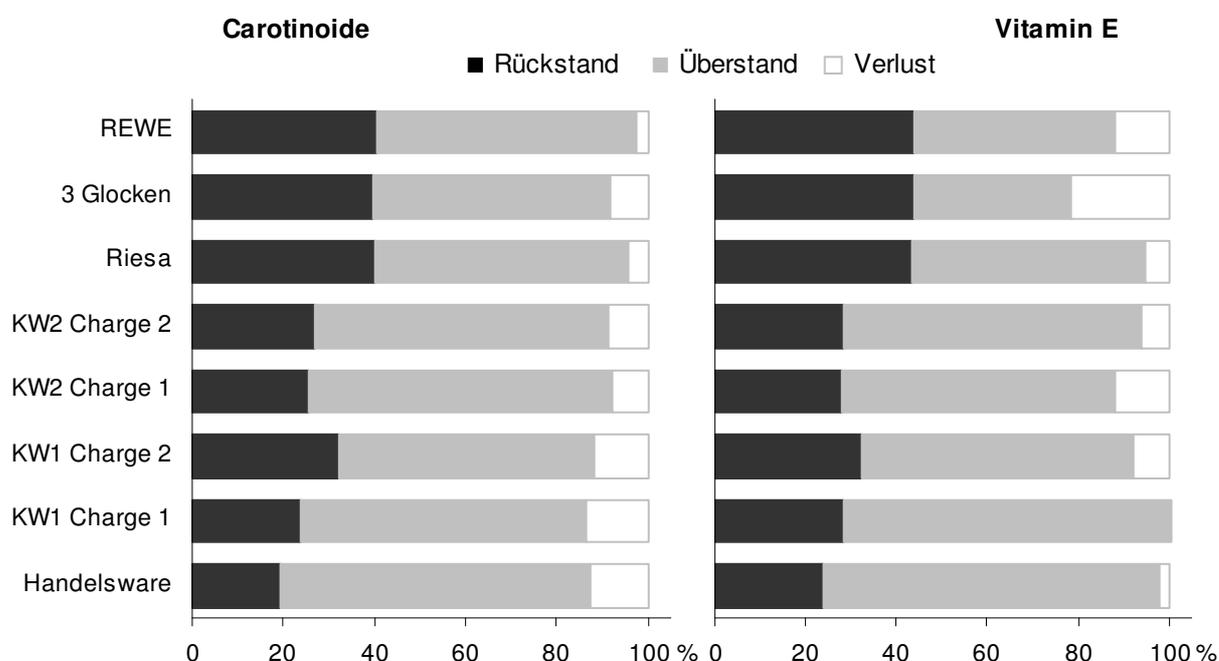


Abb. 60: Mittelwerte der relativen Gehalte an Gesamt-Carotinoiden (links) und Vitamin E (rechts) in Rückstand und Überstand von Teigwaren nach simulierter Verdauung

Mit einer durchschnittlichen Wiederfindung von 91 % bzw. 92 % wiesen sowohl die Carotinoide als auch Vitamin E eine recht hohe **Stabilität** während der *in-vitro*-Verdauung auf. Obwohl die Empfindlichkeit der Carotinoide gegenüber Säuren, Licht und Sauerstoff bekannt ist, stellten auch andere Autoren teilweise nur sehr geringe Verluste an Carotinoiden während der *in-vitro*-Verdauung fest (Tab. 39). In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen konnte keiner der Autoren eine signifikante Isomerisierung der Carotinoide während der simulierten Magenpassage beobachten. Vitamin E war mit einer Wiederfindung von über

75 % bzw. 77-90 % nach der simulierten Verdauung auch in anderen *in-vitro*-Studien stabil (GRANADO *et al.* 2006, GRANADO-LORENCIO *et al.* 2007a). Verluste könnten auf Abbau- und Oxidationsreaktionen beruhen. Des Weiteren konnte die Filtration des wässrigen Verdauungsüberstandes nicht eindeutig als Ursache für die Verluste ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt „Filtration“ im Kapitel 5.7.1, Seite 139). Eine weitere Ursache könnte methodischer Natur sein. Während in den Mizellenfraktionen teilweise einzelne Verbindungen unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen, konnten diese in den unverdauten Teigwaren quantifiziert werden, was zu scheinbaren Verlusten in den Gesamtgehalten an Carotinoiden und Vitamin E geführt haben könnte.

Tab. 39: Publierte Wiederfindungsraten für Carotinoide nach *in-vitro*-Verdauung

Quelle	Wiederfindung
eigene Daten	> 83 %
CHITCHUMROONCHOKCHAI <i>et al.</i> 2004, HUO <i>et al.</i> 2007, THAKKAR <i>et al.</i> 2007	> 70 %
GRANADO <i>et al.</i> 2006, GRANADO-LORENCIO <i>et al.</i> 2009b	> 75 %
PULLAKHANDAM und FAILLA 2007, THAKKAR und FAILLA 2008, GRANADO-LORENCIO <i>et al.</i> 2009b	> 80 %
GRANADO-LORENCIO <i>et al.</i> 2007a	> 85 %
GARRETT <i>et al.</i> 1999	> 95 %

Zwischen der Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide und der von Vitamin E aus Teigwaren bestand ein starker linearer Zusammenhang ($r = 0,908$, $p < 0,01$). Die Versuche zur *in-vitro*-Verdauung ergaben relativ hohe Resorptionsverfügbarkeiten aus Teigwaren ohne Ei sowohl für Carotinoide ($71,2 \pm 5,2$ %) als auch für Vitamin E ($70,0 \pm 4,2$ %). Die schlechtere Verfügbarkeit der untersuchten Inhaltsstoffe aus Eierteigwaren ($57,3 \pm 1,0$ % der Carotinoide und $49,4 \pm 5,1$ % des Vitamin E) war nicht zu erwarten gewesen, da CHUNG *et al.* (2004) im Rahmen einer Interventionsstudie eine signifikant höhere Bioverfügbarkeit von Lutein aus Eigelb als aus Spinat oder Supplementen feststellten. Im Ei sind die Carotinoide in der gut zugänglichen Fettmatrix zusammen mit Cholesterin und Phospholipiden lokalisiert. In den Teigwaren könnte ein Einschluss der Inhaltsstoffe in das Netzwerk aus Stärke und Proteinen vermutet werden. Außerdem enthielten die Eierteigwaren mit Canthaxanthin und γ -Tocopherol zwei weitere lipophile Verbindungen, die in die Mizellenfraktion überführt werden mussten. Lipophile Substanzen konkurrieren um den Transfer in gemischte Mizellen und somit um die Resorption in Enterozyten. Ei-Phospholipide wie Phosphatidylcholin können die Aufnahme von Carotinoiden in Caco-2-Zellen hemmen. Das Hydrolyseprodukt Lyso-phosphatidylcholin konnte hingegen die Resorption erhöhen. Die Phospholipide hatten jedoch keinen Einfluss auf die Mizellenbildung (YONEKURA und NAGAO 2007) und spielen daher als potentielle Ursache für die geringere Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Eierteigwaren vermutlich keine entscheidende Rolle. Eine Ursache wäre

jedoch möglicherweise im Cholesteringehalt von Eiern zu sehen, da ein kompetitiver Einschluss von Cholesterin, Carotinoiden und Tocochromanolen in gemischte Mizellen vermutet werden kann.

Die allgemein angenommene höhere Bioverfügbarkeit von Vitamin E im Vergleich zu Carotinoiden (HALLIWELL *et al.* 2000) konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Allerdings handelte es sich bei den Carotinoiden in Teigwaren ausschließlich um **Xanthophylle**, welche in anderen *in-vitro*-Studien eine bessere Resorptionsverfügbarkeit als Tocopherole (GRANADO-LORENCIO *et al.* 2007a) und Carotine (DHUIQUE-MAYER *et al.* 2007, GRANADO-LORENCIO *et al.* 2007a, RYAN *et al.* 2008) zeigten (siehe auch Tab.). Diese kann durch ihre unterschiedliche Lokalisation in Pflanzenzellen (Chloroplasten, Chromoplasten), ihre unterschiedliche Polarität und den daraus resultierenden Transfer zwischen Fetttröpfchen und Mizellen erklärt werden (GARRETT *et al.* 2000). Während die polareren Carotine im Kern der Fetttröpfchen eingeschlossen sind, befinden sich Verbindungen mit Hydroxylgruppen wie Xanthophylle und Tocochromanole näher an der Oberfläche, was einen Austausch zwischen Fettphase und Mizellen erleichtert. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, können Xanthophylle zum Teil spontan in die Mizellenfraktion übertreten, während Carotine auf die Triglyceridhydrolyse mittels Pankreaslipase angewiesen sind (BOREL *et al.* 1996). Humanstudien zufolge waren Xanthophylle ebenfalls besser bioverfügbar als Carotine (CASTENMILLER *et al.* 1999, GARRETT *et al.* 2000, GONI *et al.* 2006). Die einzelnen Xanthophylle unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant in ihrer Resorptionsverfügbarkeit. Auch CHITCHUMROONCHOKCHAI *et al.* (2004) fanden keinen Unterschied zwischen Lutein und Zeaxanthin, jedoch zwischen Lutein-Isomeren. Demnach war (*13Z*)-Lutein schlechter verfügbar als (*all-E*)-Lutein. Andere Autoren konnten hingegen für β -Carotin eine höhere Resorptionsverfügbarkeit der (*Z*)-Isomere zeigen (TYSSANDIER *et al.* 2003, FERRUZZI *et al.* 2006, GRANADO-LORENCIO *et al.* 2007a, 2009, BENGTSOON *et al.* 2009). Da (*Z*)-Isomere in einer wässrigen Umgebung weniger zur Kristallisation und Aggregation neigen, werden sie besser in Mizellen gelöst, absorbiert und transportiert als (*all-E*)-Isomere (BRITTON 1995a). Den eigenen Ergebnissen zufolge gab es keinen signifikanten Unterschied in der Resorptionsverfügbarkeit von (*all-E*)- und (*Z*)-Lutein-Isomeren. Ein Vergleich mit publizierten Werten zur Resorptionsverfügbarkeit von Lutein aus anderen Lebensmitteln wurde in Tab. 40 vorgenommen. Für Teigwaren fanden sich in der Literatur keine Vergleichswerte.

Tab. 40: Vergleich der Resorptionsverfügbarkeit (RV) von Lutein aus verschiedenen Lebensmitteln

Quelle	RV [%]	untersuchte Lebensmittel
eigene Daten	57 / 71	Teigwaren mit Ei / ohne Ei
CHITCHUMROONCHOKCHAI <i>et al.</i> 2004	53	Spinat
GARRETT <i>et al.</i> 2000	29	Gemüsemischung
GONI <i>et al.</i> 2006	33 / 83	Obst / Gemüse
GRANADO <i>et al.</i> 2006	6-15	Broccoli
GRANADO-LORENCIO <i>et al.</i> 2007b	5-88	Broccoli, Spinat ^a , Mais, Paprika, Orange, Kiwi etc.
GRANADO-LORENCIO <i>et al.</i> 2009b	26	Fruchtsaft
HUO <i>et al.</i> 2007 *	46	Gemüsemischung
KEAN <i>et al.</i> 2008 *	62-80	Maisbrot
O'CONNELL <i>et al.</i> 2007	19-100	Orange, Kiwi, Spinat ^b , Broccoli, Paprika, Kartoffel etc.
PULLAKHANDAM und FAILLA 2007 *	30	Früchte des Meerrettichbaumes
REBOUL <i>et al.</i> 2006b	38-59	Karotte, Erbse, Spinat ^c , Tomate, Wassermelone
THAKKAR und FAILLA 2008 *	30	Maisbrei (Porridge)

* Untersuchungen ergaben eine höhere Resorptionsverfügbarkeit für Xanthophylle als für Carotine.

^a RV = 5 %

^b RV = 19 %

^c RV = 48 %

Zur Resorptionsverfügbarkeit von **Tocopherolen** gab es im Vergleich zu den Carotinoiden nur sehr wenige Publikationen, während für **Tocotrienole** gar keine *in-vitro*-Studien zu finden waren. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lieferten demzufolge erste Erkenntnisse zur Resorptionsverfügbarkeit von Tocotrienolen im Vergleich zu Tocopherolen. Während bei den Tocopherolen das α -Isomer tendenziell besser verfügbar war als das β -Isomer, zeigte sich bei den Tocotrienolen ein umgekehrtes Verhältnis. Generell gab es zwischen den einzelnen Vitameren kaum signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Resorptionsverfügbarkeit. REBOUL *et al.* (2006b) fanden jedoch für α - und γ -Tocopherol bei verschiedenen Lebensmitteln zum Teil sehr unterschiedliche Resorptionsverfügbarkeiten, die jedoch kein einheitliches Bild ergaben. Die Werte schwankten zwischen 0,5 % für α -Tocopherol und 6,5 % für γ -Tocopherol aus Äpfeln und 101,3 % für α -Tocopherol und 27,1 % für γ -Tocopherol aus Salat. Aus Weizenbrot war Vitamin E ebenfalls sehr gut verfügbar (α -T 98,8 %, γ -T 8,4 %). Im Gegensatz dazu fanden GRANADO *et al.* (2006) und GRANADO-LORENCIO *et al.* (2007a) keine unterschiedliche Resorptionsverfügbarkeit für α - und γ -Tocopherol aus Broccoli und sahen darin eine Übereinstimmung mit Humanstudien. Eine hohe Resorptionsverfügbarkeit von 84 % wurde für α -Tocopherol aus Fruchtsaft gefunden (GRANADO-LORENCIO *et al.* 2009b). Untersuchungen von MANDALARI *et al.* (2008) zufolge standen 45 % des Vitamins E aus gemahlenden Mandeln für die Resorption zur Verfügung.

Die **Vergleichbarkeit verschiedener *in-vitro*-Studien** muss jedoch kritisch betrachtet werden, da die verwendeten Verdauungsmethoden in einzelnen Punkten zum Teil stark differierten (Tab. 38, Seite 146). Ein weiterer Unterschied bestand auch in der Berechnung der

Resorptionsverfügbarkeit. Während häufig der Gehalt der entsprechenden Inhaltsstoffe in der Ausgangsprobe als Referenz herangezogen wurde, ist in der vorliegenden Arbeit die Wiederfindung der Inhaltsstoffe im Verdauungsansatz in die Berechnung eingegangen. Die Gehalte in der Mizellenfraktion wurden demzufolge auf die tatsächliche Menge im Testansatz und nicht auf die Ausgangsmenge in der unverdauten Probe bezogen. Diese Berechnungsmethode wurde ebenfalls von anderen Autoren verwendet (GALLARDO-GUERRERO *et al.* 2008, GANDUL-ROJAS *et al.* 2009). Aus einigen Publikationen ging jedoch die genaue Berechnung der Resorptionsverfügbarkeit gar nicht hervor, was einen Vergleich mit den eigenen Ergebnissen erschwerte.

Während Lebensmittel früher vorwiegend nach ihren **Gehalten** an Vitaminen und sekundären Pflanzenstoffen beurteilt wurden, rückt nun die **Bioverfügbarkeit** der Inhaltsstoffe zunehmend in den Blickpunkt. Obwohl grüne Blattgemüse häufig als Hauptlieferanten für Lutein angegeben werden, erscheinen die hohen Gehalte unter Berücksichtigung der Bioverfügbarkeit in einem anderen Licht. Mehrere Studien ergaben eine geringere Resorptionsverfügbarkeit *in vitro* für Carotinoide aus grünem Gemüse im Vergleich zu nicht grünem Gemüse oder Obst (GRANADO-LORENCIO *et al.* 2007a, 2007b, O'CONNELL *et al.* 2007). So betrug die Resorptionsverfügbarkeit für Spinat, der häufig als gute Luteinquelle angegeben wird, nur zwischen 5 % und 53 %. Aus Teigwaren schien Lutein deutlich besser verfügbar zu sein. Eine entscheidende Rolle spielen jedoch die **Verzehrmengen** bzw. -häufigkeiten. Spinat besitzt etwa die 20-30-fache Menge an Lutein wie Teigwaren. Berücksichtigt man jedoch die Resorptionsverfügbarkeit und einen Pro-Kopf-Verbrauch von etwa 7 kg Nudeln und nur 0,8 kg Spinat jährlich, so erscheinen die Teigwaren als ähnlich gute Luteinquelle wie der Spinat.

Abschließend muss auch erwähnt werden, dass nicht absorbierte Antioxidantien wie Carotinoide und Vitamin E ihre Wirkungen im Verdauungstrakt entfalten können und demzufolge zur Prävention von Magen- und Darmkrebs beitragen könnten (HALLIWELL *et al.* 2000).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das erste überlieferte Nudelrezept sowie der älteste Fund von spaghettiähnlichen Teigwaren stammen aus dem heutigen China und sind etwa 4.000 Jahre alt. Diese Nudeln unterschieden sich von den heutigen Teigwaren durch die Verwendung von Hirse statt Hartweizen. Die moderne Teigwarenherstellung bedient sich kontinuierlich arbeitender Produktionslinien zum Kneten, Pressen und Ausformen des Teiges sowie zum Trocknen der Teigwaren. Während der Einfluss der Teigwarenherstellung auf die Hauptinhaltsstoffe (Stärke, Proteine) hinreichend bekannt ist, fehlten bisher umfangreiche Untersuchungen zu lipophilen Inhaltsstoffen wie den Carotinoiden und Vitamin E. Einige ältere Studien zum Verlust von Gelbpigmenten dienten eher zur Beurteilung der Teigwarenfarbe als zu deren ernährungsphysiologischer Bewertung. Bis heute ist die vollständige Aufklärung der Zusammensetzung des Gelbpigmentgehaltes von Hartweizen nicht gelungen. Carotinoide machten nach derzeitigem Kenntnisstand nur etwa die Hälfte des Gelbpigmentgehaltes aus. Neben der Teigwarenherstellung beeinflusst auch der Kochvorgang die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E im verzehrfertigen Produkt. Inwieweit die lipophilen Substanzen ihre krankheitspräventiven Wirkungen im Organismus entfalten können, hängt maßgeblich von deren Bioverfügbarkeit ab.

Die vorliegende Arbeit hatte daher folgende Zielstellungen:

1. Im Rahmen der Untersuchung der Extrahierbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Hartweizen und Teigwaren sollte eine Methode zur quantitativen Extraktion der Substanzen aus Hartweizen und Teigwaren gefunden werden. Darüber hinaus sollte die HPLC-Analytik den untersuchten Substanzen und Probenmatrices angepasst werden.
2. Die Analyse diverser Proben von zwei verschiedenen industriellen Produktionslinien sollte Aufschluss über den Einfluss der Teigwarenherstellung auf die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E geben. Des Weiteren sollten die Veränderungen während des Kochens der Teigwaren untersucht werden.
3. Die Anwendung einer *in-vitro*-Verdauung zur Freisetzung von Carotinoiden und Vitamin E aus gekochten Teigwaren sowie zum anschließenden Transfer der lipophilen Verbindungen in gemischte Mizellen sollte Hinweise auf ihre Bioverfügbarkeit liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine unvollständige **Extraktion von Carotinoiden und Vitamin E** aus Hartweizen und Teigwaren bei ausschließlicher Verwendung organischer Lösungsmittel festgestellt. Eine quantitative Extraktion wurde erst durch ein vorheriges Quellen der Proben mit Wasser erreicht. Für die Optimierung der Extraktion von Carotinoiden wurde die photometrische Bestimmung der Gelbpigmente nach der ICC-Standardmethode Nr. 152 als Referenzmethode verwendet. Die Extraktion von Hartweizen mit einem

Gemisch aus Methanol (MeOH) und Tetrahydrofuran (THF) (1/1, v/v, + 0,1 % BHT) ergab einen Anteil der Carotinoide von etwa 37-55 % am Gelbpigmentgehalt. Durch die Quellung der Proben mit Wasser vor der Extraktion mit dem Lösungsmittelgemisch konnte dieser Anteil bei Vollkorn-Hartweizen auf 90-97 % und bei Hartweizengrieß auf 100-104 % gesteigert werden. Demzufolge wurde eine Beteiligung anderer Substanzklassen neben den Carotinoiden am Gelbpigmentgehalt von Hartweizen ausgeschlossen. Die Quellung mit Wasser vor der Extraktion hatte bei Vollkorn-Hartweizen einen geringen, bei rohen Teigwaren hingegen einen deutlich positiven Effekt auf die Vitamin-E-Gehalte in den Extrakten. Gekochte Teigwaren konnten sowohl für die Carotinoid-, als auch für die Vitamin-E-Analytik direkt mit dem Lösungsmittelgemisch extrahiert werden. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse sollten publizierte Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E in Hartweizen und Teigwaren kritisch betrachtet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Carotinoidgehalte lagen zum Teil deutlich über publizierten Werten. Die Anwendung der optimierten Extraktionsmethode auf weitere Weizenarten und andere Getreide ergab bezüglich der Extrahierbarkeit der Carotinoide ein differenziertes Bild. Während die Quellung der Proben mit Wasser die Carotinoidgehalte in den MeOH/THF-Extrakten von Emmer und Mais etwa verdoppelte, hatte die Quellung bei Weichweizen, Einkorn, Dinkel, Roggen und Hafer keinen nennenswerten Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Als Ursachen für die differenzierte Extrahierbarkeit wurde eine unterschiedliche Lokalisation der lipophilen Substanzen im Getreidekorn diskutiert. Ein Einschluss von Carotinoiden und Vitamin E in bestimmte zelluläre Strukturen des Weizenkorns (z. B. Stärkekörner) könnte deren Extrahierbarkeit ebenso erschweren wie ein rein mechanischer Einschluss der Verbindungen in das kompakte Netzwerk aus Proteinen und Stärke bei getrockneten Teigwaren. Ein mechanischer Einschluss in die Proteinmatrix erklärt auch die unterschiedliche Extrahierbarkeit der Carotinoide aus Hart- und Weichweizen, da sich beide Weizenarten deutlich in Kornstruktur und Festigkeit der Protein-Stärke-Matrix unterscheiden.

Die Vitamin-E-Analyse der Extrakte erfolgte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die Trennung der Tocochromanole an einer Diol-Säule wurde innerhalb von 45 min unter Verwendung eines Gemisches aus n-Hexan und Methyl-*tert*-Butylether (MtBE) als Fließmittel durch eine isokratische Elution erreicht. Die Zusammensetzung dieser mobilen Phase wurde im Hinblick auf eine Reduzierung der Säulentemperatur auf 35 °C modifiziert. Die Trennung von γ -Tocopherol und β -Tocotrienol erwies sich dabei als schwierig, konnte aber für eine Quantifizierung der Analyten in ausreichendem Maß gewährleistet werden. Mit einem Anteil von mindestens 60 % war β -Tocotrienol das Hauptvitamer in sämtlichen untersuchten Proben. Daneben wurden in Vollkorn-Hartweizen, Grieß und Teigwaren ohne Ei auch α -Tocotrienol sowie α - und β -Tocopherol detektiert. Eierteigwaren enthielten bedingt durch die Vitamin-E-Gehalte in Hühnereiern zusätzlich γ -Tocopherol.

Für die Bestimmung der Carotinoidgehalte in den Extrakten wurde eine publizierte HPLC-Methode modifiziert und optimiert. Eine Trennung zahlreicher Xanthophylle sowie verschiedener Stereoisomere des Luteins und Zeaxanthins wurde an einer C₃₀-Säule innerhalb von 45 min mit Hilfe einer isokratischen Elution mit einem Methanol-Wasser-Gemisch erreicht. Diese Methode wurde zur Analyse von Hartweizen und Teigwaren genutzt. Für die Bestimmung des Carotinoidgehaltes in Eierteigwaren wurde sie auf 75 min verlängert, was die Detektion weiterer Carotinoide, die zur Supplementierung von Hühnerfutter zugelassen sind, ermöglichte. Zur Analyse anderer Getreidearten war zusätzlich eine Erfassung von (*all-E*)- β -Cryptoxanthin, (*all-E*)- α -Carotin sowie verschiedener Stereoisomere des β -Carotins notwendig. Dies wurde mit Hilfe einer HPLC-Gradientenmethode mit einem Methanol-Wasser-Gemisch und MtBE als Fließmittel innerhalb von 65 min erreicht. Der Carotinoidgehalt von Vollkorn-Hartweizen und Grieß bestand zu über 90 % aus (*all-E*)- und (*Z*)-Lutein, wobei die (*Z*)-Isomere knapp 10 % des gesamten Luteingehaltes ausmachten. Darüber hinaus wurden geringe Mengen (*all-E*)-Zeaxanthin und (*Z*)-Zeaxanthin sowie bei Eierteigwaren zusätzlich (*all-E*)-Canthaxanthin und (*all-E*)- β -apo-8'-Carotinsäureethylester bestimmt. Dass es sich bei den Minoranteilen im Hartweizen tatsächlich um (*Z*)-Isomere der beiden Xanthophylle handelte, wurde durch massenspektroskopische Messungen gezeigt. Nach dem Vergleich mit chemisch und thermisch isomerisierten Referenzsubstanzen sowie mit publizierten HPLC-Trennungen von Lutein- und Zeaxanthin-Stereoisomeren an C₃₀-Säulen und der Auswertung der UV-Spektren lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den unbekanntesten Verbindungen um (*13Z*)-Lutein oder (*13'Z*)-Lutein (oder eine Coelution beider Isomere) sowie um (*9Z*)-Lutein, (*9'Z*)-Lutein und (*13Z*)-Zeaxanthin handelte. Eine exakte Identifizierung wurde jedoch mit den angewandten Methoden nicht erreicht.

Um den Einfluss der Prozessparameter zur **Teigwarenherstellung** auf die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E zu beurteilen, wurden die Rohstoffe (Grieße) und Endprodukte (Teigwaren) sowie diverse Zwischenprodukte von zwei verschiedenen industriellen Produktionslinien (PL) untersucht. Diese unterschieden sich sowohl im Mischvorgang und in der Pressung des Teiges als auch in den Trocknungsparametern. Als Prozessschritt mit den höchsten Verlusten an Carotinoiden und Vitamin E wurde die Teigbildung identifiziert. Die Trocknung verursachte geringere Verluste der untersuchten Inhaltsstoffe. Die reduzierten Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E wurden sowohl auf eine enzymatische Oxidation der Inhaltsstoffe nach der Zugabe von Wasser zum Grieß als auch auf die Sensitivität der lipophilen Verbindungen gegenüber den hohen Trocknungstemperaturen zurückgeführt. Die PL 2 war eine konventionelle Produktionslinie mit einer etwa 20-minütigen Teigbildung und einer knapp 4,5-stündigen Trocknung bei Temperaturen zwischen 60 °C und 70 °C. Bei der PL 1 erfolgte die Mischung der Komponenten und die Pressung des Teiges innerhalb weniger Sekunden mit Hilfe einer Polymatik[®]-Presse unter einem höheren Energieeintrag als bei

der PL 2. Die Trocknung der Teigwaren bei etwa 90 °C dauerte nur etwa 3 Stunden. Die PL 2 verursachte höhere Verluste an Carotinoiden ($23 \pm 8 \%$) und Vitamin E ($30 \pm 4 \%$) als die PL 1 (Carotinoide $20 \pm 2 \%$, Vitamin E $12 \pm 6 \%$). Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass eine moderne Presstechnologie in Verbindung mit einer Ultra-Hochtemperatur-Trocknung Verluste an Carotinoiden und Vitamin E minimieren kann. Die Prozessparameter der PL 1 führten tendenziell zu einer stärkeren Isomerisierung des (*all-E*)-Luteins als die der PL 2. Das Kochen der Teigwaren verursachte eine weitere Verschiebung der (*E*)/(*Z*)-Verhältnisse zugunsten der (*Z*)-Lutein-Isomere. Die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E blieben unter Berücksichtigung der Gewichtsänderung der Teigwaren während des Kochvorgangs weitestgehend unverändert.

Zur Beurteilung der Freisetzung von Carotinoiden und Vitamin E im Verdauungstrakt und des anschließenden Transfers der lipophilen Verbindungen in gemischte Mizellen als Teilaspekt der **Bioverfügbarkeit** wurde ein *in-vitro*-Verdauungsmodell verwendet. Die simulierte Verdauung gekochter Teigwaren mit Hilfe von α -Amylase, Pepsin und Pankreatin resultierte in signifikanten Zunahmen der Gehalte an freien Aminosäuren sowie Mono- und Disacchariden. Die dünnschichtchromatographische Trennung von Fettextrakten zeigte jedoch eine unzureichende Lipolyse unter Verwendung der *in-vitro*-Verdauungsmethode. Die Resorptionsverfügbarkeit („*bioaccessibility*“) wurde definiert als der Anteil der lipophilen Verbindungen, der aus der Lebensmittelmatrix mit Hilfe von Gallensalzen in gemischte Mizellen überführt wurde und theoretisch zur Resorption zur Verfügung stand. Die Resorptionsverfügbarkeit der Carotinoide aus eifreien Teigwaren betrug im Mittel $71 \pm 5 \%$, die des Vitamins E $70 \pm 4 \%$. Die untersuchten Substanzen waren aus Eierteigwaren schlechter verfügbar als aus Teigwaren ohne Eizusatz (Carotinoide $57 \pm 1 \%$, Vitamin E $49 \pm 5 \%$). Zwischen dem (*all-E*)-Lutein und den (*Z*)-Isomeren gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit. Die Betrachtung einzelner Tocopherole und Tocotrienole ergab kein einheitliches Bild. Die vorliegende Arbeit lieferte erstmalig Daten zur Resorptionsverfügbarkeit von Carotinoiden und Vitamin E aus Teigwaren und konnte somit zu deren ernährungsphysiologischer Bewertung beitragen. Teigwaren besitzen im Vergleich zu anderen pflanzlichen Lebensmitteln wie Obst und Gemüse bzw. zu Pflanzenölen und Nüssen zwar relativ geringe Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E. Aufgrund der hohen Resorptionsverfügbarkeit sowie hohen Verzehrsmengen und -häufigkeiten sind auch Teigwaren wertvolle Lieferanten für Carotinoide (Lutein, Zeaxanthin) und Vitamin E (v. a. Tocotrienole). Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse ist der stetig steigende Teigwarenverzehr in Deutschland zu begrüßen. Dabei sind weder Teigwaren ohne noch solche mit Eizusatz zu bevorzugen, da Eierteigwaren sich zwar durch höhere Gehalte der untersuchten Inhaltsstoffe auszeichneten, diese aber schlechter verfügbar waren als aus reinen Hartweizen-Teigwaren.

7 SUMMARY

Cereal products are an important part of the human diet since thousands of years. Durum wheat (*Triticum durum*) is primarily used for pasta production. The protective effects of whole grain cereals against chronic diseases like cancer and cardiovascular diseases are partly attributed to their contents of carotenoids and vitamin E. Besides the amounts in the grain, changes during the processing of durum semolina and the cooking of pasta as well as the bioavailability of the lipophilic phytochemicals are of great importance for the nutritional evaluation of durum wheat and pasta. High-performance liquid chromatography has become the method of choice for the determination of carotenoids and vitamin E. A crucial step prior to the chromatographic separation is the quantitative extraction from the food matrix. It was ascertained that carotenoids and vitamin E are not completely extractable from whole durum wheat, semolina and raw pasta using common solvent extraction methods. Therefore, the aims of the present investigations were the optimisation of extraction methods and liquid chromatographic separation procedures for carotenoids and vitamin E, the determination of changes during the manufacturing and cooking of pasta as well as the estimation of the bioavailability of these lipophilic substances on the basis of their bioaccessibility in an *in vitro* digestion model.

It was shown that soaking of whole durum wheat, semolina and raw pasta in water for 5-30 min prior to extraction with organic solvents had the strongest impact on the extraction yields of carotenoids and vitamin E and resulted in the most rapid and gentle extraction method. Contents of carotenoids in the extracts of several durum wheat and emmer (*T. dicoccum*) varieties as well as corn (*Zea mays*) products were approximately doubled by soaking in water before extracting with methanol/tetrahydrofuran (1/1, v/v, + 0,1% BHT). Soaking of water and subsequent solvent extraction resulted in slightly, but significantly higher contents of vitamin E in the extract of durum semolina. The impact of water on the extractability of carotenoids and vitamin E from raw pasta was even stronger. In contrast, cooked pasta was directly extractable with the solvent mixture. Additionally, carotenoids from whole flours of soft wheat (*T. aestivum*), einkorn (*T. monococcum*), spelt (*T. spelta*), oat (*Avena sativa*) and rye (*Secale cereale*) were quantitatively extractable without previous soaking in water. These oppositional results were explained by the difference in texture of different cereal grains. Since the texture, e.g. the kernel hardness, is genetically defined, the need of soaking with water prior to solvent extraction is predictable for different cereal species. The mechanical inclusion of the lipophilic substances into the continuous protein matrix of durum endosperm as well as into the compact network of proteins with embedded starch granules in durum pasta is presumably one of the reasons for the impeded extractability of carotenoids and vitamin E.

The complete extraction of carotenoids from whole durum wheat and semolina by using the optimised extraction procedure was evidenced by the comparison to the yellow pigment content, which was determined according to the ICC standard method 152. For several semolina samples, there was no significant difference between the two parameters. For whole wheat, the photometrically determined yellow pigment content was slightly higher than the contents of carotenoids which was attributed to interfering pigments in the seed coat. As a result, it was ascertained that the yellow pigment content of durum wheat consists mainly of (*all-E*)-lutein and small quantities of (*all-E*)-zeaxanthin as well as of some (*Z*)-isomers of these xanthophylls. These findings challenge the contribution of compounds other than carotenoids to the yellow pigment content of durum wheat. Additionally, it was suggested that the amounts of carotenoids in durum wheat and products thereof may be underestimated in the literature.

The processing of pasta from durum semolina resulted in significant losses of carotenoids and vitamin E which was ascribed to oxidation of the substances by lipoxygenase as well as to their heat sensitivity. A modern production line equipped with a polymatic[®]-press and with very high temperature drying (PL 1) caused lower losses than a production line with conventional mixing and pressing of the dough and with high temperature drying (PL 2). For the PL 1 the estimated losses of carotenoids and vitamin E were in the range of 20% and 12%, respectively, and for the PL 2 approximately 23% and 30%, respectively. In contrast, the processing parameters of PL 1 provoked a slightly higher isomerisation of (*all-E*)-lutein in comparison to the PL 2. The losses of carotenoids and vitamin E seemed to be greater during mixing of semolina with water than during the drying of pasta. The cooking process caused further isomerisation of (*all-E*)-lutein. Taking cooking losses into account, i.e. the leaching of soluble solids into the cooking water, the amounts of both carotenoids and vitamin E remained almost unchanged.

A partial aspect of the bioavailability of lipophilic nutrients is their release from the food matrix by digestive enzymes and the subsequent incorporation into bile salt micelles, which is defined as their bioaccessibility. In comparison to the literature data for some vegetables and fruits the bioaccessibility of carotenoids from pasta, which was determined by using an *in vitro* digestion model, was relatively high ($71 \pm 5\%$). The bioaccessibility of vitamin E from pasta was in the same range ($70 \pm 4\%$). The bioaccessibility from pasta containing 10% eggs was lower and averaged $57 \pm 1\%$ for carotenoids and $49 \pm 5\%$ for vitamin E. The estimated values were highly dependent on the amount of bile salts present in the digestive medium and to a lesser extent on the simulated gastric pH and the duration of the incubation with digestive enzymes.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- AACC (1961) AACC method 14-50. In: *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, MN, USA,
- AALAMI M, RAO UJSP, LEELAVATHI K (2007) Physicochemical and biochemical characteristics of Indian durum wheat varieties: Relationship to semolina milling and spaghetti making quality. *Food Chem* 102, 993-1005.
- ABDEL-AAL E-SM, AKHTAR MH (2006) Recent advances in the analyses of carotenoids and their role in human health. *Curr Pharm Anal* 2, 195-204.
- ABDEL-AAL E-SM, HUCL P (2002) Amino acid composition and in vitro protein digestibility of selected ancient wheats and their end products. *J Food Compost Anal* 15, 737-747.
- ABDEL-AAL E-SM, YOUNG JC, RABALSKI I, HUCL P, FREGEAU-REID J (2007) Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *J Agric Food Chem* 55, 787-794.
- ABIDI SL (2000) Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J Chromatogr A* 881, 197-216.
- ABIDI SL, MOUNTS TL (1996) Normal phase high-performance liquid chromatography of tocopherols on polar phases. *J Liq Chromatogr R T* 19, 509 - 520.
- ACQUISTUCCI R (2000) Influence of Maillard reaction on protein modification and colour development in pasta. Comparison of different drying conditions. *LWT - Food Sci Technol* 33, 48-52.
- ADOLF T, SCHNEIDER R, EBERHARDT W, HARTMANN S, HERWIG A, HESEKER H, HÜNCHEN K, KÜBLER W, MATIASKE B, MOCH KJ, ROSENBAUER J (1995) Ergebnisse der Nationalen Verzehrsstudie (1985-1988) über die Lebensmittel- und Nährstoffaufnahme in der Bundesrepublik Deutschland. In: Kübler W, Anders HJ, Heeschen W and Kohlmeier M (Hrsg.) *VERA-Schriftenreihe Band XI*. Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck, Niederkleen.
- ADOM KK, SORRELLS ME, LIU RH (2005) Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *J Agric Food Chem* 53, 2297-2306.
- AKTAN B, KHAN K (1992) Effect of high-temperature drying of pasta on quality parameters and on solubility, gel electrophoresis, and reversed-phase high-performance liquid chromatography of protein components. *Cereal Chem* 69, 288-295.
- ALVES-RODRIGUES A, SHAO A (2004) The science behind lutein. *Toxicol Lett* 150, 57-83.
- AMAN R, BIEHL J, CARLE R, CONRAD J, BEIFUSS U, SCHIEBER A (2005a) Application of HPLC coupled with DAD, APCI-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chem* 92, 753-763.
- AMAN R, SCHIEBER A, CARLE R (2005b) Effects of heating and illumination on *trans-cis* isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *J Agric Food Chem* 53, 9512-9518.
- ANJUM FM, WALKER CE (1991) Review on the significance of starch and protein to wheat kernel hardness. *J Sci Food Agric* 56, 1-13.

- ARMANINO C, DE ACUTIS R, ROSA FESTA M (2002) Wheat lipids to discriminate species, varieties, geographical origins and crop years. *Anal Chim Acta* 454, 315-326.
- ATIENZA SG, BALLESTEROS J, MARTIN A, HORNERO-MENDEZ D (2007) Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among tritordeum (*Tritordeum Ascherson et Graebner*) and durum wheat accessions. *J Agric Food Chem* 55, 4244-4251.
- AUFHAMMER W (2003a) Alte Weizenarten. In: *Rohstoff Getreide*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 24-26.
- AUFHAMMER W (2003b) Artenspezifische Korninhaltsstoffe. In: *Rohstoff Getreide*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 45-60.
- AUFHAMMER W (2003c) Korneigenschaften alter Weizenarten. In: *Rohstoff Getreide*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 61-63.
- AUFHAMMER W (2003d) Vermahlendes Korngut - Mehl, Grieß. In: *Rohstoff Getreide*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 213-221.
- AURA AM, HARKONEN H, FABRITIUS M, POUTANEN K (1999) Development of in vitro enzymic digestion method for removal of starch and protein and assessment of its performance using rye and wheat breads. *J Cereal Sci* 29, 139-152.
- BALL GFM (2006) Vitamin E. In: *Vitamins in Foods*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 119-136.
- BALZ M, SCHULTE E, THIER HP (1992) Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen durch HPLC. *Fett Wiss Technol* 94, 209-213.
- BALZ MK, SCHULTE E, THIER HP (1993) Simultaneous determination of α -tocopheryl acetate, tocopherols, and tocotrienols by HPLC with fluorescence detection in foods. *Fett Wiss Technol* 95, 215-220.
- BARNES PJ, DAY KW, SCHOFIELD JD (1981) Commercial pasta manufacture: changes in lipid binding during processing of durum wheat semolina. *Z Lebensm Unters For* 172, 373-376.
- BARONE R, BRIANTE R, D'AURIA S, FEBBRAIO F, VACCARO C, DEL GIUDICE L, BORRELLI GM, DI FONZO N, NUCCI R (1999) Purification and characterization of a lipoxygenase enzyme from durum wheat semolina. *J Agric Food Chem* 47, 1924-1931.
- BAST A, HAENEN GRMM, VAN DEN BERG R, VAN DEN BERG H (1998) Antioxidant effects of carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res* 68, 399-403.
- BEN-AZIZ A, GROSSMAN S, ASCARELLI I, BUDOWSKI P (1971) Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry* 10, 1445-1452.
- BENDER DA (2003) Vitamin E: Tocopherols and Tocotrienols. In: *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*. Cambridge University Press, Cambridge, 109-130.
- BENGTSSON A, LARSSON ALMINGER M, SVANBERG U (2009) In vitro bioaccessibility of β -carotene from heat-processed orange-fleshed sweet potato. *J Agric Food Chem* 57, 9693-9698.

- BHAVE M, MORRIS C (2008) Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant Mol Biol* 66, 205-219.
- BINNINGTON DS, SIBBITT LD, GEDDES WF (1938) A comparative study of the utility of various commercially available organic solvents for the determination of wheat and flour pigments. *Cereal Chem* 15, 119-132.
- BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (1984) Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik.
- BÖHM V (2001) Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C30 high performance liquid chromatography. *J Sep Sci* 24, 955-959.
- BÖHM V, PUSPITASARI-NIENABER NL, FERRUZZI MG, SCHWARTZ SJ (2002) Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin. *J Agric Food Chem* 50, 221-226.
- BONE RA, LANDRUM JT, DIXON Z, CHEN Y, LLERENA CM (2000) Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. *Exp Eye Res* 71, 239-245.
- BOREL P (2003) Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin Chem Lab Med* 41, 979-994.
- BOREL P, GROLIER P, ARMAND M, PARTIER A, LAFONT H, LAIRON D, AZAIS-BRAESCO V (1996) Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *J Lipid Res* 37, 250-261.
- BOREL P, PASQUIER B, ARMAND M, TYSSANDIER V, GROLIER P, ALEXANDRE-GOUABAU M-C, ANDRE M, SENFT M, PEYROT J, JAUSSAN V, LAIRON D, AZAIS-BRAESCO V (2001) Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G95-103.
- BOREL P, REBOUL E (2006) Absorption and transport of the xanthophylls lutein and zeaxanthin: from foods to tissues. In: Motahashi N (Ed.) *The Lutein- Prevention and Treatment for Age-Related Diseases*. Transworld Research Network, Trivandrum, India, 79-100.
- BOROWSKA J, KOWALSKA M, CZAPLICKI S, ZADERNOWSKI R (2003) Effect of hydrothermal processing on carrot carotenoids changes and interactions with dietary fiber. *Nahrung* 47, 46-48.
- BORRELLI GM, DE LEONARDIS AM, FARES C, PLATANI C, DI FONZO N (2003) Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. *Cereal Chem* 80, 225-231.
- BORRELLI GM, TROCCHI A, DI FONZO N, FARES C (1999) Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta color. *Cereal Chem* 76, 335-340.
- BOYACIOGLU MH, D'APPOLONIA BL (1994) Characterization and utilization of durum wheat for breadmaking. I. Comparison of chemical, rheological, and baking properties between bread wheat flours and durum wheat flours. *Cereal Chem* 71, 21-28.
- BREITHAAPT DE, BAMEDI A (2002) Carotenoids and carotenoid esters in potatoes (*Solanum tuberosum* L.): new insights into an ancient vegetable. *J Agric Food Chem* 50, 7175-7181.

- BRIGELIUS-FLOHE R, KELLY FJ, SALONEN JT, NEUZIL J, ZINGG J-M, AZZI A (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 76, 703-716.
- BRITTON G (1995a) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal* 9, 1551-1558.
- BRITTON G (1995b) UV/Vis Spectroscopy. In: Britton G, Liaaen-Jensen S and Pfander H (Eds.) *Carotenoids, Volume 1B: Spectroscopy*. Birkhäuser Verlag, Basel, 13-62.
- BRITTON G, LIAAEN-JENSEN S, PFANDER H (2004) *Carotenoids, Handbook*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- BURKHARDT S (2003) Beurteilung von Hartweizen verschiedener Jahrgänge und Teigwaren anhand ihrer antioxidativen Aktivität sowie Untersuchungen zum Gelbpigmentgehalt. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
- BURTON GW, TRABER MG (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutrition* 10, 357-382.
- CALVO MM (2005) Lutein: A valuable ingredient of fruit and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 671-696.
- CASTENMILLER JJ, WEST CE, LINSSEN JP, VAN HET HOF KH, VORAGEN AG (1999) The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *J Nutr* 129, 349-355.
- CHEN BH, CHEN YY (1993) Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking. *J Agric Food Chem* 41, 1315-1320.
- CHITCHUMROONCHOKCHAI C, FAILLA ML (2006) Hydrolysis of zeaxanthin esters by carboxyl ester lipase during digestion facilitates micellarization and uptake of the xanthophyll by Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 136, 588-594.
- CHITCHUMROONCHOKCHAI C, SCHWARTZ SJ, FAILLA ML (2004) Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 134, 2280-2286.
- CHOPRA M, THURNHAM DI (1993) In vitro antioxidant activity of lutein. In: Waldron KW, Johnson IT and Fenwick GR (Eds.) *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*. Royal Society of Chemistry, London, 125-129.
- CHRISTIE WW (1989) *Gas Chromatography and lipids: a practical guide*. 1st ed., The Oily Press, Bridgwater.
- CHUNG H-Y, RASMUSSEN HM, JOHNSON EJ (2004) Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J Nutr* 134, 1887-1893.
- COOPER DA, ELDRIDGE AL, PETERS JC (1999) Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutr Rev* 57, 201-214.
- COOPER DA, WEBB DR, PETERS JC (1997) Evaluation of the potential for Olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr* 127, 1699S-1709S.

- CORTES C, ESTEVE MJ, FRIGOLA A, TORREGROSA F (2004) Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection. *J Agric Food Chem* 52, 2203-2212.
- COYNE T, IBIEBELE TI, BAADE PD, DOBSON A, MCCLINTOCK C, DUNN S, LEONARD D, SHAW J (2005) Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. *Am J Clin Nutr* 82, 685-693.
- CRAFT NE, SOARES JH (1992) Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *J Agric Food Chem* 40, 431-434.
- CUNIN C, HANDSCHIN S, WALTHER P, ESCHER F (1995) Structural changes of starch during cooking of durum wheat pasta. *Food Sci Technol* 28, 323-328.
- DACHTLER M, GLASER T, KOHLER K, ALBERT K (2001) Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Anal Chem* 73, 667-674.
- DACHTLER M, KOHLER K, ALBERT K (1998) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C30 bonded phase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 720, 211-216.
- DAHLE LK (1965) Factors affecting oxidative stability of carotenoid pigments of durum milled products. *J Agric Food Chem* 13, 12-15.
- DARLINGTON HF, TECSI L, HARRIS N, GRIGGS DL, CANTRELL IC, SHEWRY PR (2000) Starch granule associated proteins in barley and wheat. *J Cereal Sci* 32, 21-29.
- DE ROSSO VV, MERCADANTE AZ (2007) Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. *J Agric Food Chem* 55, 5062-5072.
- DE SA MC, RODRIGUEZ-AMAYA DB (2004) Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables-comparison of analytical and calculated data. *J Food Compost Anal* 17, 37-51.
- DEBBOUZ A, DOETKOTT C (1996) Effect of process variables on spaghetti quality. *Cereal Chem* 73, 672-676.
- D'EGIDIO MG (2001) Composition and quality of durum wheat and pasta products. In: Abecassis J, Aufran J-C and Feillet P (Eds.) *Durum wheat, semolina and pasta quality: Recent achievements and new trends*. Les Colloques de l'INRA N° 99, Paris, 93-111.
- DELCOUR JA, VANSTEELANDT J, HYTHIER MC, ABECASSIS J (2000) Fractionation and reconstitution experiments provide insight into the role of starch gelatinization and pasting properties in pasta quality. *J Agric Food Chem* 48, 3774-3778.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNGSFORSCHUNG, SCHWEIZERISCHE VEREINIGUNG FÜR ERNÄHRUNG (2000) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau/Braus Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (2004) Ernährungsbericht 2004.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG (2008) Ernährungsbericht 2008.
- DEXTER JE, DRONZEK BL, MATSUO RR (1978) Scanning electron microscopy of cooked spaghetti. *Cereal Chem* 55, 23-30.

- DEXTER JE, MARCHYLO BA (2001) Recent trends in durum wheat milling and pasta processing: impact on durum wheat quality requirements. In: Abecassis J, Aufran J-C and Feillet P (Eds.) *Durum wheat, semolina and pasta quality: Recent achievements and new trends*. Les Colloques de l'INRA N° 99, Paris, 139-164.
- DEXTER JE, MATSUO RR (1977) Changes in semolina proteins during spaghetti processing. *Cereal Chem* 54, 882-894.
- DEXTER JE, MATSUO RR (1979) Changes in spaghetti protein solubility during cooking. *Cereal Chem* 56, 394-398.
- DEXTER JE, MATSUO RR, MORGAN BC (1981) High temperature drying: effect on spaghetti properties. *J Food Sci* 46, 1741-1746.
- DHUIQUE-MAYER C, BOREL P, REBOUL E, CAPORICCIO B, BESANCON P, AMIOT M-J (2007) β -cryptoxanthin from citrus juices: assessment of bioaccessibility using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Br J Nutr* 97, 883-890.
- DIMITROV N, MEYER C, GILLILAND D, RUPPENTHAL M, CHENOWETH W, MALONE W (1991) Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am J Clin Nutr* 53, 723-729.
- DONNELLY BJ, PONTE JR. JG (2000) Pasta: Raw materials and processing. In: Kulp K and Ponte Jr. JG (Hrsg.) *Handbook of cereal science and technology*. Marcel Dekker, New York, Basel,
- DÖRMANN P (2007) Functional diversity of tocochromanols in plants. *Planta* 225, 269-276.
- DWYER JH, NAVAB M, DWYER KM, HASSAN K, SUN P, SHIRCORE A, HAMA-LEVY S, HOUGH G, WANG X, DRAKE T, MERZ CN, FOGELMAN AM (2001) Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Circulation* 103, 2922-2927.
- EHRENBERGEROVA J, BELCREDIOVA N, PRYMA J, VACULOVA K, NEWMAN CW (2006) Effect of cultivar, year grown, and cropping system on the content of tocopherols and tocotrienols in grains of hulled and hullless barley. *Plant Foods Hum Nutr* 61, 145-150.
- EITENMILLER R, LEE J (2004a) Extraction of vitamin E before quantification by high-performance liquid chromatography. In: *Vitamin E: food chemistry, composition, and analysis*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 336-364.
- EITENMILLER R, LEE J (2004b) Stability of vitamin E during food processing. In: *Vitamin E: food chemistry, composition, and analysis*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 231-284.
- ELMADFA I, BOSSE W (1985) Verarbeitungsmaßnahmen, Lagerhaltung und Tocopherolgehalt. In: *Vitamin E: Eigenschaften, Wirkungsweisen und therapeutische Bedeutung*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 47-57.
- EMENHISER C, SANDER LC, SCHWARTZ S (1995) Capability of a polymeric C30 stationary phase to resolve cis-trans carotenoid isomers in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 707, 205-216.
- EMENHISER C, SIMUNOVIC N, SANDER LC, SCHWARTZ SJ (1996) Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using a polymeric C30 column in reversed-phase liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 44, 3887-3893.

- ENGLERT G, NOACK K, BROGER EA, GLINZ E, VECCHI M, ZELL R (1991) Synthesis, isolation, and full spectroscopic characterization of eleven (Z)-isomers of (3R,3'R)-zeaxanthin. *Helv Chim Acta* 74, 969-982.
- ERNST-DE GROE R (2004) Teigwaren. In: Heiss R (Hrsg.) *Lebensmitteltechnologie: Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- EVANS HM, BISHOP KS (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56, 650-651.
- FAILLA ML, HUO T, THAKKAR SK (2008) In vitro screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. *Asia Pac J Clin Nutr* 17, 200-203.
- FAILLA ML, THAKKAR SK, KIM JY (2009) In vitro bioaccessibility of β -carotene in orange fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). *J Agric Food Chem* 57, 10922-10927.
- FALK J, KRAHNSTOVER A, VAN DER KOOIJ TA, SCHLENSOG M, KRUPINSKA K (2004) Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry* 65, 2977-2985.
- FANG K, KHAN K (1996) Pasta containing regrinds: effect of high temperature drying on product quality. *Cereal Chem* 73, 317-322.
- FARDET A, ABECASSIS J, HOEBLER C, BALDWIN PM, BULÉON A, BÉROT S, BARRY J-L (1999) Influence of technological modifications of the protein network from pasta on in vitro starch degradation. *J Cereal Sci* 30, 133-145.
- FARDET A, HOEBLER C, BALDWIN PM, BOUCHET B, GALLANT DJ, BARRY JL (1998) Involvement of the protein network in the in vitro degradation of starch from spaghetti and lasagne: a microscopic and enzymic study. *J Cereal Sci* 27, 133-145.
- FAULKS RM, SOUTHON S (2005) Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *BBA - Mol Basis Dis* 1740, 95-100.
- FEILLET P, AUTRAN J-C, ICARD-VERNIERE C (2000) Pasta brownness: an assessment. *J Cereal Sci* 32, 215-233.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA E, MÍNGUEZ-MOSQUERA MI, PÉREZ-GÁLVEZ A (2007) Changes in composition of the lipid matrix produce a differential incorporation of carotenoids in micelles. Interaction effect of cholesterol and oil. *Innovat Food Sci Emerg Tech* 8, 379-384.
- FERRUZZI MG, FAILLA ML, SCHWARTZ SJ (2001) Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and caco-2 human cell model. *J Agric Food Chem* 49, 2082-2089.
- FERRUZZI MG, LUMPKIN JL, SCHWARTZ SJ, FAILLA M (2006) Digestive stability, micellarization, and uptake of β -carotene isomers by caco-2 human intestinal cells. *J Agric Food Chem* 54, 2780-2785.
- FRANKE AA, MURPHY SP, LACEY R, CUSTER LJ (2007) Tocopherol and tocotrienol levels of foods consumed in Hawaii. *J Agric Food Chem* 55, 769-778.
- FRANKE S (2008) Analyse von kaltgepressten und raffinierten Speiseölen aus dem Handel sowie von Versuchsmustern aus einer Ölmühle auf Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.

- FRATIANNI A, CABONI MF, IRANO M, PANFILI G (2002) A critical comparison between traditional methods and supercritical carbon dioxide extraction for the determination of tocochromanols in cereals. *Eur Food Res Technol* 215, 353-358.
- FRATIANNI A, IRANO M, PANFILI G, ACQUISTUCCI R (2005) Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *J Agric Food Chem* 53, 2373-2378.
- FREIMUTH U, LUDWIG E, HEINIG R, GEBHARDT E (1972) Das Verhalten der Lipoxygenase und der Peroxidase in Weizenmehlen und -teigen. *Nahrung* 16, 149-156.
- FRIEDMAN H, NYLUND B (1980) Intestinal fat digestion, absorption, and transport. A review. *Am J Clin Nutr* 33, 1108-1139.
- FRÖHLICH K (2007) Lycopin-Isomere in Lebensmitteln und Humanplasma - Strukturaufklärung, antioxidative Aktivität, Gehalte und relative (E)-(Z)-Verhältnisse. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
- FULLMER LA, SHAO A (2001) The role of lutein in eye health and nutrition. *Cereal Foods World* 46, 408-413.
- GALLARDO-GUERRERO L, GANDUL-ROJAS B, MINGUEZ-MOSQUERA MI (2008) Digestive stability, micellarization, and uptake by caco-2 human intestinal cell of chlorophyll derivatives from different preparations of pea (*Pisum sativum* L.). *J Agric Food Chem* 56, 8379-8386.
- GALLESCHI L, CAPOCCHI A, GHIRINGHELLI S, SAVIOZZI F, CALUCCI L, PINZINO C, ZANDOMENEGHI M (2002) Antioxidants, free radicals, storage proteins, and proteolytic activities in wheat (*Triticum durum*) seeds during accelerated aging. *J Agric Food Chem* 50, 5450-5457.
- GANDUL-ROJAS B, GALLARDO-GUERRERO L, MINGUEZ-MOSQUERA MI (2009) Influence of the chlorophyll pigment structure on its transfer from an oily food matrix to intestinal epithelium cells. *J Agric Food Chem* 57, 5306-5314.
- GARCIA DEL MORAL LF, RHARRABTI Y, MARTOS V, ROYO C (2007) Environmentally induced changes in amino acid composition in the grain of durum wheat grown under different water and temperature regimes in a mediterranean environment. *J Agric Food Chem* 55, 8144-8151.
- GARRETT DA, FAILLA ML, SARAMA RJ (1999) Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* 47, 4301-4309.
- GARRETT DA, FAILLA ML, SARAMA RJ (2000) Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J Nutr Biochem* 11, 574-580.
- GABMANN B (1995a) Natürlich vorkommende Vitamin-E-Formen - Geschichte und Stand ihrer Bewertung, Teil 1: Bioverfügbarkeit und Biopotenz. *Ernährungs-Umschau* 42, 394-398.
- GABMANN B (1995b) Natürlich vorkommende Vitamin-E-Formen - Geschichte und Stand ihrer Bewertung, Teil 2: Absorption, Transport, Verteilung, Retention. *Ernährungs-Umschau* 42, 442-446.
- GABMANN B (1995c) Vitamin-E-Stoffwechsel und -Bedarf. *Ernährungs-Umschau* 42, 80-86.

- GAUTIER M-F, COSSON P, GUIRAO A, ALARY R, JOUDRIER P (2000) Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum* species. *Plant Sci* 153, 81-91.
- GOICOECHEA E, VAN TWILLERT K, DUIJS M, BRANDON EDFA, KOOTSTRA PR, BLOKLAND MH, GUILLEN MD (2008) Use of an in vitro digestion model to study the bioaccessibility of 4-hydroxy-2-nonenal and related aldehydes present in oxidized oils rich in omega-6 acyl groups. *J Agric Food Chem* 56, 8475-8483.
- GONI I, SERRANO J, SAURA-CALIXTO F (2006) Bioaccessibility of beta-carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. *J Agric Food Chem* 54, 5382-5387.
- GRANADO F, OLMEDILLA B, BLANCO I, ROJAS-HIDALGO E (1992) Carotenoid composition in raw and cooked spanish vegetables. *J Agric Food Chem* 40, 2135-2140.
- GRANADO F, OLMEDILLA B, HERRERO C, PEREZ-SACRISTAN B, BLANCO I, BLAZQUEZ S (2006) Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: in vivo and in vitro assessment. *Exp Biol Med* 231, 1733-1738.
- GRANADO-LORENCIO F, HERRERO-BARBUDO C, ACIÉN-FERNÁNDEZ G, MOLINA-GRIMA E, FERNÁNDEZ-SEVILLA JM, PÉREZ-SACRISTÁN B, BLANCO-NAVARRO I (2009a) In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chem* 114, 747-752.
- GRANADO-LORENCIO F, HERRERO-BARBUDO C, BLANCO-NAVARRO I, PEREZ-SACRISTAN B, OLMEDILLA-ALONSO B (2009b) Bioavailability of carotenoids and α -tocopherol from fruit juices in the presence of absorption modifiers: *in vitro* and *in vivo* assessment. *Br J Nutr* 101, 576-582.
- GRANADO-LORENCIO F, OLMEDILLA-ALONSO B, HERRERO-BARBUDO C, BLANCO-NAVARRO I, PEREZ-SACRISTAN B, BLAZQUEZ-GARCIA S (2007a) In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chem* 102, 641-648.
- GRANADO-LORENCIO F, OLMEDILLA-ALONSO B, HERRERO-BARBUDO C, PEREZ-SACRISTAN B, BLANCO-NAVARRO I, BLAZQUEZ-GARCIA S (2007b) Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *J Agric Food Chem* 55, 6387-6394.
- GREENWELL P, SCHOFIELD JD (1986) A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem* 63, 379-380.
- GROBOSCH T (2008) Grundlagen von LC/MS und LC/MS-MS. Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben, Institut für Toxikologie, <http://www.toxberlin.de/FT/Download/Grundlagen LCMS.pdf>, Stand Sept. 2009.
- GUINAZI M, RODRIGUES RC, MILAGRES M, PINHEIR HM, PAES CHAVES JB (2009) Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova* 32, 2098-2103.
- GUNSTONE FD, HARWOOD JL, DIJKSTRA AJ (2007) Cereal Lipids. In: *The Lipid Handbook*. CRC Press, Boca Radon, London, New York, 121-122.
- HABEEB AFSA (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene-sulfonic acid. *Anal Biochem* 14, 328-336.
- HAILA KM, LIEVONEN SM, HEINONEN M (1996) Effects of lutein, lycopene, annatto and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. *J Agric Food Chem* 44, 2096-2100.

- HÅKANSSON B, JÄGERSTAD M (1990) The effect of thermal inactivation of lipoxygenase on the stability of vitamin E in wheat. *J Cereal Sci* 12, 177-185.
- HAKANSSON B, JÄGERSTAD M, ÖSTE R (1987) Determination of vitamin E in wheat products by HPLC. *J Micronutr Anal* 3, 307-318.
- HALLIWELL B, ZHAO K, WHITEMAN M (2000) The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 33, 819 - 830.
- HAMMOND BR, JR., JOHNSON EJ, RUSSELL RM, KRINSKY NI, YEUM KJ, EDWARDS RB, SNODDERLY DM (1997) Dietary modification of human macular pigment density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1795-1801.
- HAO Z, PARKER B, KNAPP M, YU LL (2005) Simultaneous quantification of α -tocopherol and four major carotenoids in botanical materials by normal phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1094, 83-90.
- HARGIN KD, MORRISON WR (1980) The distribution of acyl lipids in the germ, aleurone, starch and non-starch endosperm of four wheat varieties. *J Sci Food Agric* 31, 877-888.
- HART DJ, SCOTT KJ (1995) Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem* 54, 101-111.
- HÉBRARD A, OULAHNA D, GALET L, CUQ B, ABECASSIS J, FAGES J (2003) Hydration properties of durum wheat semolina: influence of particle size and temperature. *Powder Technol* 130, 211-218.
- HEDREN E, DIAZ V, SVANBERG U (2002) Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *Eur J Clin Nutr* 56, 425-430.
- HEINONEN M, OLLIAINEN V, LINKOLA E, VARO P, KOIVISTOINEN P (1989) Carotenoids and retinoids in finnish foods: cereal and bakery products. *Cereal Chem* 66, 270-273.
- HENTSCHEL V, KOLB N, MÜNZING K, BÖHM V, BITSCH R (2000) Einfluss der Teigwarenherstellung auf farbgebende sekundäre Pflanzenstoffe von Durumweizen. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung e. V., XXXV. Vortragstagung, 145-149.
- HENTSCHEL V, KRANL K, HOLLMANN J, LINDHAUER MG, BOHM V, BITSCH R (2002) Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *J Agric Food Chem* 50, 6663-6668.
- HERMANSSON A-M, SVEGMARK K (1996) Developments in the understanding of starch functionality. *Trends Food Sci Technol* 7, 345-353.
- HERNELL O, STAGGERS JE, CAREY MC (1990) Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry* 29, 2041-2056.
- HERRERO-BARBUDO MC, GRANADO-LORENCIO F, BLANCO-NAVARRO I, PÉREZ-SACRISTÁN B, OLMEDILLA-ALONSO B (2009) Applicability of an in vitro model to assess the bioaccessibility of vitamins A and E from fortified commercial milk. *Int Dairy J* 19, 64-67.

- HERRON KL, MCGRANE MM, WATERS D, LOFGREN IE, CLARK RM, ORDOVAS JM, FERNANDEZ ML (2006) The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs. *J Nutr* 136, 1161-1165.
- HIDALGO A, BRANDOLINI A (2008) Kinetics of carotenoids degradation during the storage of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *J Agric Food Chem* 56, 11300-11305.
- HIDALGO A, BRANDOLINI A, POMPEI C, PISCOZZI R (2006) Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *J Cereal Sci* 44, 182-193.
- HOOD RL (1998) Tocotrienols in metabolism. In: Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS and Jahner D (Eds.) *Phytochemicals - a new paradigm*. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, 33-51.
- HORNERO-MÉNDEZ D, MÍNGUEZ-MOSQUERA MI (2007) Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovat Food Sci Emerg Tech* 8, 407-412.
- HORVATH G, WESSJOHANN L, BIGIRIMANA J, JANSEN M, GUISEZ Y, CAUBERGS R, HOREMANS N (2006) Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67, 1185-1195.
- HOWE JA, TANUMIHARDJO SA (2006) Evaluation of analytical methods for carotenoid extraction from biofortified maize (*Zea mays* sp.). *J Agric Food Chem* 54, 7992-7997.
- HOWITT CA, POGSON BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* 29, 435-445.
- HUMPHRIES JM, KHACHIK F (2003) Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *J Agric Food Chem* 51, 1322-1327.
- HUO T, FERRUZZI MG, SCHWARTZ SJ, FAILLA ML (2007) Impact of fatty acyl composition and quantity of triglycerides on bioaccessibility of dietary carotenoids. *J Agric Food Chem* 55, 8950-8957.
- ICARD-VERNIERE C, FEILLET P (1999) Effects of mixing conditions on pasta dough development and biochemical changes. *Cereal Chem* 76, 558-565.
- ICC (1990) ICC method 152. In: *Standard Methods of the International Association for Cereal Science and Technology*. Verlag Moritz Schäfer, Detmold,
- IRVINE GN, ANDERSON JA (1953) Variation in principal quality factors of durum wheats with a quality prediction test for wheat or semolina. *Cereal Chem* 30, 334-342.
- IRVINE GN, ANDERSON JA (1955) Effect of lipoxidase activity on the macaroni-making quality of durum wheats. *Intern Brotkongr*, 3, Hamburg, 230-233.
- IRVINE GN, WINKLER CA (1950) Factors affecting the color of macaroni. II. Kinetic studies of pigment destruction during mixing. *Cereal Chem* 27, 205-218.
- ISHIDA BK, CHAPMAN MH (2009) Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *J Agric Food Chem* 57, 1051-1059.
- JAHN-DEESBACH W, SCHIPPER A (2009) Gelbmehl-Weizen. *Getreidetechnologie* 63, 40-44.

- JAHN-DEESBACH W, SCHIPPER A, MÜLLER H (2004) Carotinoide in Weizen. *Getreidetechnologie* 58, 203-206.
- JOHNSON JD (2007) Lutein and zeaxanthin - an introduction to the chemistry of dietary carotenoids. Department of Chemistry, Florida State University. Tallahassee, FL, USA, www.chm.bris.ac.uk/motm/varotenoids/carotenoids.htm.
- KALANTARI F (2009) Untersuchungen zum Einfluss der industriellen Verarbeitung von Hartweizen zu Teigwaren auf Gehalte an Carotinoiden, Vitamin E sowie Gelbpigmenten. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
- KALANTZI L, GOUMAS K, KALIORAS V, ABRAHAMSSON B, DRESSMAN J, REPPAS C (2006) Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res* 23, 165-176.
- KAMAL-ELDIN A, APPELQVIST L-A (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671-701.
- KANEKO S, NAGAMINE T, YAMADA T (1995) Esterification of endosperm lutein with fatty acids during storage of wheat seeds. *Biosci Biotech Biochem* 59, 1-4.
- KAUKOVIRTA-NORJA A, REINIKAINEN P, OLKKU J, LAAKSO S (1997) Starch lipids of barley and malt. *Cereal Chem* 74, 733-738.
- KEAN EG, HAMAKER BR, FERRUZZI MG (2008) Carotenoid bioaccessibility from whole grain and degermed maize meal products. *J Agric Food Chem* 56, 9918-9926.
- KHACHIK F, BEECHER GR, WHITTAKER NF (1986) Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 34, 603-616.
- KHACHIK F, BERNSTEIN PS, GARLAND DL (1997a) Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1802-1811.
- KHACHIK F, ENGLERT G, DAITCH CE, BEECHER GR, TONUCCI LH, LUSBY WR (1992a) Isolation and structural elucidation of the geometrical isomers of lutein and zeaxanthin in extracts from human plasma. *J Chromatogr* 582, 153-166.
- KHACHIK F, GOLI MB, BEECHER GR, HOLDEN J, LUSBY WR, TENORIO MD, BARRERA MR (1992b) Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *J Agric Food Chem* 40, 390-398.
- KHACHIK F, SPANGLER CJ, SMITH JC, JR., CANFIELD LM (1997b) Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem* 69, 1873-1881.
- KHACHIK F, STECK A, PFANDER H (1999) Isolation and structural elucidation of (13Z,13'Z,3R,3'R,6'R)-lutein from marigold flowers, kale, and human plasma. *J Agric Food Chem* 47, 455-461.
- KIMURA M, RODRIGUEZ-AMAYA DB, GODOY HT (1990) Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. *Food Chem* 35, 187-195.

- KLING CI, BREUER J, MUENZING K (2006) Eignung alter Weizenkulturen für heutige Anforderungen. *Getreidetechnologie* 60, 55-60.
- KLINGLER RW (1995a) Getreideinhaltsstoffe. In: *Grundlagen der Getreidetechnologie*. Behr's Verlag, Hamburg, 53-65.
- KLINGLER RW (1995b) Teigwaren. In: *Grundlagen der Getreidetechnologie*. Behr's Verlag, Hamburg, 268-280.
- KNETSCH R (2007) Analyse von Proben aus der Teigwarenherstellung auf Gehalte an Vitamin E und Carotinoiden sowie Gelbpigmenten - methodische und technologische Aspekte. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
- KNOWLES RE, LIVINGSTON AL, KOHLER GO (1972) Rapid determination of carotene and xanthophyll in dried plant materials. *J Agric Food Chem* 20, 1127-1129.
- KOHLER GO, KNOWLES RE, LIVINGSTON AL (1967) An improved analytical procedure for the determination of xanthophyll. *J Assoc Off Anal Chem* 50, 707-711.
- KONINGS EJM, ROOMANS HHS, BELJAARS PR (1996) Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in margarine, infant foods, and vegetables. *J AOAC Int* 79, 902-906.
- KONOPKA I, CZAPLICKI S, ROTKIEWICZ D (2006) Differences in content and composition of free lipids and carotenoids in flour of spring and winter wheat cultivated in Poland. *Food Chem* 95, 290-300.
- KONOPKA I, KOZIROK W, ROTKIEWICZ D (2004) Lipids and carotenoids of wheat grain and flour and attempt of correlating them with digital image analysis of kernel surface and cross-sections. *Food Research International* 37, 429-438.
- KRINSKY NI (2002) Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *J Nutr* 132, 540S-542S.
- KRINSKY NI, RUSSETT MD, HANDELMAN GJ, SNODDERLY DM (1990) Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J Nutr* 120, 1654-1662.
- KROMIDAS S (1999) Validierung in der Analytik. 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.
- KURZHALS H-A (2003) Lexikon Lebensmitteltechnik. 1. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg.
- LAKSHMINARAYANA R, ARUNA G, SANGEETHA RK, BHASKAR N, DIVAKAR S, BASKARAN V (2008) Possible degradation/biotransformation of lutein in vitro and in vivo: isolation and structural elucidation of lutein metabolites by HPLC and LC-MS (atmospheric pressure chemical ionization). *Free Radic Biol Med* 45, 982-993.
- LAKSHMINARAYANA R, RAJU M, KRISHNAKANTHA TP, BASKARAN V (2007) Lutein and zeaxanthin in leafy greens and their bioavailability: olive oil Influences the absorption of dietary lutein and its accumulation in adult rats. *J Agric Food Chem* 55, 6395-6400.
- LAMACCHIA C, DI LUCCIA A, BAIANO A, GAMBACORTA G, LA GATTA B, PATI S, LA NOTTE E (2007) Changes in pasta proteins induced by drying cycles and their relationship to cooking behavior. *J Cereal Sci* 46, 58-63.
- LAMPI A-M, NURMI T, OLLILAINEN V, PIIRONEN V (2008) Tocopherols and tocotrienols in wheat genotypes in the HEALTHGRAIN diversity screen. *J Agric Food Chem* 56, 9716-9721.

- LANDRUM JT, BONE RA, CHEN Y, HERRERO C, LLERENA CM, TWAROWSKA E (1999) Carotenoids in the human retina. *Pure Appl Chem* 71, 2237-2244.
- LEBET V, ARRIGONI E, AMADO R (1998) Digestion procedure using mammalian enzymes to obtain substrates for in vitro fermentation studies. *LWT - Food Sci Technol* 31, 509-515.
- LEE J, LANDEN JR. WO, PHILLIPS RD, EITENMILLER RR (1998) Application of direct solvent extraction to the LC quantification of vitamin E in peanuts, peanut butter, and selected nuts. *Peanut Sci* 25, 123-128.
- LEENHARDT F, LYAN B, ROCK E, BOUSSARD A, POTUS J, CHANLIAUD E, REMESY C (2006a) Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties. *Eur J Agron* 25, 170-176.
- LEENHARDT F, LYAN B, ROCK E, BOUSSARD A, POTUS J, CHANLIAUD E, REMESY C (2006b) Wheat lipoxygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *J Agric Food Chem* 54, 1710-1715.
- LEPAGE M, SIMS RPA (1968) Carotenoids of wheat flour: their identification and composition. *Cereal Chem* 45, 600-604.
- LI X-X, HAN L-J (2008) Iron(II)-induced isomerization of (*all-E*)-xanthophyll pigments lutein, zeaxanthin, and β -cryptoxanthin in acetone. *Eur Food Res Technol* 227, 1307-1313.
- LIENAU A, GLASER T, TANG G, DOLNIKOWSKI GG, GRUSAK MA, ALBERT K (2003) Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS. *J Nutr Biochem* 14, 663-670.
- LINDHAUER MG (2001) Analytical methods utilized in the durum wheat chain. In: Abecassis J, Autran J-C and Feillet P (Eds.) *Durum wheat, semolina and pasta quality: Recent achievements and new trends*. Les Colloques de l'INRA N° 99, Paris, 181-195.
- LIU C-S, GLAHN RP, LIU RH (2004) Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. *J Agric Food Chem* 52, 4330-4337.
- LIU CY, SHEPHERD KW, RATHJEN AJ (1996) Improvement of durum wheat pasta-making and breadmaking qualities. *Cereal Chem* 73, 155-166.
- LIVINGSTON AL, KNOWLES RE, KOHLER GO (1971) Determination of carotene and xanthophyll in alfalfa products. *J AOAC* 54, 981-982.
- LU H, YANG X, YE M, LIU K-B, XIA Z, REN X, CAI L, WU N, LIU T-S (2005) Culinary archaeology: Millet noodles in Late Neolithic China. *Nature* 437, 967-968.
- MANDALARI G, FAULKS RM, RICH GT, LO TURCO V, PICOUT DR, LO CURTO RB, BISIGNANO G, DUGO P, DUGO G, WALDRON KW, ELLIS PR, WICKHAM MSJ (2008) Release of protein, lipid, and vitamin E from almond seeds during digestion. *J Agric Food Chem* 56, 3409-3416.
- MARKLEY MC, BAILEY CH (1935) The nature of the pigments of the gasoline extract of wheat. *Cereal Chem* 12, 33-39.

- MATSUO RR (1987) The effect of enzymes on pasta and noodle products. In: Kruger JE (Ed.) *Enzymes and Their Role in Cereal Technology*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn., 325-334.
- MATSUO RR, BRADLEY JW, IRVINE GN (1970) Studies on pigment destruction during spaghetti processing. *Cereal Chem* 47, 1-5.
- MATSUO RR, DEXTER JE, DRONZEK BL (1978) Scanning electron microscopy study of spaghetti processing. *Cereal Chem* 55, 744-753.
- MAX RUBNER-INSTITUT (BUNDESFORSCHUNGSINSTITUT FÜR ERNÄHRUNG UND LEBENSMITTEL) (2008) Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht Teil 2. http://www.was-esse-ich.de/uploads/media/NVSII_Abschlussbericht_Teil_2.pdf.
- MCDONALD CE (1979) Lipoxygenase and lutein bleaching activity of durum wheat semolina. *Cereal Chem* 56, 84-89.
- MENGER A (1964) Über die Beeinflussung der Teigwarenfarbe durch Verlust und Neubildung von Pigmenten während der Herstellung. *Getreide Mehl* 14, 85-89.
- MILLER ER, III, PASTOR-BARRIUSO R, DALAL D, RIEMERSMA RA, APPEL LJ, GUALLAR E (2005) Meta-analysis: High-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142, 37-46.
- MILLER NJ, SAMPSON J, CANDEIAS LP, BRAMLEY PM, RICE-EVANS CA (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* 384, 240-242.
- MØLLER NIELSEN M, HANSEN A (2008) Rapid high-performance liquid chromatography determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Cereal Chem* 85, 248-251.
- MOORE J, HAO Z, ZHOU K, LUTHER M, COSTA J, YU L (2005) Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of maryland-grown soft wheat. *J Agric Food Chem* 53, 6649-6657.
- MOROS EE, DARNOKO D, CHERYAN M, PERKINS EG, JERRELL J (2002) Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J Agric Food Chem* 50, 5787-5790.
- MORRISON WR (1981) Starch lipids: a reappraisal. *Stärke* 33, 408-410.
- MORRISON WR, COVENTRY AM (1985) Extraction of lipids from cereal starches with hot aqueous alcohols. *Stärke* 37, 83-87.
- MORRISON WR, MANN DL, SOON W, COVENTRY AM (1975) Selective extraction and quantitative analysis of non-starch and starch lipids from wheat flour. *J Sci Food Agric* 26, 507-521.
- MÜLLER L, THEILE K, BÖHM V (2010) In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Mol Nutr Food Res* 54, 1-12.
- MULOKOZI G, HEDREN E, SVANBERG U (2004) In vitro accessibility and intake of β -carotene from cooked green leafy vegetables and their estimated contribution to vitamin A requirements. *Plant Foods Hum Nutr* 59, 1-9.
- MUNSEY VE (1938) Application of the neutral wedge photometer to the measurement of carotenoid pigments in flour and macaroni products. *J Assoc Off Agric Chem* 21, 331-351.

- MURPHY DJ (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40, 325-438.
- MURPHY DJ, VANCE J (1999) Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24, 109-115.
- MURPHY EW, CRINER PE, GRAY BC (1975) Comparisons of methods for calculating retentions of nutrients in cooked foods. *J Agric Food Chem* 23, 1153-1157.
- NAUMANN C, BASSLER R (1976) Methodenbuch Band 3: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 3. Aufl., VDLUFA-Verlag, Darmstadt.
- NIKI E (1996) α -Tocopherol. In: Cadenas E and Packer L (Eds.) *Handbook of antioxidants*. Marcel Dekker Inc., New York,
- O'CONNELL OF, RYAN L, O'BRIEN NM (2007) Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutr Res* 27, 258-264.
- OKUYAMA T, SATAKE K (1960) On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenylamino acids and peptides. *J Biochem* 47, 454-466.
- OLLILAINEN V, HEINONEN M, LINKOLA E, VARO P, KOIVISTOINEN P (1989) Carotenoids and retinoids in Finnish foods: dairy products and eggs. *J Dairy Sci* 72, 2257-2265.
- OLMEDILLA B, GRANADO F, ROJAS-HIDALGO E, BLANCO I (1990) A rapid separation of ten carotenoids, three retinoids, α -tocopherol and α -tocopherol acetate by high performance liquid chromatography and its application to serum and vegetable samples. *J Liq Chromatogr* 13, 1455-1483.
- OOMEN AG, ROMPELBERG CJM, BRUIL MA, DOBBE CJG, PEREBOOM DPKH, SIPS AJAM (2003) Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 44, 0281-0287.
- ORNELAS-PAZ JDJ, FAILLA ML, YAHIA EM, GARDEA-BEJAR A (2008) Impact of the stage of ripening and dietary fat on *in vitro* bioaccessibility of β -carotene in 'Ataulfo' Mango. *J Agric Food Chem* 56, 1511-1516.
- PACKER L (1993) Vitamin E: Biological activity and health benefits: Overview. In: Packer L and Fuchs J (Eds.) *Vitamin E in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York.
- PACKER L, WEBER SU, RIMBACH G (2001) Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr* 131, 369S-373S.
- PANFILI G, FRATIANNI A, IRANO M (2003) Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *J Agric Food Chem* 51, 3940-3944.
- PANFILI G, FRATIANNI A, IRANO M (2004) Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *J Agric Food Chem* 52, 6373-6377.
- PARKER RS, SWANSON JE, YOU C-S, EDWARDS AJ, HUANG T (1999) Bioavailability of carotenoids in human subjects. *Proc Nutr Soc* 58, 155-162.
- PASTORE D, TRONO D, PADALINO L, SIMONE S, VALENTI D, DI FONZO N, PASSARELLA S (2000) Inhibition by α -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and β -carotene bleaching activities in durum wheat semolina. *J Cereal Sci* 31, 41-54.

- PELZ R, SCHMIDT-FABER B, HESEKER H (1998) Die Carotinoidzufuhr in der Nationalen Verzehrsstudie. *Z Ernährungswiss*, 319-327.
- PEREZ-JIMENEZ J, SAURA-CALIXTO F (2005) Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J Agric Food Chem* 53, 5036-5040.
- PIIRONEN V, SYVAOJA EL, VARO P, SALMINEN K, KOIVISTOINEN P (1986) Tocopherols and tocotrienols in cereal products from Finland. *Cereal Chem* 63, 78-81.
- PINZINO C, CAPOCCHI A, GALLESCHI L, SAVIOZZI F, NANNI B, ZANDOMENEGHI M (1999) Aging, free radicals, and antioxidants in wheat seeds. *J Agric Food Chem* 47, 1333-1339.
- POOL-ZOBEL B, BUB A, MULLER H, WOLLOWSKI I, RECHKEMMER G (1997) Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 18, 1847-1850.
- PULLAKHANDAM R, FAILLA ML (2007) Micellarization and intestinal cell uptake of β -carotene and lutein from drumstick (*Moringa oleifera*) leaves. *J Med Food* 10, 252-257.
- QUACKENBUSH FW, DYER MA, SMALLIDGE RL (1970) Analysis for carotenes and xanthophylls in dried plant materials. *J Assoc Off Anal Chem* 53, 181-185.
- QUACKENBUSH FW, FIRCH JG, RABOURN WJ, MCQUISTAN M, PETZOLD EN, KARGL TE (1961) Analysis of carotenoids in corn grain. *J Agric Food Chem* 9, 132-135.
- QURESHI AA, MO H, PACKER L, PETERSON DM (2000) Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *J Agric Food Chem* 48, 3130-3140.
- QURESHI N, QURESHI AA (1993) Tocotrienols: Novel hypocholesterolemic agents with antioxidant properties. In: Packer L and Fuchs J (Eds.) *Vitamin E in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York,
- RAMAKRISHNAN TV, FRANCIS FJ (1980) Carotenoid-protein complexes and their stability towards oxygen and radiation. *Environ Exp Bot* 20, 1-6.
- REBOUL E, ABOU L, MIKAIL C, GHIRINGHELLI O, ANDRE M, PORTUGAL H, JOURDHEUIL-RAHMANI D, AMIOT MJ, LAIRON D, BOREL P (2005a) Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J* 387, 455-461.
- REBOUL E, BOREL P, MIKAIL C, ABOU L, CHARBONNIER M, CARIS-VEYRAT C, GOUPY P, PORTUGAL H, LAIRON D, AMIOT M-J (2005b) Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and beta-carotene bioavailability in men. *J Nutr* 135, 790-794.
- REBOUL E, KLEIN A, BIETRIX F, GLEIZE B, MALEZET-DESMOULINS C, SCHNEIDER M, MARGOTAT A, LAGROST L, COLLET X, BOREL P (2006a) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem* 281, 4739-4745.
- REBOUL E, RICHELLE M, PERROT E, DESMOULINS-MALEZET C, PIRISI V, BOREL P (2006b) Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem* 54, 8749-8755.
- RICH G, BAILEY A, FAULKS R, PARKER M, WICKHAM M, FILLERY-TRAVIS A (2003a) Solubilization of carotenoids from carrot juice and spinach in lipid phases: I. Modeling the gastric lumen. *Lipids* 38, 933-945.

- RICH G, FAULKS R, WICKHAM M, FILLERY-TRAVIS A (2003b) Solubilization of carotenoids from carrot juice and spinach in lipid phases: II. Modeling the duodenal environment. *Lipids* 38, 947-956.
- RICH G, FILLERY-TRAVIS A, PARKER M (1998) Low pH enhances the transfer of carotene from carrot juice to olive oil. *Lipids* 33, 985-992.
- RISO P, BRUSAMOLINO A, CIAPPELLANO S, PORRINI M (2003) Comparison of lutein bio-availability from vegetables and supplement. *Int J Vitam Nutr Res* 73, 201-205.
- RODRIGUEZ-AMAYA DB (1993) Stability of carotenoids during the storage of foods. *Dev Food Sci* 33, 591-628.
- RODRIGUEZ-AMAYA DB (1999) Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Arch Latinoam Nutr* 49, 38S-47S.
- RODRIGUEZ-AMAYA DB (2001) A guide to carotenoid analysis in foods, ILSI Press, Washington DC.
- RODRIGUEZ-AMAYA DB (2002) Effects of processing and storage on food carotenoids. *Sight and life newsletter* 3, 25-35.
- ROODENBURG AJ, LEENEN R, VAN HET HOF KH, WESTSTRATE JA, TIJBURG LB (2000) Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr* 71, 1187-1193.
- RYAN L, O'CONNELL O, O'SULLIVAN L, AHERNE S, O'BRIEN N (2008) Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods Hum Nutr* 63, 127-133.
- SALEH MH, TAN B (1991) Separation and identification of cis/trans carotenoid isomers. *J Agric Food Chem* 39, 1438-1443.
- SANDER LC, SHARPLESS KE, PURSCH M (2000) C30 Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 880, 189-202.
- SASHIDHAR RB, CAPOOR AK, RAMANA D (1994) Quantitation of e-amino group using amino acids as reference standards by trinitrobenzenesulfonic acid. A simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio. *J Immunol Methods* 167, 121-127.
- SATAKE K, OKUYAMA T, OHASHI M, SHINODA T (1960) The spectrophotometric determination of amines, amino acids, and peptides with 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid. *J Biochem* 47, 654-660.
- SAURA-CALIXTO F, GARCIA-ALONSO A, GONI I, BRAVO L (2000) In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *J Agric Food Chem* 48, 3342-3347.
- SCHALCH W (1999) Lutein und Zeaxanthin, die Carotinoide des gelben Flecks in der Netzhaut des menschlichen Auges. *Ernährung/Nutrition* 23, 53-57.
- SCHALCH W, COHN W, BARKER FM, KOPCKE W, MELLERIO J, BIRD AC, ROBSON AG, FITZKE FF, VAN KUIJK FJ (2007) Xanthophyll accumulation in the human retina during supplementation with lutein or zeaxanthin - the LUXEA (LUtein Xanthophyll Eye Accumulation) study. *Arch Biochem Biophys* 458, 128-135.

- SCHIEBER A, CARLE R (2008) Stability of carotenoids in vegetables, fruits, functional foods, and dietary supplements with particular reference to *trans-cis*-isomerization. In: Culver CA and Wrolstad RE (Eds.) *Color quality of fresh and processed foods*. American Chemical Society, Washington, USA, 140-150.
- SCHIERLE J, HÄRDI W, FACCIN N, BÜHLER I, SCHÜEP W (1995) Geometrical isomers of β,β -carotene. In: Britton G, Liaaen-Jensen S and Pfander H (Eds.) *Carotenoids, Volume 1A: Isolation and analysis*. Birkhäuser Verlag, Basel, 265-272.
- SCHLATTERER J, BREITHAUPT DE (2006) Xanthophylls in commercial egg yolks: quantification and identification by HPLC and LC-(APCI)MS using a C30 phase. *J Agric Food Chem* 54, 2267-2273.
- SCHMIDT Y (2007) Der Urnudel auf der Spur. <http://www.mdr.de/lexi-tv/essen-trinken/6855212.html>, Stand 16.11.2009.
- SCHUDEL P, MAYER H, ISLER O (1972) Chemistry. In: Sebrell J, W. H. and Harris RS (Eds.) *The vitamins: chemistry, physiology, pathology, methods Volume V*. Academic Press, New York, London, 168-218.
- SCOTT KJ (1992) Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chem* 45, 357-364.
- SCOTT KJ, FINGLAS PM, SEALE R, HART DJ, DE FROIDMONT-GORTZ I (1996) Interlaboratory studies of HPLC procedures for the analysis of carotenoids in foods. *Food Chem* 57, 85-90.
- SEDDON JM, AJANI UA, SPERDUTO RD, HILLER R, BLAIR N, BURTON TC, FARBER MD, GRAGOUDAS ES, HALLER J, ET AL. (1994) Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *J Amer Med Assoc* 272, 1413-1420.
- SEIBEL W, ZWINGELBERG H (1989) Farbveränderung bei der Verarbeitung von Durumweizen. *Getreide Mehl Brot* 43, 71-76.
- SEIBEL W, ZWINGELBERG H (1997) Besondere Verarbeitungseigenschaften von Winterdurumweizen - 2. Teil: Studien zur Farbstabilität von Teigwaren. *Getreide Mehl Brot* 51, 183-187.
- SERPEN A, GÖKMEN V, KARAGÖZ A, KÖKSEL H (2008) Phytochemical quantification and total antioxidant capacities of emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and einkorn (*Triticum monococcum* L.) wheat landraces. *J Agric Food Chem* 56, 7285-7292.
- SERRANO J, GONI I, SAURA-CALIXTO F (2005) Determination of β -carotene and lutein available from green leafy vegetables by an in vitro digestion and colonic fermentation method. *J Agric Food Chem* 53, 2936-2940.
- SEYBOLD C, FRÖHLICH K, BITSCH R, OTTO K, BÖHM V (2004) Changes in contents of carotenoids and vitamin E during tomato processing. *J Agric Food Chem* 52, 7005-7010.
- SHARONI Y, DANILENKO M, DUBI N, BEN-DOR A, LEVY J (2004) Carotenoids and transcription. *Arch Biochem Biophys* 430, 89-96.
- SHEPPARD AJ, PENNINGTON JAT, WEIHRAUCH JL (1993) Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. In: Packer L and Fuchs J (Eds.) *Vitamin E in health and disease*. Marcel Dekker Inc., New York,

- SHI XM, CHEN F (1997) Stability of lutein under various storage conditions. *Nahrung* 41, 38-41.
- SHIN T-S, GODBER JS (1994) Isolation of four tocopherols and four tocotrienols from a variety of natural sources by semi-preparative high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 678, 49-58.
- SIES H, STAHL W (2003) Non-nutritive bioactive constituents of plants: lycopene, lutein and zeaxanthin. *Int J Vitam Nutr Res* 73, 95-100.
- SIMMONDS DH (1972) Wheat-grain morphology and its relationship to dough structure. *Cereal Chem* 49, 324-335.
- SLOVER HT, LEHMANN J, VALIS RJ (1969) Nutrient composition of selected wheats and wheat products. III. Tocopherols. *Cereal Chem* 46, 635-641.
- SOUTHON S, FAULKS R (2002) Measuring the bioavailability of anti-oxidants: the method determines the answer. *Free Radic Res* 36, 3-5.
- SUBAGIO A, MORITA N, SAWADA S (1998) Thermal isomerization of all-trans-lutein in a benzene solution. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 2453-2456.
- SUBAGIO A, WAKAKI H, MORITA N (1999) Stability of lutein and its myristate esters. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 1784-1786.
- TAHA SA, SAGI F (1987) Relationships between chemical composition of durum wheat semolina and macaroni quality. II. Ash, carotenoid pigments and oxidative enzymes. *Cereal Res Commun* 15, 123-129.
- TESORIERE L, FAZZARI M, ANGILERI F, GENTILE C, LIVREA MA (2008) In vitro digestion of beta-lainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and anti-oxidative potential of food digesta. *J Agric Food Chem* 56, 10487-10492.
- TESTER RF, MORRISON WR (1990) Swelling and gelatinization of cereal starches. I. Effects of amylopectin, amylose, and lipids. *Cereal Chem* 67, 551-557.
- THAKKAR SK, FAILLA ML (2008) Bioaccessibility of pro-vitamin A carotenoids is minimally affected by non pro-vitamin A xanthophylls in maize (*Zea mays* sp.). *J Agric Food Chem* 56, 11441-11446.
- THAKKAR SK, HUO T, MAZIYA-DIXON B, FAILLA ML (2009) Impact of style of processing on retention and bioaccessibility of β -carotene in cassava (*Manihot esculanta*, Crantz). *J Agric Food Chem* 57, 1344-1348.
- THAKKAR SK, MAZIYA-DIXON B, DIXON AGO, FAILLA ML (2007) β -Carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to β -carotene content in different genotypes of cassava. *J Nutr* 137, 2229-2233.
- THOMPSON JN, HATINA G (1979) Determination of tocopherols and tocotrienols in foods and tissues by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* 2, 327-344.
- TOEPFER EW, POLANSKY MM, EHEART JF, SLOVER HT, MORRIS ER, HEPBURN FN, QUACKENBUSH FW (1972) Nutrient composition of selected wheats and wheat products. XI. Summary. *Cereal Chem* 49, 173-186.
- TRABER MG, SIES H (1996) Vitamin E in Humans: Demand and Delivery. *Annu Rev Nutrition* 16, 321-317.

- TRANQUILLI G, LIJAVETZKY D, MUZZI G, DUBCOVSKY J (1999) Genetic and physical characterization of grain texture-related loci in diploid wheat. *Mol Gen Genet* 262, 846-850.
- TRIESCHMANN M, BEATTY S, NOLAN JM, HENSE HW, HEIMES B, AUSTERMANN U, FOBKER M, PAULEIKHOFF D (2007) Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: the LUNA study. *Exp Eye Res* 84, 718-728.
- TRONO D, PASTORE D, DI FONZO N (1999) Carotenoid dependent inhibition of durum wheat lipoxygenase. *J Cereal Sci* 29, 99-102.
- TSCHEUSCHNER H-D (1996) Grundzüge der Lebensmitteltechnik. Behr's Verlag, Hamburg.
- TYDEMAN E, WICKHAM M, FAULKS R, PARKER M, WALDRON K, FILLERY-TRAVIS A, GIDLEY M (2001) β -carotene release from carrot during digestion is modulated by plant structures. *Special Publication - Royal Society of Chemistry* 269, 429-432.
- TYSSANDIER V, LYAN B, BOREL P (2001) Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *BBA - Mol Cell Biol L* 1533, 285-292.
- TYSSANDIER V, REBOUL E, DUMAS JF, BOUTELOUP-DEMANGE C, ARMAND M, MARCAND J, SALLAS M, BOREL P (2003) Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G913-923.
- TZEN JT, HUANG AH (1992) Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol* 117, 327-335.
- UEDA T, IGARASHI O (1987) Effect of coexisting fat on the extraction of tocopherols from tissues after saponification as a pretreatment for HPLC determination. *J Micronutr Anal* 3, 15-25.
- UEDA T, IGARASHI O (1990) Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC - pretreatment of samples and extraction of tocopherols. *J Micronutr Anal* 7, 79-96.
- UPDIKE AA, SCHWARTZ SJ (2003) Thermal processing of vegetables increases cis isomers of lutein and zeaxanthin. *J Agric Food Chem* 51, 6184-6190.
- VAN BREEMEN RB, HUANG C-R, TAN Y, SANDER LC, SCHILLING AB (1996) Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom* 31, 975-981.
- VAN HET HOF KH, WEST CE, WESTSTRATE JA, HAUTVAST JG (2000) Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130, 503-506.
- VERSANTVOORT CHM, OOMEN AG, VAN DE KAMP E, ROMPELBERG CJM, SIPS AJAM (2005) Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol* 43, 31-40.
- VERSANTVOORT CHM, ROMPELBERG CJM, SIPS AJAM (2000) Methodologies to study human intestinal absorption. A review., RIVM report 630030001, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Niederlande.
- VISHNEVETSKY M, OVADIS M, VAINSTEIN A (1999) Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci* 4, 232-235.

- WALSH DE, YOUNGS VL, GILLES KA (1970) Inhibition of durum wheat lipoxidase with L-ascorbic acid. *Cereal Chem* 47, 119-125.
- WANG W, CONNOR SL, JOHNSON EJ, KLEIN ML, HUGHES S, CONNOR WE (2007) Effect of dietary lutein and zeaxanthin on plasma carotenoids and their transport in lipoproteins in age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr* 85, 762-769.
- WATZL B, BUB A (2001) Carotinoide. *Ernährungs-Umschau* 48, 71-74.
- WENNERMARK BH, JÄGERSTAD M (1992) Breadmaking and storage of various wheat fractions affect vitamin E. *J Food Sci* 57, 1205-1209.
- WENZEL M, SEUSS-BAUM I, SCHLICH E (2010) Influence of pasteurization, spray- and freeze-drying, and storage on the carotenoid content in egg yolk. *J Agric Food Chem* 58, 1726-1731.
- WHITE DA, FISK ID, GRAY DA (2006) Characterisation of oat (*Avena sativa* L.) oil bodies and intrinsically associated E-vitamins. *J Cereal Sci* 43, 244-249.
- WHITE DA, FISK ID, MAKKHUN S, GRAY DA (2009) In vitro assessment of the bioaccessibility of tocopherol and fatty acids from sunflower seed oil bodies. *J Agric Food Chem* 57, 5720-5726.
- WIDICUS WA, KIRK JR (1981) Storage stability of α -tocopherol in a dehydrated model food system containing methyl linoleate. *J Food Sci* 46, 813-816.
- WIDICUS WA, KIRK JR, GREGORY JF (1980) Storage stability of α -Tocopherol in a dehydrated model food system containing no fat. *J Food Sci* 45, 1015-1018.
- WILDFEUER I, ACKER L (1968) Carotenoid determination in baked goods and in their raw materials. *Mitt Geb Lebensm Hyg* 59, 392-400.
- WRIGHT AJ, PIETRANGELO C, MACNAUGHTON A (2008) Influence of simulated upper intestinal parameters on the efficiency of beta carotene micellarization using an in vitro model of digestion. *Food Chem* 107, 1253-1260.
- WYATT CJ, PEREZ CARBALLIDO S, MENDEZ RO (1998) α - and γ -tocopherol content of selected foods in the mexican diet: effect of cooking losses. *J Agric Food Chem* 46, 4657-4661.
- YEUM K-J, RUSSELL RM (2002) Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr* 22, 483-504.
- YONEKURA L, NAGAO A (2007) Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51, 107-115.
- YOUNG AJ, LOWE GM (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 385, 20-27.
- ZANDOMENEGHI M, FESTA C, CARBONARO L, GALLESCHI L, LENZI A, CALUCCI L (2000) Front-surface absorbance spectra of wheat flour: determination of carotenoids. *J Agric Food Chem* 48, 2216-2221.
- ZARIPHEH S, ERDMAN JW, JR. (2002) Factors that influence the bioavailability of xanthophylls. *J Nutr* 132, 531S-534S.

- ZECHMEISTER L (1944) Cis-trans isomerization and stereochemistry of carotinoids and diphenylpolyenes. *Chem Rev* 34, 267-344.
- ZHOU J-R, GUGGER ET, ERDMAN JW, JR. (1996) The crystalline form of carotenes and the food matrix in carrot root decrease the relative bioavailability of beta- and alpha-carotene in the ferret model. *J Am Coll Nutr* 15, 84-91.
- ZIGERLIG C (2006) AW-Wertmessung, Wasseraktivität von Lebensmitteln. *L & B* 2, 46-47.

ANHANG A: GERÄTE UND CHEMIKALIEN

A.1 Verzeichnis der verwendeten Geräte

Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage MC1 Analytic AC 210 S (Sartorius, Göttingen)
 Apparatur zur Probenaufkonzentrierung (Jüke Systemtechnik, Altenberge)
 Gefriertrocknungsanlage Beta 1-8K (Christ, Osterode)
 Heißextraktionsapparatur Soxtherm 2000 automatic (C. Gerhardt, Königswinter)
 Labormühle A10 (IKA Labortechnik, Staufen)
 Labormühle Grindomix GM 200 (Retsch, Haan)
 pH-Meter Microprocessor pH 537 (WTW, Weilheim)
 pH-Meter CG 840 (Schott Instruments, Mainz)
 Präzisionswaage MC1 Research RC 210 P (Sartorius, Göttingen)
 Reagenzglasschüttler MS 2 Minishaker (IKA Labortechnik, Staufen)
 Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
 Rotationsverdampfer Rotavapor R-124 und Wasserbad B-480 (Büchi, Flawil, Schweiz) mit
 Vakuumpumpe MZ-2C (Vacuubrand, Wertheim)
 Schüttel-Inkubator ES-20 (Peqlab, Erlangen)
 Schüttelwasserbad GFL 1086 (GFL, Burgwedel)
 Spektralphotometer V 530 (Jasco, Groß-Umstadt)
 Trockenschrank VT 6130 M (Heraeus Instruments, Hanau)
 Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin, Berlin)
 Ultra-Turrax T 25 mit Dispergierstäben S25N-18G und S25N-8G (IKA-Labortechnik, Staufen)
 Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K mit Rotor Typ 50.4 Ti (Beckman Instruments, Krefeld)
 Wasserbad (GFL, Burgwedel)
 Zentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)
 Zentrifuge Labofuge 400R mit Rotor 8179 (Heraeus Instruments, Hanau)
 Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen)

Präparative HPLC

Pumpe: L-7100 (Merck, Darmstadt)
 UV-Detektoren: Lambda 1000 (Bischoff, Leonberg)
 Knauer variable wavelength monitor (Knauer, Berlin)
 Integrator: Chromatopac C-R6A (Shimadzu, Duisburg)
 Säulentermostat: Jetstream (Jasco, Groß-Umstadt)

 Trennsäule: C₃₀: 300 × 10 mm, 5 µm (YMC Europe, Dinslaken)
 Vorsäule: C₁₈: ProntoSil 120-5-C18H; 10 x 4,0 mm, 5 µm (Bischoff, Leonberg)

Analytische HPLC – Carotinoide

	<u>Merck (Darmstadt)</u>	und	<u>Jasco (Groß-Umstadt)</u>
Autosampler:	AS-2000A		AS-1555-10 (gekühlt auf 10 °C)
Pumpe:	L-6200 A		PU-1580
Gradientsystem:	-		LG-1580-02
PDA-Detektor:	L-4500		MD-1510
Interface:	D-6000		LC-Net II / ADC
Temperierung:	Säulenofen CTO-10AC (Shimadzu, Duisburg)		Säulentermostat Jetstream Entgaser DG-1580-53
Software:	D-6500 DAD System Manager		Borwin

Trennsäulen:

YMC C₃₀: Carotenoid S-5µm; 250 x 4,6 mm; 5 µm (YMC Europe, Dinslaken)
 Trentec Vertex-C₃₀: Stability 100 C30; 250 x 4,6 mm; 5 µm (Trentec, Rutesheim)
 Trentec PEEK-C₃₀: Stability 100 C30; 250 x 4,6 mm; 5 µm (Trentec, Rutesheim)

Vorsäulen:

C₁₈: ProntoSil 120-5-C18H; 10 x 4,0 mm; 5 µm (Bischoff, Leonberg)
 C₁₈: VYDAC 201 GD54SP; 10 x 4,0 mm; 5 µm (MZ-Analysentechnik, Mainz)

Analytische HPLC – Vitamin E

Merck (Darmstadt)

Autosampler: AS-2000A
 Pumpe: L-6200A
 Fluoreszenz-Detektor: F-1080
 Interface: D-6000
 Säulenofen: L-5025
 Software: D-7000 HPLC System Manager

Trennsäule: Knauer Eurospher-100 DIOL; 250 x 4,0 mm; 7 µm (Knauer, Berlin)
 Vorsäule: Knauer Eurospher-100 DIOL; 5 x 4,0 mm; 7 µm (Knauer, Berlin)

HPLC-MS/MS

HPLC: Shimadzu (Duisburg)

Autosampler SIL-10AD _{VP}	mobile Phase:	MeOH/H ₂ O (97/3, v/v)
Pumpe LC-20AB	Laufzeit:	45 min, isokratisch
Entgaser DGU-20A ₃	Flussrate:	1,3 ml/min
Säulenofen CTO-10AS _{VP}	Säulentemperatur:	19 ± 1 °C
Controller CBM-10A	Injektionsvolumen:	50 µl

MS: API 2000 von Applied Biosystems (Darmstadt)

Software: Analyst 1.5	TEM (°C):	450
Ionisierung: APCI, positiver Modus	CUR (psi):	50
DP (V): 80	GS1 (psi):	60
FP (V): 300	GS2 (psi):	70
EP (V): 10	NC (µA):	1

Trennsäule: Trentec PEEK-C₃₀: Stability 100 C30; 250 x 4,6 mm; 5 µm; (Trentec, Rutesheim)
 Vorsäule: C₁₈: VYDAC 201 GD54SP; 10 x 4,0 mm, 5 µm (MZ-Analysentechnik, Mainz)
 Vakuumpumpe: HS602 (Varian, Darmstadt)
 Stickstoffmembran-Generator: NGM-11-LC/MS (CMC Instruments, Eschborn)

A.2 Verzeichnis der verwendeten Arbeitsmittel

Indikatorpapier, pH 1-14 (Merck, Darmstadt)

Prüfsiebe 0,1 mm; 0,2 mm; 0,5 mm; 1 mm; 2 mm

Kolbenhubpipetten:

Transferpette 5-50 µl, 10-100 µl, 20-200µl, 50-250 µl, 100-1000 µl (Brand, Wertheim)
 Research (variable) 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
 Reference (variable) 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
 Multipette Plus (Eppendorf, Hamburg)
 Nichipet Ex 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl (Nichiryo, Tokyo, Japan)

Carotinoid-Analytik

Braunglas-Rundkolben (250 ml)
 Braunglas-Spitzkolben (50 ml)
 Braunglas-V-Vials
 Büchnertrichter
 Erlenmeyerkolben (50 ml)
 Glasküvetten, 1 cm Schichtdicke (zur Konzentrationsbestimmung der Standards)
 Maßkolben (5 ml)
 Pasteurpipetten
 Reaktionsgefäße (1,5 ml)
 Rundfilter Nr. 390 (Filtrak, Niederschlag)
 Vakuum-Saugflasche

Vitamin-E-Analytik

Maßkolben (1 ml)
 Quarzküvetten, 1 cm Schichtdicke (zur Konzentrationsbestimmung der Standards)
 Zentrifugengläser (15 ml)
 Soxhlet-Extraktion: Siedesteinchen
 Cellulose-Extraktionshülsen 603, 33 x 80 mm (Whatman, Dassel)
 Seesand
 Watte
 weitere Arbeitsmittel analog Carotinoid-Analytik

***in-vitro*-Verdauung**

20-ml-Kunststoff-Spritzen (Henke-Sass Wolf, Tuttlingen)
 Erlenmeyerkolben (100 ml)
 Reaktionsgefäße (1,5 ml)
 Spritzenvorsatzfilter mit PP-Membran, 0,2 µm, Ø 25 mm (VWR, Darmstadt)
 Ultrazentrifugenröhrchen Ultra-Clear™ Tubes (13 x 64 mm) (Beckman Coulter, Krefeld)
 Zentrifugengläser (15 ml)
 Zentrifugengläser (90 ml)

Gelbpigment-Bestimmung

Erlenmeyerkolben (50 ml, 100 ml) mit Schliffstopfen
 Faltenfilter QL 115, 185 mm (Fisher Scientific, Schwerte)
 Glasküvetten, 1 cm Schichtdicke
 Glastrichter
 Maßkolben (10 ml)

Trockenmassebestimmung

Aluminium-Schalen
 Exsikkator
 Glasstäbe
 Seesand (Merck, Darmstadt)

Aminosäuren-Bestimmung

Kunststoffküvetten, 1 cm Schichtdicke
 Maßkolben (10 ml)
 Pasteurpipetten
 Zentrifugengläser (15 ml)

Maltose/Glucose-Bestimmung

Kunststoffküvetten, 1 cm Schichtdicke
Maßkolben (10 ml)
Pasteurpipetten
Zentrifugengläser (15 ml)

Dünnschichtchromatographie

DC-Kammer
Kieselgelplatte Glas TLC silica Gel 60 F254 (Merck, Darmstadt)
UV-Gerät (CAMAG, Berlin)
Soxhlet-Extraktion: Siedesteinchen
Cellulose-Extraktionshülsen 603, 33 x 80 mm (Whatman, Dassel)
Seesand
Watte

A.3 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Lösungen

1-Butanol
Chloroform
Cyclohexan
Diethylether
Ethanol
Ethylacetat
Methanol
Methyl-*tert*-Butyl-Ether (MtBE)
n-Hexan
Petrolether
Tetrahydrofuran
HPLC-Wasser (Reinstwasser, 18 M Ω): MilliQ Synthesis A 10 (Millipore, Schwalbach)
Stickstoff 4.6

Carotinoid-Analytik

Standardsubstanzen: BASF (Ludwigshafen)
DSM Nutritional Products (Basel, Schweiz)
CaroteNature (Lupsingen, Schweiz)
- Stammlösungen 50-100 μ g/ml MeOH (Xanthophylle) bzw. Cyclohexan/Toluol (4/1, v/v) (Carotine), Lagerung bei -25 °C
- Arbeitslösungen durch Verdünnung der Stammlösungen 1:50 mit Ethanol (täglich frisch herzustellen)

Iod-Lösung (0,4 mg/ml):

- Iod, kristallin (Merck, Darmstadt)
- 25 mg Iod in 100 ml n-Hexan lösen

Magnesiumhydroxidcarbonat (Riedel-de Haën, Seelze)

*Butylhydroxytoluol (BHT; 2,6-Di-*tert*.-butyl-4-methylphenol)* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methanol/Tetrahydrofuran (1/1, v/v, + 0,1 % BHT)

Natriumsulfat, entwässert (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methanolische KOH-Lösung (10 %):

- Kaliumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
- 5 g KOH in 50 ml HPLC-Wasser lösen

Enzymatischer Aufschluss mit Pepsin

Pepsin-Lösung (20 mg/ml):

- Pepsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Salzsäure (0,1 M)
- 1 g Pepsin in 50 ml 0,1 M HCl lösen, Lösung im Kühlschrank aufbewahren

1 M HCl / 0,1 M HCl:

- Salzsäure, 32 % (Merck, Darmstadt) 1:10 bzw. 1:100 mit HPLC-Wasser verdünnen

NaOH (2 g/100 ml):

- Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck, Darmstadt), in HPLC-Wasser lösen

Enzymatischer Aufschluss mit α -Amylase

Amylase-Lösung (20 mg/ml):

- α -Amylase (EC 3.2.1.1) from *Aspergillus oryzae*, 208 U/mg Protein (A6211, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 0,2 g Amylase in 10 ml HPLC-Wasser lösen (Ultraschall), Lagerung im Kühlschrank

Puffer-Lösung (pH 6,9):

- Kaliumdihydrogenphosphat (Acros Organics, Geel, Belgien)
- di-Natriumhydrogenphosphat (Fluka, Buchs, Schweiz)
- 0,45365 g KH_2PO_4 /50 ml Wasser mit 0,59350 g Na_2HPO_4 /50 ml Wasser mischen

Vitamin-E-Analytik

Standardsubstanzen: Tocopherole (Calbiochem, Darmstadt)

Tocotrienole (Calbiochem, Darmstadt; Davos Life Science, Singapur)

α -Tocopherolacetat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

- Stammlösungen T und T3 ca. 1 mg/ml Ethanol, Stammlösung α -TAC ca. 5 mg/ml, Lagerung bei -25 °C
- Arbeitslösungen T und T3 durch Verdünnung der Stammlösungen 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 und 1:5000 mit mobiler Phase, α -TAC 1:100 verdünnen (täglich frisch herzustellen)

KOH-Lösung (10 % und 60 %):

- Kaliumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
- 5 g KOH bzw. 30 g KOH in 50 ml HPLC-Wasser lösen

NaCl-Lösung (10 g/l Wasser):

- Natriumchlorid (Riedel-de Haën, Seelze)

Pyrogallol-Lösung (60 g/l Ethanol)

- Pyrogallol (Riedel-de Haën, Seelze)

Weitere Reagenzien siehe Carotinoid-Analytik

***in-vitro*-Verdauung**

NaCl-Lösung (0,9 %) mit Pyrogallol (12,6 mg/ml):

- NaCl (Riedel-de Haën, Seelze)
- Pyrogallol (Riedel-de Haën, Seelze)
- 1,80 g NaCl + 2,52 g Pyrogallol in 200 ml HPLC-Wasser lösen, an jedem Analysentag frisch herzustellen

Amylase-Lösung (20 mg/ml)

- α -Amylase (EC 3.2.1.1) from *Aspergillus oryzae*, 208 U/mg Protein (A6211, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 0,2 g Amylase in 10 ml HPLC-Wasser lösen (Ultraschall), Lagerung im Kühlschrank

0,1 M HCl

- Salzsäure, 32 % (Merck, Darmstadt) 1:100 mit HPLC-Wasser verdünnen

Pepsin-Lösung (40 mg/ml):

- Pepsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Salzsäure (0,1 M)
- 0,4 g Pepsin in 10 ml 0,1 M HCl lösen, Lagerung im Kühlschrank

0,1 M NaHCO₃:

- Natriumhydrogencarbonat (Riedel-de Haën, Seelze)
- 0,84 g NaHCO₃ in 100 ml HPLC-Wasser lösen

Lösung mit Pankreatin (2 mg/ml) und Galleextrakt (12 mg/ml):

- Pancreatin from porcine pancreas (P7545, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Bile extract porcine (B8631, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 0,1 g Pancreatin + 0,6 g Bile extract in 50 ml 0,1 M NaHCO₃ lösen
- Lösung vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtrieren

Lösung mit Galleextrakt (0,1 g/ml):

- 2 g Bile extract porcine (B8631, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 20 ml 0,1 M NaHCO₃ lösen
- Lösung vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtrieren

Gelbpigment-Bestimmung

Wassergesättigtes 1-Butanol (wBuOH):

- 6 Teile 1-Butanol mit 1 bis 2 Teilen Wasser in einem Scheidetrichter mischen, nach der Phasentrennung obere klare Phase verwenden

Lutein-Kalibrierlösungen:

- aus (*all-E*)-Lutein-Stammlösung (50-100 μ g/ml) eine Lösung mit 50 μ g/10 ml wBuOH herstellen
- aus dieser Lösung eine Verdünnungsreihe mit 2,5 / 5,0 / 7,5 / 10,0 / 12,5 μ g Lutein/10 ml wBuOH herstellen

Aminosäuren-Bestimmung

NaHCO₃-Lösung (4 %):

- Natriumhydrogencarbonat (Riedel-de Haën, Seelze)
- 4 g in 100 ml Wasser lösen

SDS (10 %):

- Natriumdodecylsulfat (Fluka, Buchs, Schweiz)
- 10 g in 100 ml Wasser lösen

TNBS (0,01 %):

- 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure 5 % (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- TNBS 1:500 mit NaHCO₃-Lösung verdünnen, unmittelbar vor der Analyse herstellen

1 M HCl / 0,1 M HCl:

- Salzsäure, 32 % (Merck, Darmstadt) 1:10 bzw. 1:100 mit HPLC-Wasser verdünnen

Ethanol/0,1 M HCl (1/1, v/v)

Glutaminsäure-Kalibrierlösungen:

- L-Glutaminsäure, minimum 99 % (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Stammlösung (1 mg/ml): L-Glutaminsäure in Ethanol/0,1 M HCl (1/1, v/v) lösen
- 1. Verdünnung (0,05 mg/ml): Stammlösung mit Ethanol/0,1 M HCl (1/1, v/v) verdünnen
- aus der 1. Verdünnung Kalibrierlösungen mit 2, 5, 10 und 20 µg/ml herstellen
-

Maltose/Glucose-Bestimmung

Hexokinase/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

- Suspension unverdünnt verwenden (entspricht 2 mg HK/ml, 1 mg G6P-DH/ml)

α-Glucosidase:

- aus *Saccharomyces cerevisiae*, Aktivität ≥ 10 U/mg Protein (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 105,26 mg in 1 ml HPLC-Wasser lösen
- Lösung vor der Verwendung 1:20 mit HPLC-Wasser verdünnen

NADP-Lösung (ca. 11,5 mmol/l):

- Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat-Dinatriumsalz, ca. 98 % (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- 60 mg NADP-Na₂ in 6 ml Wasser lösen

ATP-Lösung (ca. 81 mmol/l):

- Adenosin-5'-triphosphat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Natriumhydrogencarbonat (Riedel-de Haën, Seelze)
- 300 mg ATP-Na₂H₂ und 300 mg NaHCO₃ in 6 ml Wasser lösen

Acetat-Puffer (0,1 mol/l, pH 6,6):

- Natriumacetat-Trihydrat (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure (Merck, Darmstadt)
- 0,68 g Natriumacetat · 3 H₂O in 40 ml Wasser lösen, mit ca. 0,5 ml Essigsäure (0,1 mol/l) auf pH 6,6 einstellen, mit Wasser auf 50 ml auffüllen

Triethanolamin-Puffer (0,75 mol/l, pH 7,6) :

- Triethanolamin-Hydrochlorid (Merck, Darmstadt)
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)

- 14 g Triethanolamin-Hydrochlorid und 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 80 ml Wasser lösen, mit ca. 5 ml NaOH (5 mol/l) pH 7,6 einstellen, auf 100 ml mit Wasser auffüllen

Dünnschichtchromatographie

Laufmittel:

- n-Hexan/Diethylether/Eisessig (80/20/1, v/v/v)

Sprühreagenz:

- 2',7'-Dichlorfluoreszein (Fluka,Buchs, Schweiz); 0,2 % in Ethanol

Mischstandard (PhL, Chol, FFS, TAG, FAME, CE):

- 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine (Larodon fine chemicals)
- Cholesterin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Magaric acid (C17), 99% (Sigma- Aldrich, Taufkirchen)
- Tripalmitin, ca 90% (Sigma- Aldrich, Taufkirchen)
- Palmitinsäuremethylester, 99% (Sigma- Aldrich, Taufkirchen)
- Cholesterylpalmitat, 91% (Sigma- Aldrich, Taufkirchen)
- Stammlösung: Standardgemisch mit 60 mg/ml in Chloroform, Lagerung im Kühlschrank

ANHANG B: ANALYSENDATEN

Tab. A 1: Übersicht über die verwendeten Vollkorn-Getreide und Grieße

	Bezeichnung	Herkunft	Bemerkungen
Hartweizen	sortenreine Vollkorn-Getreide		
	Prowidur 1	MRI, Detmold	Ernte 2001
	Prowidur 2	MRI, Detmold	Ernte 2002
	Prowidur 3	MRI, Detmold	Ernte 1999
	Orjaune	MRI, Detmold	Ernte 2002
	Topdur	MRI, Detmold	Ernte 1999
	Heradur	MRI, Detmold	Ernte 1999
	Lloyd 1	MRI, Detmold	Ernte 2001
	Lloyd 2	MRI, Detmold	Ernte 2002
	Duramar	MRI, Detmold	Ernte 2007
	Durabon	MRI, Detmold	Ernte 2007
	Kombo	MRI, Detmold	Ernte 2007
	Grieße		
	Aurora	Supermarkt	
	Frießinger	Supermarkt	
Weltgold	Supermarkt		
Weichweizen	Weichweizen 1	MRI, Detmold	
	Weichweizen 2	Bauernhof	
	Weichweizen 3	Reformhaus	Bio-Getreide
	Weichweizen 4	MRI, Detmold	Sorte Tiger, Ernte 2007
	Weichweizen 5	MRI, Detmold	Sorte Tommi, Ernte 2001
	Purpurweizen 1	Saatbau Linz	weißmehlig
	Purpurweizen 2	Saatbau Linz	gelbmehlig
	Gelbweizen 1	MRI, Detmold	
Gelbweizen 2	MRI, Detmold	Sorte Luteus, Ernte 2007	
weitere Weizenarten	Emmer 1	MRI, Detmold	
	Emmer 2	MRI, Detmold	Zuchtstamm, Ernte 2007
	Emmer 3	MRI, Detmold	Zuchtstamm, Ernte 2007
	Emmer 4	MRI, Detmold	Zuchtstamm, Ernte 2007
	Einkorn	MRI, Detmold	
	Dinkel 1	Reformhaus	Bio-Getreide
	Dinkel 2	MRI, Detmold	Sorte Franckenkorn, Ernte 2007
	Dinkel 3	MRI, Detmold	Sorte Badengold, Ernte 2007
Dinkel 4	MRI, Detmold	Sorte Oberkulmer Rotkorn, Ernte 2007	
Roggen	Roggen 1	Bauernhof	
	Roggen 2	Reformhaus	Bio-Getreide
Hafer	Hafer	Reformhaus	Bio-Getreide
Mais	Maisgrieß	Supermarkt	
	Maismehl	Supermarkt	
	Mais (Vollkorn)	Auftragsprobe	

Tab. A 2: Zur Berechnung von Gesamt-Carotinoidgehalten verwendete Molmassen

Carotinoide	Molmasse [g/mol]
(<i>all-E</i>)-Lutein	568,85
(<i>all-E</i>)-Zeaxanthin	568,85
(<i>all-E</i>)-Canthaxanthin	564,86
(<i>all-E</i>)- β -Cryptoxanthin	552,85
(<i>all-E</i>)- α -Carotin	536,85
(<i>all-E</i>)- β -Carotin	536,85

Tab. A 3: Parameter zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der Carotinoide

Carotinoide	Lösungsmittel	λ_{\max} [nm]	($E_{1\text{cm}}^{1\%}$)
(<i>all-E</i>)-Neoxanthin ^a	Ethanol	437	2330
(<i>all-E</i>)-Violaxanthin ^a	Ethanol	440	2550
(<i>all-E</i>)-Antheraxanthin ^a	Ethanol	444	2350
(<i>all-E</i>)-Astaxanthin ^a	Ethanol	478	2100
(<i>all-E</i>)-Capsanthin ^b	Benzol	483	2072
(<i>all-E</i>)-Lutein ^b	Ethanol	445	2550
(<i>all-E</i>)-Zeaxanthin ^{b, c}	Ethanol	450	2540
(<i>all-E</i>)-Canthaxanthin ^c	Ethanol	466	2220
(<i>all-E</i>)- β -apo-8'-Carotinal ^c	Ethanol	457	2640
(<i>all-E</i>)- β -apo-8'-Carotinsäureethylester ^e	Cyclohexan	446	2540
(<i>all-E</i>)-Citranaxanthin ^e	Hexan	468	2745
(<i>all-E</i>)- β -Cryptoxanthin ^c	Ethanol	452	2386
(<i>all-E</i>)- α -Carotin ^c	Hexan	444	2800
(<i>all-E</i>)- β -Carotin ^c	Hexan	453	2592
(15 <i>Z</i>)- β -Carotin ^d	Hexan	447	1820
(13 <i>Z</i>)- β -Carotin ^d	Hexan	443	2090
(9 <i>Z</i>)- β -Carotin ^d	Hexan	445	2550
(<i>all-E</i>)-Lycopin ^c	Hexan	472	3450

^a BRITTON *et al.* 2004

^d SCHIERLE *et al.* 1995

^b BRITTON 1995b

^e NAUMANN und BASSLER 1976

^c OLMEDILLA *et al.* 1990

Tab. A 4: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Xanthophylle für die isokratische Elutionsmethode (Trentec PEEK-C30-Analysensäule, 250 x 4,6 mm, 5 μm)

Carotinoide	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/ml}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/ml}$]
(<i>all-E</i>)-Neoxanthin	0,011	0,038
(<i>all-E</i>)-Violaxanthin	0,013	0,042
(<i>all-E</i>)-Antheraxanthin	0,009	0,031
(<i>all-E</i>)-Astaxanthin	0,015	0,049
(<i>all-E</i>)-Capsanthin	0,013	0,042
(<i>all-E</i>)-Lutein	0,013	0,044
(<i>all-E</i>)-Zeaxanthin	0,013	0,042
(<i>all-E</i>)-Canthaxanthin	0,019	0,063
(<i>all-E</i>)-Citanaxanthin	0,042	0,141
(<i>all-E</i>)- β -apo-8'-Carotinsäureethylester	0,033	0,111
(<i>all-E</i>)- β -Cryptoxanthin	0,033	0,110

Tab. A 5: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Carotinoide für die Gradientenmethode 1 (Trentec PEEK-C30-Analysensäule, 250 x 4,6 mm, 5 μm)

Carotinoide	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/ml}$]	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/ml}$]
(<i>all-E</i>)-Lutein	0,015	0,049
(<i>all-E</i>)-Zeaxanthin	0,016	0,053
(<i>all-E</i>)-Canthaxanthin	0,014	0,045
(<i>all-E</i>)- β -Cryptoxanthin	0,013	0,044
(<i>all-E</i>)- α -Carotin	0,020	0,065
(<i>all-E</i>)- β -Carotin	0,017	0,055
(15 <i>Z</i>)- β -Carotin	0,027	0,090
(13 <i>Z</i>)- β -Carotin	0,024	0,080
(9 <i>Z</i>)- β -Carotin	0,019	0,064
(<i>all-E</i>)-Lycopin	0,035	0,117

Tab. A 6: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Carotinoide für die Gradientenmethode 2 (Trentec Vertex-C30-Analysensäule, 250 x 4,6 mm; 5 µm)

Carotinoide	Nachweisgrenze [µg/ml]	Bestimmungsgrenze [µg/ml]
(<i>all-E</i>)-Lutein	0,019	0,062
(<i>all-E</i>)-Zeaxanthin	0,017	0,058
(<i>all-E</i>)-Canthaxanthin	0,016	0,055
(<i>all-E</i>)-β-Cryptoxanthin	0,018	0,059
(<i>all-E</i>)-α-Carotin	0,020	0,066
(<i>all-E</i>)-β-Carotin	0,035	0,117
(15 <i>Z</i>)-β-Carotin	0,032	0,108
(13 <i>Z</i>)-β-Carotin	0,027	0,089
(9 <i>Z</i>)-β-Carotin	0,017	0,058

Tab. A 7: Zur Berechnung von Vitamin E verwendete Molmassen der Tocochromanole

Tocochromanol	Molmasse [g/mol]
α-Tocopherol	430,72
β-Tocopherol	416,69
γ-Tocopherol	416,69
δ-Tocopherol	402,66
α-Tocotrienol	424,67
β-Tocotrienol	410,64
γ-Tocotrienol	410,64
δ-Tocotrienol	396,61

Tab. A 8: Absorptionsmaxima und spezifische Extinktionskoeffizienten der Tocopherole und Tocotrienole in Ethanol

Vitamin-E-Standardsubstanzen	λ _{max} [nm]	(E _{1cm} ^{1%})
α-Tocopherol ^{a, c}	292	75,8
β-Tocopherol ^{a, b, c}	296	89,4
γ-Tocopherol ^{a, b, c}	298	91,4
δ-Tocopherol ^{a, b}	298	87,3
α-Tocotrienol ^{a, b}	292,5	91,0
β-Tocotrienol ^{a, b}	294	87,3
γ-Tocotrienol ^{a, b}	296	90,5
δ-Tocotrienol ^{a, b}	297	88,1
α-Tocopherolacetat ^a	285	44,0

^a SCHUDEL *et al.* 1972, SHIN und GODBER 1994, FRANKE *et al.* 2007

^b KONINGS *et al.* 1996

^c EITENMILLER und LEE 2004b

Tab. A 9: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Tocopherole und Tocotrienole für Knauer Eurospher-100 DIOL-Analysensäule (250 x 4,0 mm; 7µm)

Vitamin-E-Standardsubstanzen	Nachweisgrenze [µg/ml]	Bestimmungsgrenze [µg/ml]
α-Tocopherol	0,032	0,105
β-Tocopherol	0,023	0,078
γ-Tocopherol	0,027	0,092
δ-Tocopherol	0,025	0,083
α-Tocotrienol	0,028	0,094
β-Tocotrienol	0,034	0,114
γ-Tocotrienol	0,027	0,090
δ-Tocotrienol	0,028	0,095

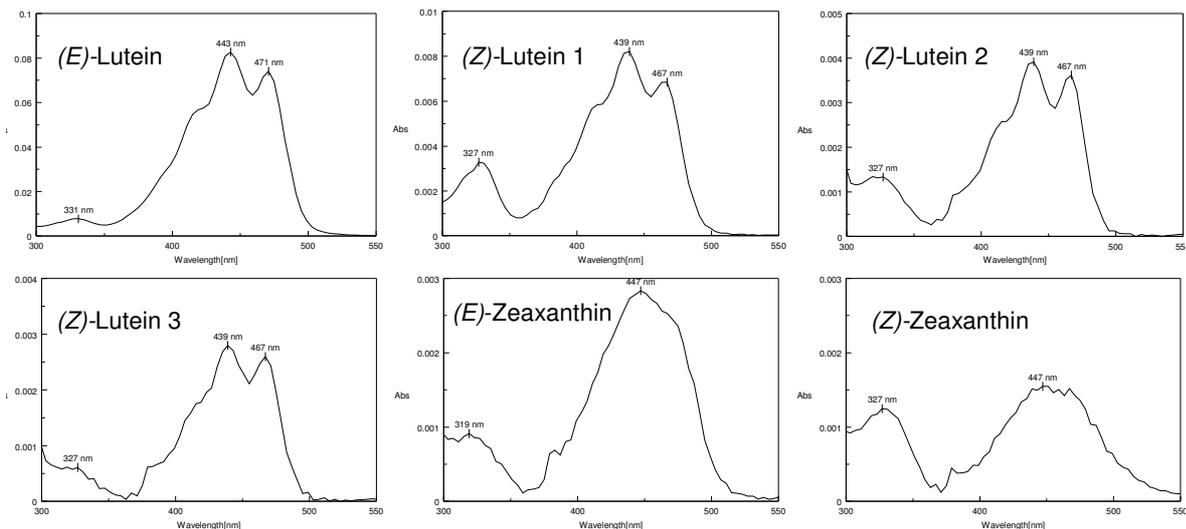


Abb. 61: PDA-Absorptionsspektren der Lutein- und Zeaxanthin-Isomere einer Teigware

Tab. A 10: Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur in Abhängigkeit von der Einweichzeit mit MeOH/THF (1/1, v/v) sowie dem Zusatz von BHT zum Extraktionsmittel

	Luteingehalt [mg/100 g TM] ^A nach Extraktion mit vorheriger Einweichzeit von								
	0 h	3 h	7 h	12 h	17 h	20 h	24 h	30 h	36 h
mit BHT	0,136	0,197	0,265	0,269	0,299	0,289	0,321	0,318	0,309
ohne BHT	0,153	0,162	0,193	0,186	0,191	0,199	0,201	0,216	0,199

^A Werte aus Einfachbestimmungen

Tab. A 11: Luteingehalt der Hartweizensorte Prowidur nach Extraktion unter permanentem Schütteln bei verschiedenen Einweichzeiten

Luteingehalt [mg/100 g TM] ^A nach Extraktion mit vorheriger Einweichzeit von					
0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	
0,136	0,169	0,187	0,205	0,225	

^A Werte aus Einfachbestimmungen

Tab. A 12: Carotinoidgehalte verschiedener Weizen- und Getreidearten nach Extraktion mit bzw. ohne vorherige Quellung mit Wasser^A

	Carotinoide [mg/100 g TM]				Σ Carotinoide [µmol/100 g TM]
	Lutein	Zeaxanthin	β-Cryptoxanthin	β-Carotin ^B	
Weichweizen 1	0,117 ± 0,003 0,113 ± 0,006	0,010 ± 0,000 0,010 ± 0,001	n. n.	n. n.	0,223 ± 0,006 0,215 ± 0,012
Weichweizen 2	0,102 ± 0,002 0,095 ± 0,005	0,009 ± 0,001 0,010 ± 0,002	n. n.	n. n.	0,195 ± 0,005 0,183 ± 0,011
Weichweizen 3	0,145 ± 0,003 0,132 ± 0,003*	0,020 ± 0,001 0,021 ± 0,000*	n. n.	0,033 ± 0,001 0,033 ± 0,001	0,352 ± 0,007 0,339 ± 0,008
Weichweizen 4	0,085 ± 0,003 0,075 ± 0,003*	0,021 ± 0,000 0,021 ± 0,000	n. n.	n. n.	0,187 ± 0,005 0,170 ± 0,005*
Weichweizen 5	0,072 ± 0,005 0,068 ± 0,008	0,018 ± 0,001 0,018 ± 0,000	n. n.	0,036 ± 0,002 0,034 ± 0,001	0,224 ± 0,013 0,214 ± 0,012

Purpurweizen 1 (unverseift)	0,036 ± 0,001 0,032 ± 0,001*	0,016 ± 0,001 0,014 ± 0,001*	n. n.	0,030 ± 0,002 0,028 ± 0,001	0,149 ± 0,008 0,131 ± 0,001*
Purpurweizen 2 (unverseift)	0,091 ± 0,004 0,092 ± 0,017	0,028 ± 0,008 0,034 ± 0,004	n. n.	0,145 ± 0,019 0,134 ± 0,008	0,479 ± 0,015 0,472 ± 0,051
Gelbweizen 1	0,496 ± 0,007 0,494 ± 0,028	0,021 ± 0,001 0,023 ± 0,001	n. n.	0,227 ± 0,011 0,207 ± 0,005	1,331 ± 0,007 1,294 ± 0,055
Gelbweizen 2	0,217 ± 0,004 0,198 ± 0,004*	0,021 ± 0,001 0,020 ± 0,001	n. n.	0,136 ± 0,008 0,133 ± 0,004	0,672 ± 0,018 0,629 ± 0,017
Einkorn	0,135 ± 0,003 0,138 ± 0,001	0,026 ± 0,003 0,026 ± 0,001	n. n.	0,327 ± 0,005 0,351 ± 0,002*	0,892 ± 0,020 0,942 ± 0,004*
Emmer 1	0,159 ± 0,014 0,097 ± 0,004*	0,014 ± 0,000 0,014 ± 0,001	n. n.	n. n.	0,236 ± 0,006 0,152 ± 0,002*
Emmer 2	0,200 ± 0,003 0,108 ± 0,001*	0,023 ± 0,000 0,021 ± 0,001	n. n.	n. n.	0,391 ± 0,005 0,227 ± 0,004*
Emmer 3	0,183 ± 0,009 0,094 ± 0,007*	0,020 ± 0,002 0,019 ± 0,002	n. n.	n. n.	0,357 ± 0,012 0,199 ± 0,014*
Emmer 4	0,181 ± 0,002 0,087 ± 0,004*	0,018 ± 0,001 0,015 ± 0,000*	n. n.	n. n.	0,349 ± 0,002 0,196 ± 0,007*
Dinkel 1	0,206 ± 0,000 0,208 ± 0,002	0,028 ± 0,001 0,029 ± 0,000	n. n.	0,039 ± 0,001 0,044 ± 0,004	0,487 ± 0,004 0,497 ± 0,006
Dinkel 2	0,090 ± 0,007 0,100 ± 0,006	0,016 ± 0,001 0,018 ± 0,001	n. n.	0,042 ± 0,004 0,042 ± 0,003	0,264 ± 0,007 0,291 ± 0,017
Dinkel 3	0,080 ± 0,007 0,076 ± 0,001	0,038 ± 0,001 0,040 ± 0,002	n. n.	0,043 ± 0,002 0,044 ± 0,006	0,283 ± 0,003 0,287 ± 0,009
Dinkel 4	0,084 ± 0,003 0,082 ± 0,002	0,025 ± 0,002 0,026 ± 0,001	n. n.	0,039 ± 0,003 0,043 ± 0,001	0,266 ± 0,012 0,274 ± 0,006
Roggen 1	0,093 ± 0,005 0,087 ± 0,003	0,031 ± 0,002 0,031 ± 0,001	n. n.	0,032 ± 0,003 0,031 ± 0,002	0,277 ± 0,016 0,272 ± 0,015
Roggen 2	0,078 ± 0,003 0,074 ± 0,004	0,041 ± 0,002 0,043 ± 0,001	n. n.	n. n.	0,210 ± 0,007 0,207 ± 0,008
Hafer	0,055 ± 0,003 0,059 ± 0,002	0,034 ± 0,001 0,037 ± 0,001	n. n.	0,032 ± 0,001 0,037 ± 0,001*	0,232 ± 0,007 0,253 ± 0,007*
Mais (Vollkorn)	1,113 ± 0,024 0,441 ± 0,067*	0,452 ± 0,008 0,182 ± 0,023*	0,034 ± 0,008 0,013 ± 0,002*	0,106 ± 0,011 0,047 ± 0,003*	2,962 ± 0,087 1,208 ± 0,170*
Maisgrieß	0,972 ± 0,023 0,408 ± 0,048*	0,931 ± 0,072 0,388 ± 0,039*	0,170 ± 0,016 0,077 ± 0,011*	0,098 ± 0,004 0,043 ± 0,008*	3,836 ± 0,187 1,619 ± 0,183*
Maismehl	1,025 ± 0,065 0,556 ± 0,003*	0,847 ± 0,042 0,457 ± 0,002*	0,097 ± 0,010 0,058 ± 0,003*	0,063 ± 0,004 0,042 ± 0,002*	3,584 ± 0,215 1,964 ± 0,012*

^A **fett** gedruckte Werte sind Gehalte nach Extraktion **mit Quellung mir Wasser**,

^B (*E+Z*)- β -Carotin, (*Z*)-Isomere identifiziert als (*15Z*)-, (*13Z*)- und (*9Z*)- β -Carotin,

n. n. = nicht nachweisbar (Nachweisgrenzen: Tab. A 5, Tab. A 6),

grau hinterlegt: deutlich positiver Effekt der Quellung mit Wasser auf die Carotinoidgehalte im Extrakt,

* markiert signifikanten Unterschied zwischen beiden Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test)

Tab. A 13: Gehalte an Gesamt-Carotinoiden [mg/100 g TM] von Hartweizen, Grieß und Teigwaren nach Extraktion mit und ohne Quellung mit Wasser im Vergleich zum jeweiligen Gelbpigmentgehalt

	Gelbpigmente (photometrisch)	Gesamt-Carotinoide (HPLC)		Quotient ¹
		Wasser + MeOH/THF	MeOH/THF (1/1, v/v)	
Hartweizen Vollkorn				
Prowidur 1	0,393 ± 0,006 ^A	0,371 ± 0,006 ^B	0,168 ± 0,009 ^C	2,2
Prowidur 2	0,568 ± 0,018 ^A	0,509 ± 0,018 ^B	0,208 ± 0,012 ^C	2,4
Prowidur 3	0,354 ± 0,002 ^A	0,336 ± 0,027 ^A	0,137 ± 0,004 ^B	2,4
Orjaune	0,476 ± 0,004 ^A	0,446 ± 0,005 ^B	0,199 ± 0,014 ^C	2,2
Duramar	0,585 ± 0,009 ^A	0,539 ± 0,012 ^B	0,276 ± 0,010 ^C	2,0
Durabon	0,669 ± 0,003 ^A	0,628 ± 0,029 ^B	0,369 ± 0,005 ^C	1,7
Kombo	0,734 ± 0,010 ^A	0,710 ± 0,004 ^A	0,401 ± 0,021 ^B	1,8

Hartweizengrieß (Handel)				
Aurora	0,577 ± 0,004 ^A	0,593 ± 0,035 ^A	0,214 ± 0,009 ^B	2,8
Frießinger	0,504 ± 0,003 ^A	0,524 ± 0,009 ^B	0,264 ± 0,004 ^C	2,0
Weltgold	0,540 ± 0,017 ^A	0,542 ± 0,010 ^A	0,244 ± 0,012 ^B	2,2
Hartweizengrieß (Industrie)				
KW 1 Charge 2	-	0,429 ± 0,002 ^A	0,292 ± 0,029 ^B	1,5
KW 1 Charge 3	-	0,414 ± 0,006 ^A	0,301 ± 0,006 ^B	1,4
KW 2 Charge 1	-	0,381 ± 0,014 ^A	0,263 ± 0,006 ^B	1,4
KW 2 Charge 2	-	0,302 ± 0,015 ^A	0,189 ± 0,005 ^B	1,6
KW 2 Charge 4	0,629 ± 0,003 ^A	0,634 ± 0,025 ^A	0,432 ± 0,043 ^B	1,5
Teigwaren ohne Ei (Handel)				
Buitoni	0,410 ± 0,007 ^A	0,327 ± 0,007 ^B	0,067 ± 0,004 ^C	4,9
Erfurter	0,470 ± 0,004 ^A	0,381 ± 0,001 ^B	0,095 ± 0,006 ^C	4,0
Alnatura	-	0,211 ± 0,010 ^A	0,059 ± 0,003 ^B	3,6
Teigwaren ohne Ei (Industrie)				
KW 1 Charge 2	-	0,337 ± 0,023 ^A	0,081 ± 0,001 ^B	4,2
KW 1 Charge 3	-	0,338 ± 0,003 ^A	0,091 ± 0,003 ^B	3,7
KW 2 Charge 1	-	0,270 ± 0,004 ^A	0,105 ± 0,005 ^B	2,6
KW 2 Charge 2	-	0,260 ± 0,002 ^A	0,099 ± 0,004 ^B	2,6
KW 2 Charge 4	0,465 ± 0,004 ^A	0,429 ± 0,040 ^B	0,150 ± 0,001 ^C	2,9
Eierteigwaren (Handel)				
Riesa	0,626 ± 0,009 ^A	0,548 ± 0,009 ^B	0,342 ± 0,013 ^C	1,6
3 Glocken	0,630 ± 0,003 ^A	0,515 ± 0,021 ^B	0,288 ± 0,003 ^C	1,6
REWE	0,622 ± 0,007 ^A	0,492 ± 0,014 ^B	0,274 ± 0,017 ^C	1,8
Eierteigwaren (Auftragsproben)				
	-	1,277 ± 0,029 ^A	1,130 ± 0,022 ^B	1,1
	-	1,003 ± 0,075 ^A	0,882 ± 0,013 ^B	1,1

¹ Quotient aus Carotinoidgehalt mit und ohne Quellung mit Wasser vor der Lösungsmittlextraktion, verschiedene Buchstaben in einer Zeile markieren signifikante Unterschiede (p < 0,05, ANOVA, S-N-K bzw. t-Test)

Tab. A 14: Gehalte einzelner Carotinoide in Hartweizen, Grieß und Teigwaren [mg/100 g TM] nach Extraktion mit vorheriger Quellung mit Wasser

Probe	(E)-Lutein	(Z)-Lutein	(E)-Zeaxanthin	(Z)-Zeaxanthin	(E)-Canthaxanthin
Vollkorn-Hartweizen					
Prowidur 3	0,269 ± 0,028	0,035 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,007 ± 0,001	n. n.
Duramar	0,472 ± 0,010	0,039 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,001 ± 0,001	n. n.
Durabon	0,532 ± 0,019	0,053 ± 0,005	0,040 ± 0,005	0,004 ± 0,000	n. n.
Kombo	0,632 ± 0,010	0,050 ± 0,002	0,030 ± 0,001	0,002 ± 0,000	n. n.
Grieß					
KW 1 Charge 2	0,372 ± 0,002	0,035 ± 0,000	0,016 ± 0,001	0,006 ± 0,001	n. n.
Charge 3	0,377 ± 0,005	0,024 ± 0,004	0,011 ± 0,001	n. n.	n. n.
KW 2 Charge 1	0,329 ± 0,012	0,034 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,005 ± 0,001	n. n.
Charge 2	0,257 ± 0,012	0,028 ± 0,004	0,012 ± 0,001	0,005 ± 0,001	n. n.
Teigwaren ohne Ei					
KW 1 Charge 2	0,271 ± 0,021	0,044 ± 0,003	0,019 ± 0,001	0,003 ± 0,001	n. n.
Charge 3	0,287 ± 0,003	0,040 ± 0,002	0,010 ± 0,001	n. n.	n. n.
KW 2 Charge 1	0,227 ± 0,005	0,028 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,005 ± 0,001	n. n.
Charge 2	0,213 ± 0,003	0,031 ± 0,000	0,010 ± 0,001	0,007 ± 0,000	n. n.

Teigwaren mit Ei					
Riesa	0,432 ± 0,003	0,063 ± 0,004	0,026 ± 0,001	0,011 ± 0,002	0,018 ± 0,001
3 Glocken	0,396 ± 0,017	0,050 ± 0,005	0,054 ± 0,001	0,007 ± 0,000	0,009 ± 0,000
REWE	0,380 ± 0,010	0,053 ± 0,001	0,041 ± 0,003	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001

n. n. = nicht nachweisbar (Nachweisgrenzen: Tab. A 5, Tab. A 6)

Tab. A 15: Carotinoidgehalte in Eierteigwaren [mg/100 g TM]

	Lutein ^A	Zeaxanthin ^A	Canthaxanthin ^B	β-apo-8'-Carotin-säureethylester ^B
Auftragsprobe 1	0,941 ± 0,017	0,096 ± 0,002	0,025 ± 0,002	0,215 ± 0,009
Auftragsprobe 2	0,408 ± 0,031	0,051 ± 0,005	0,054 ± 0,005	0,490 ± 0,034

^A Summe aus (*all-E*)- und (*Z*)-Isomeren

^B nur (*E*)-Isomere identifiziert

Tab. A 16: Vitamin-E-Gehalte von Hartweizen, Grieß und Teigwaren nach Extraktion mit bzw. ohne vorherige Quellung mit Wasser

	Vitamin E [µmol/100 g TM]			Quotient ^A
	Wasser + MeOH/THF (1/1, v/v)		MeOH/THF (1/1, v/v)	
Hartweizen (Vollkorn)				
Prowidur 1	7,95 ± 0,15	*	6,84 ± 0,07	1,2
Prowidur 2	6,56 ± 0,13	*	5,96 ± 0,10	1,1
Topdur	8,63 ± 0,12	*	7,59 ± 0,11	1,1
Heradur	7,70 ± 0,20	*	6,51 ± 0,26	1,2
Lloyd 1	12,75 ± 0,12	*	10,77 ± 0,14	1,2
Lloyd 2	9,24 ± 0,90		8,83 ± 0,41	1,0
Kombo	14,63 ± 0,34	*	12,93 ± 0,28	1,1
Duramar	16,74 ± 0,89	*	14,69 ± 0,87	1,1
Durabon	12,81 ± 0,56		13,52 ± 0,68	0,9
Grieß				
KW 1 Charge 2	7,99 ± 0,33		7,27 ± 0,38	1,1
KW 1 Charge 3	10,01 ± 0,12	*	9,10 ± 0,04	1,1
KW 2 Charge 1	10,87 ± 0,28	*	8,19 ± 0,19	1,3
KW 2 Charge 2	7,73 ± 0,13	*	6,77 ± 0,07	1,1
KW 2 Charge 4	8,62 ± 0,37		8,16 ± 0,34	1,1
Teigwaren (ohne Ei)				
KW 1 Charge 2	7,33 ± 0,19	*	2,01 ± 0,00	3,6
KW 1 Charge 3	8,40 ± 0,44	*	2,68 ± 0,06	3,1
KW 2 Charge 1	7,39 ± 0,33	*	3,25 ± 0,14	2,3
KW 2 Charge 2	5,20 ± 0,13	*	2,33 ± 0,02	2,2
KW 2 Charge 4	5,83 ± 0,08	*	2,41 ± 0,03	2,4

^A Quotient aus Vitamin-E-Gehalt mit und ohne Quellung mit Wasser vor der Lösungsmittelextraktion

* markiert signifikanten Unterschied zwischen beiden Extraktionsmethoden ($p < 0,05$, t-Test)

Tab. A 17: Gehalte an Tocopherolen, Tocotrienolen und Vitamin E in Hartweizen

	Σ Tocopherole [μmol/100 g TM]	Σ Tocotrienole [μmol/100 g TM]	Vitamin E [μmol/100 g TM]	Vitamin-E-Aktivität ^A [mg α-TÄ/100 g FM]	T3/T
Hartweizen (Vollkorn)					
Prowidur 1	2,59 ± 0,08	5,36 ± 0,07	7,95 ± 0,15	1,01 ± 0,03	2,1
Prowidur 2	2,37 ± 0,08	4,20 ± 0,08	6,56 ± 0,13	0,88 ± 0,02	1,8
Topdur	3,21 ± 0,06	5,42 ± 0,07	8,63 ± 0,12	1,21 ± 0,02	1,7
Heradur	2,54 ± 0,08	5,16 ± 0,21	7,70 ± 0,20	1,04 ± 0,02	2,0
Lloyd 1	2,91 ± 0,08	9,85 ± 0,13	12,75 ± 0,12	1,21 ± 0,04	3,4
Lloyd 2	1,96 ± 0,11	7,28 ± 0,79	9,24 ± 0,90	0,87 ± 0,05	3,7
Kombo	3,55 ± 0,16	13,26 ± 0,53	16,80 ± 0,66	1,62 ± 0,08	3,7
Duramar	3,32 ± 0,24	13,42 ± 0,69	16,74 ± 0,89	1,53 ± 0,10	4,0
Durabon	4,71 ± 0,07	8,10 ± 0,60	12,81 ± 0,56	1,75 ± 0,02	1,7
Grieß					
KW 1 Charge 2	1,71 ± 0,08	6,28 ± 0,25	7,99 ± 0,33	0,73 ± 0,02	3,7
KW 1 Charge 3	1,77 ± 0,01	8,24 ± 0,12	10,01 ± 0,12	0,82 ± 0,00	4,7
KW 2 Charge 1	1,58 ± 0,08	9,29 ± 0,20	10,87 ± 0,28	0,76 ± 0,02	5,9
KW 2 Charge 2	1,94 ± 0,05	5,79 ± 0,08	7,73 ± 0,13	0,79 ± 0,02	3,0
KW 2 Charge 4	1,69 ± 0,06	6,93 ± 0,31	8,62 ± 0,37	0,73 ± 0,04	4,1
Teigwaren (ohne Ei)					
KW 1 Charge 2	1,64 ± 0,04	5,70 ± 0,15	7,33 ± 0,19	0,70 ± 0,02	3,5
KW 1 Charge 3	1,56 ± 0,10	6,84 ± 0,34	8,40 ± 0,44	0,72 ± 0,04	4,4
KW 2 Charge 1	1,22 ± 0,09	6,17 ± 0,37	7,39 ± 0,33	0,57 ± 0,03	5,1
KW 2 Charge 2	0,96 ± 0,02	4,24 ± 0,11	5,20 ± 0,13	0,41 ± 0,01	4,4
KW 2 Charge 4	0,87 ± 0,01	4,96 ± 0,08	5,83 ± 0,08	0,39 ± 0,00	5,7

^A Berechnung mit den in Tab. 3 angegebenen Bioaktivitäten der einzelnen Tocochochromanole

Tab. A 18: Gehalte an Gesamt-Carotinoiden und Vitamin E von Rohware und Endprodukt verschiedener Chargen der Produktionslinien 1 und 2

	Carotinoide [mg/100 g TM]		Vitamin E [μmol/100 g TM]	
	Grieß	Teigware	Grieß	Teigware
KW1 Charge 2	0,429 ± 0,002	0,337 ± 0,023*	7,99 ± 0,33	7,33 ± 0,19*
Charge 3	0,414 ± 0,006	0,338 ± 0,003*	10,01 ± 0,12	8,40 ± 0,44*
KW2 Charge 1	0,381 ± 0,014	0,270 ± 0,004*	10,87 ± 0,28	7,39 ± 0,33*
Charge 2	0,302 ± 0,015	0,260 ± 0,002*	7,73 ± 0,13	5,20 ± 0,13*
Charge 3	0,569 ± 0,015	0,424 ± 0,009*	9,81 ± 0,53	7,36 ± 0,19*

* markiert signifikante Abnahme (p < 0,05, t-Test)

Tab. A 19: Resorptionsverfügbarkeit [%] der Tocopherole (T) und Tocotrienole (T3) aus Teigwaren (Mw ± SD aus jeweils 3 Ansätzen an 2 verschiedenen Tagen)

Teigware	α-T	β-T	γ-T	α-T3	β-T3
eifreie Teigwaren					
KW1 Charge 1	73,6 ± 1,4 ^A	68,0 ± 4,0 ^{A,B}	n. n.	65,2 ± 1,3 ^B	69,5 ± 2,7 ^{A,B}
	78,1 ± 1,7 ^A	70,2 ± 3,7 ^B	n. n.	71,8 ± 1,8 ^B	73,4 ± 2,1 ^B
KW1 Charge 2	66,4 ± 2,3 ^A	65,3 ± 4,1 ^A	n. n.	59,8 ± 2,9 ^A	63,1 ± 3,0 ^A
	65,4 ± 4,1 ^A	63,4 ± 6,4 ^A	n. n.	59,6 ± 4,7 ^A	66,8 ± 7,5 ^A
KW2 Charge 1	69,4 ± 1,7 ^A	69,8 ± 6,5 ^A	n. n.	64,8 ± 4,1 ^A	69,3 ± 1,0 ^A
	71,2 ± 0,7 ^A	61,3 ± 0,2 ^B	n. n.	64,4 ± 0,7 ^C	67,4 ± 2,2 ^D
KW2 Charge 2	64,1 ± 6,5 ^A	50,1 ± 6,3 ^A	n. n.	53,7 ± 6,4 ^A	58,2 ± 5,1 ^A
	81,8 ± 0,7 ^A	78,1 ± 1,8 ^B	n. n.	78,6 ± 1,8 ^B	80,4 ± 0,8 ^{A,B}

Eierteigwaren					
Riesa	55,5 ± 0,7 ^A	36,5 ± 3,5 ^B	48,5 ± 7,5 ^A	46,7 ± 4,2 ^A	49,7 ± 1,7 ^A
	64,6 ± 0,8 ^A	42,6 ± 2,4 ^B	47,6 ± 11,1 ^{A,B,C}	54,4 ± 1,0 ^C	57,2 ± 1,6 ^A
3 Glocken	36,5 ± 0,7 ^A	25,3 ± 1,2 ^B	36,0 ± 6,0 ^{A,B,C}	34,1 ± 0,6 ^C	34,0 ± 0,6 ^C
	55,0 ± 0,9 ^A	48,6 ± 3,4 ^{A,B}	44,7 ± 7,9 ^{A,B}	49,3 ± 0,9 ^C	55,2 ± 1,2 ^A
REWE	38,8 ± 0,4 ^A	23,9 ± 1,1 ^B	29,6 ± 5,6 ^{A,B,C}	36,3 ± 1,6 ^C	35,6 ± 0,8 ^C
	65,1 ± 0,7 ^A	60,0 ± 2,6 ^{A,B}	61,6 ± 0,2 ^B	60,4 ± 0,9 ^C	64,0 ± 1,4 ^{A,B}

verschiedene Buchstaben in einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, ANOVA, S-N-K bzw. Games-Howell)

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe. Alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit angegeben.

Ferner erkläre ich, dass mich keine weiteren als die angegebenen Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben. Insbesondere habe ich hierfür weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich versichere, dass ich weder die gleiche oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche, noch eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, Juli 2010

Susanne Werner

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Susanne Werner (geb. Burkhardt)
Geburtsdatum, -ort: 04.03.1980, Jena
Anschrift: Bischof-Neuhäusler-Weg 4
85221 Dachau
Staatsangehörigkeit: Deutschland
Familienstand: verheiratet

SCHULBILDUNG

09/1986-08/1991 Polytechnische Oberschule „Dr. Theodor Neubauer“ in Hainspitz
09/1991-07/1998 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Hainspitz und Eisenberg/Thüringen
Abschluss: Abitur

HOCHSCHULSTUDIUM

09/1998-12/2003 Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena
experimentelle Diplomarbeit am LS Humanernährung im Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena
Thema: „Beurteilung von Hartweizen-Grießen verschiedener Jahrgänge anhand ihrer antioxidativen Aktivität und Carotinoidgehalte“
Abschluss als Diplom-Trophologin

BERUFLICHER WERDEGANG / PROMOTION

11/2003-7/2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin am LS Humanernährung im Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena
8/2005-7/2008 wissenschaftliche Mitarbeiterin der Food GmbH Jena Analytik – Consulting in Jena
8/2008-7/2009 wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe im Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena
9/2005 Annahme als Doktorandin an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena

Wissenschaftliche Publikationen, Poster und Vorträge

PUBLIKATIONEN

.....

S. Burkhardt, V. Böhm:

Development of a new method for the complete extraction of carotenoids from cereals with special reference to durum wheat (*Triticum durum* Desf.).

J Agric Food Chem 55 (2007), 8295-8301.

M. Al-Duais, J. Hohbein, **S. Werner**, V. Böhm, G. Jetschke:

Contents of vitamin C, carotenoids, tocopherols and tocotrienols in the subtropical plant species *Cyphostemma digitatum* as affected by processing.

J Agric Food Chem 57 (2009), 5420-5427.

C. Hengst, **S. Werner (nee Burkhardt)**, L. Müller, V. Böhm:

Determination of the antioxidant capacity: influence of the sample concentration on the measured values.

Eur J Food Res Technol 230 (2009), 249-254.

S. Franke, K. Fröhlich, **S. Werner**, V. Böhm, F. Schöne:

Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils.

Eur J Lipid Sci Tech (im Druck).

POSTER

.....

S. Burkhardt, K. Kranl, J. Hollmann, M. G. Lindhauer, R. Bitsch, V. Böhm:

“Evaluation of durum wheat semolina of different years by their antioxidant activity and contents of carotenoids.”

9. Symposium „Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier“, 24.-25.09.2003, Jena.

S. Burkhardt, V. Böhm:

“New method for the complete extraction of carotenoids from cereals.”

14th International Carotenoid Symposium, 17.-22.07.2005, Edinburgh, UK

F. Fröhlich, **S. Burkhardt**, V. Böhm:

“Bioactive compounds in tomatoes and tomato products – investigations of different commercially available foodstuffs.”

10. Symposium „Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier“, 28.-29.09.2005, Jena.

J. Gutte, **S. Burkhardt**, V. Böhm:

“Vitamin C and antioxidative potential of oranges and other citrus fruits.”

10. Symposium „Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier“, 28.-29.09.2005, Jena.

V. Böhm, **S. Burkhardt**:

„Zimt – mehr als nur ein Gewürz?“

43. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V.,
09.-10.03.2006, Stuttgart/Hohenheim.

J. Hoßfeld, **S. Burkhardt**, K. Otto, V. Böhm:

“Processing of sea buckthorn to purée and nectar – effects on contents of carotenoids and vitamin E.”

13th European Meeting on Fat Soluble Vitamins, 30.03.-01.04.2006, Jena.

S. Burkhardt, V. Böhm:

„Carotinoide in diversen Weizenarten – Unterschiede in der Extrahierbarkeit.“

44. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V.,
07.-08.03.2007, Halle/Saale.

V. Böhm, K. Fröhlich, J. Möbus (geb. Hohbein), **S. Werner**:

„Isomerenspezifische Carotinoidtrennungen mit C₃₀-Säule – Beispiele und Probleme.“

38. Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin.

L. D'Evoli, M. Lucarini, J. Hohbein, **S. Werner**, K. Fröhlich, V. Böhm, G. Lombardi-Boccia:
“Post-harvest profile of carotenoids and tocopherols of PGI kiwi Latina (*Actinidia deliciosa*).”

14th European Meeting on Fat Soluble Vitamins, 01.-03.10.2009, Potsdam.

S. Franke, K. Fröhlich, **S. Werner**, V. Böhm, F. Schöne:

„Carotinoide und Vitamin E in Saat und Presskuchen und Öl von Raps, Sonnenblume, Lein
und Distel – Analyse mittels HPLC und Vergleich mit einem photometrischen Carotinoid-
nachweis.“

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

VORTRÄGE

„Sind Carotinoide aus allen Lebensmitteln in gleicher Weise extrahierbar?“

14. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesell-
schaft, 01.-02.04.2004, Halle/Saale.

„Optimierte Extraktion von Xanthophyllen aus verschiedenen Getreidearten und -erzeugnissen.“

15. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesell-
schaft, 17.-18.05.2005, Jena

„How does concentration affect measurement of antioxidant capacity?“

10. Symposium „Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier“,
28.-29.09.2005, Jena.

„Einfluss der Teigwarenherstellung auf die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E.“

Arbeitstagung der Regionalverbände Nord, Nord-Ost und Süd-Ost der Lebensmittel-
chemischen Gesellschaft, 02.-03.04.2009, Berlin

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie PD Dr. Volker Böhm für die Überlassung des vielseitigen Themas und das Vertrauen, das er mir damit entgegen brachte. Ich bedanke mich für die langjährige Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Entwicklung und die zahlreichen Möglichkeiten, Teilaspekte meiner Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen. Nicht zuletzt danke ich ihm auch für seine Bemühungen, den Fortgang der Arbeiten zu finanzieren. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenso bei Prof. Dr. Manfred Grün für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens bedanken.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humanernährung und der Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit. Dr. Kati Fröhlich gebührt mein Dank für die umfassende Einarbeitung in die Carotinoid-Analytik, zahlreiche Anregungen und ihre stete Diskussionsbereitschaft. Juliane Möbus und Lars Müller kann ich für das unermüdliche Korrekturlesen meines Manuskripts gar nicht genug danken. Außerdem bedanke ich mich bei ihnen für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Bei Dr. Marc Birringer, Dr. Gabi Schmidt und Beate Laube möchte ich mich für die Hilfe bei der Lösung zahlreicher HPLC-Probleme bedanken. Insbesondere Beate gilt mein Dank für die nette Zusammenarbeit und so manches aufmunternde Wort, auch abseits der wissenschaftlichen Fragestellungen. Das selbe gilt für Charlotte Flügel, die mich während all der Jahre in Jena freundschaftlich begleitet hat.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungsphysiologie, insbesondere Peter Möckel, Christian Degen und Ronny Kramer danke ich für ihre Unterstützung bei der Soxhlet-Extraktion sowie der Dünnschichtchromatographie. Bei Dr. Rainer Schubert bedanke ich mich für die Beantwortung so mancher statistischer Fragestellung.

Weiterhin danke ich Ricarda Knetsch und Faezeh Kalantari, die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten diverse Erkenntnisse zur Teigwarenherstellung gewannen, welche zum Teil auch in meine Dissertation eingeflossen sind.

Dr. Klaus Münzing (Max Rubner-Institut, Detmold) danke ich herzlich für die Überlassung zahlreicher Getreideproben. Bei Markus Bogel (Erfurter Teigwaren GmbH) möchte ich mich für die wiederholte Bereitstellung von Proben aus der Teigwarenproduktion bedanken.

Ich danke allen Freunden und Wegbegleitern, die immer am Fortschritt meiner Arbeiten interessiert waren. Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Gabriele Venbrocks, für die finanzielle Hilfe und das grenzenlose Vertrauen in meine Fähigkeiten. Ihrer Unterstützung konnte und kann ich mir in allen Lebenslagen gewiss sein.

Meinem Mann, Frank Werner, gilt mein besonderer Dank für seine Geduld und sein Verständnis. Er hat mich all die Jahre immer wieder aufs Neue motiviert und mir über so manchen schwierigen Abschnitt hinweg geholfen.

Korrektur

Tab. 28: Resorptionsverfügbarkeit [%] der einzelnen Xanthophylle und Gesamt-Carotinoide aus Teigwaren (Mittelwerte aus allen Verdauungsansätzen)

Teigware	(<i>all-E</i>)-Lutein	(<i>Z</i>)-Lutein	(<i>all-E</i>)- Zeaxanthin	(<i>all-E</i>)- Canthaxanthin	Carotinoide
eifreie Teigwaren					
Handelsware	77,9 ± 0,8 ^a	73,2 ± 2,4*	87,9 ± 1,6 ^b	n. n.	77,7 ± 0,7^A
KW1 Charge 1	72,3 ± 3,2 ^a	73,3 ± 3,9	71,7 ± 9,0 ^a	n. n.	72,3 ± 3,5^{A,C}
KW1 Charge 2	63,0 ± 4,4 ^a	65,3 ± 2,6	62,6 ± 2,0 ^a	n. n.	63,3 ± 4,0^B
KW2 Charge 1	73,2 ± 2,7 ^a	70,7 ± 4,1	68,3 ± 13,8 ^a	n. n.	72,0 ± 2,2^C
KW2 Charge 2	70,7 ± 14,7 ^a	70,5 ± 11,2	71,9 ± 9,5 ^a	n. n.	70,8 ± 14,0^{A,B,C}
Eierteigwaren					
Riesa	58,5 ± 3,2 ^a	57,9 ± 7,3	48,1 ± 21,7 ^a	47,7 ± 8,5 ^a	57,9 ± 2,2^B
3 Glocken	55,7 ± 16,8 ^a	60,0 ± 8,0	59,1 ± 8,6 ^a	52,7 ± 1,5 ^a	56,5 ± 14,5^{A,B,C}
REWE	57,3 ± 17,9 ^a	59,1 ± 13,0	59,2 ± 11,1 ^a	52,3 ± 5,2 ^a	57,6 ± 16,5^{A,B,C}

n. n.: nicht nachweisbar,

^{a-b} verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede zw. den (*all-E*)-Isomeren (p<0,05, ANOVA),

^{A-C} verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede (p<0,05, ANOVA, Games-Howell),

* markiert signifikanten Unterschied zwischen (*all-E*)- und (*Z*)-Lutein (p<0,05, t-Test)