

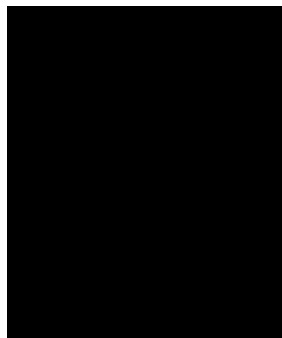


**Ermittlung der lipophilen antioxidativen Aktivitäten/Kapazitäten  
mittels Photochemolumineszenz-Methode: Untersuchungen zur  
Anwendung auf Carotinoide, Vitamin E und Lebensmittel sowie zum  
Einfluss von Wechselwirkungen und Lebensmittelmatrix**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“

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



von Diplom Lebensmittelchemikerin  
**Jasmin Karmowski (geb. Bauerfeind)**

geboren am 09.03.1987 in Berlin

## **Gutachter:**

**1. PD Dr. habil. Volker Böhm**

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

**2. Prof. Dr. Gerhard Scriba**

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

**3. Prof. Dr. Sascha Rohn**

Universität Hamburg  
Institut für Lebensmittelchemie  
Grindelallee 117  
20146 Hamburg

Tag der Disputation: 22. Mai 2015

„OB EINE SACHE GELINGT, ERFÄHRST DU ERST, WENN DU NICHT DARÜBER NACHDENKST,  
SONDERN WENN DU ES AUSPROBIERST.“

Werner Berthmann

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>III</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>IV</b>	<b>Formelverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Oxidativer Stress und freie Radikale .....	1
1.2	Antioxidantien .....	5
1.2.1	Carotinoide .....	6
1.2.2	Vitamin E .....	8
1.3	Bestimmung der antioxidativen Aktivität/Kapazität .....	11
1.4	Wechselwirkungen zwischen antioxidativen Substanzen .....	14
1.5	Matrixeinfluss auf die antioxidative Kapazität .....	15
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Übersicht der Manuskripte</b> .....	<b>19</b>
3.1	Manuskript I .....	25
3.2	Manuskript II .....	33
3.3	Manuskript III .....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>64</b>
4.1	Antioxidative Aktivitäten von Carotinoiden und Vitamin E und ihre Struktur- Wirkungsbeziehungen .....	65
4.2	Anwendung der PCL-Methode auf lipophile Lebensmittelextrakte .....	76
4.3	Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien sowie Matrixeinflüsse auf die lipophile antioxidative Kapazität .....	84
4.4	Physiologische Relevanz der PCL-Methode .....	89
4.5	Beurteilung der PCL-Methode .....	92
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>102</b>

A Wissenschaftliche Publikationen .....	A
B Danksagung .....	D
C Eidesstattliche Erklärungen .....	E

## I Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-bindende Kassetten-Transporter, engl. <i>ATP-binding cassette-Transporter</i>
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADI-Werte	tolerierbare Tagesdosis, engl. <i>acceptable daily intake</i>
AMVN	2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitril)
AOA	antioxidative Aktivität
AOK	antioxidative Kapazität
ATBC-Studie	$\alpha$ -Tocopherol- $\beta$ -Carotin-Studie
ATP	Adenosintriphosphat
AVED	Ataxie mit Vitamin-E-Mangel, engl. <i>ataxia vitamin E deficiency</i>
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
C	Kohlenstoff
CAR	Carotinoid
CEHC	Carboxyethyl-hydroxy-chroman
CDB	konjugierte Doppelbindung; engl. <i>conjugated double bond</i>
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DHA	Docosahexaensäure; C22:6n-3
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EPA	Eicosapentaensäure; C20:5n-3
et al.	und andere; lat. <i>et alii</i>
ET bzw. SET	Ein-Elektronentransfer; engl. <i>single electron transfer</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid-Dihydrid
Fe <sup>2+</sup>	zweiwertiges Eisen
FRAP	Eisen III -reduzierende antioxidative Stärke; engl. <i>ferric reducing antioxidant power</i>
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
H	Wasserstoff

HAT	Wasserstoffatomtransfer
HDL	Lipoprotein hoher Dichte, <i>engl. high density lipoprotein</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>engl. high performance liquid chromatography</i>
I-Effekt	induktiver Effekt
IPP	Isopentenylidiphosphat
LDL	Lipoprotein geringer Dichte, <i>engl. low density lipoprotein</i>
LPSC	Luminol-Chemolumineszenz basierte peroxyradikalabfangende Kapazität; <i>engl. luminol-chemiluminescence peroxy radical scavenging capacity</i>
M-Effekt	Mesomerie-Effekt
MeOH	Methanol
MtBE	Methyl-tertiär-butylether
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid
NPC1-L1	Niemann Pick C1 like 1 Protein
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> bzw. <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff bzw. Triplett-Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanionen
O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	Peroxidanionen
OH <sup>·</sup>	Hydroxylanionen
OH	Hydroxylgruppe
HO <sub>2</sub>	Hydroperoxyradikal
p	Signifikanz
PCL	Photochemolumineszenz
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren; <i>engl. polyunsaturated fatty acids</i>
PSY	Phytoensynthase
R	Bestimmtheitsmaß
R <sup>·</sup>	Radikal
RNS	reaktive Stickstoffspezies, <i>engl. reactive nitrogen species</i>



ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>engl. reactive oxygen species</i>
SR-B1	Scavenger-Rezeptor B1
TBHQ	tertiär-Butylhydrochinon
TEAC	Trolox äquivalente antioxidative Kapazität; <i>engl. trolox equivalent antioxidant capacity</i>
$\alpha$ -TE	$\alpha$ -Tocopherol äquivalente; <i>engl. <math>\alpha</math>-tocopherol equivalent</i>
$\alpha$ -TEAC	$\alpha$ -Tocopherol äquivalente antioxidative Kapazität; <i>engl. <math>\alpha</math>-tocopherol equivalent antioxidant capacity</i>
THF	Tetrahydrofuran
$\alpha$ -TTP	$\alpha$ -Tocopherol-Transferprotein
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
VLDL	Lipoproteine sehr geringer Dichte, <i>engl. very low density lipoprotein</i>

## II Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Vorkommen und Wirkungen von Carotinoiden. ....	<b>8</b>
<b>Tabelle 2:</b> Gewichtete Mittelwerte der antioxidativen Aktivitäten von Carotinoiden und Vitamin E. ....	<b>75</b>

### III Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Gleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien; Ursachen und Folgen. ....	<b>4</b>
<b>Abbildung 2:</b> Vitamin-E-Metabolismus, modifiziert nach Borel et al., 2013. ....	<b>11</b>
<b>Abbildung 3:</b> Möglicher Reaktionsmechanismus am Beispiel von Luminol im Photochemolumineszenz-System. ....	<b>14</b>
<b>Abbildung 4:</b> Die Wirkung von $\alpha$ -Tocopherol als Radikalfänger, modifiziert nach Pfluger, 2007. ....	<b>69</b>
<b>Abbildung 5:</b> Sterisch ungehinderte A) und sterisch gehinderte B) <i>cis</i> -Doppelbindungen in der Polyketten-Struktur, Britton, 1995. ....	<b>71</b>
<b>Abbildung 6:</b> Chemische Strukturen von ausgewählten Carotinoiden. ....	<b>72</b>
<b>Abbildung 7:</b> Beiträge von Carotinoiden und Vitamin E zur AOK von passierten Tomaten mittels PCL-Methode. ....	<b>80</b>
<b>Abbildung 8:</b> Interaktionen zwischen zwei Antioxidantien im additiven, synergistischen und antagonistischen Effekt. ....	<b>85</b>
<b>Abbildung 9:</b> Die Entstehung der ROS in der Atmungskette, modifiziert nach Bieger, 2001 & Rehner et al., 2010. ....	<b>91</b>
<b>Abbildung 10:</b> online-HPLC-Chemolumineszenzdetektion, modifiziert nach Dapkevicius et al., 1999. ....	<b>94</b>

## IV Formelverzeichnis

**Formel 1:** Berechnung des gewichteten Mittelwertes am Beispiel von Lutein. .... **74**

# 1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten belegten zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen dem gesteigerten Verzehr von Obst bzw. Gemüse und dem verminderten Auftreten von chronischen sowie degenerativen Erkrankungen einschließlich Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen (Huang et al., 2005; Ikram et al., 2009). Diese Erkrankungen werden mit der Oxidation von Molekülen wie Proteinen, Lipiden und DNA assoziiert, welche durch reaktive Verbindungen hervorgerufen werden können (oxidativer Stress) (Wu et al., 2004). Pflanzen und ihre Produkte enthalten neben hohen Konzentrationen an Vitaminen und Mineralstoffen auch sekundäre Pflanzenstoffe. Diese antioxidativ wirksamen Substanzen können die Oxidation von zellulären Bestandteilen im Organismus reduzieren (Agudo et al., 2007) und möglicherweise einen gesundheitsfördernden Beitrag leisten. Neben hydrophilen Antioxidantien, wie Ascorbinsäure (Vitamin C) und Polyphenolen sind auch lipophile Inhaltsstoffe wie Carotinoide und Vitamin E für das protektive Potential mitverantwortlich. Die protektiven Wirkungen, auf die oben genannten Erkrankungen, gehen möglicherweise auf die starken antioxidativen Eigenschaften dieser sekundären Pflanzenstoffe bzw. ihrer Metabolite zurück. Aufgrund ihrer reduzierenden Wirkung und Eigenschaften als Radikalfänger finden Antioxidantien Anwendungen in Lebensmittel- und Kosmetikprodukten. Sie schützen vor Lipidoxidation und verbessern somit Qualität und Haltbarkeit von Produkten (Kerscher et al., 2011; Laguerre et al., 2007).

Das steigende Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung hinsichtlich einer ausreichenden Versorgung mit Vitaminen sowie antioxidativen Substanzen und der damit verbundenen Prävention von Erkrankungen ist gegenwärtig noch im Fokus der Wissenschaft. Die Untersuchungen und Bewertungen der antioxidativen Wirksamkeiten von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und Lebensmitteln sowie der antioxidative Status im Organismus sind somit erforderlich und von großer Bedeutung.

## 1.1 Oxidativer Stress und freie Radikale

Für aerobe Organismen ist Sauerstoff zur Energiegewinnung lebensnotwendig. Jedoch geht diese immer mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einher (Rehner et al., 2010). Die Entstehung von ROS erfolgt u. a. endogen im Metabolismus sowie bei der mitochondrialen und peroxisomalen Atmung durch die Xanthinoxidase, aber auch bei

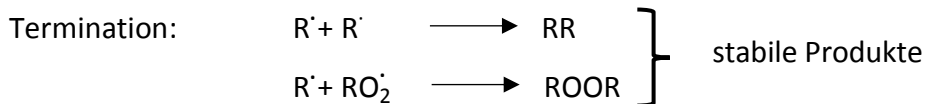
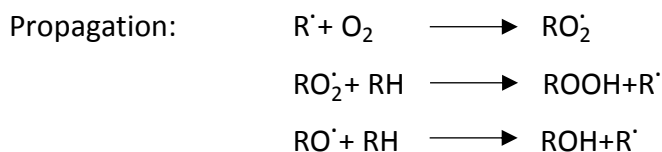
Entzündungsprozessen und Entgiftungsreaktionen im Cytochrom-P450-Stoffwechsel sowie durch körperliche Bewegung (Carocho et al., 2013; Choudhari et al., 2014). Des Weiteren können reaktive Verbindungen (z. B. ROS) bei der Immunantwort in Makrophagen durch das Enzym NADPH-Oxidase gebildet werden, um phagozytierte Bakterien abzutöten (Grune, 2014). Externe Einflussfaktoren wie Rauchen, Umweltschadstoffe, Strahlungen, Medikamente, Pestizide sowie industrielle Lösungsmittel und Ozon können die Bildung von ROS ebenfalls begünstigen (Carocho et al., 2013). Da aerobe Lebensformen, einschließlich des menschlichen Organismus, der Oxidation durch hoch reaktive Verbindungen konstant ausgesetzt sind, besitzen diese physiologischen Systeme ein Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und Prooxidantien. Ist dieses Gleichgewicht durch die vermehrte Entstehung von ROS oder durch zu geringe Gehalte an Antioxidantien gestört, verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der Prooxidantien. Dieser Zustand wird als „oxidativer Stress“ definiert (Sies, 1991).

Die ROS sind in ihrer biologischen Funktionalität paradox: Auf der einen Seite sind physiologisch positive Effekte bekannt. Die ROS wirken präventiv und unterstützen das Immunsystem. Gleichzeitig vermitteln sie Zellsignale und spielen eine essentielle Rolle in der Apoptose (Seifried et al., 2007). Auf der anderen Seite können ROS pathophysiologische Vorgänge im Organismus unterstützen und Moleküle wie Proteine, Lipide und DNA durch Oxidation schädigen. Daher wird oxidativer Stress mit der Entwicklung von verschiedenen chronischen, degenerativen und neuronalen Erkrankungen assoziiert, wie z. B. Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus, Atherosklerose, Alzheimer-Krankheit, Morbus Parkinson, aber auch mit Alterungsprozessen (Bieger, 2001; Wu et al., 2004). Reaktive Spezies, die den oxidativen Stress auslösen können, sind freie Radikale (Atome, Ionen, Moleküle), welche ein oder mehrere ungepaarte Elektronen im äußersten Orbital aufweisen. Aufgrund ihrer Instabilität weisen sie eine Affinität zu aktiven chemischen Reaktionen mit anderen Molekülen auf (Carocho et al., 2013; Clarkson et al., 2000). Die ROS sind reaktive Metabolite des molekularen Sauerstoffs ( $O_2$ ). Je nach Anzahl der übertragenen Elektronen und der damit einhergehenden Reduktion des Sauerstoffs oder auch durch Enzym- und Metall-katalysierte Reaktionen (z. B. Fenton-Reaktion) werden Zwischenprodukte wie Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Einelektronübergang), Peroxide ( $O_2^{2-}$ ) (Zweielektronenübergang) und Hydroxylanionen ( $OH^{\cdot}$ ) (Dreielektronenübergang) sowie auch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gebildet (Apel et al., 2004; Köhler et al., 2014; Lugrin et al., 2014).

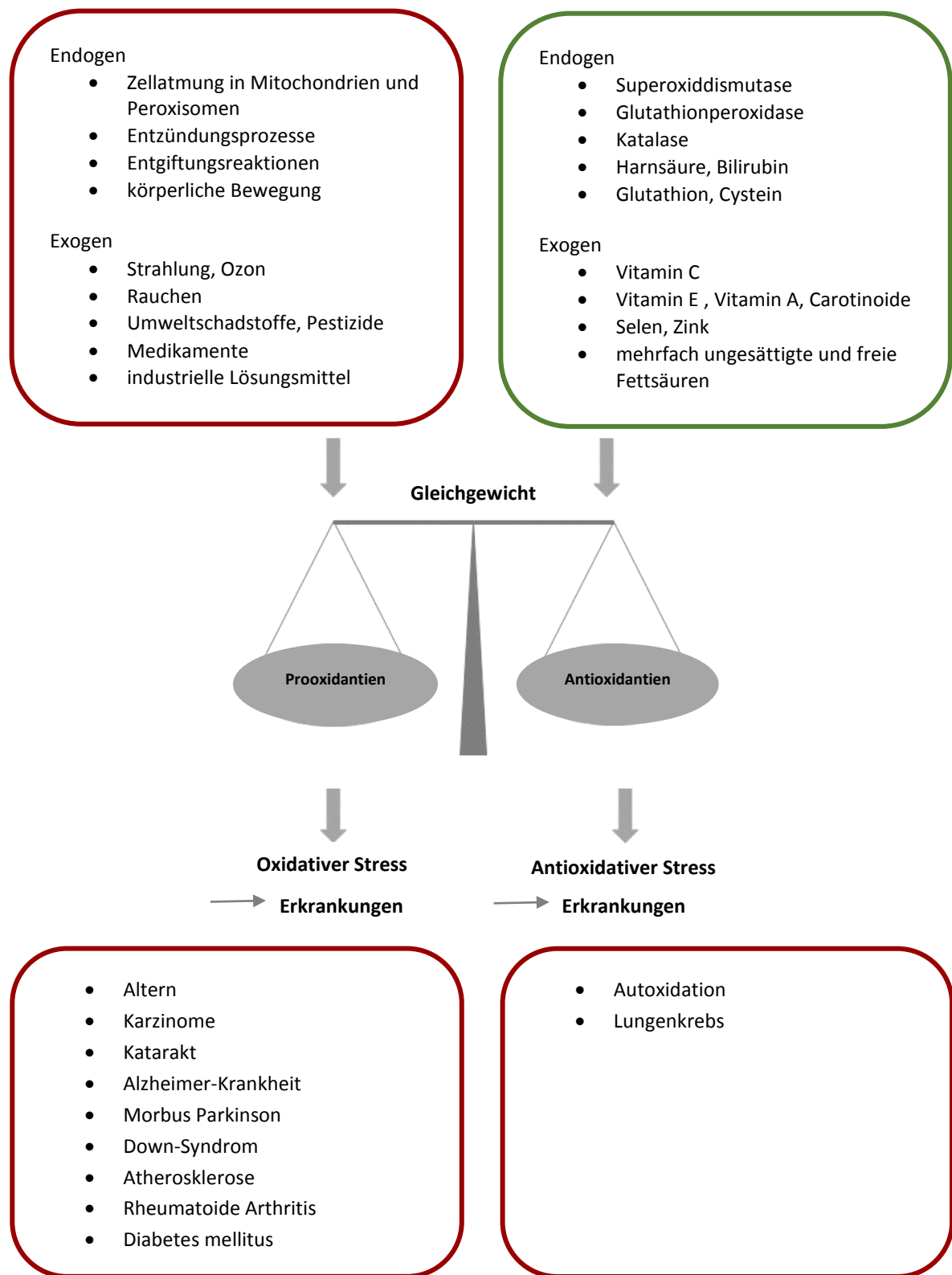
Darüber hinaus existieren ebenfalls reaktive Stickstoffspezies (RNS), welche gleichermaßen für oxidativen Stress verantwortlich sein können. Das Hauptmolekül aller RNS ist das freie Stickstoffmonoxid-radikal (NO<sup>•</sup>). Dieses entsteht bei der Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin, welche durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase katalysiert wird (Choudhari et al., 2014; Lugin et al., 2014).

Die generierten freien Radikale und reaktiven Spezies besitzen die Fähigkeit, mit ungesättigten Phospholipiden in biologischen Membran zu reagieren (Sies, 1986). Die resultierende Lipid-peroxidation kann zusätzlich durch Hitze, Licht und Metallionen hervorgerufen werden (Laguette et al., 2007). Insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), welche zwei oder mehrere Doppelbindungen besitzen, unterliegen der Lipidperoxidation (Belitz et al., 2008). Die Lipidperoxidation umfasst drei Prozesse: Initiation (Kettenstart), Propagation (Kettenwachstum) und Termination (Kettenabbruch) (Clarkson et al., 2000):

Initiation: Bildung von Peroxyl (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>)-, Alkoxy (RO<sup>•</sup>)-, oder Alkyl (R<sup>•</sup>)-Radikalen



Unter bestimmten Umständen können allerdings auch Antioxidantien prooxidativ wirken und oxidativen Stress auslösen. Beispielsweise kann α-Tocopherol die Autoxidation von Linolsäure fördern, da es bei der Reaktion mit Radikalen selbst zum Radikal wird und bei einem Mangel an Ascorbinsäure nicht regeneriert werden kann (Carocho et al., 2013). Außerdem fördert die Supplementierung mit β-Carotin bei Rauchern das Risiko für Lungenkrebs (Virtamo et al., 2014), welches sich in der α-Tocopherol-β-Carotin-Studie (ATBC-Studie) herausstellte (The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994). Abbildung 1 gibt einen Überblick über das Gleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien.



**Abbildung 1: Gleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien; Ursachen und Folgen.**

Endogene und exogene Prooxidantien modifiziert nach Carcho et al., 2013. Endogene und exogene Antioxidantien modifiziert nach Bieger, 2001. Oxidativer Stress modifiziert nach Bieger, 2001. Antioxidativer Stress modifiziert nach Carcho et al., 2013 & Virtamo et al., 2014.



## 1.2 Antioxidantien

Aerobe Lebensformen entwickelten eine Reihe von enzymatischen und nichtenzymatischen Abwehrsystemen, die vor oxidativem Stress schützen (Choudhari et al., 2014) und die Balance zwischen Antioxidantien und Prooxidantien im Gleichgewicht halten sollen (Burton et al., 2011). Enzymatische Schutzmechanismen wie beispielsweise Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase wirken endogen und können die Oxidation von zellulären Bestandteilen im Organismus reduzieren und durch oxidativen Stress bedingte Krankheiten vermindern (Huang et al., 2005). Im Allgemeinen wird ein Antioxidans als eine Substanz definiert, „die in niedrigen Konzentrationen, im Vergleich zum oxidierbarem Substrat, eine Oxidation des Substrates verzögert, verlangsamt oder verhindert“ (Halliwell, 1990).

Über die Nahrung können exogene und damit nichtenzymatisch wirkende Antioxidantien aufgenommen werden. Die protektiven Eigenschaften der Antioxidantien lassen sich auf die Wirkungen als freie Radikalfänger, Wasserstoff-Donatoren, Singulett-Sauerstoff-Quencher oder Metallion-Chelatoren zurückführen (Ikram et al., 2009). Neben hydrophilen Antioxidantien wie Ascorbinsäure und Polyphenolen zeigen auch lipophile Verbindungen wie Carotinoide und Vitamin E eine protektive Wirkung u. a. gegen Krebs, Diabetes mellitus und Entzündungen (Fiedor et al., 2014; Mocchegiani et al., 2014).

Des Weiteren existieren neben den natürlichen Antioxidantien auch synthetische Verbindungen, welche Lebensmittel- und Kosmetikprodukte vor Oxidation schützen sollen. Diese sind als Zusatzstoffe mit E-Nummern in Lebensmitteln gekennzeichnet wie z. B. E 320 Butylhydroxyanisol (BHA), E 321 Butylhydroxytoluol (BHT) und E 319 tertiär-Butylhydrochinon (TBHQ) (Baltes et al., 2011). Die Anwendung von synthetischen Antioxidantien wird in der Europäischen Union durch die Verordnung (EG) Nr.1333/2008 geregelt. Auf Grundlage langfristiger toxikologischer Studien wurde die Sicherheit und Zulassung der betreffenden Verbindungen geprüft. Dennoch scheinen sie nicht unbedenkliche Nebenwirkungen zu haben und können in hohen Konzentrationen kanzerogen wirken. Daher wird die Aufnahme von synthetischen Antioxidantien durch eine erlaubte Tagesdosis (ADI-Werte) geregelt (Taghvai et al., 2013). Aufgrund der möglichen gesundheitsschädigenden Auswirkungen der chemisch hergestellten Antioxidantien auf die Gesundheit steigen das Interesse und die Nachfrage beim Verbraucher, natürliche Antioxidantien einzusetzen. Dementsprechend ist die Erforschung der antioxidativen Naturstoffe unumgänglich.



Nährstoffstatus, die Menge an verzehrten Carotinoiden, die Matrixzusammensetzung, die Nahrungs-mittelverarbeitung und Interaktionen zwischen Carotinoiden eine wichtige Rolle (Fernández-García et al., 2012; van het Hof et al., 2000). Beispielsweise wird die Aufnahme von Lutein und Cantaxanthin durch die gleichzeitige Aufnahme von  $\beta$ -Carotin gestört und führt somit zu einer verringerten Bioverfügbarkeit (van het Hof et al., 2000).

Die Aufnahme von Carotinoiden erfolgt aufgrund des lipophilen Charakters wie bei den Fetten über den Lipidstoffwechsel (Krinsky et al., 2005). Nach der Freisetzung der Carotinoide aus der Lebensmittelmatrix werden sie im Dünndarm mit den Nahrungsfetten unter Einwirkung von Gallensäuren und Pankreassaft in Mizellen eingebaut, die den Darm passiv diffundieren können (Krinsky et al., 2005; Rao et al., 2007). Die mizellaren Carotinoide werden nach der rezeptorvermittelten Aufnahme in die Enterozyten in Chylomikronen eingelagert und gelangen über Lymphe und Blutbahn zur Leber (Krinsky et al., 2005). During et al. (2005) berichteten, dass der Scavenger-Rezeptor (SR) wie beispielsweise SR-B1 und Niemann Pick C1 like 1 Proteine (NPC1-L1) beim intestinalen Carotinoid-Transport beteiligt sein könnten (During et al., 2005). In der Leber werden zum einen die Provitamin-A-Carotinoide zu Vitamin A metabolisiert und zum anderen werden die Carotinoide über Lipoproteine sehr geringer Dichte (*very low density lipoprotein*, VLDL) wieder ins Blut abgegeben. VLDL wird durch Lipolyse und die damit verbundene Abgabe von Triglyzeriden zum Lipoprotein geringer Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) (Schweigert et al., 1998). LDL sind die Haupttransporter von unpolaren Carotinoiden wie Lycopin,  $\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin. Die polareren Xanthophylle sind gleichermaßen zwischen LDL und Lipoproteinen hoher Dichte (*high low density lipoprotein*, HDL) verteilt (Deming et al., 1999). Carotinoide von Lipoproteinen, insbesondere von LDL, werden in extrahepatischen Geweben aufgenommen (Deming et al., 1999). Die Speicherung von Carotinoiden erfolgt hauptsächlich im Fettgewebe (Rao et al., 2007).

Die Absorption von Carotinoiden ist individuell verschieden und kann durch Erkrankungen, wie z. B. genetische Defekte und Störungen der intestinalen Resorption, gehemmt sein (Brigelius-Flohé, 2014).

Tabelle 1: Vorkommen und Wirkungen von Carotinoiden.

Carotinoid	Vorkommen	vermutete Wirkung
<b>Astaxanthin</b>	Hefe, Algen, Lachs, Forelle, Shrimps, Krabben, Languste (Ambati et al., 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inhibierung der Lipidperoxidation (Ambati et al., 2014)</li> <li>▪ Reduktion der LDL-Oxidation (Iwamoto et al., 1999)</li> <li>▪ anti-inflammatorisch (Park et al., 2013)</li> <li>▪ präventiv gegen Atherosklerose, kardiovaskuläre Erkrankungen (Ambati et al., 2014)</li> <li>▪ anti-diabetisch (Dong et al., 2013)</li> <li>▪ protektiv gegen UV-Strahlung, Hautkrebs (Rao et al., 2013)</li> </ul>
<b>α-Carotin</b>	Kürbis, Spinat, Süßkartoffel, Broccoli, grüne Bohnen (Rashid, 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vorstufe von Vitamin A (Kopec et al., 2014)</li> <li>▪ senkt das Risiko für Prostatakrebs (Umesawa et al., 2014)</li> </ul>
<b>β-Carotin</b>	Karotten, Orangen, Aprikosen, Mango, Pfirsich, Pfeffer, Ölpalme, grünes Blattgemüse (Rymbai et al., 2011)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vorstufe von Vitamin A (Eldahshan, 2013)</li> <li>▪ vermindert das Risiko für Lungenkrebs, Brustkrebs (Krinsky et al., 2005)</li> <li>▪ Quenching von Singulett-Sauerstoff (Krinsky et al., 2005)</li> </ul>
<b>β-Crypto-xanthin</b>	Orangen, Pfirsich, Nektarine, Papaya (Rodriguez-Amaya, 1999), Avocado (Lu et al., 2005), Zitrusfrüchte (Granado-Lorencio et al., 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vorstufe von Vitamin A (Granado-Lorencio et al., 2014)</li> <li>▪ reduziert das Risiko für Lungen-, Gebärmutter-, Blasen-, Speiseröhrenkrebs (Iino et al., 2014)</li> <li>▪ Vorbeugung von Diabetes mellitus, rheumatische Arthritis (Iino et al., 2014)</li> </ul>
<b>Lutein</b>	Spinat, Broccoli, Grünkohl, Erbsen, Eigelb, Weizen (Abdel-Aal et al., 2013), Zucchini (Rymbai et al., 2011)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ präventiv gegen altersbedingte Makuladegeneration (AMD) (Arnold et al., 2013)</li> <li>▪ präventiv gegen Alzheimer-Krankheit, anti-inflammatorisch (Johnson, 2014)</li> <li>▪ Scavenger für ROS (Wang et al., 2014)</li> </ul>
<b>Lykopen</b>	Tomate, Wassermelone, Grapefruit (Zu et al., 2014), Papaya, Guave, Aprikosen (Jabeen et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ präventiv gegen Prostata- (Ting et al., 2014), Ösophagus-, Magen- (Krinsky et al., 2005) und Brustkrebs (Chen et al., 2014)</li> <li>▪ Quenching von Singulett-Sauerstoff (Krinsky et al., 2005)</li> <li>▪ reduziert das Risiko für Prostatakrebs, Osteoporose, Herz-Kreislauf-Erkrankung (Rao et al., 2007)</li> </ul>
<b>Neoxanthin</b>	Spinat, grünes Blattgemüse (Kanabur et al., 2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ präventiv gegen Prostatakrebs (Kanabur et al., 2014)</li> <li>▪ schützt Membranlipide vor ROS (Kanabur et al., 2014)</li> </ul>
<b>Zeaxanthin</b>	Mais, Weizen, Spinat, Petersilie, Kohl (Abdel-Aal et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ präventiv gegen altersbedingte Makuladegeneration (AMD) (Arnold et al., 2013)</li> <li>▪ Scavenger für ROS (Wang et al., 2014)</li> </ul>

## 1.2.2 Vitamin E

Vitamin E ist ein fettlösliches Vitamin, welches in jeweils vier  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Isomere der Tocopherole sowie der Tocotrienole unterteilt wird. Die chemischen Strukturen der Tocopherole und Tocotrienole sind im Manuskript II (Seiten 33 - 40) dargestellt und ausführlich erläutert. In der Natur liegt  $\alpha$ -Tocopherol nur in der *RRR*-Konfiguration an den chiralen Zentren C2, C4 und C8 vor (Colombo, 2010).

Zur Biosynthese sind nur höher entwickelte Pflanzen befähigt. Der aromatische Ring wird vom Tyrosinzweig der Shikimisäuresynthese und die isoprenoide Seitenkette auf dem Weg der Terpensynthese gebildet. Tocopherole und Tocotrienole sind für den menschlichen Organismus essentiell, da sie aufgrund des fehlenden Shikimatweges nicht synthetisiert werden können (Elmadfa et al., 1997). Nahrungsquellen sind u. a. pflanzliche Öle, Nüsse, Eigelb, Margarine, Käse, Sojabohnen, Weizen, Avocados, Oliven und grünes Blattgemüse.

Tocopherole sind überwiegend in Olivenöl, Sojaöl, Mais- und Sonnenblumenöl zu finden und Tocotrienole in Palmöl, Gerste und Reiskleie (Colombo, 2010).

Die empfohlene Tagesdosis für Vitamin E beträgt laut DGE geschlechtsspezifisch 12 - 15 mg (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, 2013). In Europa erreichen 8 % der Männer und 15 % der Frauen nicht die empfohlene Tagesdosis (Borel et al., 2013). Ein nahrungsbedingter Mangel an isoliertem Vitamin E ist jedoch beim Menschen sehr selten anzutreffen. Allerdings sind diese Vitamin-E-Empfehlungen ohne Berücksichtigung von Erkrankungen, wie z. B. Lipid-Malabsorption, Störungen des Lipoprotein-Stoffwechsels und genetische Defekte des  $\alpha$ -Tocopherol-Transfer-Proteins ( $\alpha$ -TTP) im angeborenen isolierten Vitamin-E-Mangel (AVED), welche ein Vitamin-E-Defizit hervorrufen können (Mocchegiani et al., 2014). Bei der Hypovitaminose können u. a. Tremor, Myasthenie und geistige Retardierung auftreten (Brigelius-Flohé, 2014).

Bei einer überhöhten Vitamin-E-Zufuhr wird  $\alpha$ -Tocopherol in Form des Metaboliten Carboxyethyl-hydroxy-chroman (CEHC) über Galle bzw. Harnwege ausgeschieden (Traber, 2013). Shekelle et al. (2004) fassten zusammen, dass es durch eine erhöhte Vitamin-Zufuhr, beispielsweise in Form von Supplementen, keine positiven oder auch negativen Auswirkungen bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen gibt (Shekelle et al., 2004). Die Studie von Miller et al. (2005) zeigte allerdings, dass eine Vitamin-E-Supplementierung von > 400 IU pro Tag die Gesamtmortalität erhöhen kann und demzufolge eine überhöhte Vitamin-Aufnahme zu vermeiden ist (Miller et al., 2005). Diese Studie wurde von Traber et al. (2007) kritisiert, da keine statistischen Signifikanzen von Vitamin E auf die Gesamtmortalität festgestellt wurden (Traber, 2007). Die langfristige Supplementation mit Vitamin E wird gegenwärtig immer noch kontrovers diskutiert. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit legte 2006 eine Vitamin-E-Obergrenze von 300 mg/Tag fest (European Food Safety Authority, 2006).

Vitamin E gilt als das wichtigste lipophile Antioxidans und ist als solches ein Bestandteil von Zellmembranen. Die ungesättigten Fettsäuren in den Membranlipiden werden dadurch vor Lipidperoxidationen, Peroxylradikalen und RNS geschützt. Dieser protektive Effekt beruht auf dem Abbruch von Radikal-Kettenreaktionen (Bartosz, 2010; Elmadfa et al., 1997; Mocchegiani et al., 2014). Dabei reagiert Vitamin E mit Alkoxy- und Peroxylradikalen und wird selbst zum Tocopheroxyl- bzw. Tocotrienoxylradikal oxidiert. Diese Radikale sind in

physiologischen Konzentrationen kaum wirksam und können über das Ascorbat/Ascorbyl-Radikalsystem recycelt werden (Brigelius-Flohé, 2014). Vitamin E wird mit einem geringeren Risiko für Krebs und Neuralrohrdefekt assoziiert. Weiterhin wird auch der positive Einfluss auf Diabetes mellitus, Neurodegenerationen und Entzündungen diskutiert (Azzi et al., 2000; Bartosz, 2010; Mocchegiani et al., 2014). Die protektive Wirkung von Vitamin E gegenüber koronaren kardiovaskulären Herzerkrankungen und Atherosklerose wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Wallert et al., 2014).

Lebensmittel- und Kosmetikindustrie setzen gezielt Vitamin E aufgrund der antioxidativen Eigenschaften ein, um beispielsweise Öle/Fette, die einen hohen Anteil an PUFA besitzen, vor oxidativem Verderb zu schützen (Elmadfa et al., 1997; Kerscher et al., 2011). Diese PUFA, wie beispielsweise Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) sind aufgrund der zahlreichen isolierten Doppelbindungen sehr anfällig für einen oxidativen Abbau in Lebensmitteln und Kosmetika. Die Oxidation hat einen erheblichen Einfluss auf die Produktqualität, da sie für Geschmacks- und Aromaverluste verantwortlich ist, gleichzeitig aber auch Veränderungen der Farbe und der Textur sowie des Nährwertes verursacht (Medina-Meza et al., 2014). PUFA besitzen u. a. eine anti-inflammatorische Wirkung (Mori, 2014) und beeinflussen Flexibilität und Fließeigenschaften von Membranen (Mandal et al., 2014) und können demzufolge das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen vermindern (Dittrich et al., 2014). In Folge der Oxidation (Strukturveränderungen) können die PUFA ihre positiven Eigenschaften nicht mehr ausüben.

Aus der Nahrung werden in Abhängigkeit vom Fettgehalt etwa 10 - 79 % Vitamin E absorbiert (Borel et al., 2013). Alle Isomere von Vitamin E werden, wie die Carotinoide, über Lipide in die Enterozyten des Dünndarms und anschließend über Chylomikronen weiter zur Leber transportiert. Daneben wird aber auch über eine Aufnahme von Scavenger-Rezeptor (SR) wie beispielsweise B1 (SR-B1) und Niemann Pick C1 like 1 Proteine (NPC1-L1) diskutiert. Des Weiteren ist ein direkter Austausch von Vitamin E zwischen verschiedenen Lipoproteinklassen über ATP-bindende Kassetten (ABC)-Transporter möglich (Brigelius-Flohé, 2014). In der Leber wird  $\alpha$ -Tocopherol über  $\alpha$ -TTP und über VLDL weiter mit Hilfe von LDL-Rezeptoren oder SR-B1 in extrahepatische Gewebe transportiert (Brigelius-Flohé, 2014).  $\alpha$ -Tocopherol besitzt die höchste Affinität zum  $\alpha$ -TTP (Borel et al., 2013), welches sich in der höchsten biologischen Aktivität der Vitamin-E-Isomere widerspiegelt (Schneider, 2005). Das  $\alpha$ -TTP

zeigte gegenüber anderen Vitamin-E-Formen eine geringere Affinität (z. B.  $\beta$ -Tocopherol: 50 %,  $\gamma$ -Tocopherol: 10 - 30 %,  $\delta$ -Tocopherol: 1 %). Somit wird der höchste Anteil an Nicht- $\alpha$ -Tocopherol-Isomeren in der Leber durch Cytochrom P450 katabolisiert (Jiang, 2014).

Im Gegensatz zu anderen lipophilen Vitaminen reichert sich Vitamin E nicht zu toxikologischen Konzentrationen in der Leber an. Eine erhöhte Vitamin-E-Aufnahme hat einen erhöhten Vitamin-E-Metabolismus zur Folge (Shils et al., 2006). Die höchsten Gewebekonzentrationen an  $\alpha$ -Tocopherol sind in der Leber sowie im Fettgewebe und in der Nebenniere zu finden. Dagegen wird das nicht aufgenommene  $\alpha$ -Tocopherol über Faeces und Galle ausgeschieden (Brigelius-Flohé, 2014).

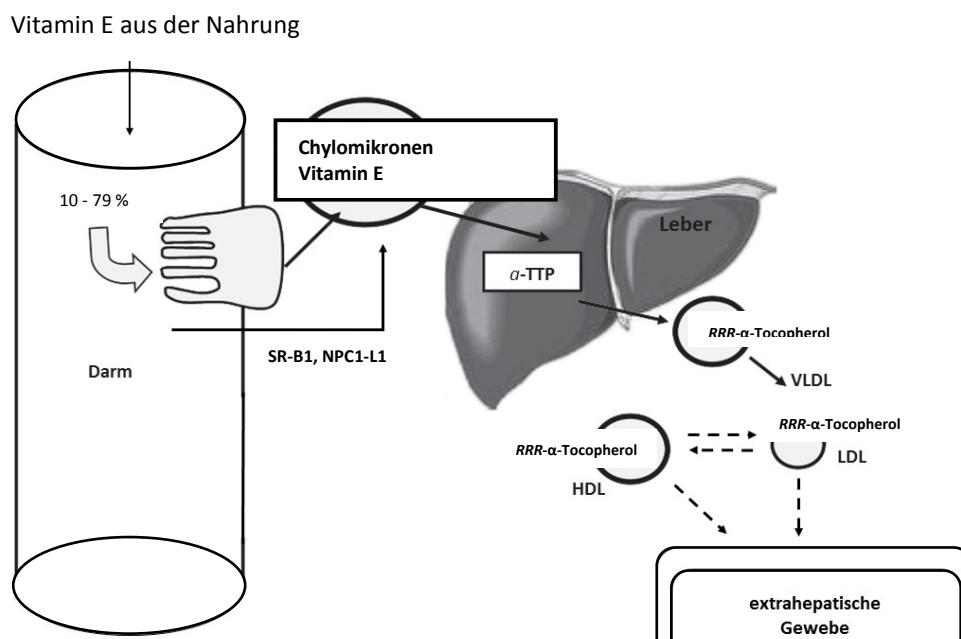


Abbildung 2: Vitamin-E-Metabolismus, modifiziert nach Borel et al., 2013.

### 1.3 Bestimmung der antioxidativen Aktivität/Kapazität

Zur Beurteilung des Radikal-Antioxidantien-Gleichgewichts in chemischen und biologischen Systemen wird die Bestimmung der antioxidativen Kapazität herangezogen (Fraga et al., 2014). Erforderlich sind *in-vitro*-analytische Methoden für die schnelle Bestimmung der antioxidativen Aktivität (AOA) von Einzelverbindungen oder antioxidativen Kapazität (AOK) von komplexen Matrices wie von Lebensmitteln und biologischen Proben (Magalhães et al., 2008). Die antioxidative Kapazität in Plasma und Gewebe kann außerdem als Biomarker für oxidativen Stress verwendet werden (Prior et al., 2013).

Die AOA steht im Zusammenhang mit einer Einzelsubstanz und wird als Reaktionskinetik zwischen Antioxidans und Radikal definiert. Während sich die AOK auf ein Stoffgemisch bezieht und mit der Thermodynamik in Verbindung gebracht wird (Apak et al., 2013). Die AOK ist ein Summenparameter, welcher die additiven/synergistischen Interaktionen von antioxidativen Einzelsubstanzen kombiniert (Apak et al., 2013). Die Testsysteme können bezüglich ihrer Reaktion in Elektronentransfer (ET)- und Wasserstoffatomtransfer (HAT)-basierende Methoden eingeteilt werden (Prior et al., 2005). Im ET-basierenden Testsystem werden Elektronen eines Antioxidans auf ein Oxidans übertragen. Diese Reduktion hängt mit einer Farbveränderung, welche der Konzentration des Antioxidans proportional ist, zusammen und kann photometrisch gemessen werden (Apak et al., 2013). Zu den ET-basierenden Methoden zählen u. a. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC)-Test, *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)-Test, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-Test und Gesamtphenol-Test nach Folin-Ciocalteu (Huang et al., 2005).

HAT-basierende Methoden detektieren hingegen die Fähigkeiten eines Antioxidans, Wasserstoffatome auf ein freies Radikal zu übertragen und es entsprechend abzufangen (Prior et al., 2005). Eine Referenzsubstanz wird als oxidierbares Substrat genutzt und konkurriert mit dem Antioxidans um die freien Radikale, wie z. B. Fluoreszein im *Oxygen Radical Absorption Capacity* (ORAC)-Test mit Peroxylradikalen. Weitere verwendete HAT-Methoden sind der Crocin-Bleichtest und der *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP)-Test (Huang et al., 2005). Im letzten Jahrzehnt etablierten sich vor allem wässrige Testsysteme, um das antioxidative Potential von hydrophilen Antioxidantien wie Ascorbinsäure und Polyphenolen zu untersuchen (Apak et al., 2013; Çelik et al., 2010).

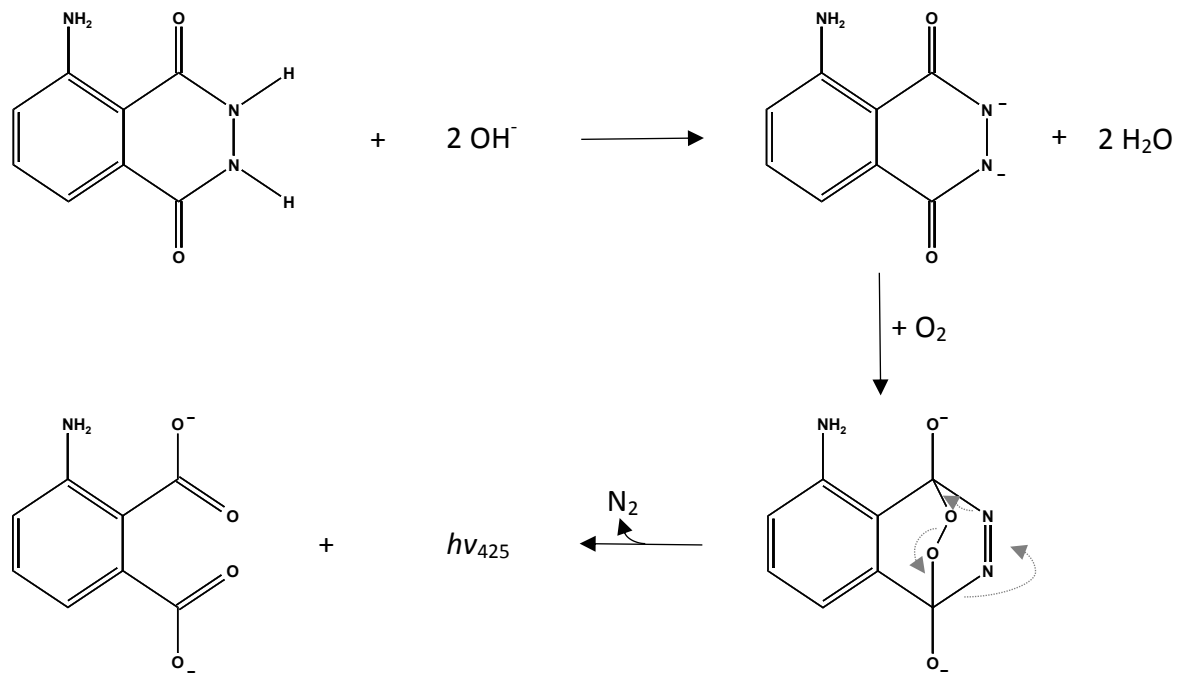
Die AOK-Ergebnisse sind oft nicht vergleichbar, da sie auf unterschiedlichen Mechanismen, Redoxpotentialen und pH-Abhängigkeiten sowie Lösungsmitteln basieren. Aus diesem Grund sind verschiedene Verbindungen oder Lebensmittelextrakte nur innerhalb eines Testsystems vergleichbar (Apak et al., 2013). Generell existiert kein Einzeltest, der die "gesamte antioxidative Kapazität" einer Probe repräsentiert. Außerdem finden die chemischen Reaktionen *in vitro* statt, und dementsprechend ist die Bedeutung dieser Ergebnisse *in vivo* nicht bekannt. Auch Informationen über Bioverfügbarkeit, Absorption, Verteilung und Metabolismus ermöglichen nicht, die Ergebnisse aus den *in-vitro*-Tests auf den menschlichen



Organismus zu übertragen (Apak et al., 2013; Niki, 2010). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine große Anzahl von analytischen Methoden zur Messung der AOK in den verschiedensten Matrices entwickelt. In Abhängigkeit von der unterschiedlichen Löslichkeit der Antioxidantien sowie Lebensmittel- und Pflanzenextrakte wurden zur Erfassung der AOA von lipophilen Substanzen bisher nur wenige Methoden in der Wissenschaft etabliert (Müller et al., 2011; Wu et al., 2004).

Der  *$\alpha$ -Tocopherol Equivalent Antioxidant Capacity* ( $\alpha$ -TEAC)-Test ist neben dem lipophilen ORAC-Test bereits eine etablierte Methode um die AOA lipidlöslicher antioxidativer Substanzen zu bestimmen. Für diese lipophilen Messungen wurde der wasserlösliche Trolox-Kalibrierstandard des TEAC-Tests gegen das fettlösliche Analogon  $\alpha$ -Tocopherol ausgetauscht (Müller et al., 2011; Müller et al., 2010). Die Reaktion beruht auf der Reduktion des stabilen blaugrünen ABTS-Radikalkations in Anwesenheit von antioxidativ wirksamen Substanzen und der damit verbundenen Abschwächung der Absorption bei 734 nm (Müller et al., 2011; Westphal et al., 2014).

Die Photochemolumineszenz-Methode (PCL) ist eine weitere Möglichkeit, um lipophile Antioxidantien als Summenparameter zu erfassen. Das Testsystem basiert auf einer photoinduzierten Chemolumineszenzreaktion im alkalischen Milieu. Der Reaktionsmechanismus basiert auf einer nukleophilen Addition (Merényi et al., 1990) und ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt (Popov et al., 1994; Prior et al., 2005) Abbildung 3 zeigt den möglichen Reaktionsmechanismus.



**Abbildung 3: Möglicher Reaktionsmechanismus am Beispiel von Luminol im Photochemolumineszenz-System.**

Im basischen Milieu liegt Luminol (3-Aminophthalhydrazid) deprotoniert vor und kann durch Oxidationsmittel wie Sauerstoff an den Carbonylgruppen nukleophil angegriffen werden. Aus dem instabilen Intermediat entsteht unter Stickstoffabspaltung das angeregte 3-Aminophthalat-Dianion, welches in seinen Grundzustand zurückfällt. Dadurch wird Energie in Form von Licht ( $\lambda=425 \text{ nm}$ ) frei. Antioxidantien können diese Reaktion hinauszögern, in dem sie den Singulett-Sauerstoff abfangen.

## 1.4 Wechselwirkungen zwischen antioxidativen Substanzen

Die natürlich vorkommenden Antioxidantien existieren in der Natur nur in Kombinationen. Somit können Antioxidantien die Oxidation von biologischen Molekülen durch Wechselwirkungen mit anderen antioxidativen Substanzen inhibieren (Niki, 2010). Wechselwirkungen von zwei oder mehr Antioxidantien können in Bezug auf die AOK größer (Synergismus) oder kleiner (Antagonismus) als die Summe der Einzelwirkungen sein (Prieto et al., 2014). Die Effizienz der einzelnen Substanzen ist bei additiven Interaktionen gleich (Peyrat-Maillard et al., 2003). Die unterschiedlichen Zusammensetzungen an antioxidativ wirksamen Substanzen können entsprechend synergistisch, antagonistisch und additiv miteinander wechselwirken (Liu et al., 2008).

Das bekannteste Zusammenspiel ist die synergistische, antioxidative Wirkung von Vitamin E und Vitamin C z. B. bei der Lipidperoxidation *in vivo* (Niki et al., 2012), wobei das entstehende  $\alpha$ -Tocopheryloxylradikal von Vitamin C wieder regeneriert wird (Niki, 2014b). Carotinoide interagieren synergistisch mit anderen Antioxidantien und sind in Mischungen effektiver als Einzelverbindungen (Stahl et al., 2003). Mehrere Autoren berichteten über synergistische Interaktionen von lipophilen Antioxidantien wie Lycopin mit  $\alpha$ -Tocopherol,

$\beta$ -Carotin mit Lutein, Lutein mit  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Tocopherol mit  $\beta$ -Carotin (Kotíková et al., 2011; Liu et al., 2008; Palozza et al., 1992; Zanfini et al., 2010).

Unterstützend zu den *in-vitro*-Daten konnte *in vivo* bei Schweinen gezeigt werden, dass eine kombinierte Fütterung von  $\alpha$ -Tocopherol und Vitamin C eine höhere Tocopherolkonzentration als bei einer singularen Vitamin-E-Gabe nach sich zieht (Eichenberger et al., 2004). Im Rattenleber-Homogenat wurden ebenfalls synergistische Effekte auf die Inhibierung der eiseninduzierten Lipidperoxidation untersucht. Die Kombination aus Melatonin, Vitamin E, Glutathion und Vitamin C verbesserte erheblich die Schutzwirkung gegen die Lipidperoxidation (Gitto et al., 2001). Des Weiteren wurde berichtet, dass die Kombination von Lycopin und  $\alpha$ -Tocopherol synergistische antioxidative Effekte gegenüber der LDL-Oxidation zeigte. Die LDL-Oxidation spielt vermutlich eine wichtige Schlüsselrolle bei der Entstehung von Atherosklerose. Die Kombination von Lycopin und  $\alpha$ -Tocopherol könnte das Risiko an Atherosklerose zu erkranken, möglicherweise verringern (Fuhrman et al., 2000).

Weiterhin könnten die Wechselwirkungen von Antioxidantien deren Resorption beeinflussen und infolgedessen auch physiologische Auswirkungen haben (van het Hof et al., 2000; Wang et al., 2011). Die Interaktionen der Antioxidantien haben auch bei der Bestimmung der AOK von Lebensmittel- und Pflanzenextrakten sowie biologischen Materialien einen erheblichen Einfluss.

## **1.5 Matrixeinfluss auf die antioxidative Kapazität**

Die chemische Vielfalt von natürlichen Antioxidantien erschwert die Trennung und Quantifizierung einzelner antioxidativer Substanzen aus einem komplexen Lebensmittel und aus biologischen Matrices (Apak et al., 2013). Diese Matrices bestehen z. B. aus einer komplexen Substanzmischung unterschiedlicher Polaritäten wie aus hydrophilen Polyphenolen und Ascorbinsäure sowie aus lipophilen Carotinoiden und Vitamin E, welche zudem unterschiedlich miteinander wechselwirken können (Michiels et al., 2012). Des Weiteren zeigen auch nichtphenolische Verbindungen wie Fructose, Glucose und Saccharose in Lebensmittelproben synergistische/antagonistische Effekte, die Einflüsse auf die Bestimmung der AOK haben könnten (Magalhães et al., 2010).

Die Abgrenzung zwischen polaren und unpolaren Substanzen stellt ebenfalls eine Problematik dar. Phenolische Verbindungen werden beispielsweise mit Wasser, Methanol, Ethanol, Aceton, Diethylether und Ethylacetat extrahiert (Acosta-Estrada et al., 2014; Michiels et al., 2012). Vitamin E ist ebenfalls in Ethanol löslich (Werner et al., 2011) sowie in Aceton, Ether und anderen organischen Lösungsmittel (Schneider, 2005). Die Extrahierbarkeit der Carotinoide unterscheidet sich im Hinblick auf die verschiedenen Polaritäten. Carotine sind sehr gut in aprotisch unpolaren Lösungsmittel wie Hexan löslich, während für die sauerstoffhaltige Xanthophylle und ihre Ester polare Lösungsmittel wie Ethanol und Aceton geeignet sind (Amorim-Carrilho et al., 2014). Allerdings können Proteingebundene Carotinoide auch in wässriger Umgebung gelöst werden (Müller, 2011). Bei der Extraktion von lipophilen Antioxidantien ist je nach Lösungsmittel die Mitextraktion von polaren Substanzen und Matrizes wie z. B. Zucker nicht auszuschließen. Bei Verwendung des protischen Lösungsmittels Ethanol können zum einen lipophile Verbindungen wie Vitamin E, Xanthophylle (Lutein, Zeaxanthin) und zum anderen auch polare Substanzen wie u. a. Polyphenole, Fructose, Glucose extrahiert werden. Je nach Wahl des Lösungsmittels können lipophile Extrakte auch hydrophile Antioxidantien enthalten. Infolgedessen ist die Messung der tatsächlichen AOK von lipophilen Antioxidantien gegenwärtig nicht ohne Probleme.

## 2 Zielstellung

Zur Messung der antioxidativen Aktivität/Kapazität von antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen wurden chemisch-analytische *in-vitro*-Testsysteme entwickelt. Derzeit existiert allerdings keine universelle standardisierte Methode, welche eine gesamte antioxidative Kapazität ermittelt. Nicht nur SET- und HAT-basierende Reaktionsmechanismen sollten berücksichtigt werden, sondern neben der hydrophilen Kapazität auch die lipophile Kapazität. Eine große Anzahl von Testsystemen basieren auf der Bestimmung von hydrophilen Antioxidantien. Ein Problem besteht darin, dass lipophile Antioxidantien in der Natur in kleineren Konzentrationen vorkommen als hydrophile Verbindungen. Demzufolge müssen Methoden zur Messung der lipophilen AOK ausreichend empfindlich für niedrige Konzentrationen sein. Für fettlösliche Substanzen wie Vitamin E und Carotinoide wurden erst in den letzten vier Jahren von Müller et al. (2010, 2011) Methoden zur Erfassung der antioxidativen Aktivität von lipophilen Antioxidantien entwickelt und optimiert (Müller et al., 2011; Müller et al., 2010).

Ein großer Kritikpunkt an den *in-vitro*-Testmethoden ist die fehlende physiologische Relevanz. Denn die ermittelten antioxidativen Kapazitäten von Lebensmitteln *in vitro* können nicht auf den menschlichen Organismus übertragen werden. Zum einen wird in einigen *in-vitro*-Testsystemen das physiologische pH-Milieu vernachlässigt (Schlesier et al., 2002), zum anderen reagieren beispielsweise die DPPH- und TEAC-Testsysteme mit nicht physiologisch gebildeten Radikalen. Dagegen ist der ORAC-Test durch die Messung von Peroxylradikalen biologisch relevanter, da Peroxylradikale im Organismus gebildet werden können (Rodriguez-Amaya, 2010). Deshalb sind Methoden notwendig, die noch weitere biologisch wichtige Radikale und Singulett-Sauerstoff-Quencher berücksichtigen sollten (Rodriguez-Amaya, 2010).

Daher bestand das Ziel dieser Arbeit darin, eine optimierte Photochemolumineszenz-Methode in einem Küvettenystem zur Bestimmung des lipophilen antioxidativen Potentials zu etablieren. In dieser Methode sollten Superoxidradikal-Anionen zur Detektion von fettlöslichen Antioxidantien herangezogen werden, die physiologisch von großer Bedeutung sind. Das Vitamin-E-Isomer  $\alpha$ -Tocopherol sollte als Referenzsubstanz verwendet werden, da es als wichtiges lipophiles Antioxidans gilt. Die antioxidativen Aktivitäten von verschiedenen fettlöslichen Antioxidantien wie Carotinoide und Vitamin E sollten zunächst ermittelt und auf

ihre Struktur-Wirkungsbeziehung untersucht werden. Nachfolgend sollte die PCL-Methode auf die Untersuchung der AOK von Pflanzenölen und Lebensmittelkomponenten angewendet werden. Die HPLC-Quantifizierung der einzelnen Carotinoide und von Vitamin E wird zur Berechnung des Beitrags an der lipophilen AOK herangezogen. Des Weiteren ist der Einfluss der Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien und der Matrix zu untersuchen. Dies sollte zur Vergleichbarkeit der AOK ebenso mit dem bereits etablierten  $\alpha$ -TEAC-Test durchgeführt werden.

### 3 Übersicht der Manuskripte

#### Manuskript I

**Use of photochemiluminescence for the determination of antioxidant activities of carotenoids and antioxidant capacities of selected tomato products**

Bauerfeind J., Hintze V., Kschonsek J., Killenberg M., Böhm V.  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2014), 62, 7452-7459

[dx.doi.org/10.1021/jf502019r](https://doi.org/10.1021/jf502019r)

Annahme: 01.07.2014

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die in einem optimierten PCL-Küvetten-System ermittelten antioxidativen Aktivitäten von ausgewählten Carotinoiden mit bereits etablierten Methoden ( $\alpha$ -TEAC, FRAP, DPPH, LPSC) zu vergleichen. Dabei konnte ein positiver Einfluss der chemischen Struktur der Carotinoide auf die AOA beobachtet werden. Innerhalb der Gruppe der Carotine zeigte die AOA eine Abhängigkeit von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen, mit Ausnahme von Lycopin. Frische Tomaten und Tomatenprodukte, die reich an Lycopin sind, wurden zur Prüfung der Anwendbarkeit des PCL-Testsystems für die Bestimmung des lipophilen antioxidativen Potentials untersucht. Zum Vergleich wurden sie auch mit dem  $\alpha$ -TEAC-Test analysiert. Die Gehalte an Carotinoiden und Vitamin E korrelierten nicht mit der AOK im PCL-System. Des Weiteren konnte aber ein linearer Zusammenhang zwischen der AOK im  $\alpha$ -TEAC-Test und dem Carotinoid-Gehalt in den Tomatenproben festgestellt werden.

#### Arbeitsanteile:

- Jasmin Bauerfeind: Messungen der AOA der Carotinoide mittels PCL, Quantifizierungen der Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte in den Tomatenproben mittels HPLC, experimentelle und statistische Auswertungen, Erstellung des Manuskriptes  
Gesamtanteil: 70 %
- Victoria Hintze: Messungen der AOK von Tomatenproben mittels PCL

Josephine Kschonsek: Extraktion der Tomatenproben, Messung der AOK von Tomatenproben mittels  $\alpha$ -TEAC

Dr. Margrit Killenberg: Bereitstellung des PCL-Küvettenystems, Korrektur des Manuskriptes

PD Dr. Volker Böhm: Korrektur des Manuskriptes



## Manuskript II

### **Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence**

Karmowski J., Hintze V., Kschonsek J., Killenberg M., Böhm V.

*Food Chemistry (2015), 175, 593-600*

<http://dx.dio.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.010>

Annahme: 03.12.2014

Vitamin E kann vom menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden und ist eines der wichtigsten Antioxidantien in der menschlichen Ernährung. Die antioxidative Aktivität von Tocopherolen und Tocotrienolen im PCL-System zeigte eine Abhängigkeit von der Anzahl und Position der Methylgruppen am Chromanring. Die biologischen Aktivitäten und Redoxpotentiale der Vitamin-E-Isomere stehen im Zusammenhang zu ihrer AOA. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Summe der Gehalte an Vitamin E und Carotinoiden mit den lipophilen antioxidativen Kapazitäten (PCL,  $\alpha$ -TEAC) von diversen Ölen, Weizenproben sowie einem Weizenprodukt, Milch und Sahne korrelieren. Wie erwartet, wiesen Vitamin-E-reiche Öle die höchsten antioxidativen Effekte auf. Des Weiteren konnte in beiden Testsystemen eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Differenzen zwischen den experimentellen Messwerten und den theoretisch berechneten AOK im PCL-System könnten auf synergistische und antagonistische Effekte zwischen Antioxidantien hinweisen.

#### **Arbeitsanteile:**

- Jasmin Karmowski: Versuchungsdurchführung: Messungen der AOA von Tocopherolen und Tocotrienolen mittels PCL sowie der AOK von Pflanzenölen mittels PCL und  $\alpha$ -TEAC, Quantifizierungen der Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte in den Ölproben mittels HPLC, experimentelle und statistische Auswertungen, Erstellung des Manuskriptes  
Gesamtanteil: 70 %
- Victoria Hintze: Versuchungsdurchführung: Messungen der AOK von Lebensmittelproben (Weizen, Makkaroni, Milch, Sahne) mittels PCL

- Josephine Kschonsek: Versuchungsdurchführung: Extraktion der Weizenproben und Makkaroni, Quantifizierung von Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalten in den Lebensmittelproben mittels HPLC, Messung der AOK von Lebensmittelproben (Weizen, Makkaroni, Milch, Sahne) mittels  $\alpha$ -TEAC
- Dr. Margrit Killenberg: Bereitstellung des PCL-Küvetten systems, Korrektur des Manuskriptes
- PD Dr. Volker Böhm: Korrektur des Manuskriptes

## Manuskript III

### Interactions between lipophilic antioxidants measured by PCL and $\alpha$ -TEAC as well as the influence of matrix compounds on the lipophilic antioxidant capacity

Karmowski J., Enke K., Killenberg M., Böhm V.

LWT- Food Science and Technology

Submission: 19.01.2015

Die Summe aus den Gehalten von Vitamin E und Carotinoiden spiegelte sich nicht in der lipophilen AOK von Lebensmittelextrakten wieder (Manuskript I). Diese Differenzen ließen Wechselwirkungen zwischen den Antioxidantien vermuten. Untersuchungen von je zwei verschiedenen lipophilen Antioxidanten verschiedener Konzentrationen im Gemisch bestätigten die Annahme von synergistischen, additiven und antagonistischen Effekten im PCL-System. Die Anwesenheit von funktionellen Gruppen wie Hydroxylgruppen könnte einen Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Antioxidantien besitzen. Im  $\alpha$ -TEAC zeigten die untersuchten Mischungen einen Antagonismus in Bezug auf die AOK. Des Weiteren können Glucose, Fructose, Saccharose und lösliche Stärke in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel und ihrer Löslichkeit die lipophile antioxidative Kapazität im PCL-System beeinflussen sowie mit Antioxidantien wie  $\alpha$ -Tocopherol und Lycopin interagieren. Im  $\alpha$ -TEAC zeigten die mit n-Hexan extrahierten Zuckerproben keine Reduktion der ABTS-Radikalkationen und damit keine AOK.

#### Arbeitsanteile:

Jasmin Karmowski: Versuchungsdurchführung: Messungen der Wechselwirkungen zwischen den Antioxidantien mittels PCL und  $\alpha$ -TEAC, Messungen der AOK von Zuckerextrakten im  $\alpha$ -TEAC-System sowie Bestimmungen der AOK von Zuckerextrakten (Extraktionsmittel: MeOH/MtBE, 50/50, v/v) mittels PCL, experimentelle und statistische Auswertungen, Erstellung des Manuskriptes  
Gesamtanteil: 80 %

Kathleen Enke: Versuchungsdurchführung: Messungen der AOK von methanolischen Zuckerextrakten mittels PCL

Dr. Margrit Killenberg: Bereitstellung des PCL-Küvettenystems, Korrektur des Manuskriptes

PD Dr. Volker Böhm: Korrektur des Manuskriptes

## 3.1 Manuskript I

## Use of Photochemiluminescence for the Determination of Antioxidant Activities of Carotenoids and Antioxidant Capacities of Selected Tomato Products

Jasmin Bauerfeind,<sup>†</sup> Victoria Hintze,<sup>†</sup> Josephine Kschonsek,<sup>†</sup> Margrit Killenberg,<sup>‡</sup> and Volker Böhm<sup>\*†</sup>

<sup>†</sup>Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29, D-07743 Jena, Germany

<sup>‡</sup>Analytik Jena AG, Konrad-Zuse Straße 1, 07745 Jena, Germany

**ABSTRACT:** The purpose of this study was to compare the antioxidant activity of carotenoids to that of  $\alpha$ -tocopherol by using a photochemiluminescence method (PCL). Comparisons to results obtained by using other established methods ( $\alpha$ -TEAC, FRAP, DPPH, LPSC) were carried out. A relationship between the chemical structure of carotenoids and their antioxidant activity could be discussed. The number of conjugated double bonds and functional groups had a positive influence. Additionally, the lipophilic antioxidant capacities of selected tomato products were analyzed using PCL and  $\alpha$ -TEAC. HPLC was used to identify and quantify contents of carotenoids, tocopherols, and tocotrienols. The raw material fresh tomatoes had the lowest antioxidant effect in both assays due to the lower carotenoid content. Tomato ketchup had the highest AOC in PCL, and tomato puree, in  $\alpha$ -TEAC. The antioxidant capacities were mainly dependent on the water content of the samples. Furthermore, a concentration-dependent effect could be observed in both assays.

**KEYWORDS:** lipophilic antioxidants, carotenes, xanthophylls, singlet oxygen, concentration-dependent effects

### INTRODUCTION

Carotenoids are a family of fat-soluble natural colorants and are responsible for many of the red, orange, and yellow hues of plant leaves, fruits, and flowers as well as the colors of some birds, insects, fishes, and crustaceans.<sup>1</sup> Approximately 750 carotenoids have been described in nature; however, only 20 of them are present in the human diet.<sup>2</sup> Only plants, bacteria, fungi, and algae are able to synthesize carotenoids, but many animals accumulate carotenoids from their diet.<sup>3</sup> Epidemiologic studies have shown that the increasing consumption of carotenoids is correlated with a diminished risk for several major degenerative diseases, including certain types of cancer, coronary heart diseases, and age-related macular degeneration.<sup>2</sup> The preventive effects have been associated with their antioxidant activity, protecting cells and tissues from oxidative damage.<sup>3</sup> Carotenoids play an important role in the protection of plants against photooxidative processes. They are efficient antioxidants, scavenging singlet molecular oxygen and peroxy radicals. In the human organism, carotenoids are part of the antioxidant defense system.<sup>3</sup>

Medicinal and Life Sciences are very interested in the measurement of AOA of single substances or of AOC of foods, plants, and biological liquids such as blood and urine. Methods are established as sum parameters which have different physical and chemical reactions, e.g. fluorescence (ORAC), UV-vis absorption (TEAC, FRAP), but to date these methods are rarely used for lipophilic substances. The photochemiluminescence (PCL) is another method to measure the lipophilic antioxidants. References with data of the determination of AOA of single carotenoid standards or of lipophilic AOC of food samples by PCL are scarce.

The photochemiluminescence assay (PCL), which can be used to investigate the antioxidant activity of lipophilic substances, was first described by Popov and Lewin.<sup>4,5</sup> This

method is based on a photoinduced chemiluminescence reaction, induced by UV light at 375 nm, in an alkaline environment. The reaction mechanism is a special case of nucleophilic addition. To date, the mechanism is not completely clarified, but the following mechanism shown in Figure 1 is supposed.<sup>6,7</sup>



Figure 1. Reaction mechanism for PCL assay.

A photosensitizer (S) gets an optical excitation ( $h\nu_1$ ), then two kinds of radicals are generated: photosensitizer-cation ( $S^+$ ) and superoxide-anion radical ( $O_2^-$ ). The free radicals are detected with chemiluminescence reagent, which works as photosensitizer as well as an oxygen radical detection reagent. The intensity of the chemiluminescence signal decreased with rising concentrations of antioxidants.<sup>8,9</sup>

The aim of this work was to analyze the oxidation-inhibition properties of carotenes and xanthophylls by using a lipophilic photochemiluminescence method. Following, these values were compared to results, which were measured by  $\alpha$ -TEAC-, FRAP-, and LPSC-assays. The correlation between the antioxidant activities of the carotenoids and their structures will be discussed. The second intention was to determine the lipophilic antioxidant capacities of different tomato products, e.g. tomato ketchup and tomato pesto. Furthermore, the carotenoid and vitamin E contents in all samples were analyzed by HPLC.

Received: February 3, 2014

Revised: June 24, 2014

Accepted: July 1, 2014

Published: July 15, 2014

## MATERIAL AND METHODS

**Chemicals.** DMSO (dimethyl sulfoxide), MtBE (methyl-*tert*-butyl ether), and all other solvents used were of HPLC grade. Pure *DL*- $\alpha$ -tocopherol (100% analytical grade) was used from Calbiochem (Darmstadt, Germany). All carotenoids (97–99% analytical grade) were purchased from CaroNature (Ostermundigen, Switzerland). HPLC grade water (18 M $\Omega$ ) was prepared using a Millipore Milli-Q purification system (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany). Carbonate buffer, polar aprotic mixture, photosensitizer, and all other chemicals were of analytical grade. Special reagent was 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany).

**Standard Preparation.** Stock solutions of each carotenoid standard were prepared in the specific solvent and stored at  $-30^{\circ}\text{C}$ . The exact concentrations of the stock solutions were determined spectrophotometrically at their specific absorption maxima as described in ref 10.

**Food Samples.** Fresh tomatoes, tomato ketchup, tomato passata, tomato pesto, and tomato puree were bought in a local supermarket and stored in the refrigerator until analysis.

**Food Extraction.** All examinations were performed under subdued light conditions. All products were each weighed into an Erlenmeyer flask and extracted with methanol/tetrahydrofuran (1/1, v/v) by homogenization using an ultra turrax (type T25, IKA-Werke, Staufen, Germany) for 30 s on ice. The extract was filtered under vacuum through filter paper no. 390 (Filtrak, Niederschlag, Germany) on a Büchner funnel with magnesium hydroxide carbonate. This extraction was repeated until colorlessness. The combined extracts were rotary-evaporated under reduced pressure at  $30^{\circ}\text{C}$  to a small volume. The dried residues were dissolved in a defined volume of MeOH/THF (50/50, v/v) using an ultrasonic bath. After centrifugation (18407 rcf, 5 min), the samples were used for PCL and HPLC measurement. For the  $\alpha$ -TEAC assay the samples were extracted with *n*-hexane.

**PCL.** Carotenoid stock solutions and food extracts were dried under nitrogen and dissolved in MtBE/DMSO (1/4, v/v). The carotenoid concentrations were prepared to 25, 50, and 75  $\mu\text{mol/L}$ , and the food samples were diluted in different concentrations.  $\alpha$ -Tocopherol (dissolved in methanol) at concentrations of 2.5–125  $\mu\text{mol/L}$  was used for calibration. Hence, AOA and AOC were expressed as  $\alpha$ -tocopherol equivalents ( $\alpha$ -TE). The measurement was performed in a special cuvette apparatus (Analytik Jena AG, Jena, Germany). A polar aprotic mixture, carbonate buffer, photosensitizer and sample were pipetted in a quartz glass cuvette (Hellma GmbH, Müllheim, Germany). Methanol and MtBE/DMSO (1/4, v/v), were used as blank.

**$\alpha$ -TEAC Assay.** The lipophilic  $\alpha$ -TEAC assay was performed according to (ref 10) by using a V-530 spectrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany). The  $\alpha$ -TEAC procedure is based on the decolorization of the ABTS $^{*+}$  to determine the lipophilic antioxidant properties of the samples. The method was described by Miller et al.<sup>11</sup> and was modified slightly by numerous researchers. Briefly, the radical cation ABTS $^{*+}$  was prepared by filtering an ABTS solution (tip of a spatula ABTS dissolved in PBS) covered with manganese dioxide powder. Afterward, the particles of manganese dioxide were removed by 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filtration. The stable radical cation ABTS $^{*+}$  was produced daily by diluting with 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) to an absorbance of  $0.70 \pm 0.05$  at 730 nm in a cuvette spectral photometer and preincubated at room temperature for 2 h. For the measurement, 100  $\mu\text{L}$  of lipophilic extract of the antioxidants and 1000  $\mu\text{L}$  of the adjusted ABTS $^{*+}$  solution were shaken for 30 s in reaction tubes. Following, the solution was transferred completely in half-micro cuvettes and was centrifuged for 30 s at 200 rcf to separate the phases. Exactly 2 min after initiation of mixing, the absorbance of the lower phase was measured at 734 nm. The lipophilic antioxidant potential was expressed in mmol  $\alpha$ -tocopherol equivalents per 100 g.

**Analysis of Carotenoids and Vitamin E.** The analysis of carotenoid compounds was performed on an HPLC apparatus with diode array detection at 450 nm (Merck Hitachi, Darmstadt, Germany). The chromatographic separation was performed at  $13^{\circ}\text{C}$  on a Develsil RP-Aqueous (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) C<sub>30</sub>-column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) by using the following gradient procedure of

MeOH (solvent A) and MtBE (solvent B): initial conditions 90% solvent A and 10% solvent B; 40 min linear gradient to 50% solvent B; 2 min linear gradient to 60% solvent B, 40% solvent A and 60% solvent B for 23 min; 5 min linear gradient to 10% solvent B; and 90% solvent A and 10% solvent B for 5 min. The flow rate was 1 mL/min. The carotenoid standards were diluted daily 1:50 with MeOH/THF (50/50, v/v) modified to Werner et al.<sup>12</sup>

Tocopherols and tocotrienols were analyzed with a fluorescence detector (excitation: 292 nm, emission: 330 nm) (Merck Hitachi, Darmstadt, Germany) according to the method of Franke et al.<sup>13</sup> The column was a normal-phase Eurospher 100 Diol (250 mm  $\times$  4.0 mm, 7  $\mu\text{m}$ , Knauer, Berlin, Germany) and was heated to  $35^{\circ}\text{C}$ . Elution was carried out using a mixture of *n*-hexane/MtBE (98/2, v/v) at a flow rate of 1.5 mL/min, and the run time was 45 min. Calibration curves were done for  $\alpha$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -tocopherol, and  $\gamma$ -tocotrienol in the range 0.1–3  $\mu\text{g/mL}$ , for  $\beta$ -tocopherol 0.1–1  $\mu\text{g/mL}$ , for  $\alpha$ - and  $\beta$ -tocotrienol 0.1–2  $\mu\text{g/mL}$ , and for  $\delta$ -tocotrienol 0.3–6  $\mu\text{g/mL}$ .

Carotenoids and tocopherols as well as tocotrienols were identified and quantified by comparison with external standards.

**Statistical Analysis.** All experiments were done in triplicate. The data are expressed as means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). The data were analyzed with ANOVA using SPSS statistical software (version 19.0; SPSS, Chicago, USA). The homogeneity of variances for all data was assumed by Levene's test. The antioxidant activities of carotenoids and the antioxidant capacities of tomato products were tested with Student–Newmann–Keuls procedure. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Tests on correlation between the carotenoid content and the antioxidant capacity were made using the Pearson procedure  $p < 0.01$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

**AOA of Carotenes and Xanthophylls.** The antioxidant activities of 6 carotenes and 11 xanthophylls were measured in three different concentrations on three different days. Table 1

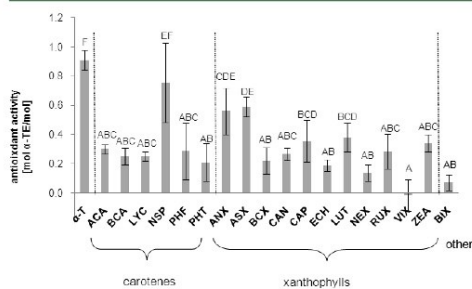
**Table 1. Antioxidant Activity (mol  $\alpha$ -TE/mol) of Different Concentrations of  $\alpha$ -Carotene, Measured on Three Different Days by Using PCL; Different Letters within Columns Indicate Significant Differences between Days, Determined by ANOVA with *post hoc* S–N–K ( $p < 0.05$ )**

day	antioxidant activity [mol $\alpha$ -TE/mol] of $\alpha$ -carotene		
	25 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	75 $\mu\text{mol/L}$
1	0.48 $\pm$ 0.02 <sup>F</sup>	0.33 $\pm$ 0.05 <sup>D</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>
2	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>F</sup>	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>D</sup>	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
3	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>E</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>C</sup>	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>A</sup>
mean $\pm$ SD	0.34 $\pm$ 0.18	0.29 $\pm$ 0.10	0.30 $\pm$ 0.03

shows the results of the antioxidant activity of  $\alpha$ -carotene. The highest concentration (75  $\mu\text{mol/L}$ ) resulted in reproducible values. In contrast, the variation in results of the smaller concentrations was higher. This trend was observed for all carotenes and xanthophylls used. One reason for this phenomenon could be adsorption effects of carotenoids at the surface of the quartz glass cuvettes. Therefore, we did experiments to check adsorption effects by using photometric spectra and measured different concentrations. However, there were no results indicating adsorption effects. We looked also for the solubility of the carotenoids in MtBE/DMSO (1/4, v/v) and for  $\alpha$ -tocopherol in MeOH. The concentrations of capsanthin, antheraxanthin, and  $\alpha$ -tocopherol were measured in stock solutions and in MtBE/DMSO (1/4, v/v) respectively MeOH. All carotenoids investigated were completely dissolved in the solvent mixture for PCL as well as  $\alpha$ -tocopherol in MeOH.

Concentration-dependent effects, which were described in the literature<sup>14–16</sup> for hydrophilic substances, could be one reason for the different values of 25, 50, and 75  $\mu\text{mol/L}$ . The AOA of pure substances and food extracts was dependent on their concentration and dilution.

The antioxidant activities of all carotenoids investigated were calculated by using the highest concentrations (75  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figure 2).  $\alpha$ -Tocopherol, used as calibration standard, expressed



**Figure 2.** Antioxidant activities (mol  $\alpha$ -TE/mol) of carotenoids ((all-E)-isomers), measured by PCL on three different days at 75  $\mu\text{mol/L}$ . Bars with different letters differ significantly (ANOVA,  $n = 3$ , *post hoc* S–N–K,  $p < 0.05$ ).  $\alpha$ -T =  $\alpha$ -tocopherol; ACA =  $\alpha$ -carotene; ANX = antheraxanthin; ASX = astaxanthin; BCA =  $\beta$ -carotene; BCX =  $\beta$ -cryptoxanthin; BIX = bixin; CAN = canthaxanthin; CAP = capsanthin; ECH = echinenone; LUT = lutein; LVC = lycopene; NEX = neoxanthin; NSP = neurosporene; PHT = phytoene; PHF = phytofluene; RUX = rubixanthin; VIX = violaxanthin; ZEA = zeaxanthin.

the highest antioxidant power compared to all analyzed carotenoids. Within the carotenes, neurosporene ( $0.76 \pm 0.27$  mol  $\alpha$ -TE/mol) presented the highest and phytoene ( $0.21 \pm 0.13$  mol  $\alpha$ -TE/mol) the lowest activity.  $\beta$ -Carotene ( $0.25 \pm 0.06$

mol  $\alpha$ -TE/mol) and lycopene ( $0.25 \pm 0.03$  mol  $\alpha$ -TE/mol) were similar as well  $\alpha$ -carotene ( $0.30 \pm 0.03$  mol  $\alpha$ -TE/mol) and phytofluene ( $0.29 \pm 0.19$  mol  $\alpha$ -TE/mol). Astaxanthin ( $0.59 \pm 0.07$  mol  $\alpha$ -TE/mol) showed the maximum antioxidant activity of all xanthophylls investigated followed by antheraxanthin ( $0.56 \pm 0.16$  mol  $\alpha$ -TE/mol), lutein ( $0.38 \pm 0.10$  mol  $\alpha$ -TE/mol), capsanthin ( $0.36 \pm 0.14$  mol  $\alpha$ -TE/mol), and zeaxanthin ( $0.34 \pm 0.06$  mol  $\alpha$ -TE/mol). The AOA of rubixanthin ( $0.28 \pm 0.12$  mol  $\alpha$ -TE/mol) and canthaxanthin ( $0.27 \pm 0.04$  mol  $\alpha$ -TE/mol) did not differ significantly. Echinenone ( $0.19 \pm 0.04$  mol  $\alpha$ -TE/mol) showed a small activity as well as neoxanthin ( $0.14 \pm 0.06$  mol  $\alpha$ -TE/mol), which showed only 15% of the activity of that of  $\alpha$ -tocopherol. Bixin was just as little ( $0.07 \pm 0.05$  mol  $\alpha$ -TE/mol) and violaxanthin ( $-0.02 \pm 0.11$  mol  $\alpha$ -TE/mol) did not show any activity using the PCL method.

**Comparison of PCL Data with Results of FRAP,  $\alpha$ -TEAC, DPPH, and LPSC Assay.** The AOA values of the PCL method were compared to the results of Müller et al. (2011) (Table 2).<sup>10</sup> Generally, the AOAs of PCL were lower than the results of FRAP, LPSC, and  $\alpha$ -TEAC for most of the investigated carotenoids. Neither carotenes nor xanthophylls demonstrated any DPPH scavenging activity. Only  $\alpha$ -tocopherol showed an activity (1.0 mol  $\alpha$ -TE/mol). In FRAP assay, rubixanthin (3.3 mol  $\alpha$ -TE/mol) indicated the highest antioxidant activity.  $\beta$ -Cryptoxanthin, capsanthin, lutein, and lycopene had the second highest activity (2.1 mol  $\alpha$ -TE/mol) with no differences between these compounds. However, all carotenes, excluding lycopene, did not show remarkable ferric reducing activity. In the  $\alpha$ -TEAC assay, the highest ABTS<sup>•+</sup> reducing activity was observed for lycopene (3.9 mol  $\alpha$ -TE/mol) followed by  $\beta$ -cryptoxanthin (3.2 mol  $\alpha$ -TE/mol), rubixanthin (3.3 mol  $\alpha$ -TE/mol),  $\alpha$ -carotene (3.3 mol  $\alpha$ -TE/mol), and  $\beta$ -carotene (3.1 mol  $\alpha$ -TE/mol). Phytoene and phytofluene showed the same reducing potential as  $\alpha$ -tocopherol (1.0 mol  $\alpha$ -TE/mol). The lowest values in the  $\alpha$ -TEAC assay with no differences were shown for astaxanthin and canthaxanthin (0.8 mol  $\alpha$ -TE/mol).

**Table 2.** Comparison of Antioxidant Activities of Carotenoids ((all-E)-Isomers) and  $\alpha$ -Tocopherol in PCL to Other AOA Assays (Data from Müller et al. 2011<sup>10</sup>); Different Letters Indicate a Significant Difference within the Column, Determined by ANOVA ( $p < 0.05$ ) with *post hoc* S–N–K

cmpd	PCL mol $\alpha$ -TE/mol	FRAP mol $\alpha$ -TE/mol	$\alpha$ -TEAC mol $\alpha$ -TE/mol	DPPH mol $\alpha$ -TE/mol	LPSC mol $\alpha$ -TE/mol
$\alpha$ -tocopherol	0.91 <sup>F</sup>	1.0 <sup>A</sup>	1.0 <sup>A</sup>	1.0	1.0 <sup>A</sup>
neurosporene	0.76 <sup>EF</sup>	0.0 <sup>B</sup>	2.1 <sup>B</sup>	0.0	0.0 <sup>B</sup>
astaxanthin	0.59 <sup>DE</sup>	0.5 <sup>E</sup>	0.8 <sup>E</sup>	0.0	26.3 <sup>E</sup>
antheraxanthin	0.56 <sup>CDE</sup>	1.8 <sup>I</sup>	2.0 <sup>B</sup>	0.0	24.7 <sup>E</sup>
lutein	0.38 <sup>BCD</sup>	2.1 <sup>C</sup>	2.0 <sup>B</sup>	0.0	19.6 <sup>D</sup>
capsanthin	0.36 <sup>BCD</sup>	2.1 <sup>C</sup>	2.0 <sup>B</sup>	0.0	25.3 <sup>E</sup>
zeaxanthin	0.34 <sup>ABC</sup>	2.0 <sup>C</sup>	1.9 <sup>B</sup>	0.0	20.3 <sup>D</sup>
$\alpha$ -carotene	0.30 <sup>ABC</sup>	0.0 <sup>B</sup>	3.3 <sup>D</sup>	0.0	19.0 <sup>D</sup>
phytofluene	0.29 <sup>ABC</sup>	0.0 <sup>B</sup>	1.0 <sup>A</sup>	0.0	0.1 <sup>B</sup>
rubixanthin	0.28 <sup>ABC</sup>	3.3 <sup>F</sup>	3.3 <sup>D</sup>	0.0	8.9 <sup>G</sup>
canthaxanthin	0.27 <sup>ABC</sup>	0.3 <sup>D</sup>	0.8 <sup>E</sup>	0.0	21.0 <sup>D</sup>
$\beta$ -carotene	0.25 <sup>ABC</sup>	0.0 <sup>B</sup>	3.1 <sup>D</sup>	0.0	19.1 <sup>D</sup>
lycopene	0.25 <sup>ABC</sup>	2.1 <sup>C</sup>	3.9 <sup>C</sup>	0.0	13.3 <sup>C</sup>
$\beta$ -cryptoxanthin	0.22 <sup>AB</sup>	2.1 <sup>C</sup>	3.2 <sup>D</sup>	0.0	19.3 <sup>D</sup>
phytoene	0.21 <sup>AB</sup>	0.1 <sup>B</sup>	1.0 <sup>A</sup>	0.0	0.1 <sup>B</sup>
echinenone	0.19 <sup>AB</sup>	0.3 <sup>D</sup>	2.2 <sup>B</sup>	0.0	26.3 <sup>E</sup>
neoxanthin	0.14 <sup>AB</sup>	1.3 <sup>G</sup>	1.1 <sup>G</sup>	0.0	20.6 <sup>D</sup>
bixin	0.07 <sup>AB</sup>	1.7 <sup>I</sup>	1.3 <sup>H</sup>	0.0	29.1 <sup>H</sup>
violaxanthin	-0.02 <sup>A</sup>	1.5 <sup>H</sup>	1.6 <sup>F</sup>	0.0	22.5 <sup>F</sup>

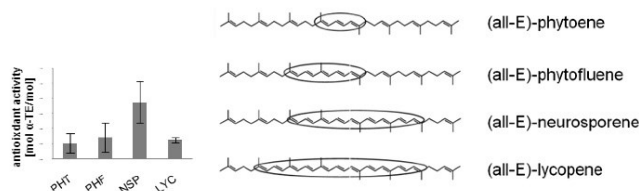


Figure 3. AOA of selected carotenoids related to their structures.

Table 3. Antioxidant Capacities Based on Fresh Weight As Well As on Dry Weight of Selected Tomato Products Measured by PCL,  $\alpha$ -TEAC, Calculated AOC of PCL; the Single Carotenoids and Vitamin E Compounds Are Listed, Too<sup>a</sup>

	fresh tomatoes	tomato ketchup	tomato passata	tomato pesto	tomato puree
PCL [ $\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g]	26.3 $\pm$ 9.4 <sup>xA</sup>	456.0 $\pm$ 104.7 <sup>xC</sup>	36.7 $\pm$ 14.7 <sup>xA</sup>	309 $\pm$ 27 <sup>xB</sup>	271 $\pm$ 63 <sup>xB</sup>
PCL (dry weight) [ $\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g]	411 $\pm$ 147 <sup>A</sup>	1714 $\pm$ 394 <sup>B</sup>	528 $\pm$ 212 <sup>A</sup>	518 $\pm$ 45 <sup>A</sup>	852 $\pm$ 198 <sup>A</sup>
AOC <sub>calculated</sub> (PCL) [ $\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g]	14.51	17.59	15.48	78.91	54.89
$\alpha$ -TEAC [ $\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g]	95.0 $\pm$ 2.4 <sup>xA</sup>	414.4 $\pm$ 19.4 <sup>xB</sup>	593.7 $\pm$ 65.0 <sup>xC</sup>	343.8 $\pm$ 20.3 <sup>xB</sup>	2562 $\pm$ 238 <sup>xD</sup>
$\alpha$ -TEAC (dry weight) [ $\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g]	1484 $\pm$ 37 <sup>A</sup>	1558 $\pm$ 73 <sup>A</sup>	8555 $\pm$ 937 <sup>B</sup>	577 $\pm$ 34 <sup>A</sup>	8046 $\pm$ 749 <sup>B</sup>
<b>Carotenoids [mg/100 g]</b>					
(all-E)-lycopene	14.77 $\pm$ 2.10	27.21 $\pm$ 3.60	20.02 $\pm$ 1.55	14.69 $\pm$ 1.8	73.34 $\pm$ 11.2
$\Sigma$ (Z)-lycopene	1.95 $\pm$ 0.42	2.06 $\pm$ 0.08	1.73 $\pm$ 0.22	19.33 $\pm$ 0.7	7.93 $\pm$ 1.29
(all-E)- $\beta$ -carotene	1.38 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.03	1.58 $\pm$ 0.09	1.85 $\pm$ 0.09
(9Z)- $\beta$ -carotene	0.05 $\pm$ 0.01	—	—	0.32 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.03
(13Z)- $\beta$ -carotene	—	—	—	—	0.33 $\pm$ 0.03
(all-E)-lutein	0.13 $\pm$ 0.01	—	—	0.63 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.02
(all-E)-zeaxanthin	0.03 $\pm$ 0.00	—	—	0.36 $\pm$ 0.06	—
$\Sigma$ [mg/100 g]	18.3 $\pm$ 1.9 <sup>A</sup>	29.8 $\pm$ 3.7 <sup>AB</sup>	22.1 $\pm$ 1.6 <sup>A</sup>	36.9 $\pm$ 2.3 <sup>B</sup>	83.9 $\pm$ 12.5 <sup>C</sup>
$\Sigma$ [ $\mu$ mol/100g]	34.1	55.5	41.2	68.6	156.3
<b>Vitamin E [mg/100 g]</b>					
$\alpha$ -tocopherol	0.85 $\pm$ 0.07	1.20 $\pm$ 0.14	1.68 $\pm$ 0.18	26.14 $\pm$ 1.09	5.36 $\pm$ 0.22
$\beta$ -tocopherol	—	—	—	1.04 $\pm$ 0.09	—
$\gamma$ -tocopherol	—	0.14 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.19	0.47 $\pm$ 0.07
$\delta$ -tocopherol	0.16 $\pm$ 0.01	—	—	—	—
$\alpha$ -tocotrienol	—	—	—	0.89 $\pm$ 0.14	—
$\beta$ -tocotrienol	1.32 $\pm$ 0.19	0.81 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.08	1.35 $\pm$ 0.18	3.11 $\pm$ 0.11
$\gamma$ -tocotrienol	0.43 $\pm$ 0.04	—	—	—	—
$\delta$ -tocotrienol	—	—	—	—	—
$\Sigma$ [mg/100 g]	2.8 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	2.2 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	2.7 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	30.4 $\pm$ 1.2 <sup>C</sup>	9.0 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>
$\Sigma$ [ $\mu$ mol/100g]	6.6	5.1	7.4	71.0	21.1

<sup>a</sup>All results presented are calculated by taking the dilution factors and means ( $\pm$  SD) of three independent analyzes. Values with different capital letters within rows differ significantly (ANOVA,  $n = 3$ , *post hoc* S–H–K,  $p > 0.05$ ). <sup>x</sup>concentration-dependent effect.

The AOA measured by LPSC showed 10 times higher values than using the PCL method. The highest luminol-chemiluminescence peroxyl radical scavenging capacity was measured for bixin (29.1 mol  $\alpha$ -TE/mol). All xanthophylls, excluding rubixanthin, showed comparable LPSC values, ranging between 19.3 and 26.3 mol  $\alpha$ -TE/mol. Astaxanthin and echinenone demonstrated the same activity with 26.3 mol  $\alpha$ -TE/mol. The carotenes phytoene, phytofluene, and neurosporene did not react in the LPSC assay.

The AOAs of  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein, capsanthin, zeaxanthin, rubixanthin, and violaxanthin analyzed by PCL differed significantly compared to the LPSC assay.  $\beta$ -Cryptoxanthin had 10 times higher antioxidant activity in FRAP and 100 times higher in LPSC than in PCL. Using FRAP and  $\alpha$ -TEAC assay, lutein, capsanthin, zeaxanthin as well as rubixanthin and violaxanthin did not show significant differences in the antioxidant activity. These xanthophylls showed considerably higher values compared to the measured activity in PCL assay

(five times for lutein, capsanthin and zeaxanthin, 12–15 times for rubixanthin and violaxanthin). No statistically significant differences were observed for astaxanthin, antheraxanthin, neoxanthin, canthaxanthin, or bixin in PCL, FRAP, and  $\alpha$ -TEAC. In the carotene group neurosporene indicated the highest activity in PCL but in  $\alpha$ -TEAC, FRAP, and LPSC was among the lowest activities. Phytofluene and phytoene differed only in  $\alpha$ -TEAC, whereas the values for FRAP, LPSC, and PCL were similarly low. Lycopene had significantly different values in all AOA assays.

**Relationship of AOA of Carotenoids and Their Structure.** The chemical structures of some carotenoids are illustrated in Figure 3. The antioxidant activity of the carotenoids increased with the number of conjugated double bonds with the exclusion of lycopene. A relationship could be established between the AOA of the carotenoids and their structure. Consequently, the following order can be presented, depending on the antioxidant activity and the number of conjugated double bonds: phytoene < phytofluene < neurosporene. Additionally,



the presence of functional groups, e.g. carbonyl-, hydroxyl-, epoxy-groups also affect the AOA of xanthophylls. The antioxidant activities of carotenoids are based on their singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) quenching properties and their ability to trap peroxy radicals.<sup>17</sup> The quenching ability is based on the number of conjugated double bonds and is influenced to a lesser extent by carotenoid end groups (cyclic or acyclic) or the nature of substituents in carotenoids containing cyclic end groups.<sup>17</sup> Carotenoids that contain more than seven conjugated double bonds were reported to have stronger antioxidant activity.<sup>18</sup> The conjugated system delocalizes the electrons along the chromophore.<sup>19</sup> This property gives the carotenoids their distinctive molecular shape, chemical reactivity, and light-absorption properties.<sup>20</sup> Carotenoids lose their color when exposed to radicals or to oxidizing species. This process involves interruption of the conjugated double bond system either by cleavage or by addition to one of the double bonds.<sup>1</sup> Lycopene, which has 11 conjugated and two nonconjugated double bonds and gives tomatoes their red color, had the highest singlet oxygen quenchers activity of the natural carotenoids.<sup>17,21–23</sup> Hence, we expected that lycopene had the highest AOA compared to the other carotenes measured by PCL. But lycopene is very susceptible to oxidation because of the high unsaturated chemical structure.<sup>24</sup> Furthermore, lycopene is also very sensitive to light, heat, oxygen, and acids in degradation, and some metallic ions such as  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  catalyze its oxidation.<sup>25</sup> In nature, lycopene exists in all-*trans*- form and seven of these bonds can isomerize from the *trans*-form ((all-*E*)-lycopene) to the mono- or poly-*cis*-form ((*Z*)-isomers) under the influence of heat, light, or certain chemical reactions.<sup>25</sup> Traces of metallic ions in solvents as well as the influence of the pH of the carbonate buffer (10.6) could be reasons for the low AOA of lycopene.

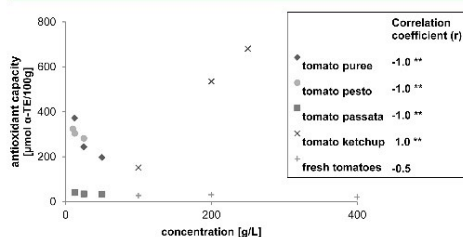
#### AOA, Carotenoid and Vitamin E Contents of Various Tomato Food Products.

Fresh tomatoes, tomato ketchup, tomato passata, tomato pesto, and tomato puree were investigated on their lipophilic antioxidant capacity by photochemiluminescence and  $\alpha$ -TEAC assay. All extracted samples were analyzed in different concentrations and in triplicate. To quantify the carotenoid and vitamin E contents, HPLC methods were used (Table 3). The results measured for the tomato samples depended on the assay used, but in general the AOC of fresh tomatoes was lower than that of other tomato product samples in PCL and  $\alpha$ -TEAC assay as well as in the carotenoid content. In PCL assay fresh tomatoes and tomato passata did not differ significantly as well as tomato pesto and tomato puree. The highest value was shown for tomato ketchup followed by tomato pesto, tomato puree, tomato passata, and fresh tomatoes. The contained herbs and spices could explain the highest antioxidant potential of tomato ketchup. The composition of the tomato pesto was basil, garlic, pine nut, different oils (e.g. sunflower oil and olive oil), hard cheese and ascorbic acid which also had a positive influence on the antioxidant capacity. In contrast to tomato passata, tomato puree is a more concentrated tomato product, and the order of the antioxidant potential, which was assumed, could be demonstrated. The raw material fresh tomato was estimated to have the smallest AOA of the measured tomato products. Because the fresh tomato is a raw material without concentration steps, and no substances like herbs or spices and no oils were added, which can have positive influence on the AOC. To date, it is very difficult to compare our results because publications about the lipophilic antioxidant capacity of tomato products measured by PCL are scarce in the literature.

The theoretically calculated antioxidant capacity in  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$  for PCL could be generated with measured single substances measured by PCL. The lowest antioxidant potential was expected for fresh tomatoes and the highest for tomato pesto. Noticeably, the experimental values were higher than the calculated values. For example, the experimental AOC of tomato ketchup was much higher than calculated (2592%). Reasons could be interaction between single substances which was described in the literature. Researchers observed synergistic effects between lycopene and  $\alpha$ -tocopherol,<sup>26,27</sup> lycopene and  $\beta$ -carotene,<sup>26,28</sup> lycopene and lutein,<sup>27,28</sup> lutein and  $\beta$ -carotene,<sup>27</sup>  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene.<sup>28,29</sup> However, Zanfini et al. described that significant synergistic acts do not take place when compounds are combined.<sup>27</sup> All four substances (lycopene,  $\beta$ -carotene, lutein, and  $\alpha$ -tocopherol) which have the ability to make synergism were detected in our tomato samples. Synergistic effects were dependent on the type of antioxidant and on their concentration.<sup>30</sup> Mixtures of carotenoids could be more effective than single substances.<sup>31</sup> Matrix effects (for example interactions between antioxidants and polysaccharides) should not be disregarded.

To check if the water content of samples had an influence on the antioxidant capacity, we calculated the dry weight-based antioxidant capacity. The differences between the fresh tomatoes and the tomato products were mainly due to the water content. In the PCL as well as in the  $\alpha$ -TEAC assay the antioxidant capacities were dependent on the water content.

For all results in the PCL assay and  $\alpha$ -TEAC, concentration-dependent effects on the measured AOC were detected. Hengst et al.<sup>14</sup> described first the influence of the sample concentration on determination of the hydrophilic antioxidant capacity. The hydrophilic PCL assay was investigated as well as TEAC, FRAP, ORAC, and total phenolics assays. The measured antioxidant activities/capacities of pure substances (gallic acid, uric acid, Trolox, ascorbic acid) and food extracts (strawberry nectar, tomato extract, white tea) decreased or increased with increasing sample concentration. Hence, the values depended significantly on the applied sample concentration. The basic causes of these dilution effects are hardly unknown.<sup>14–16</sup> The AOC of tomato pesto and tomato puree measured by PCL increased with increasing dilutions (Figure 4). The opposite was shown for tomato ketchup, having the highest polysaccharide content, the values decreased with decreasing concentrations. For fresh tomatoes and tomato passata not any relation between their concentration and their results was observed. In addition, for the three samples with high antioxidant capacity, a good linear



**Figure 4.** Correlation between the concentration of the tomato samples and their antioxidant capacity. Data were statistically analyzed using the Spearman correlation coefficient test. \*\* Indicates a significant correlation at the level of  $p < 0.01$ .

correlation between concentrations and antioxidant capacity was registered. On the basis of the concentration-dependent effects it is suggested to measure different sample dilution factors/concentrations, for the analysis to detect and to discuss the influence of concentrations.

It is assumed that the range in the  $\alpha$ -tocopherol calibration (2.5–125  $\mu\text{mol/L}$ ) had also an influence on the results. If the values were smaller than 25  $\mu\text{mol/L}$ , the standard deviation of the determined tomato products became higher. For example the tomato pesto dilutions were measured in an  $\alpha$ -tocopherol concentration range between 50  $\mu\text{mol/L}$  and 75  $\mu\text{mol/L}$ . Therefore, the variation and the concentration-dependent effects were smaller. In contrast, for the tomato passata, the concentration area analyzed was <25  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha$ -tocopherol, and the variation was higher. Consequentially, the sample concentration should not be smaller than 25  $\mu\text{mol/L}$   $\alpha$ -tocopherol calibration.

According to Navas et al.,<sup>32</sup> chemiluminescence not only has advantages such as superior sensitivity, safety, and controllable emission rate but also has some disadvantages such as poor reproducibility. Furthermore, Barni et al.<sup>33</sup> described that photosensitizer solutions can be sensitive to light and the presence of metal cations (e.g., iron and copper). In addition, the light-producing pathway for the oxidation of photosensitizers is a complex multiple process and depends on several factors, including pH, temperature, and ionic strength of the reaction medium and reactive species that can be present in solution and interact with photosensitizer metal catalyst or hydroxide ions.

The lipophilic extract of the tomato puree, characterized by a high carotenoid and vitamin E content, showed the highest antioxidant capacity (2562  $\pm$  238  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ) measured using ABTS radical cation decolorization assay. Tomato passata (594  $\pm$  65  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ) and tomato ketchup (414  $\pm$  19  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ) were significantly different from tomato pesto (344  $\pm$  20  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ). Fresh tomatoes had significantly the lowest lipophilic antioxidant capacity in the TEAC assay.

A significantly linear correlation between the antioxidant potential measured by  $\alpha$ -TEAC and the contents of carotenoids could be observed ( $R = 0.939$ ). An increase of the carotenoid content led to an increase of the lipophilic antioxidant capacity using the  $\alpha$ -TEAC. Only a low correlation between the PCL values and the carotenoid contents was observed ( $R = 0.333$ ).

The PCL and the  $\alpha$ -TEAC assays are based on different reaction mechanisms. The pH value can also have an influence. While the PCL reaction is in an alkaline the  $\alpha$ -TEAC is in a neutral milieu. Matrix effects should not be disregarded.

The antioxidant capacity of all tested tomato products showed different results. All methods to determine the antioxidant capacity are based on different principles. The  $\alpha$ -TEAC assay is based on the single electron transfer reaction (SET).<sup>9,34</sup> The mechanism of PCL is still unclear.<sup>35</sup> The antioxidant capacity is being measured by individual, different methods and reflects only the chemical reactivity under the specific conditions applied in that assay. It is inappropriate and misleading to generalize the data as indicators of "total antioxidant activity". No single assay will reflect the "total antioxidant capacity" of the samples. Diverse methods which are based on different reaction mechanisms as well as the lipophilic and hydrophilic capacities should be used.<sup>10,14,34</sup>

Our results have shown that lycopene is the main carotenoid in tomatoes, which was expected from the literature. The total lycopene contents in the tomato samples investigated ranged between 16.7 mg/100 g (tomato fresh) and 81.3 mg/100 g

(tomato puree). The total lycopene content in processed tomatoes was higher than that in the raw tomatoes. The content of carotenoids measured in this study is in good agreement with the results of Baranska et al. (2006)<sup>36</sup> who measured lycopene and  $\beta$ -carotene in tomatoes, ketchup, and puree. On the other hand, the lycopene values, determined by Fröhlich et al.<sup>37</sup> are about 45–23% lower for tomatoes, ketchup, and tomato passata. Sass-Kiss et al.<sup>38</sup> recorded that lycopene represented 90–95% of the total carotenoid content in tomatoes. Our lycopene contents also ranged between 91 and 98% of the total carotenoid composition in the variety of tomato products. Lower abundance for lycopene was determined by Kotiková et al.<sup>39</sup> with 67% and Burns et al.<sup>40</sup> with 58%. Otherwise, a much higher contribution was detected for lutein in fresh tomatoes and ketchup by Gama et al.<sup>41</sup> Total  $\beta$ -carotene in fresh tomatoes and in tomato products amounted 0.36–2.17 mg/100 g and was comparable with the results of Fröhlich et al.<sup>37</sup> and Baranska et al.<sup>36</sup> Differences between the carotenoids contents can be affected by many factors such as variety, growing conditions and time of harvest, climatic conditions, and geographical locations. Warmer and south-oriented areas may promote the production of lycopene at the expense of other carotenoids.<sup>37,39</sup>

Tomato pesto has shown the highest total tocopherol content of all samples, because of containing olive and sunflower oils, which have a high  $\alpha$ -tocopherol concentration.<sup>42</sup> Tomato puree had the highest  $\beta$ -tocotrienol content (3.11  $\pm$  0.11 mg/100 g) compared to the other samples. Tomato passata, tomato ketchup, and fresh tomatoes did not differ significantly in their vitamin E content.  $\delta$ -Tocotrienol was not found in the analyzed samples. Only  $\beta$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol were determined in tomato pesto as well as  $\delta$ -tocopherol and  $\gamma$ -tocotrienol in fresh tomatoes. In comparison to the data of Pinela et al.,<sup>43</sup> the  $\alpha$ -tocopherol content of fresh tomatoes was similar to our results. However,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherol were not detected in our fresh tomatoes, and Pinela et al. did not determine the content of tocotrienols. The main form of vitamin E determined in the tomato samples was  $\alpha$ -tocopherol with relative contents between 31% for fresh tomatoes and 86% for tomato pesto. A much higher contribution of  $\alpha$ -tocopherol for raw tomatoes (78%), ketchup (92%) and puree (94%) was measured by Chun et al.<sup>44</sup> A reason for the high content of  $\alpha$ -tocopherol could be that only  $\alpha$ -tocotrienol was found in trace amounts in raw tomatoes and no other tocotrienols were found in ketchup and puree.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel.: +49 3641 949633. Fax: +49 3641 949702. E-mail: volker.boehm@uni-jena.de (V. B.).

### Funding

The funding of this research within the project "BioOptiSens" is gratefully acknowledged.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jana Hesse for her assistance in laboratory work.

## ■ ABBREVIATIONS USED

AOA, antioxidant activity; AOC, antioxidant capacity; DPPH, 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl scavenging activity; FRAP, ferric reducing antioxidant power; LPSC, luminol-chemiluminescence peroxy radical scavenging capacity; PCL, photochemilumines-

cence;  $\alpha$ -TE,  $\alpha$ -tocopherol equivalents;  $\alpha$ -TEAC,  $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity

## REFERENCES

- (1) Eldahshan, O. A. E. O. A. Carotenoids: A review. (*Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals*) *ARPB* **2013**, *3* (1), 345–352.
- (2) Lakshminarayana, R.; Baskaran, V. Influence of olive oil on carotenoids bioavailability - A review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115* (10), 1085–1093.
- (3) Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **2003**, *24*, 345–351.
- (4) Popov, I. N.; Lewin, G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity: II. Testing of nonenzymic water-soluble antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *17*, 267–271.
- (5) Popov, I. N.; Lewin, G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: Testing of lipid-soluble antioxidants. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1996**, *31*, 1–8.
- (6) Popov, I.; Lewin, G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VII. Comparison with a modified method of thermo-initiated free radical generation with chemiluminescent detection. *Luminescence* **2005**, *20*, 321–325.
- (7) Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Res.* **2002**, *36*, 177–187.
- (8) Bauerfeind, J.; Hesse, J.; Killenberg, M.; Böhm, V. Comparison of antioxidant activities of carotenoids measured. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, *60*, 132.
- (9) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302.
- (10) Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (alpha TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chem.* **2011**, *129*, 139–148.
- (11) Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* **1996**, *384*, 240–242.
- (12) Werner, S.; Böhm, V. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: evaluation of an in vitro digestion model. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1163–1170.
- (13) Franke, S.; Fröhlich, K.; Werner, S.; Böhm, V.; Schöne, F. Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112*, 1122–1129.
- (14) Hengst, C.; Werner, S.; Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V. Determination of the antioxidant capacity: influence of the sample concentration on the measured values. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *230*, 249–254.
- (15) Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K. M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 957–998.
- (16) Sipel, A.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Grygiel, P.-G.; Defraigne, J.-O.; Dommès, J. Sample dilution influences the determination of antioxidant capacity in food: How to minimize it? *Food Anal. Method.* **2013**, *1–7*.
- (17) Stahl, W.; Sies, H. Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans? *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *336*, 1–9.
- (18) Khoo, H.-E.; Prasad, K. N.; Kong, K.-W.; Jiang, Y.; Ismail, A. Carotenoids and their isomers: Color pigments in fruits and vegetables. *Molecules* **2011**, *16*, 1710–1738.
- (19) Meléndez-Martínez, A. J.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1145–1150.
- (20) Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1551–1558.
- (21) Maiani, G.; Perigo Castón, M. J.; Catasta, G.; Toti, E.; Cambrodon, I. G.; Bysted, A.; Granado-Lorencio, F.; Olmedilla-Alonso, B.; Knuthsen, P.; Valoti, M.; Böhm, V.; Mayer-Miebach, E.; Behnlian, D.; Schlemmer, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, S194–S218.
- (22) Conn, P. F.; Schalch, W.; Truscott, T. G. The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J. Photochem. Photobiol. B* **1991**, *11*, 41–47.
- (23) Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *274*, 532–538.
- (24) Henry, L. K.; Catignani, G. L.; Schwartz, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and all-trans  $\beta$ -carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 823–829.
- (25) Shi, J. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2000**, *20*, 293–334.
- (26) Liu, D.; Shi, J.; Colina Ibarra, A.; Kakuda, Y.; Jun Xue, S. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT Food Sci. Technol.* **2008**, *41*, 1344–1349.
- (27) Zanfani, A.; Corbini, G.; La Rosa, C.; Dreassi, E. Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 67–72.
- (28) Kotikova, Z.; Lachman, J.; Hejtmankova, A.; Hejtmankova, K. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. *LWT Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1703–1710.
- (29) Palozza, P.; Krinsky, N. I.  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297*, 184–187.
- (30) Shi, J.; Qu, Q.; Kakuda, Y.; Xue, S. J.; Jiang, Y.; Koide, S.; Shim, Y.-Y. Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 603–608.
- (31) Stahl, W.; Jungmans, A.; de Boer, B.; Driomina, E. S.; Briviba, K.; Sies, H. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 305–308.
- (32) Navas, M. J.; Jiménez, A. M. Review of chemiluminescent methods in food analysis. *Food Chem.* **1996**, *55*, 7–15.
- (33) Barni, F.; Lewis, S. W.; Berti, A.; Miskelly, G. M.; Lago, G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* **2007**, *72*, 896–913.
- (34) Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856.
- (35) Ozgen, M.; Reese, R. N.; Tulio, A. Z.; Scheerens, J. C.; Miller, A. R. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1151–1157.
- (36) Baranska, M.; Schütze, W.; Schulz, H. Determination of lycopene and  $\beta$ -Carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8456–8461.
- (37) Fröhlich, K.; Burkhardt, S.; Böhm, V. Bioactive compounds in tomatoes and tomato products-investigations of different commercially available foodstuffs. *Schubert, R., Flachowsky, G., Jahreis, G., Bitsch, R. (Hrsg.): Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier (Vitamins and Additives in the Nutrition of Man and Animal), Informations- und Datenzentrum der FAL* **2005**, 240–243.
- (38) Sass-Kiss, A.; Kiss, J.; Milotay, P.; Kerek, M. M.; Toth-Markus, M. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 1023–1029.
- (39) Kotiková, Z.; Lachman, J.; Hejtmánková, A.; Hejtmánková, K. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. *LWT Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1703–1710.
- (40) Burns, J.; Fraser, P. D.; Bramley, P. M. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 939–947.

(41) Gama, J.; Tadiotti, A.; Sylos, C. Comparison of carotenoid content in tomato, tomato pulp and ketchup by liquid chromatography. *Braz. J. Food Nutr.* **2009**, *17*, 353–358.

(42) Monge-Rojas, R.; Campos, H. Tocopherol and carotenoid content of foods commonly consumed in Costa Rica. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 202–216.

(43) Pinela, J.; Barros, L.; Carvalho, A. M.; Ferreira, I. C. F. R. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 829–834.

(44) Chun, J.; Lee, J.; Ye, L.; Exler, J.; Eitenmiller, R. R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 196–204.

## 3.2 Manuskript II

Food Chemistry 175 (2015) 593–600



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence



Jasmin Karmowski<sup>a</sup>, Victoria Hintze<sup>a</sup>, Josephine Kschonsek<sup>a</sup>, Margrit Killenberg<sup>b</sup>, Volker Böhm<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29, D-07743 Jena, Germany

<sup>b</sup> Analytik Jena AG, Jena, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 July 2014

Received in revised form 1 December 2014

Accepted 3 December 2014

Available online 11 December 2014

#### Chemical compounds studied in this article:

$\alpha$ -Tocopherol (PubChem CID: 14985)

$\beta$ -Tocopherol (PubChem CID: 6857447)

$\gamma$ -Tocopherol (PubChem CID: 92729)

$\delta$ -Tocopherol (PubChem CID: 92094)

$\alpha$ -Tocotrienol (PubChem CID: 5282347)

$\beta$ -Tocotrienol (PubChem CID: 5282348)

$\gamma$ -Tocotrienol (PubChem CID: 5282349)

$\delta$ -Tocotrienol (PubChem CID: 5282350)

#### Keywords:

Lipophilic antioxidants

Singlet oxygen

Redox potential

Carotenoids

### ABSTRACT

The purpose of this study was to measure the antioxidant activity (AOA) of tocopherols and tocotrienols by using photochemiluminescence (PCL). This method enables to detect total lipophilic antioxidants. The AOA of all vitamin E isomers depended on number and position of methyl groups in the chroman ring. Correlation between the AOA and the redox potential and the biological activity of the tococchromanols was observed. The second aim was to analyse different kinds of wheat, vegetable oils, milk and milk cream on their antioxidant capacity (AOC) by using PCL and  $\alpha$ -TEAC. The contents of vitamin E and carotenoids were analysed by HPLC. Correlations between the sum of carotenoids and vitamin E and the AOC were detected. Based on high vitamin E contents, the oils had the highest and in contrast, the product macaroni showed the lowest AOC. A concentration-dependent effect was observed in both assays, PCL and  $\alpha$ -TEAC.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The term vitamin E refers to a group of eight fat-soluble vitamins which can be divided in four tocopherols (T) and four tocotrienols (T3) (Abu-Shahin, Stone, Ramsauer, & Krishnan, 2013; Colombo, 2010; Vardi, Levy, & Levy, 2013). Tocopherols have a phytyl chain, while tocotrienols have an unsaturated side chain with double bonds at positions 3', 7', and 11'. These two groups of vitamin E have four isomers each, designated as  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and

$\delta$ -, which differ in number and position of methyl groups in the chroman ring (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Vitamin E is only synthesized by plants and cyanobacteria, and therefore essential for human and animal nutrition (Müller, Theile, & Böhm, 2010; Schneider, 2005). Good sources of vitamin E for the human diet are vegetable oils.  $\alpha$ -Tocopherol is predominant in olive-, wheat germ-, and sunflower oils.  $\gamma$ -Tocopherol is the major vitamin E compound in soya-, corn-, rapeseed-, and linseed-oils.  $\delta$ -Tocopherol and  $\delta$ -tocotrienol are found in very low concentrations. Other sources are almonds, cashews, hazelnuts, peanuts, walnuts and macadamia nuts (Elmadfa & Wagner, 1997; Kornsteiner, Wagner, & Elmadfa, 2006). Vitamin E has the ability to prevent chronic diseases, cardiovascular diseases, atherosclerosis and cancer (Brigelius-Flohé & Traber, 1999). Epidemiological studies have reported that high vitamin E intakes are correlated with a reduced risk of cardiovascular diseases (Brigelius-Flohé & Traber, 1999).

Prior, Wu, and Schaich (2005) gave an overview on different methods to determine the antioxidant capacity and described

*Abbreviations:* AOA, antioxidant activity; AOC, antioxidant capacity; DPPH, 2,2'-diphenylpicrylhydrazyl scavenging activity; FRAP, ferric reducing antioxidant power; HPLC, high performance liquid chromatography; CL, chemiluminescence oxygen radical-scavenging activity assay; ORAC, oxygen reducing antioxidant capacity; PCL, photochemiluminescence; T, tocopherols; T3, tocotrienols; TE, trolox equivalents;  $\alpha$ -TE,  $\alpha$ -tocopherol equivalents;  $\alpha$ -TEAC,  $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity.

\* Corresponding author. Tel.: +49 3641 949633; fax: +49 3641 949702.

E-mail address: [volker.boehm@uni-jena.de](mailto:volker.boehm@uni-jena.de) (V. Böhm).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.010>  
0308-8146/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

besides other tests the PCL-assay. The PCL-assay can be used for the determination of hydrophilic and lipophilic antioxidants using the PHOTOCHEM<sup>®</sup> instrument, commercialised by Analytik Jena AG (Jena, Germany). Kits provided by the manufacturer have to be used (Prior et al., 2005).

The purpose of this study was to measure the lipophilic antioxidant activities of tocopherols and tocotrienols by a photochemiluminescence system (PCL) using a cuvette apparatus, which use an optical excitation (365 nm) of a photosensitive compound with UV-light, thus activating a chemical reaction resulting in production of photo energy to be measured. The relationship between the AOA and the chemical structure of tocopherols and tocotrienols will be discussed. Based on the lipophilic character, tocopherols/tocotrienols are generally resorbed in the human organism from vegetable oils. Therefore, our second intention was to determine the antioxidant capacity of various vegetable oils, wheat products as well as milk and milk cream. Furthermore, the contents of vitamin E and carotenoids in all food products were analysed by using HPLC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Carbonate buffer, polar-aprotic mixture, photosensitizer and all other chemicals were of analytical grade. HPLC grade water (18 M $\Omega$ ) was prepared using a Millipore Milli-Q purification system (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany). DMSO was obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) and MTBE (methyl tert-butyl ether) was bought from Sauerbrey (Reinhardshagen, Germany). All tocopherols were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany) and all tocotrienols from Davos Life Science (Singapore). 2,2-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) was obtained from Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany).

### 2.2. Materials

Peanut oil, maize corn oil, sesame oil, sunflower oil, walnut oil as well as milk and milk cream were bought in a local supermarket and stored in the fridge at 4 °C until analysis. Different kinds of corn were provided by the Max Rubner-Institut in Detmold, Germany, and stored in darkness, under dry conditions. Durum macaroni was also bought in a local supermarket and stored together with the wheat samples at room temperature.

Stock solution of each tocopherol/tocotrienol standard was prepared in ethanol and stored at –30 °C until analysis. The concentrations of these stock solutions were determined spectrophotometrically at their specific absorption maxima (Werner & Böhm, 2011).

### 2.3. Extraction procedures

All operations were processed under subdued light conditions. All vegetable oils were weighted in a volumetric flask and diluted directly with *n*-hexane. Milk and milk cream were extracted with diethyl ether in falcon tubes. Ethanol was added after a centrifugation (1 min, 0.2 rcf). The upper phase was collected in a volumetric flask and the extraction was repeated five times. The samples were stored at –30 °C until measurement. All wheat samples were weighed into an Erlenmeyer flask each and after the addition of 5 mL water and extraction solvent methanol/tetrahydrofuran (1/1, v/v), each sample was homogenised using an ultra turrax (type T25, IKA-Werke, Staufen, Germany) for 30 s on ice. The extract was filtered under vacuum through filter paper No. 390 (Filtrak,

Niederschlag, Germany) on a Büchner funnel with 200 mg magnesium hydroxide carbonate. This extraction was repeated until colourlessness. The combined extracts were rotary-evaporated under reduced pressure at 30 °C. The dried residues were dissolved in 5 mL (volumetric flask) of ethanol using an ultrasonic bath. After centrifugation (5 min, 18,407 rcf), the samples were used for PCL and HPLC measurement.

### 2.4. Determination of lipophilic antioxidant capacities

#### 2.4.1. PCL

Tocopherol (T), tocotrienol (T3) stock solutions and food extracts were dried under nitrogen. The T/T3 concentrations were prepared to 25, 50 and 75  $\mu\text{mol/L}$  in ethanol and the food extracts were diluted in different concentrations in MtBE/DMSO (1/4, v/v). The AOA and AOC are denoted as  $\alpha$ -tocopherol equivalents ( $\alpha$ -TE), thus,  $\alpha$ -tocopherol was used for a seven-point-calibration (2.5–125  $\mu\text{mol/L}$ ). A polar-aprotic mixture, carbonate buffer, photosensitizer and sample were pipetted in a quartz glass cuvette (Hellma GmbH, Müllheim, Germany). The measurement was done in a cuvette apparatus (Analytik Jena AG, Jena, Germany). The lipophilic antioxidant capacity is expressed in  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -tocopherol equivalents per 100 g ( $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -TE/100 g).

#### 2.4.2. $\alpha$ -TEAC

The procedure to measure the  $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity was modified from Müller, Fröhlich, and Böhm (2011). The measurement was done by using a V-530 spectrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) at 734 nm accordingly (Müller et al., 2011). The method is based on the decolourisation of the ABTS radical cation to determine the antioxidant potential of samples. 100  $\mu\text{L}$  sample solution were mixed with 1000  $\mu\text{L}$  ABTS radical cation working solution. The mixture was shaken for 30 s in reaction tubes and transferred completely in half-micro cuvettes. After centrifugation (30 s, 200 rcf) and exactly 2 min after initiation of mixing, the absorbance was measured at 734 nm. The lipophilic antioxidant capacity is expressed in  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -tocopherol equivalents per 100 g ( $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -TE/100 g).

### 2.5. HPLC analysis

The analysis of tocopherols and tocotrienols was performed by an isocratic (1.5 ml/min, *n*-hexane/MtBE, 98/2, v/m) HPLC procedure (Merck Hitachi, Darmstadt, Germany) with a fluorescence detector (excitation: 292 nm, emission: 330 nm) and using a normal-phase Eurospher 100 Diol column (250  $\times$  4.0 mm, 7  $\mu\text{m}$ , Knauer, Berlin, Germany) at 35 °C according to Franke, Fröhlich, Werner, Böhm, and Schöne (2010). The contents of carotenoids were analysed by using a RP-HPLC with diode array detection at 450 nm (Merck Hitachi, Darmstadt, Germany) and a Develosil RP-Aqueous (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) C<sub>30</sub>-column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) at 13 °C. As mobile phase (1.0 mL/min) the following gradient procedure consisting of MeOH (solvent A) and MTBE (solvent B) was used: initial conditions 90% solvent A and 10% solvent B; 40 min linear gradient to 50% solvent B; 2 min linear gradient to 60% solvent B, 40% solvent A and 60% solvent B for 23 min; 5 min linear gradient to 10% solvent B; and 90% solvent A and 10% solvent B for 5 min (Bauerfeind, Hintze, Kschonsek, Killenberg, & Böhm, 2014).

### 2.6. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The data were analysed with ANOVA using SPSS statistical software (Version 22.0; SPSS, Chicago, USA). The Student–Newman–Keuls procedure was used to compare the

means. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . A Pearson's correlation test was conducted to determine the correlations among means. Statistical significance was declared at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Antioxidant activities of tocopherols and tocotrienols

The antioxidant activities of tocopherols and tocotrienols were measured in three different concentrations (25, 50, 75  $\mu\text{mol/L}$ ) on three different days. The AOA of all tocopherols and tocotrienols were calculated by using 75  $\mu\text{mol/L}$  because the values of this highest concentration were more reproducible than the smaller concentrations (Fig. 1). A minimum sample-concentration must be given for reproducible results, depending on the sensitivity of the PCL-assay. Within the tocopherol group  $\alpha$ -tocopherol, which was used as calibration standard, presented the highest antioxidant activity ( $0.9 \pm 0.1 \text{ mol } \alpha\text{-TE/mol}$ ) followed by  $\beta$ -tocopherol ( $0.6 \pm 0.3 \text{ mol } \alpha\text{-TE/mol}$ ) and  $\gamma$ -tocopherol ( $0.2 \pm 0.1 \text{ mol } \alpha\text{-TE/mol}$ ).  $\delta$ -Tocopherol did not show any activity.  $\alpha$ -Tocotrienol ( $1.2 \pm 0.2 \text{ mol } \alpha\text{-TE/mol}$ ) had significantly the highest antioxidant power of all tocopherols, caused by the lowest redox potential of all used vitamins (Müller et al., 2010).  $\beta$ -Tocotrienol ( $0.6 \pm 0.1 \text{ mol } \alpha\text{-TE/mol}$ ), which was lower by about 47% than  $\alpha$ -tocotrienol, had the second highest value within tocotrienol group and had the same antioxidant activity than  $\beta$ -tocopherol.  $\gamma$ -Tocotrienol showed a lower antioxidant activity ( $0.3 \pm 0.1 \text{ mol } \alpha\text{-TE/mol}$ ) and  $\delta$ -tocotrienol did not show any activity.

#### 3.2. Antioxidant capacity of the selected food samples

The lipophilic antioxidant capacities of corn, peanut, sesame, sunflower and walnut oil, wheat samples of badengold, luteus, kombo, rotkorn, tommy and wheat product macaroni, as well as milk and milk cream were analysed by two different methods: photochemiluminescence assay and  $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity assay. Results are shown in Fig. 2. Within the PCL and the  $\alpha$ -TEAC, a trend of a concentration-dependent effect was observed: trends of higher AOC and lower AOC with decreasing sample concentration (increasing dilution factor). As results, the averages of all dilutions are shown. In the group of oil samples,

the sunflower oil ( $265 \pm 42 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ ) and the corn oil ( $244 \pm 43 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ ) had the highest antioxidant effects measured by PCL. The AOC of sesame oil ( $71 \pm 12 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ ) was 73% lower than that of sunflower oil. Peanut oil ( $56 \pm 5 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ ) and walnut oil ( $61 \pm 14 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ ) had no significant differences. All kinds of wheat, which ranged between 29 and 33  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ , decreased the chemiluminescence signal similarly and had no difference in the antioxidant potential determined by PCL. Macaroni showed only 43% antioxidant capacity, comparable to the other wheat samples. Milk cream ( $11 \pm 2 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ ) showed a higher PCL-value than milk ( $0.3 \pm 0.02 \mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ ).

All oil samples had significantly different antioxidant capacities measured by  $\alpha$ -TEAC and ranged between 41 and 177  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE/100 g}$ . The results of the  $\alpha$ -TEAC assay of the wheat samples were 36% lower than the PCL values. The AOC of macaroni measured by  $\alpha$ -TEAC and PCL were the same. Milk and milk cream had similar antioxidant potential in the  $\alpha$ -TEAC assay. The  $\alpha$ -TEAC value of milk was 128 times higher than the PCL value.

#### 3.3. Carotenoids and vitamin E content

Carotenoids were not detected in the oil samples (Table 1). Milk and milk cream contained only (all-E)- $\beta$ -carotene, in which milk cream was 5 times higher than milk. In all wheat samples and macaroni, lutein ranged between 0.02 and 0.3 mg/100 g. Kombo had the highest lutein content followed by macaroni and luteus. Rotkorn had a 10 times lower content of lutein than kombo. Badengold and Tommi had no significant differences in lutein content. The values of zeaxanthin varied between 0.02 and 0.05 mg/100 g. Kombo and macaroni had the same highest zeaxanthin content. The other kinds of wheat had significantly lower values. Kombo and macaroni also had the highest total carotenoid content.

The highest  $\alpha$ -tocopherol content was identified and quantified in sunflower oil ( $45 \pm 4 \text{ mg/100 g}$ ) followed by peanut oil ( $20 \pm 1 \text{ mg/100 g}$ ) and corn oil ( $13 \pm 0.3 \text{ mg/100 g}$ ). Sesame oil had 50% lower  $\alpha$ -tocopherol values than walnut oil. All wheat samples, including macaroni, milk and milk cream had similar lower contents of  $\alpha$ -tocopherol. A low content of  $\beta$ -tocopherol was detected in milk cream and in all wheat samples excluding luteus.  $\gamma$ -Tocopherol was found only in the oil samples without sunflower oil. The highest content of  $\gamma$ -tocopherol was determined in corn oil:  $87 \pm 8 \text{ mg/100 g}$ . Walnut oil contained  $29 \pm 0.3 \text{ mg/100 g}$

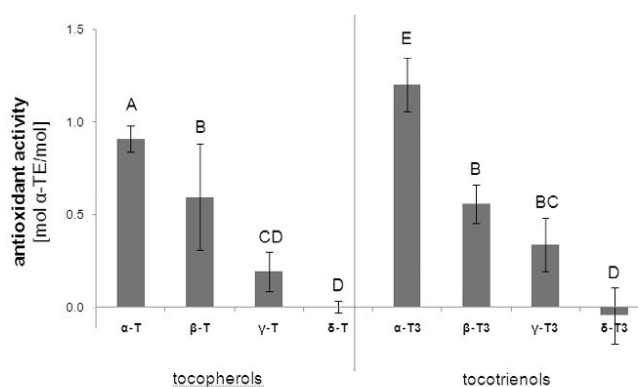


Fig. 1. Antioxidant activities in mol  $\alpha$ -TE/mol of tocopherols measured by PCL on three different days at 75  $\mu\text{mol/L}$ . Bars with different letters differ significantly (ANOVA,  $n=3$ , post hoc S-N-K,  $p < 0.05$ ).  $\alpha$ -T =  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -T =  $\beta$ -tocopherol,  $\gamma$ -T =  $\gamma$ -tocopherol,  $\delta$ -T =  $\delta$ -tocopherol,  $\alpha$ -T3 =  $\alpha$ -tocotrienol,  $\beta$ -T3 =  $\beta$ -tocotrienol,  $\gamma$ -T3 =  $\gamma$ -tocotrienol,  $\delta$ -T3 =  $\delta$ -tocotrienol.

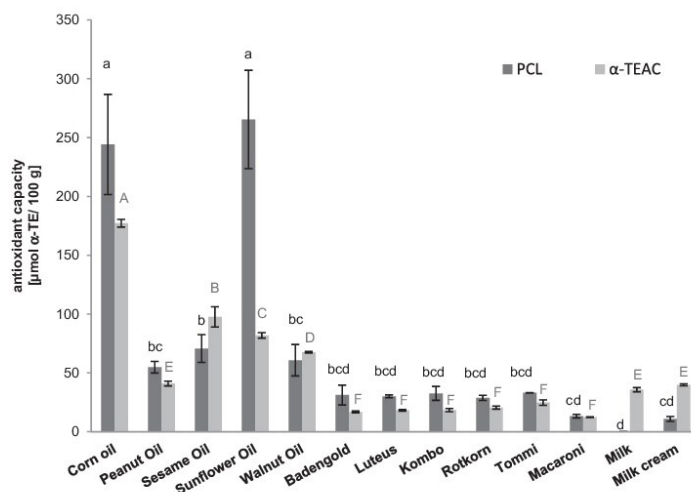


Fig. 2. Antioxidant capacities ( $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ) of oil samples, wheat samples, milk and milk cream measured by PCL and  $\alpha\text{-TEAC}$ . Different letters indicate a significant difference in PCL (small letters) or in  $\alpha\text{-TEAC}$  (capital letters). (ANOVA,  $n = 3$ , post hoc S–N–K,  $p < 0.05$ )

$\gamma$ -tocopherol, approximately 50% more than peanut oil. Sesame oil showed the lowest content with  $0.3 \pm 0.02 \text{ mg}/100 \text{ g}$ . An inconsiderable amount of  $\delta$ -tocopherol was determined in luteus. No tocotrienols were detected in milk, milk cream and in the plant oils excluding sesame oil. Sesame oil showed the highest amount of  $\delta$ -tocotrienol with  $30 \pm 7 \text{ mg}/100 \text{ g}$ . In the wheat and macaroni samples, small amounts of tocotrienols were identified and quantified. A small content of  $\alpha$ -tocotrienol was found in kombo, tommy and macaroni. In all wheat samples  $\beta$ -tocotrienol ranged between 0.9 and 2.9  $\text{mg}/100 \text{ g}$ .  $\gamma$ -Tocotrienol was analysed in badengold, luteus and kombo. Luteus contained an inconsiderable amount of  $\delta$ -tocotrienol. The highest total vitamin E content was determined in corn oil, followed by sunflower oil, walnut oil and peanut oil. All wheat samples and sesame oil had a similar order of vitamin E in  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$ . Milk showed the lowest total vitamin E content, being 8 times lower than milk cream.

## 4. Discussion

### 4.1. Antioxidant activity of vitamin E

The antioxidant activity of all tocopherols was measured by the lipophilic photochemiluminescence assay. The antioxidant activity of tocopherols depends on number and position of methyl groups in the chromanol ring.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol have three methyl groups at positions 5', 7' and 8' and  $\delta$ -tocopherol,  $\delta$ -tocotrienol have one methyl group at position 8' (Fig. 3). The hydroxyl group at C-6 of the chromanol ring is very important for the radical-scavenging activity (Müller et al., 2010). A significant decrease of the AOA was determined within the tocopherols and tocotrienols groups from  $\alpha\text{-T}/\text{T3}$ ,  $\beta\text{-T}/\text{T3}$ ,  $\gamma\text{-T}/\text{T3}$  to  $\delta\text{-T}/\text{T3}$ . Hence, a significant correlation between AOA and the chemical structure of tocopherols and tocotrienols could be observed. The antioxidant activity of vitamin E increased with degree of methylation in ortho-positions of the chromanol ring and depended on their position. A reversed correlation between the pattern of methylation and the chain-breaking activity was observed in the ORAC assay, measured by Müller et al. (2010). Furthermore, a significant correlation between the redox potential and

our antioxidant activity of tocopherols was found ( $R = -0.991$ ). The lower the redox potential, the higher the antioxidant effect, because of the structure of methyl groups in ortho- and meta-position in the hydroxyl chromanol structure (Müller et al., 2010). Moreover, a significant correlation ( $R = 0.980$ ) was proven between the biological activity and the AOA of tocopherols, and versus tocotrienols a very good, but not significant correlation ( $R = 0.993$ ) was observed. Within the tocopherol group,  $\alpha$ -tocopherol had the highest antioxidant activity and the highest biological activity. But the preventive effect of the lipophilic substances against diseases depends on their bioavailability.

It was expected that the side chain of the chromanol ring had no influence on the AOA. But  $\alpha$ -tocotrienol had significant higher values than  $\alpha$ -tocopherol. This relation was also observed in the ORAC assay (oxygen radical absorbance capacity) by Müller et al. (2010), who investigated the AOA of tocopherols and tocotrienols by FRAP – (ferric reducing antioxidant power),  $\alpha\text{-TEAC}$  – ( $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity), DPPH – (2,2'-diphenylpicrylhydrazyl scavenging activity) and CL-assay – (oxygen radical-scavenging activity) (Müller et al., 2010).

In the second hydrogen atom transfer-based assay (CL), the character of the side chain was without effect like in FRAP,  $\alpha\text{-TEAC}$  and DPPH. Furthermore, trends between the AOA of T and the related T3 were observed in all assays except for  $\alpha\text{-TEAC}$ . Generally, the values measured by PCL were lower than in FRAP, ORAC and  $\alpha\text{-TEAC}$ .

Comparing all six assays,  $\alpha\text{-T}$  did not show significant differences in AOA. This was also observed for  $\alpha\text{-T3}$ , excluding ORAC assay. All assays based on single electron transfer showed the same AOA of the T3.  $\beta\text{-T}$  showed significant differences in its AOA between the single electron transfer (SET) and the hydrogen atom transfer (HAT) based assays. The antioxidant potential of  $\gamma\text{-T}$  and  $\delta\text{-T}$  indicated differences in all comparable assays.

All tocopherols did not show significant differences between their antioxidant activity ( $\sim 1.3 \text{ TE}$ ) in the PCL system reported by Kranl et al. (2005). One reason could be the different solvent environment. The investigations presented here were done in MeOH/DMSO 60/40. In contrast, Kranl et al. (2005) used only MeOH. It is a fact, that solvents have an influence on the antioxidants (Iwatsuki, Tsuchiya, Komuro, Yamamoto, & Niki, 1994).



**Table 1**  
Contents of carotenoids and vitamin E in mg/100 g in selected food samples. Different letters within one row indicate significant differences (ANOVA,  $n = 3$ , post hoc S–N–K,  $p < 0.05$ ).

		Corn oil	Peanut oil	Sesame oil	Sunflower oil	Walnut oil	Milk	Milk cream
Vitamin E mg/100 g	$\alpha$ -Tocopherol	13 ± 0.3 <sup>D</sup>	20 ± 1 <sup>E</sup>	4 ± 0.2 <sup>B</sup>	46 ± 4 <sup>F</sup>	8 ± 1 <sup>C</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.5 ± 0.04 <sup>A</sup>
	$\beta$ -Tocopherol	–	–	–	–	–	–	0.05 ± 0.004 <sup>A</sup>
	$\gamma$ -Tocopherol	87 ± 8 <sup>D</sup>	15 ± 0.6 <sup>B</sup>	0.3 ± 0.02 <sup>A</sup>	–	29 ± 0.3 <sup>C</sup>	–	–
	$\delta$ -Tocopherol	–	–	–	–	5.0 ± 0.6 <sup>B</sup>	–	–
	$\alpha$ -Tocotrienol	–	–	–	–	–	–	–
	$\beta$ -Tocotrienol	–	–	–	–	–	–	–
	$\gamma$ -Tocotrienol	–	–	–	–	–	–	–
	$\delta$ -Tocotrienol	–	–	30 ± 7 <sup>B</sup>	–	–	–	–
	$\Sigma$ mg/100 g	100 ± 8 <sup>D</sup>	35 ± 1 <sup>B</sup>	35 ± 7 <sup>B</sup>	46 ± 4 <sup>C</sup>	42 ± 2 <sup>B</sup>	0.07 ± 0.07 <sup>A</sup>	0.5 ± 0.07 <sup>A</sup>
	$\mu$ mol/100 g	234	83	10	107	101	0.16	1.3
$\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g	67	43	9	98	31	0.15	1.2	
Carotenoids mg/100 g	Lutein	–	–	–	–	–	–	–
	Zeaxanthin	–	–	–	–	–	–	–
	(E)- $\beta$ -Carotene	–	–	–	–	–	0.03 ± 0.004 <sup>A</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>B</sup>
	$\Sigma$ mg/100 g	–	–	–	–	–	0.03 ± 0.004 <sup>A</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>E</sup>
	$\mu$ mol/100 g	–	–	–	–	–	0.06	0.3
	$\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g	–	–	–	–	–	0.01	0.07
$\Sigma$	$\mu$ mol/100 g	234	83	10	107	101	0.22	1.63
	AOC	244 ± 43	55 ± 6	71 ± 12	265 ± 42	61 ± 14	0.28 ± 0.02	11 ± 2
	$\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g	67	43	9	98	31	0.16	1.3
	AOC <sub>calculated</sub>	67	43	9	98	31	0.16	1.3
	%	27.4	78.2	12.7	37.0	50.8	57.1	11.8
		Badengold	Luteus	Kombo	Macaroni	Rotkorn	Tommi	
Vitamin E mg/100 g	$\alpha$ -Tocopherol	0.02 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.04 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.02 ± 0.003 <sup>A</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>A</sup>	
	$\beta$ -Tocopherol	0.3 ± 0.02 <sup>DE</sup>	–	0.2 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.06 ± 0.002 <sup>A</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>E</sup>	
	$\gamma$ -Tocopherol	–	–	–	–	–	–	
	$\delta$ -Tocopherol	–	0.01 ± 0.001 <sup>A</sup>	–	–	–	–	
	$\alpha$ -Tocotrienol	<LOQ	<LOQ	0.1 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.01 ± 0.003 <sup>A</sup>	<LOQ	0.03 ± 0.01 <sup>B</sup>	
	$\beta$ -Tocotrienol	1.7 ± 0.1 <sup>C</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>B</sup>	2.9 ± 0.01 <sup>F</sup>	0.9 ± 0.04 <sup>A</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>C</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>E</sup>	
	$\gamma$ -Tocotrienol	0.01 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.02 ± 0.001 <sup>A</sup>	–	<LOQ	<LOQ	
	$\delta$ -Tocotrienol	–	0.01 ± 0.001 <sup>A</sup>	<LOQ	–	<LOQ	<LOQ	
	$\Sigma$ mg/100 g	2.0 ± 0.1 <sup>A</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>A</sup>	3.3 ± 0.02 <sup>A</sup>	1.0 ± 0.4 <sup>A</sup>	1.8 ± 0.07 <sup>A</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>A</sup>	
	$\mu$ mol/100 g	4.8	3.2	7.8	2.3	4.4	6.4	
$\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g	2.7	1.8	4.6	1.3	2.5	3.7		
Carotenoids mg/100 g	Lutein	0.02 ± 0.001 <sup>A</sup>	0.05 ± 0.001 <sup>C</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>E</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>D</sup>	0.03 ± 0.003 <sup>B</sup>	0.02 ± 0.002 <sup>A</sup>	
	Zeaxanthin	0.03 ± 0.001 <sup>C</sup>	0.02 ± 0.001 <sup>AB</sup>	0.05 ± 0.002 <sup>D</sup>	0.05 ± 0.002 <sup>D</sup>	0.02 ± 0.003 <sup>B</sup>	0.02 ± 0.002 <sup>A</sup>	
	(E)- $\beta$ -Carotene	–	–	–	–	–	–	
	$\Sigma$ mg/100 g	0.05 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>D</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>F</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>B</sup>	
	$\mu$ mol/100 g	0.1	0.1	0.5	0.5	0.08	0.06	
	$\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g	0.04	0.05	0.2	0.2	0.03	0.02	
$\Sigma$	$\mu$ mol/100 g	4.9	3.2	8.4	2.9	2.6	3.7	
	AOC	31 ± 8	30 ± 1	33 ± 6	13 ± 2	29 ± 2	33 ± 0.1	
	$\mu$ mol $\alpha$ -TE/100 g	2.7	1.9	4.8	1.5	2.5	3.7	
	AOC <sub>calculated</sub>	2.7	1.9	4.8	1.5	2.5	3.7	
	%	8.7	6.3	14.5	11.5	8.6	11.2	

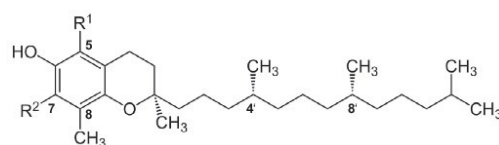
#### 4.2. Antioxidant capacity

In the present study, we determined the lipophilic antioxidant capacity of different vegetable oil, wheat, milk and milk cream samples by PCL and  $\alpha$ -TEAC. We could not observe whether the carotenoids or vitamin E have an influence on the lipophilic antioxidant capacity in our food samples. Very good correlations were only observed between the sum of carotenoids and vitamin E and PCL ( $R = 0.829$ ) as well as  $\alpha$ -TEAC ( $R = 0.858$ ). A substantial positive correlation ( $R = 0.792$ ) was shown between the antioxidant capacity measured by PCL and results obtained by  $\alpha$ -TEAC assay.

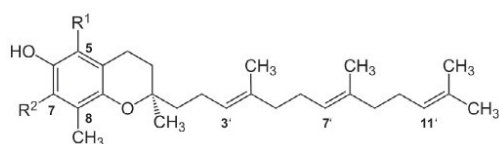
The oil samples rich in vitamin E gave the highest PCL and  $\alpha$ -TEAC values. No carotenoids were found in the oil samples because of the bleaching process in the refining (Krist & Klausberger, 2008). Pellegrini et al. (2003) found that the antioxidant capacity of corn oil was 129  $\mu$ mol TE/100 g in the  $\alpha$ -TEAC, being 27% smaller than our result. In contrast for peanut oil (61  $\mu$ mol TE/100 g) and sunflower oil (117  $\mu$ mol TE/100 g), our results were lower by about 31% in

the  $\alpha$ -TEAC assay (Pellegrini et al., 2003). Papadopoulos, Triantis, Yannakopoulou, Nikokavoura, and Dimotikali (2003) detected in the chemiluminescence measurement a similar antioxidant activity of corn oil and sunflower oil, which confirms our data (Papadopoulos et al., 2003). The findings of walnut oil by Sielicka, Malecka, and Purłan (2014) (110  $\mu$ mol TE/100 mL) and Miraliakbari and Shahidi (2008) (296  $\mu$ mol/100 g) measured by PCL are two times respectively five times higher than those observed here.

Different kinds of wheat and different milled fractions of wheat showed different antioxidants profiles (Adom, Sorrells, & Liu, 2005; Liangli, 2008). The main antioxidants such as vitamin E, phytic acid, phenolic compounds, flavonoids and sterols, are concentrated in the outer layers of the oat kernel (Liangli, 2008). Furthermore, comparisons of wheat antioxidant results among research laboratories are very difficult because different solvent systems and extracting conditions have been employed (Zhou & Yu, 2004). In comparison with the total results of Pellegrini et al. (2006) for



Tocopherol



Tocotrienol

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	redox potential	biological activity in α-T-equivalents
<b>tocopherol</b>				
α	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	+0.273 volts	1.0
β	CH <sub>3</sub>	H	+0.343 volts	0.5
γ	H	CH <sub>3</sub>	+0.348 volts	0.1
δ	H	H	+0.405 volts	0.03
<b>tocotrienol</b>				
α	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	not known	0.3
β	CH <sub>3</sub>	H	not known	0.05
γ	H	CH <sub>3</sub>	not known	0.01
δ	H	H	not known	insignificant

Fig. 3. Chemical structures and biological activities of the natural isomers of vitamin E as well as the redox potentials of tocopherols (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

white corn (TEAC: 301 μmol TE/100 g), our average wheat samples were just about one tenth measured by PCL and sixteenth part by α-TEAC. And also, our macaroni data had in both assays, PCL and α-TEAC, about 85% lower values than white pasta. Methanol was used as extraction solvent, thus, the extractability of vitamin E and xanthophylls was possible. Pellegrini et al. (2006) measured the total trolox equivalent antioxidant capacity, combined free and bound phytochemicals. Therefore, more hydrophilic phytochemicals were extracted and had a positive influence on the AOC measurements (Pellegrini et al., 2006). The inhibition of PCL for milling fractions varied from 90 to 1560 μmol α-TE/100 g for soft wheat and hard wheat, reported by Liangli (2008), values were 18 times higher for the whole grain than our results. Within the wheat samples macaroni showed the lowest antioxidant potential in both assays used. This result was expected because macaroni is a processed product and antioxidants are liable to deteriorate during the processing (Fares, Platani, Baiano, & Menga, 2010; Shi & Maguer, 2000). The lipophilic antioxidant capacity of milk was not detected by the α-TEAC (Pulido, Hernandez-Garcia, & Saura-Calixto, 2003). But our results of milk cream had 60% higher values in α-TEAC and 68% higher results in PCL than the observed results from the literature (Horn, 2011).

We calculated the theoretical antioxidant capacity in μmol α-TE/100 g for PCL. All experimental data were higher than the calculated values, ranging between +6.0% (luteus) and +57.1% (milk). This may be due to unidentified minor compounds or synergistic or antagonistic interactions among the antioxidant compounds. Sep-

arating each antioxidant compound and studying it individually is inefficient, because the complex composition of food influences the efficacy of antioxidants (Arts et al., 2002; Müller et al., 2011).

For all AOC, measured in different dilution factors in PCL and α-TEAC, concentration-dependent effects were observed. Hengst, Werner, Müller, Fröhlich, and Böhm (2009) described firstly the influence of the concentration dependence, but the basic causes of these dilution effects are hardly unknown (Hengst et al., 2009).

#### 4.3. Carotenoid and vitamin E content

The main lipophilic antioxidants in vegetable oils are vitamin E compounds. The highest total tocopherol content was found in corn oil. The composition of corn oil described in the literature showed for γ-tocopherol the highest amount followed by α-tocopherol in the proportion of around 80:20, which conforms with the own data (Krist & Klausberger, 2008). The content of α-tocopherol in peanut oil is in very good agreement with the result (19 mg/100 g) of Azzi and Stocker (2000). Other research groups determined that sesame oil had a total vitamin E content between 45 and 52.8 mg/100 g (Schwartz, Ollilainen, Piironen, & Lampi, 2008; Speek, Schrijver, & Schreurs, 1985) and was composed of 80–98% γ-T, 17–2% α-T and negligible traces of β-T, δ-T, α-T3 and γ-T3. In our sesame oil, the main vitamin E compound (86%) was δ-T3. Data on tocotrienols in sesame oil are rare. Nature products, such as vegetable oils have natural variations in their ingredients. α-Tocopherol was the main tocopherol with 96%

in the sunflower oil, reported by Kamal-Eldin and Appelqvist (1996). In comparison to our sunflower oil, only  $\alpha$ -tocopherol was detected and the total tocopherol content was one third lower. The total tocopherol content decreased until the end of the refining processes (Tasan & Demirci, 2005). In the literature, it is described that walnut oil had a total vitamin E content of 36.5 mg/100 g, without tocotrienols, and was 13% lower than our result (Krist & Klausberger, 2008). Okarter, Liu, Sorrells, and Liu (2010) indicated that the total vitamin E content of six wheat varieties ranged from 1.34 to 1.96 mg/100 g.  $\beta$ -Tocotrienol was the predominant form of vitamin E (0.86–1.19 mg/100 g) and  $\gamma$ -tocopherol was determined in lowest content, which is in agreement with own data. Only kombo wheat had 60% higher values of  $\beta$ -tocotrienol. (Okarter et al., 2010). In comparison to Slover (1971), who analysed the tocopherol content of hard, soft and durum wheat, our results were lower by around 66%. Differences can be due to many factors such as variety, growing conditions and time of harvest, climatic conditions and geographical location.

The vitamin E content of milk was 0.13 mg/100 g (70%  $\alpha$ -T, 15%  $\gamma$ -T, 15%  $\delta$ -T), reported by Barba, Esteve, and Frigola (2011), and was two times higher than own data. A reason could be the influence of seasonal variation on content of  $\alpha$ -tocopherol in various forage crops, and the difference between summer and winter milks (Herting & Drury, 1969). But the  $\alpha$ -tocopherol data, described by Gentili et al. (2012) were in good agreement with own results. The total vitamin E content of our milk cream was 74% higher than in literature (0.13 mg/100 g). The main compound was  $\alpha$ -tocopherol.

No carotenoids were found in oil samples because of the refining processes (Demirbas, 2008). Okarter et al. (2010) analysed the total carotenoid content of wheat, which ranged from 0.148 to 0.271 mg/100 g (Okarter et al., 2010). In comparison, our wheat samples amounted 0.05–0.32 mg/100 g. Lutein was the carotenoid present in the highest concentration in wheat, followed by zeaxanthin. The carotenoid values reported in that study were ten times lower than those reported by Hentschel et al. (2002). Liu (2007) published that lutein contents of the wheat grain varieties ranged from 0.026 to 0.0143 mg/100 g, agreeing to our data. The results of zeaxanthin of badengold, luteus, rotkorn and tommy conformed to the results of Liu (2007). But our contents of zeaxanthin in kombo and macaroni were 1.9 times higher. These differences may be attributed to varietal differences and variation in grown environment in different geographical locations (Adom et al., 2005).

The  $\beta$ -carotene content of the milk sample was close to the data from the literature, but we did not detect other carotenoids such as  $\beta$ -cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin (Gentili et al., 2012). The concentration in milk also depends on nature and on the amount of the consumed forage with variations related to season (Gentili et al., 2012).

## 5. Conclusion

In conclusion, four tocopherols and four tocotrienols were investigated on their antioxidant activity by using PCL. It could be shown that the chemical structure has an influence on the AOA. The AOA of all vitamin E isomers increased with number of methyl groups in the chroman ring and depended on their positions. The redox potentials of the tocopherols have an important role and showed a significant correlation to their antioxidant activity. Furthermore, the antioxidant capacity of different kinds of vegetable oils (corn, peanut, sesame, sunflower and walnut oil), wheat samples (baden-gold, luteus, kombo, rotkorn and wheat product macaroni) as well as milk and milk cream was analysed by PCL and  $\alpha$ -TEAC. Parallel, the contents of carotenoids and vitamin E were determined by HPLC. The vegetable oils showed the highest antioxidant potential in PCL and  $\alpha$ -TEAC, based on the high content of vitamin E. Macaroni had the lowest antioxidant capacity, perhaps due to

loss of phytochemicals during the product processing. But all in all, oils, wheat and milk/milk products are important components of the human diet and are a practical strategy for consumers to optimise their health and to reduce the risk of chronic diseases.

A significant correlation between the sum of carotenoids and vitamin E and PCL as well as  $\alpha$ -TEAC was determined. But only a positive correlation was observed between the values measured by PCL and by  $\alpha$ -TEAC. Prior et al. (2005) described, that no one single AOC assay will truly reflect the "total antioxidant capacity" of a particular sample. Determination of AOC of food extracts has to be done using different methods in parallel. Every assay has a different reaction mechanism and sometimes other values (based in scale) which are difficult to compare.

A concentration-dependent effect was observed in both used assays PCL and  $\alpha$ -TEAC, with basic causes yet undefinable. Hence, it is recommended to measure different dilution factors to exclude a concentration-dependent result.

We calculated the theoretical antioxidant capacity of the food samples, which was lower by 6.0–57.1% than the experimental values. This suggests synergistic or antagonistic interactions of antioxidant compounds in food matrices which possibly affected the measurement.

## References

- Abu-Shahin, F., Stone, W., Ramsauer, V., & Krishnan, K. (2013). A summary of the prostate cancer prevention trials with a focus on the role of vitamin E. *Home Health Care Management & Practice*, 25(1), 23–28.
- Adom, K. K., Sorrells, M. E., & Liu, R. H. (2005). Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2297–2306.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H.-P., et al. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1184–1187.
- Azzi, A., & Stocker, A. (2000). Vitamin E: Non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*, 39(3), 231–255.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2011). Determination of vitamins E ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *European Food Research and Technology*, 232(5), 829–836.
- Bauerfeind, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., & Böhm, V. (2014). Use of photochemiluminescence for the determination of antioxidant activities of carotenoids and antioxidant capacities of selected tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30), 7452–7459.
- Brigelius-Flohé, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: Function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10), 1145–1155.
- Colombo, M. L. (2010). An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol—Perspectives. *Molecules*, 15(4), 2103–2113.
- Demirbas, A. (2008). *Biodiesel*. London: Springer.
- Elmadfa, L., & Wagner, K.-H. (1997). Vitamin E und Haltbarkeit von Pflanzenölen. *Lipid/Fett*, 99(7), 234–238.
- Fares, C., Platani, C., Baiano, A., & Menga, V. (2010). Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. *Food Chemistry*, 119(3), 1023–1029.
- Franke, S., Fröhlich, K., Werner, S., Böhm, V., & Schöne, F. (2010). Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils. *European Food Research and Technology*, 112(10), 1122–1129.
- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari, S., & Curini, R. (2012). Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1628–1639.
- Hengst, C., Werner, S., Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2009). Determination of the antioxidant capacity: Influence of the sample concentration on the measured values. *European Food Research and Technology*, 230(2), 249–254.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M. G., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6663–6668.
- Herting, D. C., & Drury, E.-J. E. (1969). Vitamin E content of milk, milk products, and simulated milks: Relevance to infant nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 22(2), 147–155.
- Horn, J. (2011). *Anwendung verschiedener Testsysteme zur Bestimmung der lipophilen antioxidativen Kapazität auf ausgewählte Lebensmittel und Kosmetika* (Diploma thesis). Jena: Friedrich Schiller Universität.
- Iwatsuki, M., Tsuchiya, J., Komuro, E., Yamamoto, Y., & Niki, E. (1994). Effects of solvents and media on the antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1200(1), 19–26.

- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L.-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671–701.
- Kornsteiner, M., Wagner, K.-H., & Elmadfa, I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 98(2), 381–387.
- Kranl, K., Schlesier, K., Bitsch, R., Hermann, H., Rohe, M., & Böhm, V. (2005). Comparing antioxidative food additives and secondary plant products – Use of different assays. *Food Chemistry*, 93(1), 171–175.
- Krist, G. B. S., & Klausberger, C. (2008). *Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle*. Vienna: Springer.
- Liangli, L. Y. (2008). *Wheat antioxidants*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207–219.
- Miraliakbari, H., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 111(2), 421–427.
- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139–148.
- 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. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(5), 731–742.
- Okarter, N., Liu, C.-S., Sorrells, M. E., & Liu, R. H. (2010). Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chemistry*, 119(1), 249–257.
- Papadopoulos, K., Triantis, T., Yannakopoulou, E., Nikokavoura, A., & Dimotikali, D. (2003). Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, 494(1), 41–47.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., et al. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2006). Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(11), 1030–1038.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Pulido, R., Hernandez-Garcia, M., & Saura-Calixto, F. (2003). Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(10), 1275–1282.
- Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(1), 7–30.
- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., & Lampi, A.-M. (2008). Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), 152–161.
- Shi, J., & Maguer, M. L. (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 1–42.
- Sielicka, M., Malecka, M., & Purlan, M. (2014). Comparison of the antioxidant capacity of lipid-soluble compounds in selected cold-pressed oils using photochemiluminescence assay (PCL) and DPPH method. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(4), 388–394.
- Slover, H. (1971). Tocopherols in foods and fats. *Lipids*, 6(5), 291–296.
- Speck, A. J., Schrijver, J., & Schreurs, W. H. P. (1985). Vitamin E composition of some seed oils as determined by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Food Science*, 50(1), 121–124.
- Tasan, M., & Demirci, M. (2005). Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 251–254.
- Vardi, M., Levy, N. S., & Levy, A. P. (2013). Vitamin E in the prevention of cardiovascular disease – The importance of proper patient selection. *Journal of Lipid Research*.
- Werner, S., & Böhm, V. (2011). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: Evaluation of an in vitro digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1163–1170.
- Zhou, K., & Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT – Food Science and Technology*, 37(7), 717–721.

### 3.3 Manuskript III

**Interactions between lipophilic antioxidants measured by photochemiluminescence assay and  $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity as well as the influence of matrix compounds on the lipophilic antioxidant capacity**

Jasmin Karmowski<sup>1</sup>, Kathleen Enke<sup>1</sup>, Margrit Killenberg<sup>2</sup> and Volker Böhm<sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup> Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29,  
D-07743 Jena, Germany

<sup>2</sup> Analytik Jena AG, Jena, Germany

**Affiliations of all authors:**

Jasmin Karmowski • Kathleen Enke • Volker Böhm\*

Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29,  
D-07743 Jena, Germany

Margrit Killenberg

Analytik Jena AG, Jena, Germany

**Corresponding author:**

\* Institute of Nutrition, Friedrich Schiller University Jena, Dornburger Straße 25-29,  
D-07743 Jena, Germany

*E-mail address:* volker.boehm@uni-jena.de, Tel.: +49 3641 949633; fax: +49 3641 949702.

**Abstract**

Antioxidant capacity as sum parameter necessarily includes interactions between antioxidants. Thus, two compounds out of  $\alpha$ -tocopherol, lycopene,  $\beta$ -carotene and lutein were mixed and measured by lipophilic photochemiluminescence (PCL) and  $\alpha$ -TEAC assay. In the  $\alpha$ -TEAC assay, all mixtures of antioxidants showed an antagonistic effect. The highest antagonistic effect was found for all mixtures of  $\beta$ -carotene and lutein. In contrast, in the PCL system antagonistic, synergistic and additive effects were detected. The mixture  $\beta$ -carotene and lutein 2:1 had the highest synergistic effects. The presence of functional hydroxyl groups and hydrogen bonding effects may have an influence on the interactions. In both assays used, we observed a concentration-dependent effect.

The influence of glucose, fructose, saccharose and starch on the antioxidant capacity were determined by PCL and  $\alpha$ -TEAC, too. All sugars can have an effect on the lipophilic antioxidant capacity depending on the extraction solvent. The sugar samples, extracted with n-hexane, did not show any antioxidant capacity in  $\alpha$ -TEAC assay. In the PCL, the antioxidant potentials of sugars were dependent on the extraction solvent and reflected the dissolubility of sugars in methanol. The better the solubility the higher the antioxidant capacity. Additionally, sugars did not interact with antioxidants, with exception of the methanolic fructose extract.

**Keywords**

singlet oxygen, antagonistic, synergistic, matrix effects

**Chemical compounds studied in this article**

$\alpha$ -Tocopherol (PubChem CID: 14985), Lycopene (PubChem CID 446925), Lutein (PubChem CID 5281243),  $\beta$ -Carotene (PubChem CID 5280489), Glucose (PubChem 79025), Fructose (PubChem CID 5984), Saccharose (PubChem CID 5988)

**Abbreviations**

AOA	antioxidant activity
AOC	antioxidant capacity
$\beta$ -Caro	$\beta$ -Carotene
df	dilution factor
EAC	experimental antioxidant capacity
IE	interaction effect
Lut	Lutein
Lyc	Lycopene
TAC	theoretical antioxidant capacity
$\alpha$ -T	$\alpha$ -Tocopherol
$\alpha$ -TE	$\alpha$ -tocopherol equivalents
$\alpha$ -TEAC	$\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity

## 1 Introduction

Clinical trials and epidemiological studies have indicated that the incidence of diseases such as inflammation, cardiovascular diseases and cancer risk are reduced by the consumption of fruits and vegetables (Huang, Ou, & Prior, 2005). Diseases can be caused by reactive oxygen species (ROS), which can damage biological molecules (Wu, Beecher, Holden, Haytowitz, Gebhardt, & Prior, 2004). Diets rich in fruits and vegetables have been considered as excellent sources of antioxidants, which are able to reduce the oxidation of cellular components in organisms. Therefore, in the last time, there was a high interest to develop and improve reliable analytical methods to determine the antioxidant capacity of foodstuffs (Magalhães, Santos, Segundo, Reis, & Lima, 2010).

Natural antioxidants exist in combination and are consumed together in foods. Hence, the potential for interactions is high in the human diet (Liu, Shi, Colina Ibarra, Kakuda, & Jun Xue, 2008). Separating each antioxidant compound of the complex composition of food and studying it individually is inefficient, without understanding the possible synergistic or antagonistic interactions amongst the antioxidant compounds within a food matrix (Arts, Haenen, Wilms, Beetstra, Heijnen, Voss, et al., 2002; Müller, Fröhlich, & Böhm, 2011). "Synergism is, in general, the phenomenon in which a number of compounds, when present together in the same system, have a more pronounced effect than that which would be derived from a simple additivity concept". Antagonism may be defined likewise by substituting "more" with "less", whereas co-antioxidants may be defined by substituting "more" with "same" (Becker, Nissen, & Skibsted, 2004). Researchers observed synergistic effects between lycopene and  $\alpha$ -tocopherol, lycopene and  $\beta$ -carotene, lycopene and lutein, lutein and  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene (Kotíková, Lachman, Hejtmánková, & Hejtmánková, 2011; Liu, Shi, Colina Ibarra, Kakuda, & Jun Xue, 2008; Palozza & Krinsky, 1992; Zanfini, Corbini, La Rosa, & Dreassi, 2010).

Moreover, synergistic and additive effects of nonphenolic compounds found in food samples such as fructose, glucose and saccharose were observed by Magalhães et al. (2010) (Magalhães, Santos, Segundo, Reis, & Lima, 2010). The antioxidant capacity of samples with high amounts of saccharides could be affected by the sugars, which can cause an overestimation more than 50% (Magalhães, Santos, Segundo, Reis, & Lima, 2010; Stratil, Klejdus, & Kubáň, 2007).



Hence, the first aim of the present study was to investigate interactions between  $\alpha$ -tocopherol, lycopene,  $\beta$ -carotene and lutein. Mixtures containing different concentrations of two of these compounds at a time were measured by lipophilic photochemiluminescence (PCL) method and  $\alpha$ -TEAC assay. The PCL method is an optical excitation (365 nm) of a photosensitive compound with UV-light, thus activating a chemical reaction resulting in production of photo energy. The established  $\alpha$ -TEAC assay based on the decolourization of ABTS radical cation to determine the lipophilic antioxidant potentials.

A further aim of this work was to determine the influence of carbohydrates, particularly glucose, fructose, saccharose and starch on the antioxidant capacity measurements by PCL and  $\alpha$ -TEAC, too.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Chemicals

Pure DL- $\alpha$ -tocopherol (100% analytical grade) was used from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Carotenoids (97-99% analytical grade) were purchased from CaroNature (Ostermundigen, Switzerland). D(+)-Glucose and D(-)-fructose were from Merck (Darmstadt, Germany). D(+)-Saccharose was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and starch to Zulkowsky was purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). DMSO (dimethylsulfoxide) was bought from Roth (Karlsruhe, Germany), MtBE (methyl tert.-butyl ether) from Sauerbrey (Reinhardshagen, Germany) and MeOH (methanol) was obtained from VWR (Darmstadt, Germany). 2,2-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) was bought from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). HPLC grade water (18 M $\Omega$ ) was prepared using a Millipore Milli-Q purification system (Millipore GmbH, Schwalbach, Germany). Carbonate buffer, polar-aprotic mixture, photosensitizer and all other chemicals were of analytical grade.

### 2.2 Sample preparation

#### 2.2.1 Preparation of standard solutions

Two components out of  $\alpha$ -tocopherol, lycopene,  $\beta$ -carotene and lutein were mixed in molar ratios 1:1 (75+75 10 $\times$ 10 $^{-6}$  mol/L), 2:1 and 1:2. The mixtures were dried under nitrogen and dissolved in a defined volume of MtBE/DMSO (1/4, v/v) for PCL, and

n-hexane for  $\alpha$ -TEAC. For the measurement by PCL and  $\alpha$ -TEAC, two different df (df 1: undiluted, df 2: 1 vol. of antioxidant mixture plus 1 vol. of solvent) of these mixtures were prepared. The interaction effects were calculated as the ratio between experimental AOC (EAC) and theoretical AOC (TAC). If the interaction effect (IE=EAC/TAC) was 1, an additive effect was observed. Synergistic action was shown for a ratio EAC/TAC greater than 1. Antagonism was present if the ratio EAC/TAC was lower than 1. The theoretical antioxidant capacity was calculated by using the antioxidant activities of the pure substances (Eq. 1): calculation  $AOC_{A:C(x:y)} = \frac{[(AOA_A * x)] + [AOA_C * y]}{x+y}$

### 2.2.2 Sugar extraction

Sugars (glucose, fructose, saccharose, starch) were weighted in different concentrations (50 g/L, 250 g/L, 500 g/L; mix 250 g/L) in a falcon tube and were extracted with methanol or MeOH/MtBE (50/50, v/v). After a centrifugation (5 min, 3.0 rcf), the upper phase was collected in a volumetric flask and the extraction was repeated three times. For using the extracts to determine the antioxidant capacity by PCL, the extracts were centrifuged (5 min, 18407 rcf). In addition,  $\alpha$ -tocopherol ( $26 \cdot 10^{-6}$  mol/L) was added to sugar (250 g/L) and extracted with MeOH as well as with MeOH/MtBE (50/50, v/v). Lycopene ( $2.7 \cdot 10^{-6}$  mol/L) was also added to sugar (250 g/L) and extracted with MeOH/MtBE (50/50, v/v).

## 2.3 Measurements

### 2.3.1 $\alpha$ -TEAC

The procedure to measure the  $\alpha$ -tocopherol equivalent antioxidant capacity was slightly modified to Müller et al. (2011) and is based on the decolorization of the ABTS $\cdot^+$  to determine the lipophilic antioxidant properties of the samples (Müller, Fröhlich, & Böhm, 2011). Briefly, the ABTS radical cation working solution was prepared by filtering an ABTS solution (tip of a spatula ABTS dissolved in PBS) covered with manganese dioxide powder. Afterwards, the particles of manganese dioxide were removed by 0.2  $\mu$ m membrane filtration. The stable ABTS radical cation solution was produced daily by diluting with 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) to an absorbance of  $0.70 \pm 0.05$  at 730 nm in a cuvette spectral photometer and preincubated at room temperature for 2 h. For the measurements, 100  $\mu$ l samples were added to 1000  $\mu$ l ABTS radical cation working

solution (Müller, Fröhlich, & Böhm, 2011). The mixture was shaken for 30 s in reaction tubes and transferred completely in half-micro cuvettes. After centrifugation (30 s, 200 rcf) and exactly 2 min after initiation of mixing, the absorbance was measured at 734 nm by using a V-530 spectrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany). The lipophilic antioxidant capacity is expressed in  $10 \times 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -tocopherol equivalents per 100 g ( $10 \times 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g).

### 2.3.2 PCL

The standards and sugar extracts were dried under nitrogen and dissolved in MtBE/DMSO (1/4, v/v). Then, the sample solutions were diluted in different concentrations (dilution factor, df) in MtBE/DMSO (1/4, v/v).  $\alpha$ -Tocopherol was used for calibration (2.5 – 125  $10 \times 10^{-6}$  mol/L), thus the antioxidant activity/capacity is expressed in  $\alpha$ -tocopherol equivalents ( $\alpha$ -TE). A polar-aprotic mixture, carbonate buffer, photosensitizer and sample were pipetted in a quartz glass cuvette (Hellma GmbH, Müllheim, Germany). The measurement was done in a cuvette apparatus (Analytik Jena AG, Jena, Germany).

### 2.4 Statistical analysis.

The analytical data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. This average mean was calculated by the average of the different dilutions (df 1, df 2). Each dilution had triplicate measurements. The results were analysed with ANOVA using SPSS statistical software (version 19.0, SPSS, Chicago, USA). The homogeneity of variances for all data was assumed by Levene's test. The significance of mean differences was determined by Student-Newmann-Keuls' post hoc test and by independent T-test. Correlations were tested by using Pearson procedure  $p < 0.01$ .

## 3 Results

### 3.1 Interactions between antioxidants

#### 3.1.1 Interactions measured by PCL

$\alpha$ -Tocopherol and lycopene 1:1 showed an additive effect independent of the df, the calculated and the experimental results were the same.  $\alpha$ -Tocopherol and lycopene 2:1 and 1:2 had synergistic effects (Figure 1). The experimental antioxidant capacity of the combination  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene was 10-23% higher in all mixtures than the

calculated data and showed significantly synergistic effects (Table 1). All mixtures of  $\alpha$ -tocopherol and lutein showed approximately 50% of the calculated antioxidant capacity. The different dilutions had no influence on the results (data not shown). All combinations of lycopene and  $\beta$ -carotene indicated significant synergisms.  $\beta$ -Carotene showed higher influence on the synergistic effects as can be seen for the mixture of two parts  $\beta$ -carotene and one part lycopene. Lutein demonstrated a negative influence in the mixtures with lycopene or  $\alpha$ -tocopherol. But in contrast, lutein mixed with  $\beta$ -carotene had positive interactions, independent of the mixture proportions. Furthermore, all combinations with  $\beta$ -carotene showed an increase of the antioxidant potential and synergistic interactions. All results are shown in Table 1. The results are given as average of two df (data not shown) for a better comparison. A concentration-dependent effect was observed and the antioxidant capacity was dependent on the dilution/sample concentration.

### 3.1.2 Interactions measured by $\alpha$ -TEAC

All standard combinations showed significantly lower antioxidant capacity than the calculated values. Accordingly, only antagonistic effects could be observed (Figure 2).

In the mixture  $\alpha$ -tocopherol and lycopene, lycopene showed a negative influence and in the combination  $\alpha$ -tocopherol/ $\beta$ -carotene as well as  $\alpha$ -tocopherol/lutein, the tocopherol was a positive factor. All mixtures with higher concentration of  $\alpha$ -tocopherol showed less negative interactions than the other mixtures. Lycopene and  $\beta$ -carotene did not show any compound-specific interaction and all mixtures had approximately 25% of the calculated antioxidant capacity. Lycopene combined with lutein in the ratio 2:1 showed stronger negative effects than the mixture 1:1 and 1:2.  $\beta$ -Carotene mixed with lutein had the highest antagonism. On average, just 10% was detected for the antioxidant capacity of lutein and  $\beta$ -carotene in mixture.

A concentration-dependent effect was observed in all combinations. Higher df resulted in higher antioxidant capacity values. Table 2 shows an example of the concentration-dependent effect of the results of  $\alpha$ -tocopherol and lycopene.

## 3.2 Influence of sugar matrices on the measurement of the lipophilic antioxidant capacity

### 3.2.1 $\alpha$ -TEAC assay

In the  $\alpha$ -TEAC assay, all sugar solutions, being extracted with n-hexane, did not show any ABTS  $\cdot^+$  bleaching activity.

### 3.2.2 PCL assay

The sugar samples having been extracted with MeOH are described in the following (Figure 2):

The lowest concentration (50 g/L) of the sugar extracts had the highest antioxidant capacities. Depending on the concentration, significant differences in antioxidant capacity were found for fructose. The lowest concentration of fructose (50 g/L) showed the highest value and was around 9 times higher than results of the other sugar extracts.

The glucose extract (50 g/L) showed significant differences between the two dilutions; df 2 indicated the highest antioxidant capacity ( $57 \pm 8 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g), being twice the value of df 1 ( $23.6 \pm 1.1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g). The same effect was observed for the fructose extracts (50 g/L). The dilution df 2 had the highest antioxidant capacity ( $440 \pm 90 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g) and df 1 showed with  $218 \pm 50 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g half the antioxidant potential (data not shown).

All saccharose extracts did not show significant differences in their AOC ( $4.8 - 11.8 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g) between the concentrations and df with the exception of 50 g/L, df 2. This sample presented the highest antioxidant potential ( $22.2 \pm 8.9 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g), being two times higher than df 1. The starch extracts demonstrated the same concentration-dependent effects. Undiluted extracts (df 1), concentration: 50 g/L and 250 g/L, had around 50% lower antioxidant effectiveness than df 2. Different results were observed dependent on df. The higher the df (lower concentration) the higher the antioxidant capacity. Additionally, it was noticeable that the lower the concentration the higher the concentration-dependent effect. But no dilution effect was observed for fructose, saccharose and starch at a concentration of 500 g/L.

All four sugars were also mixed together in the same proportion (sum of sugars: 250 g/L) and were extracted with methanol. This mixture had, in average an antioxidant capacity

of  $166 \pm 57 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g. A dilution effect was observed. Df 2 had two-thirds higher values than df 1.

All sugars had no significant differences between the extract of the pure sugar (250 g/L) and the extract of sugar plus  $\alpha$ -tocopherol. But a significantly higher result was observed for fructose plus  $\alpha$ -tocopherol compared to pure  $\alpha$ -tocopherol. It indicated a synergistic effect. Glucose, saccharose and starch, each plus  $\alpha$ -tocopherol, showed comparable results to the expected value of pure  $\alpha$ -tocopherol ( $9.5 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g).

It was observed that the sugar samples extracted with MeOH/MtBE (50/50, v/v) had significant lower antioxidant capacities than the MeOH-extracts with the exception of glucose 250 g/L and saccharose 250 g/L. Only, the lowest concentrations of fructose had a significant difference between 50 g/L and 250 g/L. The highest antioxidant capacity was found for 50 g/L fructose (Figure 3). This value was around seven times higher than the results of the glucose extract. Saccharose at 50 g/L and 500 g/L as well as all starch extracts did not show any antioxidant potential. The antioxidant capacities of glucose, fructose and saccharose at 250 g/L had no significant differences. A concentration-dependent effect was observed. The antioxidant capacity of glucose 50 g/L and df 1 was ~50% lower than df 2. The fructose extract (50 g/L) did not show a dilution effect, but at 500 g/L a small trend was observed. Noteworthiness was the saccharose extract. Only at 250 g/L and df 2 an antioxidant capacity ( $19 \pm 5 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g) was found. In contrast, df 1 and the other extracts with different concentrations did not show any antioxidant capacity. A wide difference in the results and their df was found for the mix extracts. The sugar mix (four compounds in a 1:1:1:1 ratio) was extracted and measured using df 1 and df 2. The value of df 2 was three times higher than df 1. The mix extracted with MeOH/MtBE (50/50, v/v) showed four times significant lower results than the sugar mix extracted with MeOH. All sugar extracts (glucose, fructose, saccharose, starch) plus  $\alpha$ -tocopherol had no significant difference in their antioxidant capacity. Furthermore, there were no significant differences between the pure glucose and fructose extracts (250 g/L) without  $\alpha$ -tocopherol and the glucose and fructose extracts with added  $\alpha$ -tocopherol standard. All extracts of sugar plus  $\alpha$ -tocopherol showed the same results than the pure  $\alpha$ -tocopherol ( $9.5 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g) and indicated no effect of the sugar.

All sugar extracts including lycopene had no significant difference in their antioxidant potential. Fructose with added lycopene did not show any antioxidant capacity. The glucose extract with lycopene showed the highest results. Saccharose and starch had only very low antioxidant capacities. All extracts of sugar plus lycopene had the same antioxidant capacities than pure lycopene ( $0.27 \cdot 10^{-6}$  mol  $\alpha$ -TE/100 g) and indicated no interactions between lycopene and sugars.

## 4 Discussion

### 4.1 Interactions between antioxidants measured by $\alpha$ -TEAC and PCL

Lipophilic antioxidants ( $\alpha$ -tocopherol, lycopene,  $\beta$ -carotene and lutein) mixed in 1:1, 2:1 and 1:2 molar ratios were analysed in two dilutions on their antioxidant capacity by PCL and  $\alpha$ -TEAC assay. We observed a concentration-dependent effect in both assays. In both test systems it was observed that a higher df (lower concentration) resulted in higher antioxidant capacity values. These concentration-dependent effects were firstly described by Hengst et al. (2009) and indicated that the results of the antioxidant capacity can depend significantly on the applied sample concentration/dilution in different assays (Hengst, Werner, Müller, Fröhlich, & Böhm, 2009). Several researchers also observed the dilution effect but the basic causes of the effects are yet unknown (Bauerfeind, Hintze, Kschonsek, Killenberg, & Böhm, 2014; Sipel, Kevers, Pincemail, Grygiel, Defraigne, & Dommès, 2013; Westphal, Bauerfeind, Rohrer, Ernowita, & Böhm, 2014).

All mixtures of antioxidants showed an antagonistic effect in the  $\alpha$ -TEAC assay. In the  $\alpha$ -TEAC assay, we found the strongest antagonistic effects in all mixtures of  $\beta$ -carotene and lutein and the weakest negative interactions for  $\alpha$ -tocopherol mixed with lutein (1:1 and 2:1). Lutein appears to have a negative influence on the antioxidant capacity, but the presence of the hydroxyl group in  $\alpha$ -tocopherol had an inverse effect.  $\alpha$ -Tocopherol showed the lowest AOC in the  $\alpha$ -TEAC assay (Müller, Fröhlich, & Böhm, 2011) and could be regenerated by the more effective carotenoids. Thus, all mixtures with  $\alpha$ -tocopherol had the weakest antagonism effect. The presence of hydroxyl groups, as in the mixture  $\alpha$ -tocopherol/lutein, delivers hydrogen bonding effects and anticipates the antagonism.

In contrast, the majority of antioxidant combinations measured by PCL assay had synergistic interactions. But the mixture  $\alpha$ -tocopherol/lutein as well as lycopene/lutein showed an antagonism. The results in the PCL assay showed that the mixture  $\beta$ -carotene

and lutein 2:1 had the strongest synergistic effect, followed by  $\beta$ -carotene and lycopene 1:2 and  $\beta$ -carotene and lutein 1:1. The strongest antagonism was indicated by the mixture  $\alpha$ -tocopherol and lutein 1:2, followed by lycopene and lutein 2:1 and tocopherol and lutein 1:1. The antagonistic effect between  $\alpha$ -tocopherol and lutein in the PCL system can perhaps be explained by hydrogen bonding between the two hydroxyl groups. The hydrogen bonds between lutein and the hydroxyl group of  $\alpha$ -tocopherol can block the hydrogen donating ability of  $\alpha$ -tocopherol and decrease its antioxidant potential (Nogala-Kańska, Dwiecki, Siger, Górnaś, Polewski, & Ciosek, 2013). Furthermore, the redox potential can have an influence also. The highest difference in the redox potential was calculated for the two combinations  $\alpha$ -tocopherol and lutein ( $\Delta E = 0.09$ ) as well as lycopene and lutein ( $\Delta E = 0.093$ ), both mixtures showed an antagonism. Other phenomena yet unknown are probably also involved in the interactions measured by PCL and  $\alpha$ -TEAC assay (Peyrat-Maillard, Cuvelier, & Berset, 2003).

A good but not significant correlation between calculated AOC and experimental AOC was observed for all  $\alpha$ -tocopherol containing mixtures (with lutein:  $R = 0.987$ ,  $p = 0.103$ ; with lycopene:  $R = 0.943$ ,  $p = 0.216$ ) measured by PCL. But only the mixture  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene ( $R = 0.997$ ,  $p = 0.048$ ) showed a significant correlation. No correlations were found in the  $\alpha$ -TEAC between calculated and experimental AOC. Some combinations of antioxidants in mixtures and specific concentrations were more effective than the single antioxidants, but some were also less effective. The PCL assay and  $\alpha$ -TEAC assay based on different reaction mechanism and conditions and could explain the different results interaction in both assays.

Researcher groups indicated synergistic effects for lycopene/lutein, lycopene/ $\beta$ -carotene, lutein/ $\beta$ -carotene as well as for  $\alpha$ -tocopherol/ $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol/lycopene measured by TEAC assay using trolox for calibration (Kotíková, Lachman, Hejtmánková, & Hejtmánková, 2011; Zanfini, Corbini, La Rosa, & Dreassi, 2010). Differences to our antagonistic effects in  $\alpha$ -TEAC assay could be due to different solvents and different calibration substances. We used  $\alpha$ -tocopherol for calibration. Furthermore, the negative interactions were not in agreement with the results of Liu et al. (2008) which used the DPPH free radical method (Liu, Shi, Colina Ibarra, Kakuda, & Jun Xue, 2008).

The mixture  $\alpha$ -tocopherol and lycopene (1:1) resulted in an additive effect and lycopene/ $\beta$ -carotene (1:1) in a synergism measured by PCL assay and were in very good



agreement with TEAC data published by Kotíková et al. (2011). These authors also observed a significantly synergistic effect between  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene (1:1). Furthermore, they determined a significant synergism for lycopene and lutein, unlike this study. We found a strong synergism between  $\beta$ -carotene and lutein which is not comparable to the TEAC results of Kotíková et al. (2011) but to Zanfini et al. (2010), who also used the TEAC assay. Zanfini et al. (2010) analysed different mixture ratios and detected the strongest synergistic effects for mixtures of  $\alpha$ -tocopherol and lycopene. Lycopene and  $\beta$ -carotene mixtures also showed synergistic interactions in a study in which the DPPH method was used (Liu, Shi, Colina Ibarra, Kakuda, & Jun Xue, 2008). A significant antagonistic effect was observed for lycopene and lutein (1:1.9) in TEAC assay by Zanfini et al. (2010), being in agreement with our results.

To compare interactions observed in this study and other published data is difficult because of differences in concentrations used, mixture ratios, assay used and procedure. But all results indicate that an optimal combination of antioxidants may play a significant role in enhancement of the oxidative status of biological systems (Liu, Shi, Colina Ibarra, Kakuda, & Jun Xue, 2008).

4.2 Influence of sugar on the lipophilic antioxidant capacity measured by  $\alpha$ -TEAC and PCL

Sugar extracts were investigated on their antioxidant capacity by  $\alpha$ -TEAC and PCL method. The sugar samples, extracted with n-hexane for the  $\alpha$ -TEAC assay, did not show any ABTS radical cation decolourization. It was also not expected that the sugar extracts show any PCL signal. The extraction solvent had a high influence on the measurement. All samples extracted with a polar solvent (MeOH) showed an antioxidant capacity measured in the lipophilic PCL system. The sugars, having been extracted with a polar/nonpolar solvent mixture of MeOH/MtBE (50/50), had ca. five times lower results of AOC than extracts using methanol as solvent. Thus, the antioxidant potential of carbohydrates was dependent on the extraction solvent and reflected the dissolubility of sugars in different solvents. The solubility of glucose, fructose and saccharose decreased with higher content of nonpolar solvent and with carbon chain length of solvents (Bouchard, Hofland, & Witkamp, 2007; Montañés, Olano, Ibáñez, & Fornari, 2007).

The sugar samples showed no antioxidant potentials measured by  $\alpha$ -TEAC assay. On the one hand, the sugar samples were not dissolved in n-hexane. On the other hand the sugar could not reduce the ABTS radical cation.

The different solubility of glucose, fructose and saccharose in methanol reflected the antioxidant capacity measured by PCL. No solubility value was found for the soluble starch to Zulkowsky in methanol and cannot be discussed accordingly. Fructose had the highest solubility (141.5 g/L) followed by glucose (23.5 g/L) and saccharose (10 g/L) (Santa Cruz Biotechnologie, 2014; Montañés, Olano, Ibáñez, & Fornari, 2007), which showed a significant correlation to their antioxidant capacity, independent of the concentration. The better the solubility the higher the antioxidant capacity. Additionally, the redox potential can have an influence on the antioxidant capacity. The ketose fructose ( $E_{1/2}$  -1.76) has a lower half-wave reduction potential than the aldose glucose ( $E_{1/2}$  -1.55) and as a stronger reducer it can reduce more radicals. In addition, a strong H-donating activity makes it an extremely effective antioxidant (Brewer, 2011).

Data about the solubility of sugars in MtBE are not existing and yet unknown. Sugars are either negligible solvable or completely indissoluble in MtBE, because MtBE is a nonpolar solvent. There is no conclusion about the dependency between the solubility of sugars in MeOH/MtBE (50/50) and their antioxidant capacity.

Furthermore, the lowest sugar concentration extracted either with MeOH or with MeOH/MtBE (50/50), had the highest antioxidant capacity in the PCL method. A high concentration (higher weight) can lead to a saturated solution and less molecules are extractable than at lower concentration.

The antioxidant capacity of the measured sugar mix, which was composed of glucose, fructose, saccharose and starch in same concentration (1:1:1:1, sum: 250 g/L), had four times higher results when extracted by MeOH than by MeOH/MtBE (50/50). This is based on the different sugar solubility in the solvents. Furthermore, we observed a concentration-dependent effect for both extraction solvents. Higher dilutions resulted in higher AOC. Between df 1 and df 2 there was a difference about a factor 1.5 for the sugar mix extracted by MeOH. The sugar mix extracted by MeOH/MtBE (50/50) showed for df 2 (half concentration) three times higher values than for df 1. For both extracts of the sugar mixture, a synergistic effect was shown as the experimental AOC was around two times

higher than the expected calculated AOC. The basis for the synergism might be the hydroxyl groups in the carbohydrates.

The methanolic sugar extracts (250 g/L) including  $\alpha$ -tocopherol showed the same antioxidant capacity than pure  $\alpha$ -tocopherol, with the exception of fructose. Glucose, saccharose and starch showed no interactions with  $\alpha$ -tocopherol, but for fructose a synergistic effect was shown. Perhaps hydrogen bonding effects between the ketose and the hydroxyl group in the chromanol ring have an influence on the antioxidant capacity in sum.

In addition, the solvent mix MeOH/MtBE (50/50) was used for the extraction of the sugars, being mixed each with  $\alpha$ -tocopherol or lycopene. The pure  $\alpha$ -tocopherol showed no significant differences compared to the AOC of glucose, fructose, saccharose and starch including  $\alpha$ -tocopherol. All sugar samples, extracted with MeOH/MtBE (50/50) had no synergism or antagonism effect in combination with  $\alpha$ -tocopherol. The measured AOC of the sugar samples including lycopene were not significantly different. Neither an antagonistic effect nor a synergistic effect was shown between glucose, fructose, saccharose as well as starch and the lipophilic antioxidant lycopene.

Magalhães et al. (2008) investigated interaction effects of reducing non-phenolic compounds such as fructose, glucose and saccharose in Folin-Ciocalteu reducing capacity and showed synergistic influences of sugars combined with phenolic compounds (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008). Additionally, glucose, fructose and saccharose reacted with different intensity in determinations of antioxidant capacity measured by TEAC and FRAP (Stratil, Klejdus, & Kubáň, 2007).

A direct comparison of our results and published data is difficult because different solvents were used for the extraction, which have an influence on the antioxidant capacity. Experiments on the effects of different solvents for extraction of sugars and matrix compounds and their influences on the antioxidant capacity are rarely published. But sugar might have an influence on the lipophilic antioxidant capacity, depending on the extraction solvent.

## 5 Conclusion

A two antioxidant mixture of  $\alpha$ -tocopherol, lycopene,  $\beta$ -carotene and lutein in different molar ratios was measured by PCL and  $\alpha$ -TEAC to investigate the influence of

synergistic/antagonistic interactions in the determination of lipophilic antioxidant capacity. All mixtures of antioxidants showed an antagonism in the  $\alpha$ -TEAC assay. The strongest antagonistic effect was seen for the combinations  $\beta$ -carotene/lutein and lycopene/lutein. The weakest effect of antagonism was found in the mixture  $\alpha$ -tocopherol/lutein.

In the PCL assay, antagonistic, synergistic or additive effects were observed. Synergistic effects were detected for mixtures  $\alpha$ -tocopherol/lycopene (1:2, 2:1),  $\alpha$ -tocopherol/ $\beta$ -carotene (1:1, 1:2, 2:1), lycopene/ $\beta$ -carotene (1:1, 1:2, 2:1) and  $\beta$ -carotene/lutein (1:1, 2:1, 2:1). For all mixture ratios of  $\alpha$ -tocopherol/lutein and lycopene/lutein, antagonistic effects were observed. The presence of hydroxyl groups and hydrogen bonding effects might have an influence on the interactions in the PCL and the  $\alpha$ -TEAC assay. The interaction effects of lipophilic antioxidants determined by *in vitro* methods could have an influence on the *in vivo* resorption.

Furthermore, the influence of matrix compounds as glucose, fructose, saccharose, and starch on the lipophilic antioxidant capacity was investigated by PCL assay and  $\alpha$ -TEAC assay. The sugar samples extracted by n-hexane did not show any reducing capacity in ABTS radical cation. In the PCL assay, the lipophilic antioxidant capacity was dependent on the extraction solvent. The better the solubility of the sugar the higher the antioxidant capacity. Fructose showed the highest antioxidant capacity, extracted by MeOH as well as by MeOH/MtBE (50/50, v/v). Glucose, saccharose and starch (MeOH-extracts) showed no interaction with  $\alpha$ -tocopherol. Only fructose, extracted with MeOH, showed a synergistic effect. All sugar samples, extracted with MeOH/MtBE (50/50, v/v) had no interaction effects when mixed with  $\alpha$ -tocopherol or lycopene.

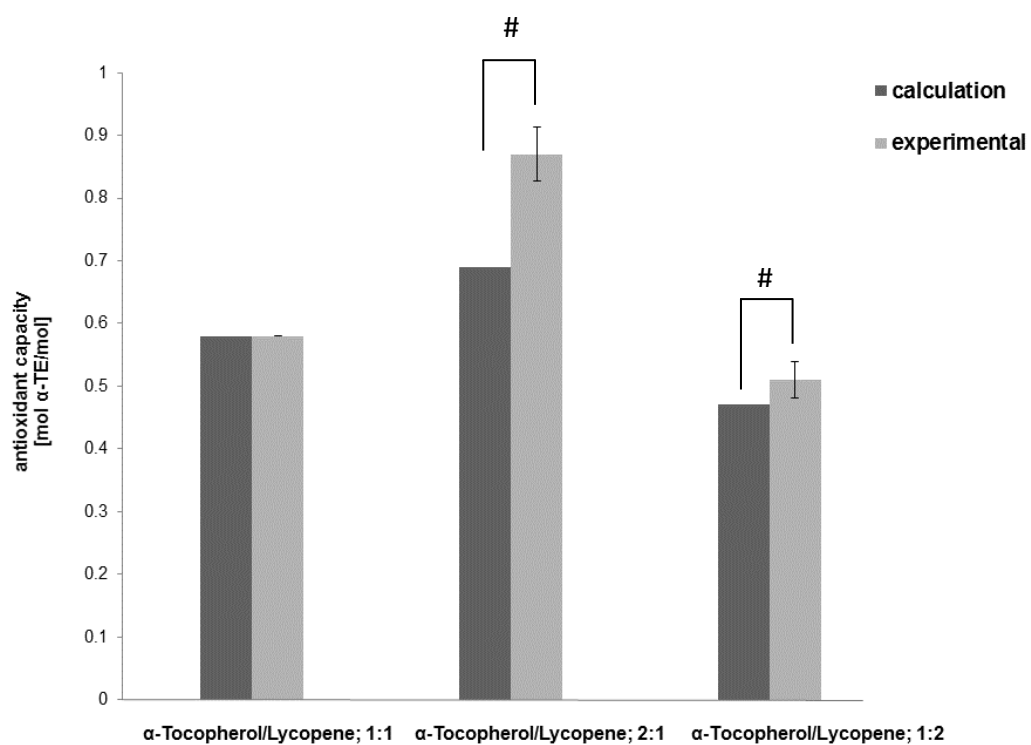
In the PCL assay as well as in the  $\alpha$ -TEAC assay, a concentration-dependent effect was observed. The antioxidant activity/capacity results were dependent on the sample concentrations/dilutions used.

## References

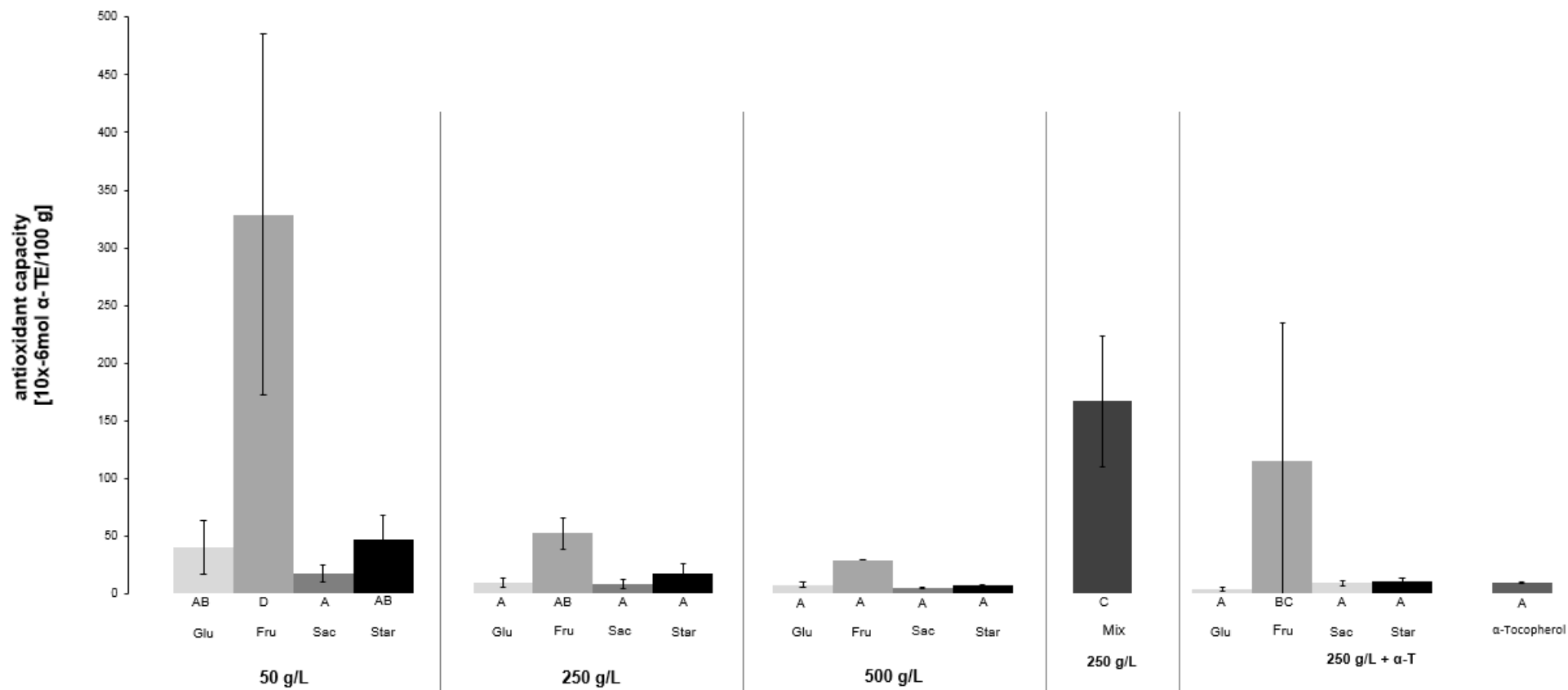
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H.-P., & Bast, A. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(5), 1184-1187.
- Bauerfeind, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., & Böhm, V. (2014). Use of photochemiluminescence for the determination of antioxidant activities of carotenoids and antioxidant capacities of selected tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(30), 7452-7459.
- Becker, E. M., Nissen, L. R., & Skibsted, L. H. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, *219*(6), 561-571.
- Bouchard, A., Hofland, G. W., & Witkamp, G.-J. (2007). Properties of sugar, polyol, and polysaccharide water-ethanol solutions. *Journal of Chemical & Engineering Data*, *52*(5), 1838-1842.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(4), 221-247.
- Hengst, C., Werner, S., Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2009). Determination of the antioxidant capacity: influence of the sample concentration on the measured values. *European Food Research and Technology*, *230*(2), 249-254.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841-1856.
- Kotíková, Z., Lachman, J., Hejtmánková, A., & Hejtmánková, K. (2011). Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(8), 1703-1710.
- Liu, D., Shi, J., Colina Ibarra, A., Kakuda, Y., & Jun Xue, S. (2008). The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(7), 1344-1349.
- Magalhães, L., Santos, F., Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, *83*(2), 441-447.
- Magalhães, L., Segundo, M., Reis, & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, *613*(1), 1-19.
- Montañés, F., Olano, A., Ibáñez, E., & Fornari, T. (2007). Modeling solubilities of sugars in alcohols based on original experimental data. *AIChE Journal*, *53*(9), 2411-2418.

- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, *129*(1), 139-148.
- Nogala-Kałużka, M., Dwiecki, K., Siger, A., Górnaś, P., Polewski, K., & Ciosek, S. (2013). Antioxidant synergism and antagonism between tocotrienols, quercetin and rutin in model system. *Acta Alimentaria*, *42*(3), 360-370.
- Palozza, P., & Krinsky, N. I. (1992).  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *297*(1), 184-187.
- Peyrat-Maillard, M., Cuvelier, M., & Berset, C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*(10), 1007-1012.
- Santa Cruz Biotechnologie (29.10.2014). <http://www.scbio.de/datasheet-204311-sucrose.html>.
- Sipel, A., Kevers, C., Pincemail, J., Grygiel, P.-G., Defraigne, J.-O., & Dommes, J. (2013). Sample dilution influences the determination of antioxidant capacity in food: How to minimize it? *Food Analytical Methods*, *6*(5), 1485-1491.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kubáň, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, *71*(4), 1741-1751.
- Westphal, A., Bauerfeind, J., Rohrer, C., Ernawita, & Böhm, V. (2014). Analytical characterisation of the seeds of two tomato varieties as a basis for recycling of waste materials in the food industry. *European Food Research and Technology*, 1-8.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(12), 4026-4037.
- Zanfini, A., Corbini, G., La Rosa, C., & Dreassi, E. (2010). Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(1), 67-72.

## FIGURE GRAPHICS

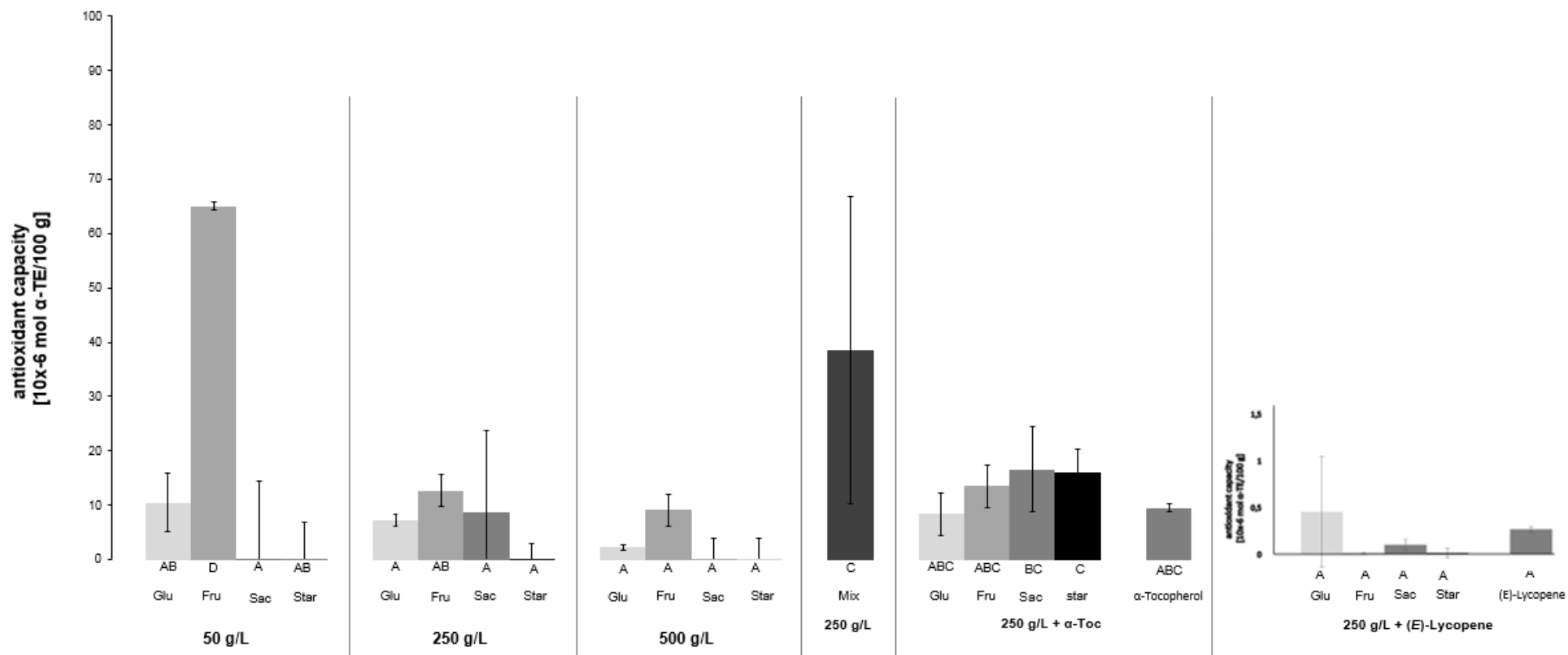


**Figure 1.** Interactions shown for the example of  $\alpha$ -tocopherol and lycopene in the PCL assay. # Differences between calculation antioxidant capacity and experimental antioxidant capacity statistically significant (independent T-test,  $p < 0.05$ )



**Figure 2.** Average antioxidant capacity (PCL assay) of glucose, fructose, saccharose and starch in different concentrations and dilution factors (df 1, df 2) as well as mix extract and sugar with  $\alpha$ -tocopherol extracts. Extraction solvent was MeOH. Bars with different letters differ significantly (ANOVA,  $n = 3$ , post hoc S-N-K,  $p < 0.05$ ). Fru = fructose, Glu = glucose, Mix = mixture, Sac = saccharose, Star = starch,  $\alpha$ -T =  $\alpha$ -tocopherol





**Figure 3.** Average antioxidant capacity (PCL assay) of glucose, fructose, saccharose and starch in different concentrations and dilution factors (df 1, df 2) as well as mix extract and sugar with  $\alpha$ -tocopherol extract and sugar with (E)-lycopene extracts. Extraction solvent was MeOH/MtBE (50/50, v/v). Bars with different letters differ significantly (ANOVA,  $n = 3$ , post hoc S–N–K,  $p < 0.05$ ). Fru = fructose, Glu = glucose, Mix = mixture, Sac = saccharose, Star = starch.

## TABLES

**Table 1.** Results of synergism, antagonism or additive effect of the investigated substances in different combinations by PCL and  $\alpha$ -TEAC. All results presented are calculated by taking the dilution factors and means of three independent analyses. Significant interactions are analysed by independent T-test ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ) IE= EAC/TAC.

## PCL

	Lycopene		$\beta$ -Carotene		Lutein	
	ratio	IE (p)	ratio	IE (p)	ratio	IE (p)
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	1:1	1.00 (0.964)	1:1	1.16 ( <b>0.023</b> )	1:1	0.53 ( <b>0.001</b> )
	1:2	1.09 ( <b>0.000</b> )	1:2	1.14 (0.333)	1:2	0.49 (0.075)
	2:1	1.26 ( <b>0.000</b> )	2:1	1.11 ( <b>0.001</b> )	2:1	0.62 ( <b>0.000</b> )
<b>Lycopene</b>	-	-	1:1	1.28 ( <b>0.016</b> )	1:1	0.68 ( <b>0.000</b> )
	-	-	1:2	1.50 ( <b>0.028</b> )	1:2	0.65 ( <b>0.001</b> )
	-	-	2:1	1.14 ( <b>0.019</b> )	2:1	0.52 ( <b>0.000</b> )
<b><math>\beta</math>-Carotene</b>	-	-	-	-	1:1	1.41 ( <b>0.000</b> )
	-	-	-	-	1:2	1.29 ( <b>0.029</b> )
	-	-	-	-	2:1	1.69 ( <b>0.000</b> )

 $\alpha$ -TEAC

	Lycopene		$\beta$ -Carotene		Lutein	
	ratio	IE (p)	ratio	IE (p)	ratio	IE (p)
<b><math>\alpha</math>-Tocopherol</b>	1:1	0.49 ( <b>0.000</b> )	1:1	0.31 ( <b>0.000</b> )	1:1	0.57 ( <b>0.000</b> )
	1:2	0.31( <b>0.000</b> )	1:2	0.21 ( <b>0.000</b> )	1:2	0.34 ( <b>0.000</b> )
	2:1	0.43 ( <b>0.000</b> )	2:1	0.39 ( <b>0.000</b> )	2:1	0.57 ( <b>0.000</b> )
<b>Lycopene</b>	-	-	1:1	0.29 ( <b>0.000</b> )	1:1	0.24 ( <b>0.000</b> )
	-	-	1:2	0.22 ( <b>0.000</b> )	1:2	0.19 ( <b>0.000</b> )
	-	-	2:1	0.16 ( <b>0.000</b> )	2:1	0.16 ( <b>0.000</b> )
<b><math>\beta</math>-Carotene</b>	-	-	-	-	1:1	0.12 ( <b>0.000</b> )
	-	-	-	-	1:2	0.11 ( <b>0.000</b> )
	-	-	-	-	2:1	0.08 ( <b>0.000</b> )

**Table 2.** Antioxidant capacity (mol  $\alpha$ -TE/mol) of different concentrations (df 1, df 2) of  $\alpha$ -tocopherol/ lycopene in different molar ration (1:1, 1:2, 2:1) by using  $\alpha$ -TEAC. # Significant differences between the df 1 and df 2 determined by ANOVA with, independent T-test ( $p < 0.05$ ).

df 1 = dilutions factor 1, df 2 = dilutions factor 2

<b><math>\alpha</math>-Tocopherol/ Lycopene</b>		<b>AOC (<math>\alpha</math>-TEAC) mol <math>\alpha</math>-TE/mol</b>	<b>Average AOC (<math>\alpha</math>-TEAC) mol <math>\alpha</math>-TE/mol</b>
<b>1:1</b>	df 1	0.89 $\pm$ 0.05	1.2 $\pm$ 0.4
	df 2	1.50 $\pm$ 0.09 $\square$ #	
<b>2:1</b>	df 1	0.70 $\pm$ 0.03	0.9 $\pm$ 0.2
	df 2	1.00 $\pm$ 0.02 $\square$ #	
<b>1:2</b>	df 1	0.64 $\pm$ 0.03	0.9 $\pm$ 0.4
	df 2	1.12 $\pm$ 0.02 $\square$ #	

## 4 Diskussion

Im Jahr 2013 waren in Deutschland laut Statistischem Bundesamt Herz-Kreislauf-Erkrankungen (40 %) die häufigste Todesursache, gefolgt von Krebs-Erkrankungen (25 %) (Statistisches Bundesamt, 2013). Kardiovaskuläre, neurodegenerative und Krebs-Erkrankungen werden mit der vermehrten Bildung von ROS und somit mit oxidativem Stress assoziiert (Sosa et al., 2013). Antioxidantien in Nahrungsmitteln, Gewürzen, Kräutern und Supplementen spielen im Hinblick auf die Erhaltung der Gesundheit und die Prävention von Krankheiten eine entscheidende Rolle, da sie den oxidativen Stress im Organismus reduzieren können (Choudhari et al., 2014). Dementsprechend sollten die Antioxidantien bezüglich ihrer AOA beurteilt werden.

Wie in der Einleitung erwähnt, sind für die Beurteilung der AOK *in-vitro*-Modelle notwendig, daher wurde bereits eine Vielzahl von *in-vitro*-Testsystemen entwickelt. Untersuchungen des gleichen Probenmaterials mit unterschiedlichen Testmethoden zeigten jedoch eine hohe Varianz in den ermittelten AOK und korrelierten nicht miteinander (Niki, 2014a). Mögliche Ursachen für die Diskrepanz könnten testspezifische Reaktionsmechanismen, pH-Wert-Bedingungen und verwendete Lösungsmittel sein. Des Weiteren sind bisher nur wenige Methoden etabliert, welche lipophile Antioxidantien in ihrer Wirkung analysieren. Bisher existiert keine absolute Methode, mit der die AOK quantitativ erfasst werden kann. Dennoch geben die erhaltenen AOK der herkömmlichen Methoden eine Vorstellung über die antioxidativen Wirksamkeiten von bioaktiven Pflanzenstoffen und Lebensmitteln sowie über den antioxidativen Status im Organismus wieder (Apak et al., 2013).

Zur Quantifizierung der AOK von fettlöslichen Antioxidantien entwickelten Popov und Lewin (1996) erstmalig die Photochemolumineszenz-Methode in einer Durchflusszelle weiter. Dabei wurde Luminol als Chemolumineszenz-Reagenz verwendet. Die basische Reaktionsbedingung wurde mit Hilfe eines Carbonatpuffers realisiert. Weiterhin wurde Wasser gegen Methanol (MeOH) ausgetauscht, um die lipophilen Antioxidantien im Testsystem zu lösen (Popov et al., 1996).

Die in dieser Arbeit verwendete optimierte Photochemolumineszenz-Methode ist eine weitere HAT-basierende Testmethode zur Bestimmung von einzelnen lipophilen Antioxidantien und Gemischen von lipophilen Lebensmittelextrakten als Summenparameter. Für die Detektion von sehr unpolaren Substanzen, wie zum Beispiel  $\beta$ -Carotin und Lykopen,

wurde MeOH durch das Lösungsmittelgemisch DMSO/MeOH (60/40, v/v) ersetzt. Die Besonderheit dieser Methode ist die Messung der Chemolumineszenz-Intensität in einem Küvetten-System.

#### **4.1 Antioxidative Aktivitäten von Carotinoiden und Vitamin E und ihre Struktur-Wirkungsbeziehungen**

Vitamin E ist der wichtigste lipophile Radikalfänger in Membranlipiden *in vivo* und gelangt wie auch Carotinoide über die Nahrungsaufnahme in den menschlichen Organismus. Um einen Hinweis auf die Radikal-schützende Wirkung zu erhalten, wurden acht Vitamin-E-Isomere sowie sechs Carotine und elf Xanthophylle auf ihre lipophile AOK mittels optimierter PCL untersucht. Die Ergebnisse für die o. g. Substanzen sowie der Vergleich zwischen der PCL-AOA und den Literaturwerten befinden sich in Manuskript I (Seiten 25 - 32) und Manuskript II (Seiten 33 - 40).

Die AOA der Carotinoide, Tocopherole und Tocotrienole wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen (25, 50, 75  $\mu\text{mol/l}$ ) in Dreifachbestimmung an verschiedenen Tagen bestimmt. Die AOA der jeweiligen einzelnen Konzentrationen der Analysesubstanzen konnte jeden Tag reproduziert werden. Erst bei Betrachtung des Gesamtmittelwertes der o. g. Einzelkonzentrationen über einen Messverlauf von drei Tagen konnte zeigen, dass ausschließlich die AOA von 75  $\mu\text{mol/l}$  reproduziert werden konnte. Je kleiner die Konzentration war, desto größer war die Streuung der Reproduzierbarkeit über die verschiedenen Tage. Des Weiteren konnte der Trend beobachtet werden, dass je kleiner die Antioxidantien-Konzentration war, desto größer war die AOA. Diese konzentrationsabhängige lipophile AOA ist mit der bisherigen Datenlage kaum vergleichbar. Die Autoren, welche die AOA von reinen Carotinoid- und Vitamin-E-Standards untersuchten, verwendeten nur eine Konzentration. Müller et al. (2010, 2011) untersuchten die AOA von Carotinoiden und Vitamin-E-Isomeren mittels FRAP-,  $\alpha$ -TEAC-, DPPH-, LPCS- sowie ORAC-Test (nur Vitamin E) und setzten eine Probenkonzentration von 25  $\mu\text{mol/l}$  ein (Müller et al., 2011; Müller et al., 2010). Die unterschiedlichen Konzentrationen in den Testsystemen könnten ausschlaggebend für die kleineren AOA-Ergebnisse der Carotinoide und Vitamin-E-Isomere in der PCL sein. Im et al. (2014) untersuchten die antioxidative Wirksamkeit von Tocopherolen in unterschiedlichen Konzentrationen im TEAC-Test (Im et al., 2014).  $\gamma$ -Tocopherol zeigte die

höchste AOA gefolgt von  $\delta$ -Tocopherol sowie  $\alpha$ -Tocopherol und  $\beta$ -Tocopherol. Unterschiede bezüglich der AOA-Ergebnisse der Tocopherole zwischen Im et al. (2014) und der vorliegenden Arbeit beruhen nicht nur auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen des TEAC-Testes oder der PCL-Methode, sondern auch auf der Verwendung von verschiedenen Referenzsubstanzen. Im Gegensatz zu der Studie von Im et al. (2014), in der die wasserlösliche Ascorbinsäure eingesetzt wurde und die Ergebnisse entsprechend in Ascorbinsäure-Äquivalenten ausgedrückt wurden, fand in dieser Arbeit  $\alpha$ -Tocopherol als fettlöslicher Kalibrierungsstandard Verwendung. Die eingesetzten Referenzsubstanzen sollten für die Untersuchungen von lipophilen Antioxidantien auf ihr antioxidatives Potential ähnliche lipophile Eigenschaften besitzen, um dessen Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Hinzu kommt die bereits erwähnte große AOA-Streuung der Vitamin-E- und Carotinoid-Konzentrationen in Bezug auf die Messungen an unterschiedlichen Tagen. Diese Probleme hatten zur Folge, dass die AOA-Daten nicht in zufriedenstellendem Maße reproduziert werden konnten. Die Ergebnisse liefern Aussagen über die Empfindlichkeit und den Konzentrationsbereich des PCL-Testsystems. Anhand dieser Daten kann geschlossen werden, dass der PCL-Test scheinbar für niedrige Konzentrationen nicht sensitiv genug ist und daher unbedingt ein optimierter Konzentrationsbereich für diese Methode etabliert werden muss.

Die Vitamin-E-Isomere  $\alpha$ -Tocotrienol und  $\alpha$ -Tocopherol zeigten gegenüber allen anderen gemessenen lipophilen Antioxidantien die höchsten AOA von 1,1 mol  $\alpha$ -TE/mol und 0,91 mol  $\alpha$ -TE/mol. Somit zeigte sich bei diesen beiden Vitamin-E-Formen sowie bei  $\gamma$ -Tocopherol und  $\gamma$ -Tocotrienol, dass die isoprenoide Seitenkette für die AOA von entscheidender Bedeutung ist. Einige Studien konnten jedoch nachweisen, dass die AOA unabhängig von der Vitamin-E-Seitenkette ist (Müller et al., 2010; Niki, 2014b; Yoshida et al., 2003). Niki (2014) und Müller et al. (2010) publizierten, dass die Hydroxylgruppe an der Position C6 am Chromanring für die AOA gegenüber freien Radikalen verantwortlich ist und nicht die Seitenkette der Vitamin-E-Isomere. Demzufolge sollten Tocopherole und Tocotrienole das gleiche antioxidative Potential als Radikalfänger aufweisen (Müller et al., 2010; Niki, 2014b). Laut Niki (2010) dient die lange Seitenkette ausschließlich der Einlagerung und Bindung in Membranen und Lipoproteine (Niki, 2010). Allerdings wird in der Literatur ebenso berichtet, dass  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ - Tocotrienole eine höhere antioxidative

Aktivität als ihre Tocopherol-Äquivalente besitzen (Singh et al., 2013). *In-vitro*-Untersuchungen zeigten, dass Tocotrienole sich aufgrund ihrer ungesättigten Seitenkette leichter in das Gewebe einlagern (Singh et al., 2013) und sich somit innerhalb und zwischen den Membranen schneller bewegen können (Niki, 2010). Dies kann zu einer vermehrten antioxidativen Wirksamkeit führen. Neuere Studien belegten, dass Tocopherole (drei chirale Zentren) und Tocotrienole (ein chirales Zentrum) verschiedene Konformationen in Phospholipid-Doppelschichten der Zellmembranen aufweisen und sie dementsprechend unterschiedlich durchdringen, sowie eine unterschiedliche Positionierung stattfindet (Wallert, 2014). Jedoch diffundieren die Vitamin-E-Isomere scheinbar unabhängig von ihrem Methylierungsmuster oder der Sättigung der Isoprenoid-Seitenkette in den Membranen, so dass die höhere antioxidative Aktivität der Tocotrienole vergleichend mit den Tocopherolen nicht auf ihrer höheren Mobilität basiert (Wallert, 2014). Die Abhängigkeit der AOA von der Vitamin-E-Seitenkette konnten Müller et al. (2010) im Peroxylradikal-abfangenden ORAC-Test im Gegensatz zu den ET-basierenden FRAP-, DPPH- und  $\alpha$ -TEAC-Testsystemen feststellen. Im ORAC-Test könnte die Einlagerung in Cyclodextrine, welche als Lösungsvermittler zwischen lipophilen Antioxidantien und wässrigen Medium eingesetzt wird, von der Seitenkette der Vitamin-E-Formen abhängig sein (Müller, 2011). Da aber auch im LPSC-Test eine Unabhängigkeit von der Seitenkette gezeigt werden konnte, kann der Einfluss der Seitenkette auf die AOA nicht anhand von ET- und HAT-basierenden Reaktionsmechanismen begründet werden. Auch die isoprenoide Seitenkette von Ubichinol, eine reduzierte Form des Coenzym Q, hatte keinen Einfluss auf das radikalabfangende Potential in homogenen Lösungen (Niki, 2010). Die Bedeutung der Seitenkette von Vitamin-E-Formen wird somit kontrovers diskutiert.

Auffallend ist die Abnahme der AOA von  $\alpha$ - zu  $\delta$ -Tocopherol sowie von  $\alpha$ - zu  $\delta$ -Tocotrienol mit der geringeren Anzahl der Methylgruppen am Chromanring. Methylierungsgrad und Position der Methylgruppen am Chromanring sind für die AOA von Vitamin E mittels PCL von Bedeutung (Manuskript II). Die relative Reaktionsfähigkeit von Tocopherolen gegenüber Sauerstoffradikalen nimmt ebenso von  $\alpha$ - zu  $\delta$ -Tocopherol ab (Niki, 2014b). Schneider et al. (2005) stellten ebenfalls fest, dass die *in-vitro*-AOA von den Methylgruppen am aromatischen Ring abhängig ist.  $\alpha$ -Tocopherol ist am wirkungsvollsten aufgrund der drei Methylgruppen am Chromanring in Positionen C5, C7 und C8 (Schneider, 2005). Die Anwesenheit von Elektronen-abgebenden Methylgruppen in *ortho*- und *para*- Stellung zu

der am C6 befindlichen Hydroxylgruppe erhöht die Elektronendichte am Chromanolring. Dieser +I-Effekt erleichtert die homolytische Spaltung der O-H-Bindung und erhöht gleichzeitig die Stabilität des resonanzstabilisierten Phenoxyradikals (Kamal-Eldin et al., 1996). Diese erhöhte Elektronendichte erleichtert die Reaktionen in ET-basierenden Testsystemen, aber gleichzeitig wird die Reaktion in HAT-basierenden Assays (PCL) erschwert, wie auch Müller et al. (2010, 2011) im ORAC-Test feststellen konnten (Müller, 2011; Müller et al., 2010). Dadurch wird verdeutlicht, dass durch eine Gruppierung der Testsysteme in ET- und HAT-basierende Reaktionen die Testsysteme nicht eindeutig definiert und eingeteilt werden können.

Weiterhin steht die AOA der Tocopherole im direkten Zusammenhang mit dem Redoxpotential und der biologischen Aktivität. Je kleiner das Redoxpotential (gemessen gegen die Standard-Wasserstoff-Elektrode) ist, desto größer war die AOA.  $\alpha$ -Tocopherol, welches das kleinste Redoxpotential mit +273 mVolt besitzt, kann in homogenen Lösungen  $\beta$ -,  $\delta$ - und  $\gamma$ -Tocopherol-Radikale wieder regenerieren (Kamal-Eldin et al., 1996).  $\alpha$ -Tocopherol wirkt im Vergleich zu den anderen Tocopherolen eher reduzierend und gibt Elektronen leichter ab, welches sich als höchste AOA in der Tocopherolgruppe widerspiegelt. Rice-Evans et al. (1997) zeigten, dass Flavonoide mit einem geringen Reduktionspotential ebenfalls sehr gute Radikalfänger sind. Die Ursache hierfür ist, dass sowohl die elektrochemische Oxidation als auch die Wasserstoff-spendenden Radikalfänger bei der Spaltung der Phenolbindung zwischen Sauerstoff und Wasserstoff Phenoxy- und Wasserstoffradikale produzieren (Rice-Evans et al., 1997). Der Zusammenhang zwischen der AOA und dem Redoxpotential der Vitamin-E-Isomere könnte auf eine ET-Reaktion in der PCL-Methode hindeuten. Die PCL-Methode beruht jedoch auf einer HAT-basierenden Reaktion (Balogh et al., 2010; Prior et al., 2005). Weiterhin wird angenommen, dass Luminol mit Peroxylradikalen und Superoxid-anionen in Abhängigkeit vom Antioxidans auch Addukte bilden kann (Chen et al., 1991; García-Campaña et al., 2000; Müller, 2011).

$\alpha$ -Tocopherol zeigte die höchste AOA und wies die höchste biologische Aktivität im Ratten-Resorption-Gestations-Test auf (Kamal-Eldin et al., 1996; Leth et al., 1977).  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol besaßen nicht nur geringere biologische Aktivitäten sondern auch schwächere antioxidative Eigenschaften, welches mit der geringeren Fettlöslichkeit im Vergleich zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tocopherol einhergehen kann (Kamal-Eldin et al., 1996).



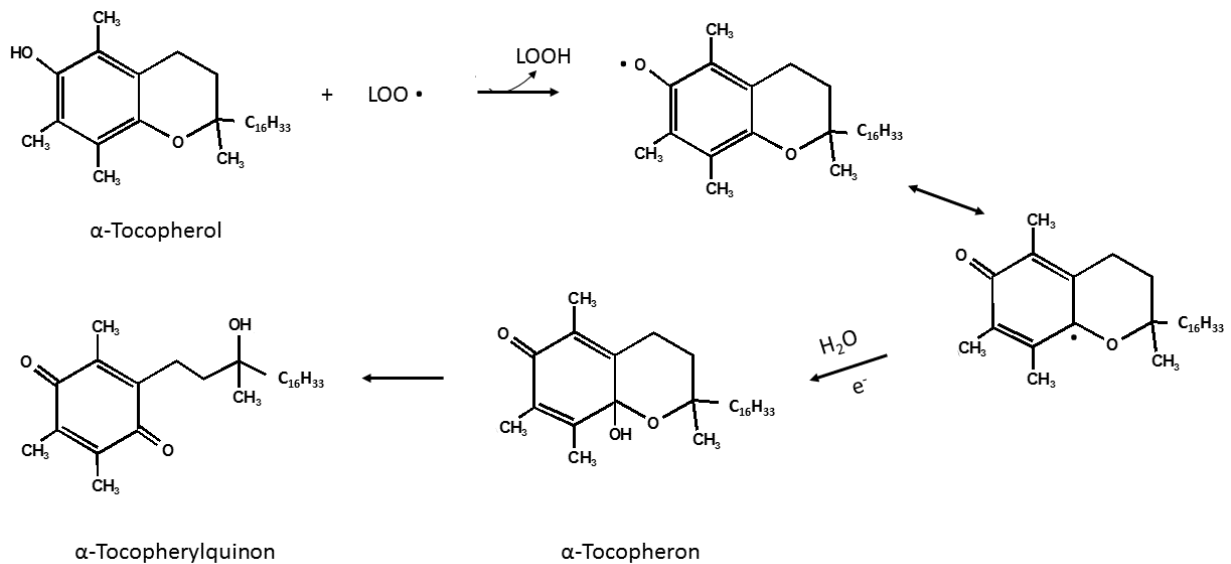


Abbildung 4: Die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol als Radikalfänger, modifiziert nach Pfluger, 2007.

e<sup>-</sup> = Elektron; H<sub>2</sub>O = Wasser; LOO<sup>•</sup> = Lipidradikal

Obwohl in der Literatur beschrieben wurde, dass  $\alpha$ -Tocotrienol eine geringere biologische Aktivität als  $\alpha$ -Tocopherol hat, gehen Forscher davon aus, dass  $\alpha$ -Tocotrienol ein besseres Antioxidans ist (Kamal-Eldin et al., 1996). Zum einen konnten keine Peroxylradikal-abfangenden Unterschiede mittels einer Fluoreszenzmethode zwischen  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocotrienol in Hexan festgestellt werden. Zum anderen zeigte  $\alpha$ -Tocotrienol in Liposomen eine 1,5-fach höhere AOA mittels AMVN-induziertem Luminol-Chemolumineszenz-Test (Serbinova et al., 1992). Zusätzlich zeigte  $\alpha$ -Tocotrienol in *in-vitro*-Testsystemen eine höhere AOA in Mikrosomen der Rattenleber gegen Fe<sup>2+</sup>-Ascorbat- und Fe<sup>2+</sup>-NADPH-induzierte Lipidperoxidation und einen besseren Schutz gegen die oxidative Zerstörung von Cytochrom P450 als  $\alpha$ -Tocopherol (Kamal-Eldin et al., 1996). Diese Vermutung kann durch die AOA-Ergebnisse der Tocopherole und Tocotrienole mittels PCL bestätigt werden, da  $\alpha$ -Tocotrienol eine signifikant höhere antioxidative Wirksamkeit als  $\alpha$ -Tocopherol zeigte (Manuskript II). Diese Unterschiede sind in der Struktur beider Tocochromanole begründet. Das  $\alpha$ -Tocotrienoxyl-Radikal kann in Membranen und Lipoproteinen schneller regeneriert werden als das entsprechende  $\alpha$ -Tocopheroxyl-Radikal (Packer et al., 2001).

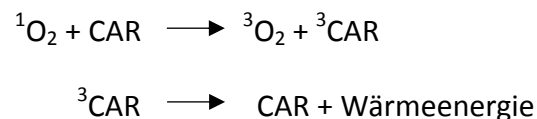
Lykopen wird in der Literatur als der antioxidativ wirksamste und effektivste Singulett-Sauerstoff-Quencher der nahrungsrelevanten Carotinoide beschrieben (Liu et al., 2015). Bisher konnte diese AOA gegenüber anderen Carotinoiden ausschließlich im lipophilen  $\alpha$ -TEAC-Test nachgewiesen werden (Miller et al., 1996; Müller et al., 2011). Im PCL-Test

dieser Arbeit sowie im FRAP- und ORAC-Test von Müller et al. (2011) konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Müller et al., 2011). Liu et al. zeigten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2008, dass mit steigender Lycopin-Konzentration die AOA im DPPH-Test sank (Liu et al., 2008). Die kleinste Konzentration an Lycopin mit 5,2 µmol/l wies eine höhere AOA als β-Carotin auf. Diese Ergebnisse verdeutlichen auch hier den Einfluss der eingesetzten Konzentration zur Bestimmung der AOA von Antioxidantien und erschwerten die Vergleichbarkeit der Daten innerhalb eines Messsystems sowie mit anderen Methoden.

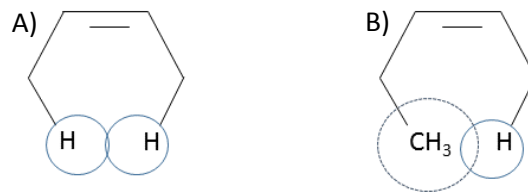
Die im PCL-Test höchste AOA erreichte Neurosporen, ein Carotin, gefolgt von Astaxanthin und Antheraxanthin; beides Xanthophylle. Daher kann nicht endgültig gesagt werden, ob Carotin- oder Xanthophyll-Carotinoide effektiver in ihrer AOA sind (Manuskript I).

Die AOA der Carotine im PCL-Test stieg mit Anzahl der konjugierten Doppelbindungen (CDB) in der Polyenkette mit Ausnahme von Lycopin, so dass sich folgende Reihenfolge ergibt: Phytoen < Phytofluen < Neurosporen (Manuskript I).

Beim Quenchen von Singulett-Sauerstoff können die Carotinoide durch das CDB-System die Energie über Elektronenaustausch transferieren. Dadurch liegt das Carotinoid im angeregten Triplett-Zustand vor, welches durch Abgabe von thermischer Energie wieder in den Grundzustand übergeht (Krinsky et al., 2005; Watzl et al., 2001):



Die Effektivität des Sauerstoff-Abfanges stieg mit Anzahl der CDB im Molekül (Conn et al., 1991; Edge et al., 1997; Tapiero et al., 2004). Lycopin konnte allerdings nicht als effektivster Sauerstoff-Quencher identifiziert werden. Zum einen könnte das sehr unpolare Lycopin sich nicht vollständig in dem Lösungsmittelgemisch DMSO/MeOH (60/40, v/v) des PCL-Testsystems gelöst haben und somit nicht zu 100 % gemessen werden. Zum anderen könnte die Stereoisomerie des Lycopins einen Einfluss auf die AOK ausüben. Lycopin ist anfällig für chemische Änderungen, bedingt durch das Vorhandensein der langkettigen, konjugierten C-C-Doppelbindungen. Beispielsweise kann durch Licht und Hitze die Bildung von (Z)-Isomeren von Lycopin begünstigt werden (Lee et al., 2002). (Z)-Doppelbindungen führen zu Wechselwirkungen und sterischen Hinderungen zwischen benachbarten Wasserstoffatomen und Methylgruppen (Britton, 1995; Fröhlich, 2007), welche die AOA beeinflussen können.



**Abbildung 5: Sterisch ungehinderte A) und sterisch gehinderte B) *cis*-Doppelbindungen in der Polyketten-Struktur, Britton, 1995.**

Die AOA von (5Z)-, (9Z)- und (13Z)-Lykopen wiesen im FRAP- und im  $\alpha$ -TEAC-Test keine unterschiedlichen Ergebnisse zum (*all-E*)-Lykopen auf. Aber im LPSC-Test zeigten alle drei (Z)-Isomere höhere AOA als (*all-E*)-Lykopen und (5Z)-Lykopen verfügte sogar im  $\text{MbFe}^{\text{III}}$ -Test über eine geringere AOA (Müller et al., 2011). Die AOA-Ergebnisse der verschiedenen Lykopen-Isomere waren somit abhängig vom verwendeten Testsystem. Daher ist nicht auszuschließen, dass Lykopen vor und während der Messung isomerisierte und dadurch eine geringere AOA bestimmt wurde als zu erwarten war.

$\alpha$ -Carotin und  $\beta$ -Carotin wiesen keine signifikanten Unterschiede in ihrer AOA im PCL-Küvetten-System auf. Beide Strukturen besitzen zwei  $\beta$ -Iononringe. Zum Vergleich mit Neurosporen, Phytofluoren und Phytoen, welche aus einer langen C-Kette mit CDB bestehen, zeigten die Molekülringe von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin einen negativen Effekt auf die AOA und erschwerten die PCL-Reaktion.

Die Struktur-Wirkungsbeziehung von sauerstoffhaltigen Xanthophyllen zeigte, dass die  $\beta$ -Iononringe mit verschiedenen Substituenten am Ende der Kohlenstoff-Kette von Bedeutung sind. Die höchste AOA innerhalb der Xanthophyllgruppe war für Astaxanthin zu finden. Astaxanthin besitzt jeweils eine Carbonylgruppe am Ring, die einen elektronenziehenden Effekt auf das benachbarte C-Atom ausübt. Zusätzlich befindet sich in *ortho*-Stellung zu der Carbonylgruppe an beiden Iononringen eine funktionelle Hydroxylgruppe, die ebenfalls durch die Verringerung der Elektronendichte einen  $-I$ -Effekt auslöst und die antioxidative Wirkung verbessern kann. Die Hydroxylierung des  $\beta$ -Iononrings wie beispielsweise bei Antheraxanthin, Lutein und Zeaxanthin hat ebenso einen positiven Effekt auf die AOA. Shakir et al. (2014) untersuchten synthetische phenolische Verbindungen auf ihre AOA mittels DPPH- und FRAP-Test. Dabei konnte ebenfalls ein Einfluss von induktiven und mesomeren Effekten beobachtet werden. Des Weiteren war der  $+M$ -Effekt

der Hydroxylgruppe in *para*-Position entscheidender als der –I-Effekt für die AOA. Die Anwesenheit von OH-Gruppen steigerte die antioxidative Fähigkeit (Shakir et al., 2014). Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den AOA-Ergebnissen von Canthaxanthin und Echinenon wieder, welche um 54 - 68 % geringere AOA-Werte als Astaxanthin zeigten. Beide Strukturen besitzen in ihren Iononringen zwei Carbonylgruppen, aber keine zusätzlichen Hydroxylgruppen. Die Position der Substituenten (z. B. OH-Gruppen) beeinflusst die antioxidative Fähigkeit wie es bei Antheraxanthin, Lutein, Capsanthin und Zeaxantin der Fall war. Violaxanthin zeigte im PCL-Test keine AOA und besitzt im Vergleich zu den anderen untersuchten Xanthophyllen nur neun konjugierte Doppelbindungen (kleinstes CDB-System), aber jeweils eine Hydroxyl- und Epoxidgruppe an beiden Ringen. Somit wird deutlich, dass die AOA der Xanthophylle sowohl von der Anzahl der CDB abhängig ist als auch von der Anzahl und Position der Substituenten.

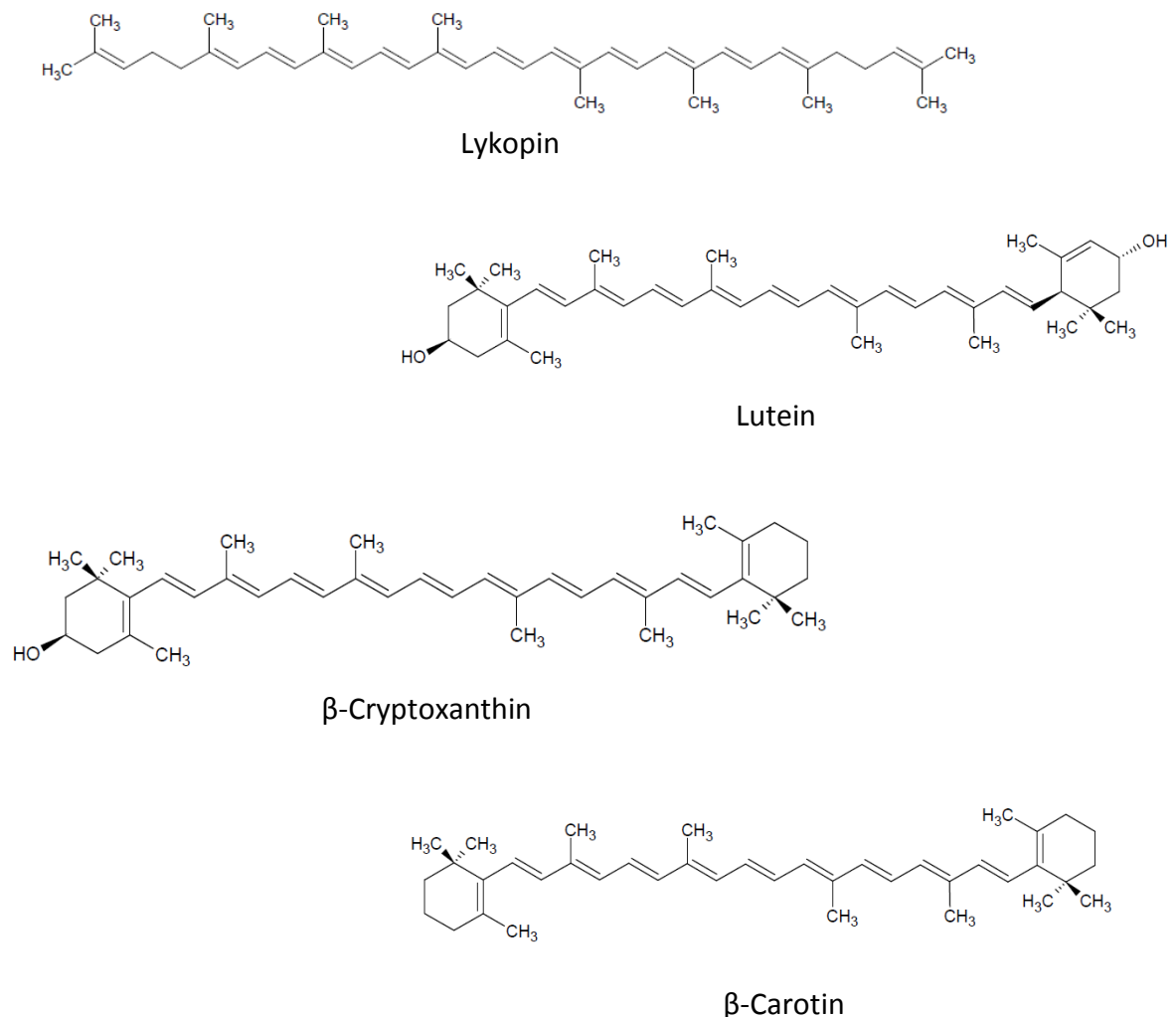


Abbildung 6: Chemische Strukturen von ausgewählten Carotinoiden.

Des Weiteren besteht ein schwacher Zusammenhang zwischen der AOA von Carotinoiden und ihren Redoxpotentialen, welcher auf einen ET-basierenden Reaktionsmechanismus der Carotinoide in der PCL-Methode vermuten lässt. Jedoch beruht der PCL-Test auf einem HAT-Mechanismus. Carotinoide können auf unterschiedliche Weise mit freien Radikalen reagieren und so als Antioxidantien wirken (El-Agamey et al., 2008):

- 1) Elektronen-Transfer:  $\text{CAR} + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{CAR}\cdot^+ + \text{R}^-$
- 2) Wasserstoffatom-Transfer:  $\text{CAR} + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{CAR}\cdot + \text{RH}$
- 3) Addukt:  $\text{CAR} + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{R-CAR}\cdot$

Die entstandenen Carotinoid-Radikale werden über CDB resonanzstabilisiert, indem ungepaarte Elektronen entlang der Polyenkette delokalisiert werden. Dabei können weitere Folgereaktionen stattfinden (Britton, 1995). Die AOA der Carotine ist entsprechend von der Anzahl der CDB abhängig, was die PCL-Ergebnisse untermauern konnten. Die Substituenten und ihre Positionen verstärken die AOA der Xanthophylle.

Im ORAC-Test konnte dagegen keine AOA von Carotinoiden gemessen werden (Müller et al., 2011; Ou et al., 2001). Chemisch gesehen sind Carotinoide keine Kettenabbruch-Antioxidantien wie Vitamin E sondern Singulett-Sauerstoff-Quencher, die durch Energietransfer den Singulett-Sauerstoff inaktivieren (Ou et al., 2001). Die Reaktion zwischen Vitamin E und Peroxylradikalen im ORAC-Test erfolgt nach dem HAT-Mechanismus. Dies spiegelt auch die Eigenschaften des Vitamin E als Kettenabbruch-Antioxidans wieder. Carotinoide nutzen unterschiedliche Reaktionsmechanismen. Beispielsweise wird angenommen, dass  $\beta$ -Carotin Peroxylradikale in einer Additionsreaktion abfängt und nicht über einen HAT-Mechanismus. Auf der anderen Seite wird aber ebenso über ET- und HAT-Reaktionen diskutiert (El-Agamey et al., 2004). Die Reaktionsmechanismen der Carotinoide sind vom reagierenden Radikal und seiner Reaktivität abhängig sowie von der Carotinoid-Struktur.

Alle Methoden zur Bestimmung der AOA basieren auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen und reflektieren nicht die gesamte AOA, sondern erfassen nur die Eigenschaften eines Antioxidans in einem bestimmten Testsystem (Prior et al., 2005). Einige Autoren (Apak et al., 2013; Hengst et al., 2009; López-Alarcón et al., 2013) empfehlen daher eine Standardisierung einzuführen, da in keinem Test die Antioxidantien quantitativ genau

erfasst werden können und sämtliche Reaktionen eines Antioxidans berücksichtigt werden sollten. Aus diesem Grund schlugen Tabart et al. (2009) einen gewichteten Mittelwert zur Standardisierung von phenolischen Verbindungen vor (Tabart et al., 2009), welcher von Müller et al. für die Carotinoide und Vitamin E aufgegriffen wurde (Müller, 2011; Müller et al., 2011). Die gewichteten Mittelwerte für Carotinoide und Vitamin E werden mit den Daten aus dieser Arbeit fortgeführt. Für die Berechnung des gewichteten Mittelwertes jedes einzelnen lipophilen Antioxidans werden die ermittelten AOA-Werte des FRAP-,  $\alpha$ -TEAC-, DPPH-, LPSC- und PCL-Testes einbezogen. In der folgenden Gleichung ist das Prinzip der Berechnung für Lutein dargestellt (Formel 1). In Tabelle 2 sind die gewichteten Mittelwerte zusammengefasst.

$$\text{gewichteter Mittelwert für Lutein} = \frac{\frac{\text{PCL}_{\text{Lutein}}}{\sum(\text{PCL})_{\text{alle}}} + \frac{\alpha\text{TEAC}_{\text{Lutein}}}{\sum(\alpha\text{TEAC})_{\text{alle}}} + \frac{\text{FRAP}_{\text{Lutein}}}{\sum(\text{FRAP})_{\text{alle}}} + \frac{\text{DPPH}_{\text{Lutein}}}{\sum(\text{DPPH})_{\text{alle}}} + \frac{\text{LPSC}_{\text{Lutein}}}{\sum(\text{LPSC})_{\text{alle}}}}{\text{Anzahl der Methoden (n=5)}}$$

**Formel 1: Berechnung des gewichteten Mittelwertes am Beispiel von Lutein.**

Die AOA-Ergebnisse von Carotinoiden im ORAC-Test konnten nicht reproduziert werden. Daher konnten keine endgültigen ORAC-Werte für die einzelnen Carotinoide bestimmt werden (Müller, 2011). Aus diesem Grund wurde der ORAC-Test nicht in den gewichteten Mittelwerten für die Carotinoide berücksichtigt. In Bezug auf die anderen fünf Testmethoden zeigten Antheraxanthin und Rubixanthin (Xanthophylle) innerhalb der Carotinoidgruppe die höchsten AOA, gefolgt von Lykopen und Capsanthin. Lykopen hat mit Abstand das wirksamste antioxidative Potential in der Carotingruppe. Des Weiteren wies Lykopen gegenüber Neurosporen 36 % mehr AOA auf, obwohl Neurosporen im PCL-Test eine 3-fach höhere AOA als Lykopen hatte. Auffallend ist, dass alle Carotinoide nicht im ET-basierenden DPPH-Test reagierten. Hier wird vermutet, dass die Stereoisomerie der Carotinoide die Reaktion mit DPPH $\cdot$  verhindern (Müller, 2011).

Innerhalb der Vitamin-E-Isomere belegten die gewichteten Mittelwerte, dass die Tocotrienole eine um etwa 15 - 20 % höhere AOA als die Tocopherole aufzeigten, begründet in den höheren ORAC-Werten der Tocotrienole. Aus diesem Grund kann der Mittelwertvergleich von nur einem Testergebnis eine deutliche Überbewertung verursachen. Des Weiteren wird auch hier deutlich, dass die AOA der Vitamin-E-Isomere von der Anzahl und Stellung der Methylgruppen am Chromanring abhängig ist, sowie von der Sättigung der Isoprenoid-Seitenkette.

Tabelle 2: Gewichtete Mittelwerte der antioxidativen Aktivitäten von Carotinoiden und Vitamin E.

	PCL	FRAP	$\alpha$ -TEAC	DPPH	LPSC	ORAC	gewichteter Mittelwert mol $\alpha$ -TE/mol
	mol $\alpha$ -TE/mol						
<b>Carotinoid</b>							
<i>Carotine</i>							
$\alpha$ -Carotin	0,30	0	3,3	0	19,0	-	0,7
$\beta$ -Carotin	0,25	0	3,1	0	19,1	-	0,7
Lykopin	0,25	2,1	3,9	0	13,3	-	1,1
Neurosporen	0,76	0	2,1	0	0	-	0,7
Phytoen	0,21	0,1	1,0	0	0,1	-	0,3
Phytofluen	0,29	0	1,0	0	0,1	-	0,3
<i>Xanthophylle</i>							
Antheraxanthin	0,56	1,8	2,0	0	24,7	-	1,2
Canthaxanthin	0,27	0,3	0,8	0	21,0	-	0,5
Capsanthin	0,36	2,1	2,0	0	25,3	-	1,1
$\beta$ -Cryptoxanthin	0,22	2,1	3,2	0	19,3	-	1,0
Echinenon	0,19	0,3	2,2	0	26,3	-	0,7
Lutein	0,38	2,1	2,0	0	19,6	-	1,0
Neoxanthin	0,14	1,3	1,1	0	20,6	-	0,7
Rubixanthin	0,28	3,3	3,3	0	8,9	-	1,2
Violaxanthin	-0,02	1,5	1,6	0	22,5	-	0,7
Zeaxanthin	0,34	2,0	1,9	0	20,3	-	1,0
Bixin	0,07	1,7	1,3	0	29,1	-	0,8
<b>Vitamin E</b>							
<i>Tocopherole</i>							
$\alpha$ -Tocopherol	0,91	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1
$\beta$ -Tocopherol	0,60	0,7	0,9	0,9	1,5	1,5	1,0
$\gamma$ -Tocopherol	0,19	0,7	0,9	0,9	1,3	1,5	0,8
$\delta$ -Tocopherol	0,00	0,6	0,9	0,7	1,5	3,0	0,8
<i>Tocotrienole</i>							
$\alpha$ -Tocotrienol	1,20	1,1	1,0	1,1	1,2	2,0	1,3
$\beta$ -Tocotrienol	0,56	0,8	0,9	0,9	1,5	3,0	1,1
$\gamma$ -Tocotrienol	0,34	0,8	0,9	0,9	1,3	3,0	1,0
$\delta$ -Tocotrienol	-0,05	0,9	0,9	0,7	1,6	5,6	1,0

## 4.2 Anwendung der PCL-Methode auf lipophile Lebensmittelextrakte

Die AOK von insgesamt 18 im Folgenden aufgeführten lipophilen Lebensmittelextrakten wurden mittels PCL-Methode bestimmt:

- frische Tomaten
- Tomatenprodukte: passierte Tomaten, Tomatenketchup, Tomatenpesto und Tomatenmark
- Maiskeimöl, Erdnussöl, Sesamöl, Sonnenblumenöl und Walnussöl
- Weizensorten: Badengold, Luteus, Kombo, Rotkorn und Tommi
- Weizenprodukt: Makkaroni
- Milch und Sahne

Zur Vergleichbarkeit und Einordnung der AOK dieser aufgeführten Produkte wurden zusätzlich alle Extrakte mit dem  $\alpha$ -TEAC-Test untersucht. Die optimierte PCL-Methode sollte damit auf die AOK von Matrices angewendet werden. Zusätzlich wurden die jeweiligen Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte in den Lebensmittelproben mittels HPLC ermittelt (Manuskript I und II).

Im PCL- sowie im  $\alpha$ -TEAC-Test konnten Verdünnungseffekte in der AOK-Bestimmung beobachtet werden. Die Bestimmungen der AOK in den Experimenten dieser Arbeit waren abhängig von den Probekonzentrationen bzw. den Verdünnungen. Eine Verdünnung der Probe ist allerdings obligatorisch, um im verwendeten Kalibrierungsbereich messen zu können. Eine konzentrationsabhängige AOA bzw. AOK von hydrophilen Substanzen und Lebensmittelkomponenten konnten bereits einige Autoren beobachten (Bolling et al., 2012; Hengst et al., 2009; Sipel et al., 2013). Auf der Grundlage der Daten von Hengst et al. (2009) ist der Verdünnungseffekt möglicherweise Substanz- und Testspezifisch (Hengst et al., 2009). In der Publikation von Lee et al. (2014) wird gezeigt, dass eine höhere Probenverdünnung von Wein mit höheren Gesamtphenolgehalten einhergeht (Lee et al., 2014). Reine Standards wie beispielsweise Ascorbinsäure und Trolox zeigten ebenfalls in ihrem Gesamtphenolgehalt einen Verdünnungseffekt. Aber auch Gallussäure und Harnsäure waren in ihrer Peroxylradikal-abfangenden AOA und in ihrem Photochemolumineszenz-Signal konzentrationsabhängig (Hengst et al., 2009). In lipophilen Probenmaterialien, wie Tomatensamen, konnten gleichartige Verdünnungseffekte in lipophilen AOK-Messsystemen



festgestellt werden (Westphal et al., 2014). Die Ursachen für diesen Effekt sind bis heute jedoch noch nicht aufgeklärt (Sipel et al., 2013). Möglicherweise kann die Probenmatrix einen Einfluss auf die AOK nehmen und den Verdünnungseffekt verstärken.

In der Literatur sind die Analysendaten für verschiedene Verdünnungen als Mittelwerte angegeben, welche oftmals keine Rückschlüsse auf ein konzentrationsabhängiges Ergebnis geben. Erst in den letzten Jahren wird die Problematik des sogenannten „Verdünnungseffekts“ bzw. der konzentrationsabhängigen AOK mehr berücksichtigt. Eine große zentrale Frage ist dabei auch, wie diese konzentrationsabhängigen Daten akzeptabel publiziert werden können, damit die Problematik des Verdünnungseffekts aufgezeigt werden kann. Ansätze zur Minimierung von Verdünnungseffekten wurden bereits vorgeschlagen. So sollten mindestens drei Konzentrationen/Verdünnungen einer Probe für die AOK-Analyse von Lebensmittel-extrakten und die Diskussion über einen Verdünnungseffekt verwendet werden (Hengst et al., 2009). Daneben könnte eine Standardisierung durch Extrapolation einer Proben-Nullkonzentration auf der Grundlage eines Pseudo-Kinetik-Modells erster Ordnung nach Barton et al. (2010) durchgeführt werden (Barton, 2010; Sipel et al., 2013). Villaño et al. (2004) analysierten die AOK von Rot- und Weißweinen über ihre Gesamtphenolgehalte und die ABTS-Radikalkation-reduzierenden Fähigkeiten. So konnte nur ein Verdünnungseffekt beobachtet werden, wenn keine Linearität zwischen den Verdünnungen der Weinproben und der AOK vorlag (Sipel et al., 2013; Villaño et al., 2004).

Wie im Manuskript I dargestellt, kann auch bei einem linearen Zusammenhang zwischen der Verdünnung/Konzentration und der AOK ein Verdünnungseffekt festgestellt werden. Die carotinoidreichen Tomatenmark- und Tomatenpesto-Proben zeigten mit steigender Verdünnung höhere AOK-Werte im PCL-Test. Entgegengesetzte Ergebnisse konnten bei dem kohlenhydratreichen Tomatenketchup beobachtet werden. Je größer die Verdünnung war, desto kleinere Werte wurden gemessen. In den Ölproben konnte nur in Walnuss- und Erdnussöl ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,048$ ,  $R = 0,997$ ) zwischen Verdünnungsfaktor und der AOK festgestellt werden. Bei den anderen Ölproben ergaben sich sehr gute aber nicht signifikante Korrelationen ( $p > 0,05$ ), wie auch bei den Weizensorten. Der Makkaroni-Extrakt wies dagegen einen signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,001$ ,  $R = 1,0$ ) zwischen der Verdünnung und der AOK auf. Gegensätzlich dazu stehen die Milch- und Sahneproben, welche keine Zusammenhänge zwischen Verdünnung und AOK im PCL-Test

zeigten. Im  $\alpha$ -TEAC-Test war in allen Proben Verdünnungseffekte bemerkbar. Bei allen Lebensmittelextrakten zeigten sich bei zunehmender Verdünnung entsprechend höhere antioxidative Potentiale. Im Gegensatz dazu konnte bei den Ölproben der Trend aufgezeigt werden, dass mit stärkerer Verdünnung die AOK stetig kleiner wurde. Im Großen und Ganzen konnten bei stärker verdünnten Probenextrakten entsprechend höhere Ergebnisse mittels PCL erfasst werden. Dennoch kann keine eindeutige Aussage bezüglich beider AOK-Messsysteme (PCL,  $\alpha$ -TEAC) getroffen werden, welcher Verdünnungstrend in der jeweiligen Testmethode bevorzugt vorliegt. Der Einfluss des Verdünnungseffekts auf die AOK ist, wie bereits schon bekannt, nicht von der Methode abhängig.

Die kleinsten AOK-Ergebnisse mittels PCL-Test wurden in den Milch- und Sahneproben beobachtet, da diese die geringsten Vitamin-E- und Carotinoid-Gehalte aufwiesen. Die Weizensorten sowie Makkaroni hatten im Vergleich zu anderen untersuchten Lebensmittelproben ebenfalls geringe AOK-Werte (13 - 33  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ), bedingt durch den geringeren Beitrag ihrer lipophilen Antioxidantien (Manuskript II). Dennoch sind sie wertvolle Lieferanten von Lutein, Zeaxanthin sowie von Tocotrienolen, die in verarbeiteten Produkten z. B. in Teigwaren eine hohe Resorptionsverfügbarkeit aufweisen. Durch den häufigen Verzehr können diese Lebensmittel zur antioxidativen Wirkung beitragen (Werner, 2010).

Erwartungsgemäß verfügten Maiskeimöl und Sonnenblumenöl über die höchste antioxidative Wirksamkeit gegenüber allen 18 untersuchten Lebensmittelproben. In Summe konnte ein lipophiler Antioxidantien-Gehalt von 234  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  und 107  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  ermittelt werden. Obwohl die o. g. Pflanzenöle aufgrund der Raffination keine Carotinoide mehr enthielten (Demirbas, 2008), wiesen sie die höchsten Vitamin-E-Gehalte, gefolgt von Tomatenmark und Tomatenpesto, welche ebenfalls sehr hohe Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalte mit 177  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  in Summe und 140  $\mu\text{mol}/100 \text{ g}$  in Summe enthielten. Allerdings konnte das höchste antioxidative Potential in Tomatenketchup bestimmt werden. Damit ergab sich folgende PCL-AOK-Reihenfolge: Tomatenketchup > Tomatenpesto > Sonnenblumenöl > Tomatenmark > Maiskeimöl > Sesamöl > Walnussöl > Erdnussöl > passierte Tomaten > frische Tomaten > Weizensorten > Makkaroni > Sahne > Milch. Eine signifikante Korrelation zwischen den Carotinoidgehalten in den Tomatenproben und der AOK mittels  $\alpha$ -TEAC-Tests ( $p = 0,000$ ,  $R = 0,939$ ) konnte aufgrund der hohen Carotinoid-

Gehalte und deren hohen Aktivitäten im  $\alpha$ -TEAC-Test beobachtet werden. Im PCL-Test konnte ein mäßiger Zusammenhang für die Produktklassen (Pflanzenöle, Tomaten-, Weizenproben) zwischen den Carotinoidgehalten und der AOK beobachtet werden. Die Einberechnung der Vitamin-E-Gehalte ergab ebenso nur eine mäßige Korrelation (Tomatenproben:  $p = 0,261$ ,  $R = 0,656$ , Weizenproben:  $p = 0,274$ ,  $R = 0,610$ , Ölproben:  $p = 0,229$ ,  $R = 0,656$ ). Allerdings ist die Korrelation zwischen der AOK im PCL-Test sowie im  $\alpha$ -TEAC-Test und den summierten Gehalten an Carotinoiden und Vitamin E unter Einberechnung aller 18 untersuchten Lebensmittelproben signifikant. Tomatenmark zeigte die höchste AOK im  $\alpha$ -TEAC-Test, welches sich mit dem höchsten chromatografisch ermittelten Gehalt an Carotinoiden erklären lässt, gefolgt von passierten Tomaten, Tomatenketchup, Tomatenpesto, Maiskeimöl, Sesamöl, frische Tomaten, Sonnenblumenöl, Walnussöl, Erdnussöl, Sahne, Milch, Rotkorn, Kombo, Badengold, Luteus, Makkaroni, und Tommi. Dennoch kann nicht explizit gesagt werden, dass die Konzentrationen von Carotinoiden und Vitamin E mit den AOK-Werten korrelierten, weder im PCL-Test noch im  $\alpha$ -TEAC-Test.

Die Beiträge der einzelnen Antioxidantien in den jeweiligen Lebensmittelproben an der lipophilen AOK konnten mit Hilfe der quantifizierten Gehalte von Carotinoiden und Vitamin E und den ermittelten Einzelwerten im PCL-Test sowie im  $\alpha$ -TEAC-Test von Müller et al. (2011) (Müller et al., 2011) berechnet werden (Manuskript I und II). Die lipophile AOK der untersuchten Extrakte war nicht vergleichbar mit den Gehalten von Vitamin E und Carotinoiden. Die AOK beispielsweise von passierten Tomaten setzte sich lediglich zu 42 % aus Carotinoiden ((*all-E*)-Lykopin, (*Z*)-Lykopin-Isomere, (*all-E*)- $\beta$ -Carotin) und Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol) zusammen. 58 % der AOK können weder auf Vitamin E noch auf die Carotinoide zurückgeführt werden (Abbildung 7).

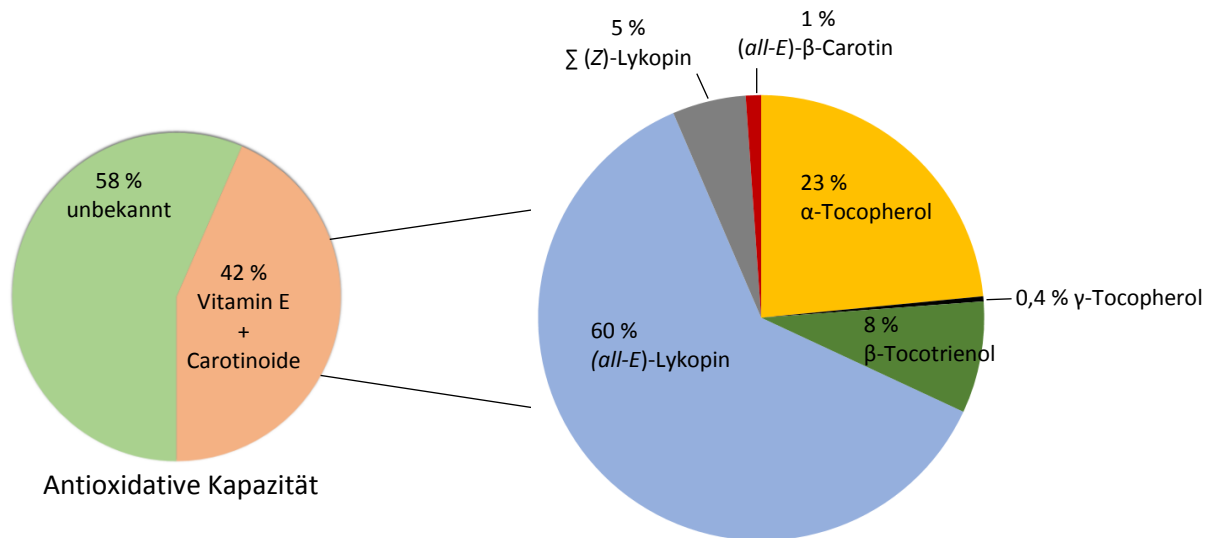


Abbildung 7: Beiträge von Carotinoiden und Vitamin E zur AOK von passierten Tomaten mittels PCL-Methode.

Dieser unbekannte Anteil kann auf Inhaltsstoffe zurückgehen, welche nicht mittels HPLC detektiert wurden. Lykopin ist das Hauptcarotinoid in Tomaten und Tomatenprodukten und liefert den größten Beitrag der Gesamt-AOK. Tomatenproben könnten allerdings noch weitere Carotinoide sowie lipidlösliche antioxidative Substanzen beinhalten, welche nicht chromatografisch berücksichtigt werden konnten. Hierzu zählt z. B. Vitamin A (Sahin et al., 2008). Vitamin A spielt aber auch in Kuhmilch mit einem Gehalt von 2,1 - 4 mg/l und demzufolge auch in Sahne eine sehr große Rolle sowie Vitamin K und Vitamin D (Belitz et al., 2008; Gentili et al., 2012) und können ebenso zur AOK beitragen. In einer älteren Publikation von Hiramastu et al. (1990) wurde beschrieben, dass Vitamin A (*all-trans*-Retinal) antioxidativ gegen Thiyl-Radikale wirkte und Retinoide eine antioxidative Effektivität gegenüber DPPH-Radikalen und Peroxylradikalen aufwiesen (Hiramastu et al., 1990). Demnach könnte Vitamin A auch im PCL-Test antioxidativ gegen Superoxidradikal wirken.

Zusätzlich können Kräuter und Gewürze die AOK positiv beeinflussen (Candy et al., 2013; Chohan et al., 2012). Des Weiteren könnten abhängig vom Extraktionsmittel (je nach Anteil an MeOH) auch polare Komponenten extrahiert worden sein. Tomaten beinhalten ebenso alkohollösliche Polyphenole wie Quercetin, Kampferol (Flavonol), Rutin (Flavonol), Naringenin (Flavanon), Ferulasäure, Chlorogensäure und Kaffeesäure (Popescu et al., 2013; Vallverdú-Queralt et al., 2012), welche im PCL-Test mit erfasst werden könnten. Im  $\alpha$ -TEAC-Test ist die Mitextraktion von Polyphenolen nicht möglich, da sie im verwendeten n-Hexan nicht löslich sind.

In Pflanzenölen scheint Vitamin E nicht das alleinige Hauptantioxidans zu sein, da die AOK-Werte des PCL- und  $\alpha$ -TEAC-Tests nicht signifikant mit den Vitamin-E-Gehalten korrelieren (PCL:  $p = 0,230$ ,  $R = 0,656$ ;  $\alpha$ -TEAC:  $p = 0,188$ ,  $R = 0,700$ ). Sonnenblumenöl enthält neben Vitamin E auch Vitamin K, welche bei der Berechnung der Beiträge einzelner Substanzen zur AOK des Öls nicht berücksichtigt wurden (Ferland et al., 1992). Des Weiteren sind Phytosterole in allen Pflanzenölen zu finden (Krist et al., 2008). Der Phytosterolgehalt lag z. B. von Sonnenblumenöl bei 411 mg/100 g (Stelmach-Mardas et al., 2013). Neue Studien berichteten, dass Phytosterole antioxidativ wirken könnten (Azhari et al., 2014; Shalaby et al., 2013). Das antioxidative Potential ist möglicherweise auf die Hydroxylgruppe an der C3-Stellung zurückzuführen. Des Weiteren befinden sich Doppelbindungen in der Seitenkette an Position C22 oder C24 im vorhandenen Sterangerüst, welche ebenfalls antioxidativ wirken können. Die Sättigung der Seitenkette zeigte bereits einen Einfluss auf die antioxidative Wirksamkeit von Tocopherolen und Tocotrienolen im PCL-Testsystem. Daher ist der Einfluss von Phytosterolen in den Pflanzenölen auf die AOK nicht auszuschließen. Ebenso ist in der Literatur bekannt, dass Weizen Phytosterole mit einem Gehalt von 70 mg/100 g enthält (Brauner, 2013), welche die AOK beeinflussen können.

Bei der Herstellung von thermisch stark verarbeiteten Lebensmitteln können aus reduzierenden Zuckern und Aminogruppen (aus Aminosäuren, Proteinen, Peptiden) in der nicht-enzymatischen Bräunungsreaktion Maillard-Reaktions-Produkte entstehen (Belitz et al., 2008), welche *in vivo* und *in vitro* antioxidativ wirken können (Limsuwanmanee et al., 2014). Zum Beispiel konnte u. a. in Kartoffelchips, Biskuit und gekochtem Rindfleisch die antioxidative Wirkung von Maillard-Reaktions-Produkten nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Datenlage wird vermutet, dass Maillard-Reaktions-Produkte Lipide vor der Oxidation schützen können (Limsuwanmanee et al., 2014). Melanoidine sind Maillard-Reaktions-Endprodukte mit einer großen Molekülmasse (Bartel et al., 2015), welche antioxidative Eigenschaften gegenüber Sauerstoffradikalen zeigten (Limsuwanmanee et al., 2014). Thermisch verarbeitete Lebensmittel wie beispielsweise u. a. passierte Tomaten, Tomatenpesto und Makkaroni enthalten Maillard-Reaktions-Produkte, welche zur AOK beitragen können. Allerdings können in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen bei der Bildung von Maillard-Reaktions-Produkten auch Amino-Redukton-Strukturen entstehen, die prooxidativ wirken und somit oxidative Schäden fördern können. Weiterhin wird angenommen, dass Maillard-Reaktions-Produkte in Gegenwart von Metallionen und Sauerstoff  $H_2O_2$  bilden

können, welche in der Fenton-Reaktion ROS generieren können (Pischetsrieder et al., 1998).

Zusätzlich können sich die Gehalte von hitzeempfindlichen Antioxidantien wie z. B. Polyphenolen (Jimenez et al., 2014), Carotinoiden (Amorim-Carrilho et al., 2014) sowie von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocotrienol (Brennan et al., 2011) bei thermischen Verarbeitungsprozessen verringern, welches zu antioxidativen Verlusten führen kann. Allerdings können eine erhöhte Temperatur und eine längere Erwärmungszeit die Extrahierbarkeit der Carotinoide und Tocopherole in Probenmaterialien verbessern, was eine höhere Bioverfügbarkeit ermöglichen kann (Hwang et al., 2012).

Weiterhin kann die Lebensmittelmatrix die AOK in den Testsystemen beeinflussen. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass Zucker im speziellen brauner Zucker und Rohrzucker antioxidative Eigenschaften aufwiesen, die im TEAC-, DPPH- und Gesamtphenoltest nach Folin-Ciocalteu ermittelt werden konnten (Caderby et al., 2013). Daher ist nicht auszuschließen, dass natürliche und synthetisch zugesetzte Polysaccharide in Lebensmittelproben in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel ein lipophiles antioxidatives Potential zeigen können. Außerdem spielen synergistische und antagonistische Wechselwirkungen zwischen Carotinoiden und Vitamin E eine große Rolle, die ebenfalls schon in der Literatur beschrieben wurden (Kotíková et al., 2011; Liu et al., 2008; Peyrat-Maillard et al., 2003).

Die ermittelten AOK im PCL- als auch im  $\alpha$ -TEAC-Test der frischen Tomaten sowie der Tomatenprodukte waren abhängig vom Wassergehalt der Lebensmittelproben (Manuskript I). So hatten frische Tomaten, passierte Tomate, Tomatenpesto und Tomatenmark keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer AOK im PCL-Test, wohingegen Tomatenketchup eine 2 - 4-mal höhere antioxidative Effizienz aufwies. Im  $\alpha$ -TEAC-Test hatten passierte Tomaten und Tomatenmark eine 5 - 15-mal signifikant höhere AOK als Ketchup, Tomatenpesto und frische Tomaten, welche statistisch die gleiche AOK aufwiesen. Dementsprechend hatte der Wassergehalt der Lebensmittelproben, insbesondere der Tomatenproben einen Einfluss auf die AOK. Die AOK im Trockengewicht (PCL,  $\alpha$ -TEAC) konnte nicht ausschließlich auf die Vitamin-E- und Carotinoid-Gehalte zurückgeführt werden. Dies gibt auch hier Hinweise, dass weitere antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe und synergistische/antagonistische Wechselwirkungen lipophiler Antioxidantien einen Einfluss auf die AOK-Messung ausüben.

Die AOK aller 18 Lebensmittelextrakte mittels PCL-Methode und  $\alpha$ -TEAC-Test korrelierten weniger gut miteinander ( $p = 0,074$ ,  $R = 0,424$ ), da beide Testsysteme auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen beruhen. Im  $\alpha$ -TEAC-Test wird die Fähigkeit gemessen, ein Radikal mit Elektronentransfer zu reduzieren. ET-basierende Testmethoden ( $\alpha$ -TEAC, DPPH, FRAP) beruhen auf einer Endpunktreaktion und bestimmen eine Inhibierung zu einem definierten Messzeitpunkt (Huang et al., 2005). Im Gegensatz dazu werden in der PCL-Methode Superoxidanionen über Wasserstoffatomtransfer abgefangen (Prior et al., 2005). Im PCL-Test wird kein Gleichgewicht erreicht, denn Superoxidradikale werden kontinuierlich über die gesamte Messzeit erzeugt (Frankel et al., 2000). Diese Messungen basieren auf der Kombination der Lag-Phase und dem Grad der Inhibierung der gebildeten Superoxidradikale, bezogen auf die Lumineszenz-Intensität, welche mit der AUC-Berechnung ausgewertet wird (Prior et al., 2005).

Allerdings zeigte die lipophile AOK von Oleoresin in Rosmarin- und Salbei-Extrakten übereinstimmende Ergebnisse im DPPH-Test (ET) und im PCL-Test (HAT) (Upadhyay et al., 2014). Weiterhin konnte eine sehr gute Korrelation zwischen den lipophilen AOK-Ergebnissen von Leinsamen, Kürbiskernen, Walnüssen, Raps, Nachtkerze und Schwarzkümmel gegenüber Superoxidanionen (PCL-Test) und DPPH-Radikalen (DPPH-Test) beobachtet werden (Sielicka et al., 2014). Dagegen zeigten die Ergebnisse von Schlesier et al. (2002) einen weniger starken Zusammenhang zwischen FRAP- und PCL-Test (Schlesier et al., 2002).

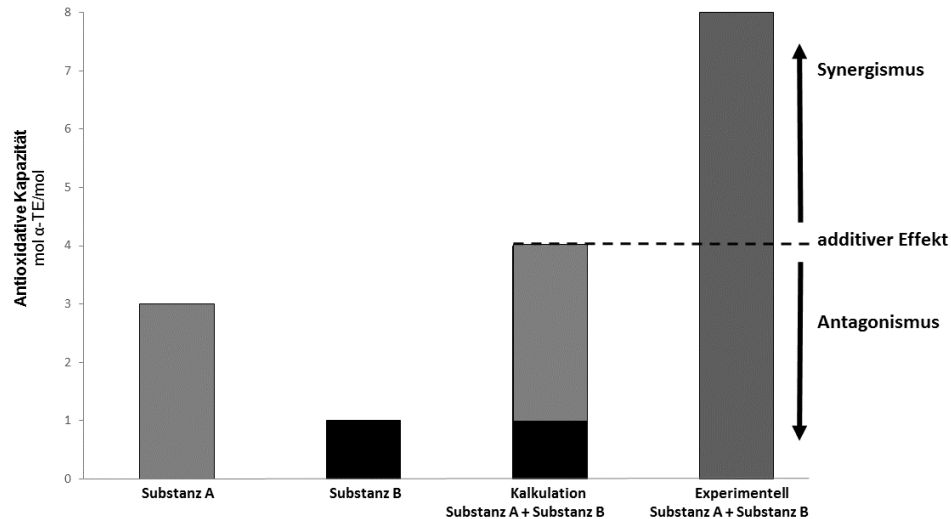
Die Wahl des Extraktionsmittels kann einen erheblichen Einfluss auf die AOK-Messung haben. Für den  $\alpha$ -TEAC wurde n-Hexan verwendet. Dagegen wurden für den PCL-Test unterschiedliche Extraktionsmittel eingesetzt. Die Pflanzenöle wurden ebenfalls, wie im  $\alpha$ -TEAC-Test, mit n-Hexan gelöst, wohingegen Tomaten- und Weizenproben mit MeOH/THF (50/50, v/v) extrahiert wurden und Milch und Sahne mit Diethylether. Michiels et al. (2012) bestätigten in ihrer Arbeit, dass die Zusammensetzung des Extraktionsmittels und die Extraktionsbedingungen große Auswirkungen auf die Ergebnisse der AOK hatten (Michiels et al., 2012). Die verwendeten Rosmarin- und Salbei-Extrakte (mittels Hexan/Aceton) in der Studie von Upadhyay (2014) wurden in MeOH gelöst und anschließend wurde die AOK im DPPH- und PCL-Test untersucht (Upadhyay et al., 2014). Gleiche Lösungsmittelbedingungen in den AOK-Testsystemen können eine sehr gute Korrelation zwischen DPPH- und PCL-Test fördern.

Serpen et al. (2012) zeigten ebenfalls den maßgeblichen Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung auf die AOK im DPPH-Test und im TEAC-Test (Serpen et al., 2012). Je nach Lösungsmittel können weitere nichtphenolische Verbindungen und Lebensmittelmatrizes mitextrahiert werden, welche ebenfalls die Messungen beeinflussen können. Bereits 1999 konnten van den Berg et al. unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der AOA von  $\beta$ -Carotin in verschiedenen Lösungsmitteln beobachten (van den Berg et al., 1999). Des Weiteren kann der unterschiedliche Grad von synergistischen, antagonistischen und additiven Wechselwirkungen von Antioxidantien ebenfalls die mäßige Korrelation zwischen den AOK-Ergebnissen im PCL- und  $\alpha$ -TEAC-Test begründen (Kotíková et al., 2011; Nogala-Kałużka et al., 2013).

### **4.3 Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien sowie Matrizeinflüsse auf die lipophile antioxidative Kapazität**

Erwartungsgemäß zeigten Maiskeimöl und Sonnenblumenöl im Vergleich zu allen analysierten Lebensmittelproben nicht die höchste AOK, bedingt durch die sehr hohen Gehalte an Vitamin E. Die höchste AOK konnte jedoch bei Tomatenketchup beobachtet werden, obwohl dieser einen geringeren Carotinoid- und Vitamin-E-Gehalt aufwies. Diese Differenzen können nicht nur auf undetektierte Antioxidantien zurückzuführen sein, wie im Abschnitt 4.2 diskutiert, sondern auch auf Wechselwirkungen zwischen den Antioxidantien sowie Einflüsse der Lebensmittelmatrizes, welche ebenfalls einen Einfluss auf die lipophilen AOK-Messungen nehmen und demzufolge nicht vernachlässigt werden dürfen. Um diese These zu bestätigen, wurde die AOK von  $\alpha$ -Tocopherol, Lycopin,  $\beta$ -Carotin und Lutein in Zwei-Komponenten-gemischen unterschiedlicher molarer Mischungsverhältnisse (1:1, 2:1, 1:2) mit optimiertem PCL-Test sowie mit  $\alpha$ -TEAC-Test untersucht. Auch bei diesen Versuchen wurden Verdünnungseffekte festgestellt (Manuskript III, Seiten 41 - 61).





**Abbildung 8: Interaktionen zwischen zwei Antioxidantien im additiven, synergistischen und antagonistischen Effekt.**

Im  $\alpha$ -TEAC-Test konnte in allen untersuchten Mischungen ein Antagonismus festgestellt werden. Der größte antagonistische Effekt wurde in allen Kombinationen mit  $\beta$ -Carotin beobachtet. Dagegen zeigte  $\alpha$ -Tocopherol einen geringeren Antagonismus im Vergleich zu den anderen untersuchten Antioxidantien-Gemischen. Die Anwesenheit von funktionellen Gruppen wie Hydroxylgruppen könnte den Antagonismus abschwächen. Diese Vermutung wird in der Kombination  $\alpha$ -Tocopherol mit Lutein (zwei OH-Gruppen) bestärkt. Die Hydroxylgruppen im Lutein und  $\alpha$ -Tocopherol könnten mittels Wasserstoffbrücken wechselwirken. Utomo et al. (2013) vermuteten, dass Lutein und Chitosan (Polyaminozucker) durch Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxylgruppen beider Strukturen anziehend wechselwirken (Utomo et al., 2013) (Manuskript III).

Im PCL-Test konnten für die untersuchten Mischungsverhältnisse der lipophilen Antioxidantien synergistische sowie antagonistische und additive Effekte festgestellt werden (Manuskript III). Alle Kombinationen mit  $\beta$ -Carotin zeigten synergistische Wechselwirkungen. Im Gegensatz dazu wurde bei dem Gemisch aus  $\alpha$ -Tocopherol und Lutein eine geringere AOK als berechnet, beobachtet (Antagonismus). Im PCL-Test könnten die Hydroxylgruppen von  $\alpha$ -Tocopherol und Lutein einen negativen Einfluss auf die Messungen ausüben. Die Hydroxylgruppen könnten die Wasserstoff-spendende Fähigkeit vom  $\alpha$ -Tocopherol hemmen. Nogala-Kalucka et al. (2013) beobachteten einen starken antagonistischen Effekt zwischen Rutin und Tocotrienolen und vermuteten, dass das Wasserstoff-abgebende Potential der Tocotrienole durch das OH-Gruppen-reiche Rutin unterdrückt wird (Nogala-Kalucka et al., 2013).

In der Literatur ist beschrieben, dass eine Supplementierung mit Selen signifikant den Vitamin-E-Gehalt in Eigelb erhöhte, aber nicht die Konzentration von Vitamin A und Carotinoiden steigerte (Skřivan et al., 2010). Noguer et al. (2014) stellten ebenfalls in neuen Studien synergistische Wirkungen zwischen Ascorbinsäure, Harnsäure sowie den Polyphenol-Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure fest. Zusätzlich konnte die Kombination von Ascorbinsäure mit dem Darmmikroflora-Metabolit 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure einen starken synergistischen Effekt und eine starke Erhöhung der Antioxidans-Reaktions-Geschwindigkeit aufweisen. Diese Reaktionsgeschwindigkeit ist in physiologischer Hinsicht relevant. Die Antioxidantien sollten die Radikale abfangen, bevor diese durch Oxidation den Organismus schädigen können (Noguer et al., 2014).

Die  $\alpha$ -Tocopherol-Aufnahme wurde durch die Anwesenheit von phenolischen Verbindungen wie Naringenin sowie Carotinoiden und  $\gamma$ -Tocopherol *in vitro* in Dickdarmkarzinomzellen (Caco-2-Zellen) gehemmt. Ebenso wurde die Vitamin-D-Aufnahme durch  $\alpha$ -Tocopherol und Phytosterole beeinträchtigt (Goncalves et al., 2015). Goncalves et al. (2015) untersuchten die Wechselwirkungen lipophiler Antioxidantien während der Absorption mit Hilfe von Caco-2-Zellen. Vitamin A verringerte signifikant die Aufnahme von Vitamin D, Vitamin E und Vitamin K. Allerdings wurde die Vitamin-A-Aufnahme durch Vitamin D und Vitamin K nicht beeinträchtigt. Vitamin E förderte sogar die Vitamin-A-Absorption (Goncalves et al., 2015). Diese Daten deuten an, dass die intestinale Resorption *in vivo* durch additive, synergistische oder antagonistische Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien beeinflusst werden kann.

Auch verschiedene Aufnahmemechanismen in den Enterozyten könnten Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien hervorrufen.  $\beta$ -Carotin, Vitamin E und Vitamin D werden durch passive Diffusion absorbiert. Zusätzlich teilen sich Vitamin D und  $\alpha$ -Tocopherol die gleichen Transporterproteine NPC1-L1 und SR-B1. Vitamin A und Vitamin K werden dagegen über bisher unbekannte Membranproteine in den Enterozyten transportiert (Goncalves et al., 2015; Reboul et al., 2011).

Am Beispiel von  $\beta$ -Carotin, Lutein und Lykopin wurde gezeigt, dass Carotinoide untereinander sowie mit  $\alpha$ -Tocopherol zum einen synergistisch wechselwirken und somit in Mischungen effektiver sein können als Einzelverbindungen. Zum anderen sind sie ebenfalls in der Lage, antagonistisch zu wirken, abhängig vom Testsystem zur Bestimmung der

antioxidativen Wirksamkeiten (Manuskript III). Diese differenzierten Ergebnisse der Interaktionseffekte im PCL-Test und im  $\alpha$ -TEAC-Test verdeutlichen erneut die unterschiedlichen Reaktions-mechanismen der beiden genannten Methoden. Somit haben die ausgewählten Testmethoden einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse und der Vergleich mit anderen publizierten Resultaten ist problematisch.

Weiterhin ist der Einfluss der Interaktionen zwischen Antioxidantien auf die intestinale Resorption nicht zu vernachlässigen. Auch in der täglichen Nahrung liegen Antioxidantien in verschiedenen Kombinationen vor. Hinzu kommt, dass sie oftmals in der Lebensmittelmatrix (Kohlenhydrate, Ballaststoffe, Proteine, Lipide) gebunden vorliegen. Daher ist zukünftig wichtig, die Bedeutung der synergistischen bzw. antagonistischen Effekte bei der Resorption von Antioxidantien zu untersuchen z. B. mit Hilfe von *in-vitro*-Verdauungsexperimenten.

Weiterführend wurde der Matrixeinfluss auf die AOK im PCL- und  $\alpha$ -TEAC-Test analysiert. Auch hier konnten in beiden Testsystemen ein Verdünnungseffekt beobachtet werden, welcher in Kapitel 4.2 diskutiert wurde. Glucose, Fructose, Saccharose und lösliche Stärke nach Zulkowsky wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (50 g/l, 250 g/l, 500 g/l) sowie im Vier-Komponentengemisch einerseits mit MeOH und andererseits mit MeOH/MtBE (50/50, v/v) für den PCL-Test extrahiert (Manuskript III). Der Einfluss der Zuckerextrakte auf die lipophile AOK im PCL-Test war abhängig vom verwendeten Extraktionsmittel. Daneben spiegelt die Löslichkeit der Zuckerproben in MeOH, mit Ausnahme von Stärke, die AOK wider, welche bei einer Konzentration von 50 g/l von 17  $\mu$ mol  $\alpha$ -TE/100 g für Saccharose bis 329  $\mu$ mol  $\alpha$ -TE/100 g für Fructose reichten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass mit zunehmender Löslichkeit die AOK steigt.

Weiterhin war auffallend, dass je geringer die Probenkonzentration war, desto höher waren die AOK-Ergebnisse. Dieser Trend konnte auch beobachtet werden, wenn die Proben mit MeOH/MtBE (50/50, v/v) extrahiert wurden. Die ermittelten AOK-Werte für Glucose und Fructose mit einem MeOH/MtBE (50/50, v/v)-Extraktionsgemisch zeigten deutlich geringere Werte mit 10  $\mu$ mol  $\alpha$ -TE/100 g und 65  $\mu$ mol  $\alpha$ -TE/100 g, sind aber trotzdem nicht zu vernachlässigen. Einige Lebensmittelprodukte weisen einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten auf. Die untersuchte Tomatenketchup-Probe hatte laut Deklaration einen Zuckergehalt von 23,7 g/100 g, welcher einen Beitrag zur AOK leisten kann. Für Saccharose und Stärke konnte dagegen keine Superoxidradikal-abfangende Kapazität im PCL-Test festgestellt werden.

Eine Mixprobe, in der Glucose, Fructose, Saccharose und lösliche Stärke zu gleichen Anteilen mit MeOH (167  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ) sowie mit MeOH/MtBE (50/50, v/v) (39  $\mu\text{mol } \alpha\text{-TE}/100 \text{ g}$ ) extrahiert wurden, zeigte hohe AOK-Werte und zusätzlich synergistische Effekte, bedingt durch den großen antioxidativen Einfluss der Fructose. Die experimentellen AOK-Ergebnisse waren etwa zweimal größer als die erwarteten und berechneten Werte. Diese Interaktionen können möglicherweise auf die vorhandenen Hydroxylgruppen zurückgehen. Jedoch interagierten die mit MeOH und MeOH/MtBE (50/50, v/v) extrahierten Zucker nicht mit  $\alpha$ -Tocopherol und Lycopin. Eine Ausnahme war dabei der methanolische Fructose-Extrakt, welcher mit  $\alpha$ -Tocopherol synergistische Effekte zeigte. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe am Chromanring und der Ketose könnten die AOK im PCL-Test beeinflussen (Manuskript III).

Der Einfluss der Lebensmittelmatrix auf die *in-vivo*-AOK von bioaktiven Verbindungen kann außerdem Auswirkungen auf deren Resorption im Organismus haben. Die Lebensmittelmatrix hatte einen signifikanten Einfluss auf die Resorption im Darm von phenolischen Verbindungen und Carotinoiden in einem Saft-Sojamilch-Getränk gegenüber den Einzelprodukten. Die Resorption für hydrophile bioaktive Verbindungen wurde um 12 - 27 % und für lipophile Antioxidantien um 8 - 14 % reduziert (Rodríguez-Roque et al., 2014). In der Publikation von van Loo-Bouwman et al. (2014) konnten ebenso Auswirkungen der Lebensmittelmatrix auf die Bioverfügbarkeit von  $\beta$ -Carotin in einem intestinalen Resorptions-Modell bestätigt werden (van Loo-Bouwman et al., 2014). Ballaststoffe könnten gleichermaßen die Carotinoid-Absorption verringern (Parada et al., 2007), aufgrund der möglichen Komplexbildung. Die Vitamin-E-Aufnahme wird ebenfalls sowohl von der Lebensmittelmatrix als auch vom Fettgehalt beeinflusst. In einer dreiwöchigen Studie mit ungesättigten Fettsäuren konnte die Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol im Serum um 7 % gesteigert werden, wohingegen gesättigte Fettsäuren die Konzentration an  $\alpha$ -Tocopherol verringerten (Jeanes et al., 2004).

Die mit n-Hexan extrahierten Zuckerproben zeigten im  $\alpha$ -TEAC-Test keine ABTS-Radikalkationen-reduzierenden Fähigkeiten, da sich Zucker nicht in n-Hexan löst. Infolgedessen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Matrices wie z. B. Zuckerextrakte einen positiven Effekt auf die lipophile AOK in Abhängigkeit vom verwendeten Extraktionsmittel haben, welcher möglicherweise auf die OH-Gruppen zurückzuführen ist.

Temperatur, Extraktionszeit und vor allem die Zusammensetzung der Extraktionslösungen sind ausschlaggebende Parameter für die oftmals nicht gute Vergleichbarkeit von AOK-Ergebnissen (Michiels et al., 2012). Die Polarität des Extraktionsmittels hat große Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Antioxidantien in der Probe, so dass weitere antioxidative Komponenten und Matrices mitextrahiert werden können und somit den AOK-Gehalt beeinflussen.

#### 4.4 Physiologische Relevanz der PCL-Methode

Die physiologische Bedeutung der *in-vitro*-Testmethoden zur Bestimmung der AOK von Antioxidantien, Lebensmittel- und Pflanzenextrakten sowie von biologischen Flüssigkeiten (Plasma, Urin) wird in ihrer Bewertung immer wieder kritisiert. Die *in-vitro*-Ergebnisse können nur schwer auf den Organismus *in vivo* übertragen werden. Die Bioverfügbarkeit, die Resorption und der Metabolismus sind u. a. Faktoren bzw. Vorgänge, welche eine entscheidende Rolle für den antioxidativen Status *in vivo* besitzen. Die *in vitro* gewonnenen AOK-Ergebnisse geben einen Anhaltspunkt über antioxidative Wirkungen von Substanzen und ermöglichen eine Einordnung sowie ein Ranking. Die AOK ist neben der Aktivität von Superoxiddismutasen, Glutathionperoxidasen und Katalasen ein weiterer Biomarker für den oxidativen Stress in Plasma und Geweben (Prior et al., 2013).

In Tiermodellen konnten im Sommer höhere TEAC-Werte bei Mutterkühen verglichen zum Winter beobachtet werden, welche auf eine erhöhte Aufnahme von nahrungsbedingten Antioxidantien, wie Carotinoiden durch frisches Gras, zurückzuführen ist (Wilken, 2003). Unterstützend dazu zeigten die Ergebnisse der Humanstudie von Pantavos et al. (2014), dass eine hohe nahrungsbedingte AOK, gemessen mittels FRAP-Test, das Risiko einer Brustkrebs-Erkrankung bei postmenopausalen Frauen verringern kann (Pantavos, et al., 2014). Weiterführend untersuchten Bhattacharyya et al. (2014) die AOK von Urate im Serum mittels FRAP-Test. So wird vermutet, dass Urate eine antioxidative Wirkung besitzen und gegen Neurodegeneration schützen. Ein hoher Gehalt an Urat im Serum verringerte die Inzidenz und verlangsamte das Fortschreiten von Morbus Parkinson. Mittels FRAP-Test konnte gezeigt werden, dass eine orale Aufnahme von Inosin, einem Zwischenprodukt des Purinstoffwechsels, die AOK von Urate im Plasma dosisabhängig erhöht (Bhattacharyya et al., 2014).

Die Verwendung des FRAP-Testes konnte in der Arbeit von Karajibani et al. (2009) zeigen, dass eine signifikante Reduktion des antioxidativen Status (enzymatisch und nichtenzymatisch) im Plasma gleichzeitig die Konzentration an Lipidperoxidationsprodukten wie Malondialdehyd in Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen erhöhte (Karajibani et al., 2009). Auf der Grundlage dieser genannten Beispiele wird deutlich, dass die AOK-Testsysteme die Kontrolle von oxidativem Stress unterstützen können. Hinzu kommt, dass mittels bestimmter *in-vitro*-AOK-Werte Zusammenhänge zwischen dem oxidativen Status und durch u. a. oxidativen Stress ausgelöste degenerative sowie kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs festgestellt werden könnte.

Die methodisch einfachen TEAC- und DPPH-Methoden werden oftmals, aufgrund der Verwendung von nicht physiologischen Radikalen, kritisiert. Somit besteht zwischen den verwendeten synthetischen stabilen Radikalen keine Vergleichbarkeit zu hoch reaktiven Radikalen, welche in der Lipidperoxidation gebildet werden (Rodríguez-Roque et al., 2014). Außerdem werden die AOK-Tests aufgrund der Verwendung von wässrigen oder organischen Lösungsmitteln beanstandet, die keine physiologische Umgebung repräsentieren (Rodríguez-Roque et al., 2014). Des Weiteren laufen viele Reaktionen zur Bestimmung der AOK oftmals bei einem nicht physiologischen pH-Wert ab. Der  $\alpha$ -TEAC-Test allerdings wird bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 durchgeführt.

Der ORAC-Test wird als physiologisch relevanter betrachtet, da Peroxylradikale *in vitro* gemessen werden, welche auch in biologischen Systemen auftreten (Rodríguez-Roque et al., 2014). In der PCL-Methode werden Superoxidradikale gebildet, welche ebenfalls physiologisch im Organismus relevant sind. Superoxidradikale entstehen permanent in der mitochondrialen Atmungskette (Brandt, 2014) und können zum einen in der Haber-Weiss-Reaktion *in vivo* als auch in Gegenwart von Eisen in der Fenton-Reaktion *in vivo* hochreaktive Hydroxylradikale bilden (Merk, 1987).

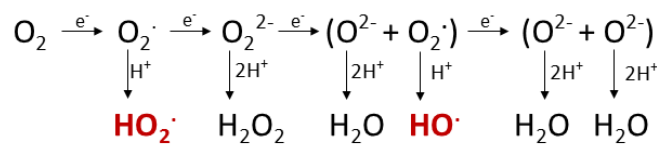
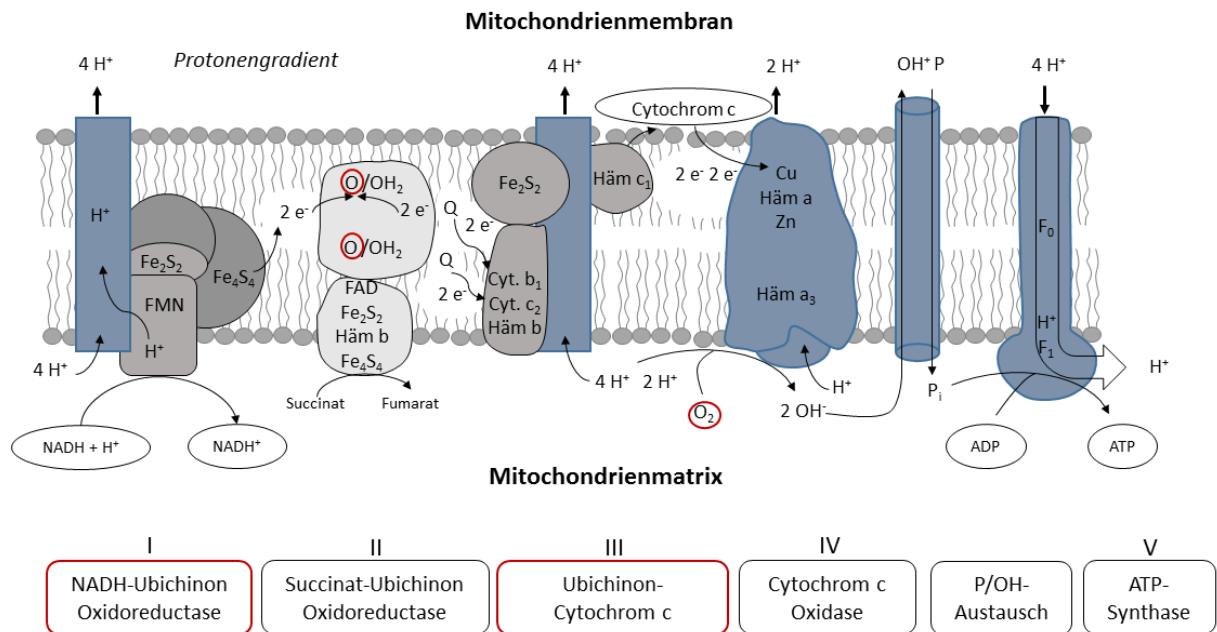


Abbildung 9: Die Entstehung der ROS in der Atmungskette, modifiziert nach Bieger, 2001 & Rehner et al., 2010.

Die Elektronen-Donatoren NADH und FADH<sub>2</sub> (aus dem Zitronensäurezyklus) geben ihre Elektronen durch eine Reihe von Proteinkomplexen, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, stufenweise ab. O<sub>2</sub> wird dabei zu H<sub>2</sub>O reduziert und Protonen aus der mitochondrialen Matrix herausgepumpt (Bildung eines Protonengradientens). ATP wird gebildet, sobald Protonen durch einen Enzymkomplex in die Mitochondrienmatrix zurückfließen. Die Komplexe I bis III gehören zur Atmungskette, während im Komplex V die ATP-Synthese stattfindet. In Komplex I und Komplex III entsteht der größte Teil der ROS. Denn die Umsetzung von O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O findet zu 95 - 98 % statt. Als Nebenprodukte können bei der Übertragung von Elektronen auf O<sub>2</sub> ständig ROS gebildet werden (Bieger, 2001; Rehner et al., 2010).

ATP = Adenosintriphosphat; e<sup>-</sup> = Elektron; FADH<sub>2</sub> = Flavin-Adenin-Dinukleotid-Dihydrid; H<sub>2</sub>O = Wasser; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Wasserstoffperoxid; HO<sub>2</sub>· = Hydroperoxyradikal; NADPH = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphathydrid; O<sub>2</sub> = Sauerstoff; OH<sup>-</sup> Hydroxylanion

Der nicht physiologische, basische pH-Wert im PCL-Messsystem, welcher zum Reaktionsablauf und zur Deprotonierung von Luminol notwendig ist, muss kritisch betrachtet werden. Vitamin E ist das wichtigste fettlösliche Kettenabbruch-Antioxidans im menschlichen Blutplasma und schützt hauptsächlich gegen Lipidperoxidation *in vivo* (Burton et al., 1982; Meineri et al., 2013). α-Tocopherol ist das physiologisch bedeutsamste Antioxidans, welches etwa 95 % des gesamten Vitamin-E-Gehaltes im menschlichen Blutplasma ausmacht (Müller et al., 2010). Die Konzentration an Vitamin E im Plasma beträgt 22-30 µmol/l. Dem gegenüber steht die Gesamtkonzentration der wichtigsten Carotinoide (α-Carotin, β-Carotin, β-Cryptoxanthin, Lutein, Lykopen) mit nicht mehr als 2 µmol/l im Plasma (Müller, 2011). Somit ist α-Tocopherol physiologisch das relevanteste lipophile

Antioxidans im Blutplasma. Im PCL-Test muss eine Mindestkonzentration an Probe vorliegen, um Ergebnisse für mehrere Tage zu reproduzieren.  $\alpha$ -Tocopherol war mit 75  $\mu\text{mol/l}$  im PCL-Test für drei Tage sehr gut reproduzierbar. Daher sind auch moderate antioxidative Ergebnisse für  $\alpha$ -Tocopherol im Plasma durch Aufkonzentrierung während der Probenvorbereitung zu erwarten.

#### 4.5 Beurteilung der PCL-Methode

Die optimierte PCL-Methode ist ein weiteres *in-vitro*-Testsystem zur Bestimmung der lipophilen antioxidativen Wirksamkeit (Summenparameter). Aufgrund unterschiedlicher Reaktionsmechanismen und verschiedener Extraktionsmittel ist nur eine moderate Vergleichbarkeit der AOK-Ergebnisse mit anderen bereits etablierten Testmethoden möglich. Ein Ranking sowie eine allgemeine Einordnung der lipophilen antioxidativen Wirksamkeiten von Antioxidantien sowie Lebensmitteln sind realisierbar. Weiterhin werden im PCL-Test synergistische, antagonistische oder additive Wechselwirkungen sowie die Einflüsse der Matrix auf den AOK-Summenparameter berücksichtigt. Die Gehalte an lipophilen Antioxidantien in den zu untersuchenden Proben sollten allerdings immer parallel mittels HPLC quantifiziert werden. Außerdem konnte wie auch in vielen anderen AOK-Messsystemen ein Verdünnungseffekt beobachtet werden. Die AOK der untersuchten Proben war konzentrationsabhängig. Um den sogenannten Verdünnungseffekt zu minimieren und vorzubeugen sind weitere Untersuchungen notwendig.

Antioxidantien mit lipophilen Eigenschaften kommen in der Natur in geringeren Konzentrationen gegenüber hydrophilen Antioxidantien vor. Eine lipophile AOK-Messmethode muss daher die Anforderung haben, sehr kleine Konzentrationen in Hinblick auf die Empfindlichkeit zu detektieren. Für die Bestimmung des lipophilen antioxidativen Potentials von Antioxidantien mittels optimiertem PCL-Test ist eine Mindestkonzentration erforderlich. Carotinoide, Tocopherole und Tocotrienole zeigten mit 75  $\mu\text{mol/l}$  die geringste Streuung über einen Messzeitraum von drei Tagen. Die Empfindlichkeit und der Arbeitsbereich des PCL-Systems sind infolgedessen eingeschränkt. Eine erhöhte Reaktionstemperatur (25 °C, 30 °C, 37 °C) konnte die Empfindlichkeit nicht positiv beeinflussen. Eine höhere Konzentration an Luminol würde höhere Lumineszenzsignale ergeben und die Sensitivität im PCL-Test möglicherweise steigern. Pogačnik et al. (2012) konnten in ihrer Arbeit beobachten, dass eine zu hohe Konzentration an Luminol von bis zu



2 mmol/l mit einer schlechteren Reproduzierbarkeit verbunden war. Zusätzlich bildete sich mit steigender Luminolkonzentration ein Niederschlag und die Reproduzierbarkeit der AOK-Ergebnisse wurde durch einen pH-Wert  $> 8$  beeinflusst (Pogačnik et al., 2012). Die Intensität der Luminol-Chemolumineszenz kann allerdings auch von ungebundenen Übergangsmetallen in Spurenkonzentrationen beeinflusst werden (Udilova, 1999). In protischen Lösungsmitteln (Wasser, Wasser-Lösungsmittelgemische, kurzkettige Alkohole) können verschiedene Sauerstoffderivate wie molekularer Sauerstoff, Peroxide und Superoxid-anionen Luminolderivate durch enzymatische oder mineralische Katalysatoren oxidieren. Dagegen ist im aprotischen Lösungsmittel, wie DMSO, Sauerstoff und eine starke Base für die Chemolumineszenz erforderlich. Denn diese Reaktion ist stark von der Zusammensetzung des Mediums abhängig (Dodeigne et al., 2000). Die Chemolumineszenz kann durch Metallionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ), Eisencyanid oder durch einige Metallkomplexe (Hämin, Hämoglobin) und Peroxidasen katalysiert werden (García-Campaña et al., 2000), welche in Lösungsmitteln und Chemikalien nicht auszuschließen sind. Die Intensität der Chemolumineszenz kann somit beeinträchtigt werden und die Nachweisgrenze herabgesetzt werden (Kazemi et al., 2014).

Um die lipophile AOK mittels PCL-Test zu messen, sind geringe Probenvolumina nötig. Somit kann der Test eingesetzt werden, wenn geringe Probenmengen vorhanden sind. Trotz optimiertem Küvetten-PCL-Test kann nach wie vor nur eine Messung pro Messzeit durchgeführt werden. Bei einer hohen Probenzahl ist die Untersuchung daher mit einem nicht unerheblichen zeitlichen Aufwand verbunden. Für eine schnelle Messung hoher Probenzahlen sollte der PCL-Küvetten-Test auf eine Mikrotiterplatten-Methode übertragen werden.

Um die Beträge einzelner Antioxidantien an der AOK im Summenparameter zu kennen, werden HPLC-Methoden mit Messprinzipien zur Bestimmung der AOK gekoppelt. Chromatografisch aufgetrennte Einzelkomponenten werden in einer Nachsäulen-derivatisierung mit DPPH-Radikalen (DPPH-Test) und ABTS-Radikalkationen (TEAC-Test) versetzt (Karaçelik et al., 2015; Xin et al., 2014; Yan et al., 2014). Die AOA von einzelnen Antioxidantien in einer komplexen Probe kann entsprechend der Gesamt-AOK zugeordnet werden. Einige Wissenschaftler koppelten bereits die HPLC mit der luminolbasierenden Chemolumineszenz, um die antioxidativen Fähigkeiten von hydrophilen Einzelverbindungen

zu detektieren (Dapkevicius et al., 1998; Ogawa et al., 1999). Die PCL-Methode zur Bestimmung der lipophilen AOK müsste auch online mit der HPLC gekoppelt werden, so dass die gesamte lipophile antioxidative Wirksamkeit auf die einzelnen Antioxidantien zurückgeführt werden kann (Abbildung 10).

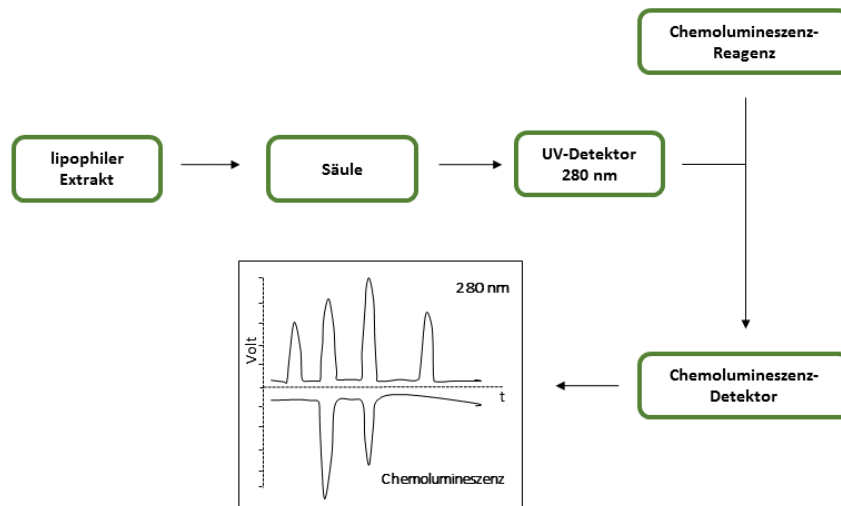


Abbildung 10: online-HPLC-Chemolumineszenzdetektion, modifiziert nach Dapkevicius et al., 1999.

## 5 Zusammenfassung

Laut statistischem Bundesamt waren im Jahr 2013 Herz-Kreislauf-Erkrankungen (40 %) die häufigste Todesursache in Deutschland, gefolgt von Krebs-Erkrankungen (25 %). Diese Erkrankungen sowie neurodegenerative Erkrankungen, Entzündungen, Allergien, aber auch Diabetes mellitus sowie auch Alterungsprozesse per se werden möglicherweise durch oxidativen Stress begünstigt und verursacht. Der oxidative Stress wird, durch das gestörte Gleichgewicht zwischen Oxidantien, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und Antioxidantien hervorgerufen und kann zelluläre Moleküle wie Proteine, Lipide und DNA oxidativ schädigen. Die Produktion von ROS erfolgt u. a. durch metabolische Reaktionen, wie in der mitochondrialen Zellatmung. Antioxidantien können endogen (z. B. Superoxid-dismutase, Glutathion) vorliegen oder exogen über die Nahrung (Obst, Gemüse, Nüsse, Getreide) aufgenommen werden. Antioxidativ wirksame Substanzen wie beispielsweise hydrophile phenolische Verbindungen (Phenolsäuren, Lignane, Phytinsäure) oder lipophile Antioxidantien (Carotinoide, Vitamin E) können protektiv gegen die o. g. Erkrankungen wirken, in dem sie als Radikalfänger, Reduktionsmittel, Kettenabbrecher oder als Singulett-Sauerstoff-Quencher fungieren. In Hinblick auf die Prävention von Erkrankungen und die Erhaltung der Gesundheit sind Antioxidantien in Form von Lebensmitteln oder Supplementen von entscheidender Bedeutung, da sie mit der Reduktion des oxidativen Stresses im Organismus assoziiert werden.

Zahlreiche *in-vitro*-Testmethoden wurden bereits zur Beurteilung der antioxidativen Wirksamkeiten von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, Lebensmitteln und dem oxidativem Status im Organismus (Plasma, Gewebe) etabliert. Antioxidative Testsysteme (Gesamtphenol-Test nach Folin-Ciocalteu, ORAC, FRAP) sind insbesondere für hydrophile Antioxidantien, wie Vitamin C und Polyphenole, geeignet. Daneben existieren allerdings nur wenige Methoden zur Bestimmung lipophiler Substanzen, wie beispielsweise Vitamin E und Carotinoide.

Daher befasste sich die vorliegende Dissertation mit folgenden Zielstellungen:

- Anwendung einer optimierten Photochemolumineszenz (PCL)-Methode in einem Küvettensystem zur Bestimmung der lipophilen antioxidativen Aktivitäten von verschiedenen lipophilen Substanzen wie Carotinoide (Xanthophylle, Carotine) und Vitamin E (Tocopherole, Tocotrienole).

- Beurteilung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der untersuchten lipophilen Substanzen in Abhängigkeit von funktionellen Gruppen und Länge des konjugierten Doppelbindungssystems.
- Ermittlung von lipophilen antioxidativen Kapazitäten ausgewählter Lebensmittel (Pflanzenöle, Tomaten, Tomatenprodukte, Weizensorten, Weizenprodukt, Milch und Sahne) mittels PCL-Methode und vergleichend mittels  $\alpha$ -TEAC-Test.
- Untersuchungen zum Einfluss von Wechselwirkungen zwischen Antioxidantien und der Lebensmittelmatrix mittels PCL-Test sowie die Vergleichbarkeit mit dem bereits etablierten  $\alpha$ -TEAC-Test.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der antioxidativen Aktivitäten der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Isomere der Tocopherole und Tocotrienole im PCL-Test. Die antioxidative Aktivität nahm von  $\alpha$ - zu  $\delta$ -Tocopherol sowie von  $\alpha$ - zu  $\delta$ -Tocotrienol mit geringerer Anzahl der Methylgruppen ab. Der Methylierungsgrad und die Position der Methylgruppen am Chromanring waren für die antioxidativen Aktivitäten von Tocopherolen und Tocotrienolen von entscheidender Bedeutung.  $\alpha$ -Tocotrienol zeigte eine signifikant höhere antioxidative Wirkung gegenüber physiologisch relevanten Superoxidradikal-Anionen im Vergleich zu  $\alpha$ -Tocopherol. Der Einfluss der Seitenkette der Vitamin-E-Formen auf die antioxidative Wirkung wird immer noch kontrovers diskutiert.

Innerhalb der Carotinoide zeigte Neurosporen (Carotin) die signifikant höchste, antioxidative Aktivität gefolgt von Astaxanthin und Antheraxanthin (Xanthophylle). Die antioxidative Aktivität der Carotine nahm mit Anzahl der konjugierten Doppelbindungen in der Polyenkette zu, mit Ausnahme von Lykopen. Innerhalb der Xanthophylle waren die antioxidativen Eigenschaften ebenso sowohl von der Länge des konjugierten Doppelbindungssystems als auch von Anzahl und Position der Substituenten bzw. funktionellen Gruppen abhängig.

Weiterhin ist zusammenfassend zu sagen, dass die PCL-Methode für geringere Konzentrationen nicht sensitiv genug war und der Konzentrationsbereich weiter optimiert werden muss. Da nach wie vor nur eine Messung pro Messzeit durchgeführt werden kann, sollte für eine schnelle Messung hoher Probenzahlen der PCL-Küvetten-Test auf eine Mikrotiterplatten-Methode übertragen werden.

Die lipophilen antioxidativen Kapazitäten von verschiedenen Lebensmittelproduktklassen im PCL-Test konnten nicht allein auf die Gehalte von Carotinoiden und Vitamin E zurückgeführt werden. Nichtdetektierte antioxidativ wirksame Substanzen wie beispielsweise Vitamin A und auch Maillard-Reaktions-Produkte könnten einen Einfluss auf die Bestimmung der lipophilen antioxidativen Kapazität haben. Kräuter und Gewürze könnten die Ergebnisse ebenso beeinflussen.

Im  $\alpha$ -TEAC-Test konnte im Gegensatz zum PCL-Test eine signifikante Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität der Tomatenproben und dem Carotinoid-Gehalt festgestellt werden. Dadurch kann auf eine Abhängigkeit vom Extraktionsmittel ( $\alpha$ -TEAC: n-Hexan, PCL: MeOH/THF (50/50, v/v)) geschlossen werden. Die Mitextraktion von weiteren hydrophilen Verbindungen im PCL-Test ist nicht auszuschließen. Die ermittelten Ergebnisse der lipophilen antioxidativen Kapazitäten von Pflanzenölen im PCL-Test und im  $\alpha$ -TEAC-Test zeigten, dass Vitamin E nicht das alleinige Hauptantioxidans ist. Phytosterole, welche in Pflanzenölen und Weizen enthalten sind, können das lipophile antioxidative Potential beeinflussen. Des Weiteren konnte ein Verdünnungseffekt in der Bestimmung der antioxidativen Kapazität mittels PCL-Test und  $\alpha$ -TEAC-Test festgestellt werden, d. h. die Ergebnisse waren von der eingesetzten Probenkonzentration bzw. Verdünnung abhängig. Derzeit sind die Ursachen für diesen konzentrationsabhängigen Effekt noch nicht bekannt.

Differenzen zwischen den Ergebnissen der antioxidativen Kapazitäten und den Gehalten an Vitamin E und Carotinoiden ließen Wechselwirkungen zwischen den Antioxidantien vermuten. Diese konnten in einem Zwei-Komponentengemisch aus  $\alpha$ -Tocopherol, Lycopin,  $\beta$ -Carotin und Lutein unterschiedlicher molarer Mischungsverhältnisse (1:1, 2:1, 1:2) im PCL-Test sowie im  $\alpha$ -TEAC-Test bestätigt werden. Im PCL-Test wirkten diese Antioxidantien in Mischungen effektiver als ihre Einzelverbindungen, aber auch antagonistisch. Dagegen zeigten alle Kombinationen der o. g. Verbindungen im  $\alpha$ -TEAC antagonistische Effekte.

Weiterhin kann zusammengefasst werden, dass der Einfluss von Lebensmittelmatrizes in den PCL- und  $\alpha$ -TEAC-Testsystemen zur Bestimmung der lipophilen antioxidativen Kapazität vom Extraktionsmittel abhängig war, wie am Beispiel von Glucose, Fructose, Saccharose und löslicher Stärke gezeigt werden konnte. Je besser die Löslichkeit im Extraktionsmittel und je geringer die Konzentration an Zuckermatrix war, desto größer war die lipophile antioxidative Kapazität und damit der Einfluss der Matrix auf die Ergebnisse. Somit kann geschlossen werden

werden, dass die Polarität des Extraktionsmittels einen erheblichen Einfluss auf die lipophile antioxidative Kapazität haben kann. Dadurch können antioxidativ wirksame Matrixbestandteile mit extrahiert werden und die lipophile antioxidative Kapazität beeinflussen. Des Weiteren zeigte ein Vier-Komponentengemisch der Zucker synergistische Effekte. So wurde gezeigt, dass Zuckermatrizes möglicherweise durch die vorhandenen OH-Gruppen miteinander wechselwirken können. Jedoch interagieren Zucker nicht mit Antioxidantien ( $\alpha$ -Tocopherol, Lycopin), mit Ausnahme des methanolischen Fructose-Extraktes, welcher mit  $\alpha$ -Tocopherol synergistisch wechselwirkte.

Bisher existiert keine universelle, standardisierte Methode, um die antioxidative Kapazität zu erfassen. Daher ist die Vergleichbarkeit der antioxidativen Kapazitäten problematisch, da die Methoden auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen, pH-Abhängigkeiten sowie Lösungsmitteln basieren. Dennoch geben diese Ergebnisse erste Vorstellungen über die antioxidativen Wirksamkeiten von bioaktiven Pflanzenstoffen und Lebensmitteln.

Antioxidantien liegen in Lebensmitteln in verschiedenen Zusammensetzungen vor. Eine getrennte Untersuchung jedes einzelnen Antioxidans ist ineffizient ohne das Verständnis für die möglicherweise vorhandenen synergistischen bzw. antagonistischen Wechselwirkungen zwischen den Antioxidantien und der Lebensmittelmatrix. Zukünftige Untersuchungen sollten den Einfluss der Interaktionen zwischen Antioxidantien auf Resorption und Metabolisierung u. a. durch *in-vitro*-Verdauungsexperimente prüfen.

## 6 Summary

In Germany, most common causes of death in 2013 were cardiovascular diseases (40%) and cancer (25%). Oxidative stress enhances the generation of these diseases as well as neurodegenerative diseases, inflammation, allergy, diabetes mellitus and aging. The term “oxidative stress” defines the imbalance between oxidants, such as reactive oxygen species (ROS), and antioxidants and can damage cellular molecules such as proteins, lipids and DNA. Reactive oxygen species are produced in metabolic reactions for example during cell respiration. There are endogen (superoxide dismutase, glutathione) and exogen sources (fruits, vegetables, nuts, corn) of antioxidants. Antioxidants such as hydrophilic phenolic compounds (phenolic acids, lignans, phytic acid) or lipophilic antioxidants (e.g. carotenoids, vitamin E) may have protective effects against the mentioned diseases. They can react as scavengers, reducing agents, chain breaking or as singlet oxygen quenchers. The antioxidants (foods or supplements) are associated with the reduction of oxidative stress and might be effective in maintaining health and prevention of diseases.

Numerous established *in vitro* methods exist for the estimation of the antioxidant capacity in plants, foods and the oxidative status in organisms. They are particularly suitable for hydrophilic antioxidants (total phenolic assay, ORAC, FRAP). But, methods are rarely for the determination of lipophilic substances such as vitamin E and carotenoids.

Therefore, the aims of this study were:

- Application of an optimized photochemiluminescence (PCL) method in a cuvette system to determine the lipophilic antioxidant activities of different lipophilic substances such as carotenoids (xanthophylls, carotenes) and vitamin E (tocopherols, tocotrienols).
- Estimation of the structure-activity relationship of the lipophilic substances depending on functional groups and length of chain conjugated double bonds.
- Use of the PCL method to determine the lipophilic antioxidant capacity of selected foods (vegetable oil, tomatoes, tomato products, wheat, wheat products, milk and cream) and comparison to  $\alpha$ -TEAC assay results.
- Investigation of the effects of interactions between antioxidants and matrix components using PCL assay and  $\alpha$ -TEAC assay.

In this study significant differences were shown for the antioxidant activities of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -isomers of tocopherols and tocotrienols measured by the PCL-method. The antioxidant activity decreased from  $\alpha$ - to  $\delta$ -tocopherol and from  $\alpha$ - to  $\delta$ -tocotrienol with reduced number of methyl groups. The degree of methylation and the position of methyl groups in the chroman ring influenced the antioxidant activity of vitamin E forms.  $\alpha$ -Tocotrienol showed significant higher antioxidant activity against physiologically relevant superoxide radical anions as  $\alpha$ -tocopherol. The influence of the side chain of vitamin E forms to the antioxidant activity is discussed controversially.

In summary, the determination of the antioxidant activity of carotenoids showed the significant highest antioxidant activity for neurosporene (carotene) followed by astaxanthin and antheraxanthin (xanthophylls). The antioxidant activity of the carotenes increased with the number of conjugated double bonds in the polyene chain, except lycopene. Within xanthophylls, the antioxidative activity depended on the number of conjugated double bonds as well as on the position of the substitutes or functional groups.

Furthermore, the PCL method was not sensitive enough for lower concentrations, thus the concentration range has to be further optimized. In the PCL-cuvette-method, only one measurement per test time can be performed. For a high number of samples and a short measurement time, the cuvette-assay should be transferred to a microwell plate.

The lipophilic antioxidant capacity of different food extracts in the PCL assay can not be explained by the contents of carotenoids and vitamin E. Not detected antioxidants, for example vitamin A as well as herbs, spices or Maillard reaction products, might have an influence on the determination of lipophilic antioxidant capacity. In contrast, there was a significant correlation between the antioxidant capacity of tomato samples in the  $\alpha$ -TEAC assay and the contents of carotenoids. The antioxidant capacity depended on the extraction solvent ( $\alpha$ -TEAC: n-hexane, PCL: MeOH/THF (50/50, v/v)). The co-extraction of hydrophilic compounds in the PCL assay was possible. Vitamin E forms were not the main antioxidants in the vegetable oils measured by PCL- and  $\alpha$ -TEAC assay. Phytosterols, which are included in vegetable oils and wheat, might have an influence on the lipophilic antioxidant capacity. In addition, a dilution effect was observed in the PCL assay and in the  $\alpha$ -TEAC assay. The results of the antioxidant capacity were dependent on the sample concentrations used.



Interactions between antioxidants are probably a reason of the differences between the results of antioxidant capacity and the contents of vitamin E and carotenoids. A two-compound mixture of each  $\alpha$ -tocopherol, lycopene,  $\beta$ -carotene and lutein in different molar ratios (1:1, 1:2, 2:1) measured by PCL assay and  $\alpha$ -TEAC assay confirmed the interaction effects. In PCL assay, on the one hand antioxidants can be more effective in mixtures than as individual compounds, but on the other hand they can act antagonistically. In contrast, all combinations of antioxidants showed antagonistic effects in the  $\alpha$ -TEAC assay.

In summary, the influence of matrix compounds (glucose, fructose, sucrose and soluble starch) on the lipophilic antioxidant capacity measured by PCL assay and  $\alpha$ -TEAC assay depended on the extraction solvent. The better the solubility in the extraction solvent and the lower the concentration of sugar were, the higher was the lipophilic antioxidant capacity and thus the influence. A four-compound mixture of sugars showed synergistic effects. The sugar samples did not interact with antioxidants ( $\alpha$ -tocopherol, lycopene), with the exception of methanolic fructose extracts, which showed synergistic effects with  $\alpha$ -tocopherol. In conclusion, the polarity of the extraction solvent and the extracted matrix components significantly influenced the lipophilic antioxidant capacity.

Until now, no universal standard method exists to determine the antioxidant capacity. Therefore, the comparison of the antioxidant capacity results is difficult, because the methods are based on different reactions mechanisms, pH-dependency and solvents. But, the results give a first idea of the antioxidant potential of bioactive compounds and food.

Antioxidants in foods occur in different compositions. Without a complete knowledge of synergistic and antagonistic interactions between antioxidants and the food matrix, a separate analysis of each individual antioxidant is inefficient. Further investigations on the influence of interactions between antioxidants on absorption and metabolism are necessary.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abdel-Aal, E.-S., Akhtar, H., Zaheer, K. & Ali, R. (2013). Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 5(4), 1169-1185.
2. Abu-Shahin, F., Stone, W., Ramsauer, V. & Krishnan, K. (2013). A summary of the prostate cancer prevention trials with a focus on the role of vitamin E. *Home Health Care Management & Practice*, 25(1), 23-28.
3. Acosta-Estrada, B., Gutiérrez-Urbe, J. & Serna-Saldívar, S. (2014). Bound phenolics in foods- A review. *Food Chemistry*, 152(0), 46-55.
4. Adom, K., Sorrells, M. & Liu, R. (2005). Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2297-2306.
5. Agudo, A., Cabrera, L., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Berenguer, T. et al. (2007). Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(6), 1634-1642.
6. Ambati, R., Phang, S.-M., Ravi, S. & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications- A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128-152.
7. Amorim-Carrilho, K., Cepeda, A., Fente, C. & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56(0), 49-73.
8. Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K., Özyürek, M. & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure & Applied Chemistry*, 85(5).
9. Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 373-399.
10. Arnold, C., Winter, L., Fröhlich, K., Jentsch, S., Dawczynski, J., Jahreis, G. et al. (2013). Macular xanthophylls and  $\omega$ -3 long-chain polyunsaturated fatty acids in age-related macular degeneration: A randomized trial. *JAMA Ophthalmology*, 131(5), 564-572.
11. Arts, M., Haenen, G., Wilms, L., Beetstra, S., Heijnen, C., Voss, H.-P. et al. (2002). Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1184-1187.
12. Azhari, S., Xu, Y., Jiang, Q. & Xia, W. (2014). Physicochemical properties and chemical composition of Seinat (Cucumis melo var. tibish) seed oil and its antioxidant activity. *Grasas y Aceites*, 65(1), 8.
13. Azzi, A. & Stocker, A. (2000). Vitamin E: Non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*, 39(3), 231-255.
14. Bai, C., Rivera, S., Medina, V., Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. et al. (2014). An in vitro system for the rapid functional characterization of genes involved in carotenoid biosynthesis and accumulation. *The Plant Journal*, 77(3), 464-475.

15. Balogh, E., Hegedűs, A. & Stefanovits-Bányai, É. (2010). Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 332-336.
16. Baltes, W. & Matissek, R. (Hrsg.) (2011). Lebensmittelchemie. 7. vollständig überarbeitete Auflage. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*.
17. Baranska, M., Schütze, W. & Schulz, H. (2006). Determination of lycopene and  $\beta$ -carotene content in tomato fruits and related products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR spectroscopy. *Analytical chemistry*, 78(24), 8456-8461.
18. Barba, F., Esteve, M. & Frígola, A. (2011). Determination of vitamins E ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *European Food Research and Technology*, 232(5), 829-836.
19. Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. & Lago, G. (2007). Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 72(3), 896-913.
20. Bartel, C., Mesias, M. & Morales, F. J. (2015). Investigation on the extractability of melanoidins in portioned espresso coffee. *Food Research International*, 67(0), 356-365.
21. Barton, H. (2010). A "zero sample concentration approach": Standardization of methods for the estimation of total antioxidant activity by the use of extrapolation to zero sample concentration. A novel standard. 1. ABTS cation radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 8918-8926.
22. Bartosz, G. (2010). Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radical Research*, 44(7), 711-720.
23. Bauerfeind, J., Hesse, J., Killenberg, M. & Böhm, V. (2012). Comparison of antioxidant activities of carotenoids measured. *Annals of Nutrition and Metabolism* 60, 132.
24. Bauerfeind, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M. & Böhm, V. (2014). Use of photochemiluminescence for the determination of antioxidant activities of carotenoids and antioxidant capacities of selected tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30), 7452-7459.
25. Becker, E., Nissen, L. & Skibsted, L. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219(6), 561-571.
26. Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. (Hrsg.) (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 6. vollständig überarbeitete Auflage. *Springer Verlag Berlin*.
27. Bhattacharyya, S., Bakshi, R., Logan, R., Ascherio, A., Macklin, E. & Schwarzschild, M. (2014). Oral inosine persistently elevates plasma antioxidant capacity in early parkinson's disease. *Neurology*, 82(10 Supplement), S09-S037.
28. Bieger, W. (2001). Oxidativer Stress und Alter. *Der Urologe B*, 41(4), 344-350.
29. Bolling, B., Chen, Y.-Y., Kamil, A. & Oliver Chen, C. (2012). Assay dilution factors confound measures of total antioxidant capacity in polyphenol-rich juices. *Journal of Food Science*, 77(2), H69-H75.
30. Borel, P., Preveraud, D. & Desmarchelier, C. (2013). Bioavailability of vitamin E in humans: An update. *Nutrition Reviews*, 71(6), 319-331.

31. Bouchard, A., Hofland, G. & Witkamp, G.-J. (2007). Properties of sugar, polyol, and polysaccharide water-ethanol solutions. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 52(5), 1838-1842.
32. Brandt, U. (2014). Oxidoreduktasen und oxidativer Stress. In: Heinrich, P. C., Müller, M. & Graeve, L. (Hrsg.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. vollständig überarbeitete Auflage. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*, 252-254.
33. Brauner, R. (2013). Dissertation: Ein neuer Mechanismus der Cholesterolsenkung durch Phytosterole. *Ludwig-Maximilians-Universität München, München*.
34. Brennan, C., Brennan, M., Derbyshire, E. & Tiwari, B. (2011). Effects of extrusion on the polyphenols, vitamins and antioxidant activity of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 22(10), 570-575.
35. Brewer, M. (2011). Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.
36. Brigelius-Flohé, R. (2014). *Fettlösliche Vitamine*: In: Heinrich, P. C., Müller, M. & Graeve, L. (Hrsg.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. vollständig überarbeitete Auflage. *Springer Verlag Berlin Heidelberg*, 706-717.
37. Brigelius-Flohe, R. & Traber, M. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(10), 1145-1155.
38. Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(15), 1551-1558.
39. Burns, J., Fraser, P. & Bramley, P. (2003). Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 62(6), 939-947.
40. Burton, G. & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287-299.
41. Burton, G., Joyce, A. & Ingold, K. (1982). First proof that vitamin E is the major lipidsoluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet*, 2(8293), 327.
42. Caderby, E., Baumberger, S., Hoareau, W., Fargues, C., Decloux, M. & Maillard, M.-N. (2013). Sugar cane stillage: A potential source of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11494-11501.
43. Candy, C., Waisundara, V. & Hoon, L. (2013). Evaluation and characterization of antioxidant activity of selected herbs and spices. *Journal of Natural Remedies*, 13(2), 95-103.
44. Carochi, M. & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(0), 15-25.
45. Cazzonelli, C. (2011). Goldacre Review: Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*, 38(11), 833-847.

46. Çelik, S., Özyürek, M., Güçlü, K. & Apak, R. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, *81*(4), 1300-1309.
47. Chen, C., Ono, M., Takeshima, M. & Nakano, S. (2014). Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of nobiletin against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, *34*(4), 1785-1792.
48. Chen, S., Yan, G., Schwartz, M., Perrin, J. & Schulman, S. (1991). Penicillin-enhanced chemiluminescence of the luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Co<sup>2+</sup> system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *80*(11), 1017-1019.
49. Chohan, M., Naughton, D., Jones, L. & Opara, E. (2012). An investigation of the relationship between the anti-inflammatory activity, polyphenolic content, and antioxidant activities of cooked and in vitro digested culinary herbs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, 9.
50. Choudhari, S., Chaudhary, M., Gadbail, A., Sharma, A. & Tekade, S. (2014). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncology*, *50*(1), 10-18.
51. Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J. & Eitenmiller, R. R. (2006). Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(2-3), 196-204.
52. Clarkson, P. & Thompson, H. (2000). Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(2), 637s-646s.
53. Colombo, M. (2010). An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*, *15*(4), 2103-2113.
54. Conn, P., Schalch, W. & Truscott, T. (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *11*(1), 41-47.
55. Dapkevicius, A., van Beek, T., Niederländer, H. & de Groot, A. (1998). On-line detection of antioxidative activity in highperformance liquid chromatography eluates by chemiluminescence. *Analytical Chemistry*, *71*(3), 736-740.
56. Deming, D. & Erdman, J. (1999). Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure and Applied Chemistry*, *71*(12), 2213-2223.
57. Demirbas, A. (Hrsg.) (2008). Biodiesel-A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. *Springer Verlag London*.
58. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2004). Ernährungsbericht 2004.
59. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2008). Ernährungsbericht 2008.
60. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung & Schweizerische Vereinigung für Ernährung (Hrsg.) (2013). Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Volume 1, 5. Auflage, korrigierter Nachdruck. *Neuer Umschau Buchverlag Neustadt*.
61. Di Mascio, P., Kaiser, S. & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *274*(2), 532-538.

62. Dittrich, M., Jahreis, G., Bothor, K., Drechsel, C., Kiehntopf, M., Blüher, M. et al. (2014). Benefits of foods supplemented with vegetable oils rich in  $\alpha$ -linolenic, stearidonic or docosahexaenoic acid in hypertriglyceridemic subjects: A double-blind, randomized, controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 1-13.
63. Dodeigne, C., Thunus, L. & Lejeune, R. (2000). Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta*, 51(3), 415-439.
64. Dong, L.-Y., Jin, J., Lu, G. & Kang, X.-L. (2013). Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress. *Marine Drugs*, 11(3), 960-974.
65. During, A., Dawson, H. & Harrison, E. (2005). Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *The Journal of Nutrition*, 135(10), 2305-2312.
66. Edge, R., Mc Garvey, D. & Truscott, T. (1997). The carotenoids as antioxidants- A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 41(3), 189-200.
67. Eichenberger, B., Pfirter, H., Wenk, C. & Gebert, S. (2004). Influence of dietary vitamin E and C supplementation on vitamin E and C content and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in different tissues of growing pigs. *Archives of animal nutrition*, 58(3), 195-208.
68. El-Agamey, A., Lowe, G., Mc Garvey, D., Mortensen, A., Phillip, D., Truscott, T. et al. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/prooxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 37-48.
69. El-Agamey, A. & McGarvey, D. J. (2008). Carotenoid Radicals and Radical Ions. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. (Hrsg.), *Carotenoids-Natural functions*, Volume 4. *Birkhauser Verlag Basel*, 119-154.
70. Eldahshan, O. (2013). Carotenoids: A review. *Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals*, 3(1), 345-352.
71. Elmadfa, I. & Wagner, K. (1997). Vitamin E und Haltbarkeit von Pflanzenölen. *Lipid/Fett*, 99(7), 234-238.
72. European Food Safety Authority (2006). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. online erhältlich unter <http://www.efsa.europa.eu/de/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf>, abgerufen am: 20.01.2015.
73. Fares, C., Platani, C., Baiano, A. & Menga, V. (2010). Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. *Food Chemistry*, 119(3), 1023-1029.
74. Ferland, G., & Sadowski, J. (1992). Vitamin K1 (phyloquinone) content of edible oils: effects of heating and light exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1869-1873.
75. Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A. & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2), 438-450.

76. Fiedor, J. & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488.
77. Fraga, C., Oteiza, P. & Galleano, M. (2014). In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(2), 931-934.
78. Franke, S., Fröhlich, K., Werner, S., Böhm, V. & Schöne, F. (2010). Analysis of carotenoids and vitamin E in selected oilseeds, press cakes and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(10), 1122-1129.
79. Frankel, E. & Meyer, A. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
80. Fröhlich, K. (2007). Dissertation: Lycopin-Isomere in Lebensmitteln und Humanplasma - Strukturaufklärung, antioxidative Aktivität, Gehalte und relative (E)-(Z)-Verhältnisse. *Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena*.
81. Fröhlich, K., Burkhardt, S. & Böhm, V. (2005). Bioactive compounds in tomatoes and tomato products - investigations of different commercially available foodstuffs. In: Schubert, R., Flachowsky, G., Jahreis, G., Bitsch, R. (Hrsg.), *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig*, 240-243.
82. Fuhrman, B., Volkova, N., Rosenblat, M. & Aviram, M. (2000). Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2(3), 491-506.
83. Gama, J., Tadiotti, A. & Sylos, C. (2009). Comparison of carotenoid content in tomato, tomato pulp and ketchup by liquid chromatography. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 17(4), 353-358.
84. García-Campaña, A. & Baeyens, W. (2000). Principles and recent analytical applications of chemiluminescence. *Analysis*, 28(8), 686-698.
85. Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari, S. & Curini, R. (2012). Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS Hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1628-1639.
86. Gitto, E., Tan, D.-X., Reiter, R., Karbownik, M., Manchester, L., Cuzzocrea, S. et al. (2001). Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(10), 1393-1401.
87. Goncalves, A., Roi, S., Nowicki, M., Dhaussy, A., Huertas, A., Amiot, M.-J. et al. (2015). Fat-soluble vitamin intestinal absorption: Absorption sites in the intestine and interactions for absorption. *Food Chemistry*, 172(0), 155-160.
88. Granado-Lorencio, F., Lagarda, M., Garcia-López, F., Sánchez-Siles, L., Blanco-Navarro, I., Alegría, A. et al. (2014). Effect of  $\beta$ -cryptoxanthin plus phytosterols on cardiovascular risk and bone turnover markers in post-menopausal women: A randomized crossover trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(10), 1090-1096.

89. Grune, T. (2014). Oxidativer Stress während der Alterung. In: Grune, T. (Hrsg.), *Alterungsprozesse und Neurodegeneration. Springer Fachmedien Verlag Wiesbaden*, 11-17.
90. Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research*, 9(1), 1-32.
91. Hengst, C., Werner, S., Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V. (2009). Determination of the antioxidant capacity: Influence of the sample concentration on the measured values. *European Food Research and Technology*, 230(2), 249-254.
92. Henry, L., Catignani, G. & Schwartz, S. (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-*cis* and *all-trans*  $\beta$ -carotene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(7), 823-829.
93. Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M., Böhm, V. & Bitsch, R. (2002). Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6663-6668.
94. Herting, D. & Drury, E.-J. (1969). Vitamin E content of milk, milk products, and simulated milks: Relevance to infant nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 22(2), 147-155.
95. Hiramatsu, M. & Packer, L. (1990). Antioxidant activity of retinoids. *Methods in Enzymology*, 190, 273-280.
96. Horn, J. (2011). Diplomarbeit: Anwendung verschiedener Testsysteme zur Bestimmung der lipophilen antioxidativen Kapazität auf ausgewählte Lebensmittel und Kosmetika. *Friedrich-Schiller-Universität-Jena, Jena*.
97. Huang, D., Ou, B. & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
98. Hwang, E.-S., Stacewicz-Sapuntzakis, M. & Bowen, P. (2012). Effects of heat treatment on the carotenoid and tocopherol composition of tomato. *Journal of Food Science*, 77(10), C1109-C1114.
99. Iino, M., Kozai, Y., Kawamata, R., Wakao, H., Sakurai, T. & Kashima, I. (2014). Effects of  $\beta$ -cryptoxanthin on bone formation parameters in the distal femoral epiphysis of ovariectomized mice. *Oral Radiology*, 30(1), 1-8.
100. Ikram, E., Eng, K., Jalil, A., Ismail, A., Idris, S., Azlan, A. et al. (2009). Antioxidant capacity and total phenolic content of Malaysian underutilized fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(5), 388-393.
101. Im, S., Nam, T., Lee, S., Kim, Y., Chun, O. & Kim, D. (2014). Additive antioxidant capacity of vitamin C and tocopherols in combination. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 693-699.
102. Iwamoto, T., Hosoda, K., Hirano, R., Kurata, H., Matsumoto, A., Miki, W. et al. (1999). Inhibition of low density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 7(4), 216-222.
103. Iwatsuki, M., Tsuchiya, J., Komuro, E., Yamamoto, Y. & Niki, E. (1994). Effects of solvents and media on the antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1200(1), 19-26.



104. Jabeen, R., Bhat, S. & Wani, A. (2013). Functions and stability of lycopene: A review. *Indian Horticulture Journal*, 3(3and4), 57-63.
105. Jeanes, Y., Hall, W., Ellard, S., Lee, E. & Lodge, J. (2004). The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. *British Journal of Nutrition*, 92(4), 575-579.
106. Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 72(0), 76-90.
107. Jimenez, P., Cabrero, P., Basterrechea, J., Tejero, J., Cordoba-Diaz, D., Cordoba-Diaz, M. et al. (2014). Effects of short-term heating on total polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(2), 168-174.
108. Johnson, E. (2014). Role of lutein and zeaxanthin in visual and cognitive function throughout the lifespan. *Nutrition Reviews*, 72(9), 605-612.
109. Kamal-Eldin, A. & Appelqvist, L.-A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701.
110. Kanabur, V. & Reddy, R. (2014). Bioactive components of spinach and their effect on some patho physiological conditions: A review. *International Journal of Current Research and Review*, 6(9), 156-166.
111. Karaçelik, A., Küçük, M., İskefiyeli, Z., Aydemir, S., De Smet, S., Miserez, B. et al. (2015). Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods. *Food Chemistry*, 175(0), 106-114.
112. Karajibani, M., Hashemi, M., Montazerifar, F., Bolouri, A. & Dikshit, M. (2009). The status of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, vitamins A, C, E and malondialdehyde in patients with cardiovascular disease in Zahedan, Southeast Iran. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 55(4), 309-316.
113. Kazemi, S. & Abedirad, S. (2014). Effect of glutathione on peroxyoxalate chemiluminescence of hypericin as the fluorophore. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118(0), 782-786.
114. Kerscher, M. & Buntrock, H. (2011). Update in der dermatologischen Kosmetik. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9(4), 314-328.
115. Khoo, H.-E., Prasad, K. N., Kong, K.-W., Jiang, Y. & Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers: Color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*, 16(2), 1710-1738.
116. Köhler, A., Sag, C. & Maier, L. (2014). Reactive oxygen species and excitation contraction coupling in the context of cardiac pathology. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73(0), 92-102.
117. Kopec, R., Cooperstone, J., Schweiggert, R., Young, G., Harrison, E., Francis, D. et al. (2014). Avocado consumption enhances human postprandial provitamin A absorption and conversion from a novel high- $\beta$ -carotene tomato sauce and from carrots. *The Journal of Nutrition*, 113, in Druck.
118. Kornsteiner, M., Wagner, K.-H. & Elmadfa, I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 98(2), 381-387.

119. Kotíková, Z., Lachman, J., Hejtmánková, A. & Hejtmánková, K. (2011). Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1703-1710.
120. Kranl, K., Schlesier, K., Bitsch, R., Hermann, H., Rohe, M. & Böhm, V. (2005). Comparing antioxidative food additives and secondary plant products - use of different assays. *Food Chemistry*, 93(1), 171-175.
121. Krinsky, N. & Johnson, E. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459-516.
122. Krist, S., Buchbauer, G. & Klausberger, C. (2008). Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle. *Springer Verlag Wien New York*.
123. Laguerre, M., Lecomte, J. & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46(5), 244-282.
124. Lakshminarayana, R. & Baskaran, V. (2013). Influence of olive oil on carotenoids bioavailability - A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(10), 1085-1093
125. Lee, E., Nomura, N., Patil, B. & Yoo, K. (2014). Measurement of total phenolic content in wine using an automatic Folin-Ciocalteu assay method. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(11), 2364-2372.
126. Lee, M. & Chen, B. (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*, 78(4), 425-432.
127. Lemmens, L., Colle, I., van Buggenhout, S., Palmero, P., van Loey, A. & Hendrickx, M. (2014). Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro) structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 38(2), 125–135
128. Leth, T. & Søndergaard, H. (1977). Biological activity of vitamin E compounds and natural materials by the resorption-gestation test, and chemical determination of the vitamin E activity in foods and feeds. *The Journal of Nutrition*, 107(12), 2236-2243.
129. Liangli, L. (Hrsg.) (2008). Wheat antioxidants. *John Wiley & Sons, New Jersey*.
130. Limsuwanmanee, J., Chaijan, M., Manurakchinakorn, S., Panpipat, W., Klomklao, S. & Benjakul, S. (2014). Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from stingray (*Himantura signifier*) non-protein nitrogenous fraction and sugar model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 57(2), 718-724.
131. Liu, C., Liu, W., Chen, W., Yang, J. & Zheng, L. (2015). Feasibility in multispectral imaging for predicting the content of bioactive compounds in intact tomato fruit. *Food Chemistry*, 173(0), 482-488.
132. Liu, D., Shi, J., Colina Ibarra, A., Kakuda, Y. & Jun Xue, S. (2008). The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1344-1349.
133. Liu, R. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46(3), 207-219.

134. López-Alarcón, C. & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763(0), 1-10.
135. Lu, Q.-Y., Arteaga, J., Zhang, Q., Huerta, S., Go, V. & Heber, D. (2005). Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: Role of lipid-soluble bioactive substances. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(1), 23-30.
136. Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R. & Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological Chemistry*, 395(2), 203-230.
137. Magalhães, L., Santos, F., Segundo, M., Reis, S. & Lima, J. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441-447.
138. Magalhães, L., Segundo, M., Reis & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
139. Maiani, G., Periago Castón, M., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I., Bysted, A. et al. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S194-S218.
140. Mandal, R., Badyakar, D. & Chakrabarty, J. (2014). Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Advances in Andrology*, 2014, 1-9.
141. Medina-Meza, I., Barnaba, C. & Barbosa-Cánovas, G. (2014). Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22(0), 1-10.
142. Meineri, G., Medana, C., Giancotti, V., Visentin, S. & Peiretti, P. (2013). Effect of dietary supplementation of vitamin E in pigs to prevent the formation of carcinogenic substances in meat products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), 67-72.
143. Meléndez-Martínez, A., Britton, G., Vicario, I. & Heredia, F. (2007). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, 101(3), 1145-1150.
144. Merényi, G., Lind, J. & Eriksen, T. (1990). Luminol chemiluminescence: Chemistry, excitation, emitter. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 5(1), 53-56.
145. Merk, H. (1987). Die Bedeutung der Sauerstoff-Metaboliten für die Entzündungsreaktion. In: Holzmann, H., Altmeyer, P., Marsch, C. M. & Vogel, G. (Hrsg.), *Dermatologie und Rheuma*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 51-56.
146. Michiels, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986-993.
147. Miller, E., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R., Appel, L. & Guallar, E. (2005). Meta-analysis: High-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*, 142(1), 37-46.
148. Miller, N., Sampson, J., Candeias, L., Bramley, P. & Rice-Evans, C. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384(3), 240-242.

149. Miraliakbari, H. & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 111(2), 421-427.
150. Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Malavolta, M., Basso, A., Piacenza, F. et al. (2014). Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. *Ageing Research Reviews*, 14(0), 81-101.
151. Monge-Rojas, R. & Campos, H. (2011). Tocopherol and carotenoid content of foods commonly consumed in Costa Rica. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 202-216.
152. Montañés, F., Olano, A., Ibáñez, E. & Fornari, T. (2007). Modeling solubilities of sugars in alcohols based on original experimental data. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 53(9), 2411-2418.
153. Mori, T. (2014). Dietary n-3 PUFA and CVD: A review of the evidence. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(01), 57-64.
154. Müller, L. (2011). Dissertation: Optimierung von Methoden zur Ermittlung der lipophilen antioxidativen Aktivität und deren Anwendung auf Lycopin-Isomere und Lycopin-Abbauprodukte. *Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena*.
155. Müller, L., Fröhlich, K. & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139-148.
156. Müller, L., Goupy, P., Fröhlich, K., Dangles, O., Caris-Veyrat, C. & Böhm, V. (2011). Comparative study on antioxidant activity of lycopene (Z)-isomers in different assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4504-4511.
157. 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. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(5), 731-742.
158. Navas, M. & Jiménez, A. (1996). Review of chemiluminescent methods in food analysis. *Food Chemistry*, 55(1), 7-15.
159. Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503-515.
160. Niki, E. (2014a). Antioxidants: Basic principles, emerging concepts, and problems. *Biomedical Journal*, 37(3), 106-111.
161. Niki, E. (2014b). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: In vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 3-12.
162. Niki, E. & Traber, M. (2012). A History of Vitamin E. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(3), 207-212.
163. Nogala-Kałużka, M., Dwiecki, K., Siger, A., Górnaś, P., Polewski, K. & Ciosek, S. (2013). Antioxidant synergism and antagonism between tocotrienols, quercetin and rutin in model system. *Acta Alimentaria*, 42(3), 360-370.

164. Noguera, M., Cerezo, A., Moyá, M., Troncoso, A. & García-Parrilla, M. (2014). Synergism effect between phenolic metabolites and endogenous antioxidants in terms of antioxidant activity. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 4(02), 258.
165. Ogawa, A., Arai, H., Tanizawa, H. & Miyahara, T. (1999). On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 383(3), 221-230.
166. Okarter, N., Liu, C.-S., Sorrells, M. & Liu, R. (2010). Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chemistry*, 119(1), 249-257.
167. Ou, B., Hampsch-Woodill, M. & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
168. Ozgen, M., Reese, R., Tulio, A., Scheerens, J. & Miller, A. (2006). Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1151-1157.
169. Packer, L., Weber, S. & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of  $\alpha$ -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *The Journal of Nutrition*, 131(2), 369S-373S.
170. Palozza, P. & Krinsky, N. (1992).  $\beta$ -Carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 297(1), 184-187.
171. Pantavos, A., Ruiters, R., Feskens, E., de Keyser, C., Hofman, A., Stricker, B. et al. (2014). Total dietary antioxidant capacity, individual antioxidant intake and breast cancer risk: The Rotterdam study. *International Journal of Cancer*, in Druck.
172. Papadopoulou, K., Triantis, T., Yannakopoulou, E., Nikokavoura, A. & Dimotikali, D. (2003). Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, 494(1), 41-47.
173. Parada, J. & Aguilera, J. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21-R32.
174. Park, J., Mathison, B., Hayek, M., Zhang, J., Reinhart, G. & Chew, B. (2013). Astaxanthin modulates age-associated mitochondrial dysfunction in healthy dogs. *Journal of Animal Science*, 91(1), 268-275.
175. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. et al. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819.
176. Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M. & Brighenti, F. (2006). Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(11), 1030-1038.
177. Peyrat-Maillard, M., Cuvelier, M. & Berset, C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(10), 1007-1012.

178. Pfluger, P. (2007). Dissertation: Der Metabolismus der Tocopherole und Tocotrienole. *Universität Potsdam, Potsdam*.
179. Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. & Ferreira, I. (2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum*.) farmer'varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3), 829-834.
180. Pischetsrieder, M., Rinaldi, F., Gross, U. & Severin, T. (1998). Assessment of the antioxidative and prooxidative activities of two aminoreductones formed during the maillard reaction: effects on the oxidation of  $\beta$ -carotene, N $\alpha$ -acetylhistidine, and cis-alkenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2945-2950.
181. Pogačnik, L. & Ulrih, N. (2012). Application of optimized chemiluminescence assay for determination of the antioxidant capacity of herbal extracts. *Luminescence*, 27(6), 505-510.
182. Popescu, S., Furdi, F., Andronescu, A., Bordean, D., Velcirov, A., Velicevici, G. et al. (2013). Biochemical variability in several tomato varieties fruits. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 17(2), 386-388.
183. Popov, I. & Lewin, G. (1994). Photochemiluminescent detection of antiradical activity: II. Testing of nonenzymic water-soluble antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(3), 267-271.
184. Popov, I. & Lewin, G. (1996). Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: Testing of lipid-soluble antioxidants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 31(1), 1-8.
185. Popov, I. & Lewin, G. (2005). Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VII. Comparison with a modified method of thermo-initiated free radical generation with chemiluminescent detection. *Luminescence*, 20(4-5), 321-325.
186. Prieto, M., Murado, M. & Vázquez, J. (2014). Quantification, characterization and description of synergy and antagonism in the antioxidant response. *Food Research International*, 60, 218-229.
187. Prior, R. & Wu, X. (2013). Diet antioxidant capacity: Relationships to oxidative stress and health. *American Journal of Biomedical Sciences*, 5(2), 126-139.
188. Prior, R., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
189. Pulido, R., Hernandez-Garcia, M. & Saura-Calixto, F. (2003). Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(10), 1275-1282.
190. Rao, A. & Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207-216.
191. Rao, A., Sindhuja, H., Dharmesh, S., Sankar, K., Sarada, R. & Ravishankar, G. (2013). Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3842-3851.

192. Rashid, A. (2014). Nutrition in cancer: Evidence-based nutrition recommendations in cancer patients and survivors. In: Sudhakaran, P., Oommen, O. & Radhakrishna Pillai, M. (Hrsg.), Perspectives in Cancer Prevention-Translational Cancer Research. *Springer Verlag India*, 1-7.
193. Reboul, E. & Borel, P. (2011). Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Progress in Lipid Research*, 50(4), 388-402.
194. Rehner, G. & Daniel, H. (Hrsg.) (2010). Biochemie der Ernährung. 3. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*.
195. Rice-Evans, C., Miller, N. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
196. Rodriguez-Amaya, D. (1999). Latin American food sources of carotenoids. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49(3 Suppl 1), 74S-84S.
197. Rodriguez-Amaya, D. (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids- A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726-740.
198. Rodríguez-Roque, M., Rojas-Graü, M., Elez-Martínez, P. & Martín-Belloso, O. (2014). In vitro bioaccessibility of health-related compounds from a blended fruit juice-soymilk beverage: Influence of the food matrix. *Journal of Functional Foods*, 7(0), 161-169.
199. Rymbai, H., Sharma, R. & Srivastav, M. (2011). Biocolorants and its implications in health and food industry-A review. *International Journal of Pharm Tech Research*, 3(4), 2228-2244.
200. Sahin, N., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, K. & Kucuk, O. (2008). The effects of tomato powder supplementation on performance and lipid peroxidation in quail. *Poultry Science*, 87(2), 276-283.
201. Santa Cruz Biotechnologie (2014). online erhältlich unter <http://www.scbio.de/datasheet-204311-sucrose.html>, abgerufen am 29.10.2014.
202. Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. & Toth-Markus, M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38(8-9), 1023-1029.
203. Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V. & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.
204. Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(1), 7-30.
205. Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V. & Lampi, A.-M. (2008). Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), 152-161.
206. Schweigert, F. (1998). Metabolism of carotenoids in mammals. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. (Hrsg.), Carotenoids- Biosynthesis and Metabolism, Volume 3. *Birkhäuser Verlag Basel*, 249-284.

207. Seifried, H., Anderson, D., Fisher, E. & Milner, J. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567-579.
208. Serbinova, E., Tsuchiya, M., Goth, S., Kagan, V. & Packer, L. (1992). Antioxidant action of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol in membranes. *Vitamin E in health and disease*, 235-246.
209. Serpen, A., Gökmen, V. & Fogliano, V. (2012). Solvent effects on total antioxidant capacity of foods measured by direct quencher procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1), 52-57.
210. Shakir, R., Ariffin, A. & Abdulla, M. (2014). Synthesis of new 2, 5-di-substituted 1, 3, 4-oxadiazoles bearing 2, 6-di-tert-butylphenol moieties and evaluation of their antioxidant activity. *Molecules*, 19(3), 3436-3449.
211. Shalaby, A. & Shanab, S. (2013). Antiradical and antioxidant activities of different spirulina platensis extracts against DPPH and ABTS radical assays. *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 2(1), 1-8.
212. Shekelle, P., Morton, S., Jungvig, L., Udani, J., Spar, M., Tu, W. et al. (2004). Effect of supplemental vitamin E for the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Journal of General Internal Medicine*, 19(4), 380-389.
213. Shi, J. & Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 1-42.
214. Shi, J., Qu, Q., Kakuda, Y., Xue, S., Jiang, Y., Koide, S. et al. (2007). Investigation of the antioxidant and synergistic activity of lycopene and other natural antioxidants using LAME and AMVN model systems. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 603-608.
215. Shils, M., Shike, M., Ross, A., Caballero, B. & Cousins, R. (Hrsg.) (2006). Modern nutrition in health and disease. *Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore*.
216. Sielicka, M., Małacka, M. & Purłan, M. (2014). Comparison of the antioxidant capacity of lipid-soluble compounds in selected cold-pressed oils using photochemiluminescence assay (PCL) and DPPH method. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(4), 388-394.
217. Sies, H. (1986). Biochemie des oxidativen Stress. *Angewandte Chemie*, 98(12), 1061-1075.
218. Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S31-S38.
219. Singh, V., Beattie, L. & Seed, T. (2013). Vitamin E: Tocopherols and tocotrienols as potential radiation countermeasures. *Journal of Radiation Research*, 54(6), 973-988.
220. Sipel, A., Kevers, C., Pincemail, J., Grygiel, P.-G., Defraigne, J.-O. & Dommes, J. (2013). Sample dilution influences the determination of antioxidant capacity in food: How to minimize it? *Food Analytical Methods*, 6(5), 1485-1491.
221. Skřivan, M., Bubancová, I., Marounek, M. & Dlouhá, G. (2010). Selenium and  $\alpha$ -tocopherol content in eggs produced by hens that were fed diets supplemented with selenomethionine, sodium selenite and vitamin E. *Czech Journal of Animal Science*, 55(9), 388-397.



222. Slover, H. (1971). Tocopherols in foods and fats. *Lipids*, 6(5), 291-296.
223. Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. & Leonart, M. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 376-390.
224. Speek, A., Schrijver, J. & Schreurs, W. (1985). Vitamin E composition of some seed oils as determined by highperformance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Food Science*, 50(1), 121-124.
225. Stahl, W., Junghans, A., de Boer, B., Driomina, E., Briviba, K. & Sies, H. (1998). Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: Synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Letters*, 427(2), 305-308.
226. Stahl, W. & Sies, H. (1996). Lycopene: A biologically important carotenoid for humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 1-9.
227. Stahl, W. & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.
228. Statistisches Bundesamt (2013). online erhältlich unter <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html#Tabellen>, abgerufen am 18.12.2014.
229. Stelmach-Mardas, M. & Przystawski, J. (2013). Klinische Aspekte der Verwendung von Phytosterolen in der Ernährung des Menschen. *Forschende Komplementärmedizin/ Research in Complementary Medicine*, 20(3), 213-218.
230. Stratil, P., Klejdus, B. & Kubáň, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71(4), 1741-1751.
231. Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.-O. & Dommès, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4), 1226-1233.
232. Taghvaei, M. & Jafari, S. (2013). Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of Food Science and Technology*, 1-11.
233. Tapiero, H., Townsend, D. & Tew, K. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(2), 100-110.
234. Tasan, M. & Demirci, M. (2005). Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 251-254.
235. The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New England Journal of Medicine*, 330(15), 1029-1035.
236. Ting, H., Deep, G., Agarwal, C. & Agarwal, R. (2014). The strategies to control prostate cancer by chemoprevention approaches. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 760, 1-15.
237. Traber, M. (2007). Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, 27(1), 347-362.
238. Traber, M. (2013). Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2295-2306.

239. Umesawa, M., Iso, H., Mikami, K., Kubo, T., Suzuki, K., Watanabe, Y. et al. (2014). Relationship between vegetable and carotene intake and risk of prostate cancer: The JACC study. *British Journal of Cancer*, *110*(3), 792-796.
240. Udilova, N. (1999). Dissertation: Vergleichende Untersuchungen von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen. *Humboldt-Universität Berlin, Berlin*.
241. Upadhyay, R. & Mishra, H. (2014). Antioxidant activity measurement of oleoresin from rosemary and sage. *Industrial Crops and Products*, *61*, 453-459.
242. Utomo, R., Chang, Y.-R., Lee, D.-J. & Chang, J.-S. (2013). Lutein recovery from *Chlorella* sp. ESP-6 with coagulants. *Bioresource Technology*, *139*(0), 176-180.
243. Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Casals-Ribes, I., Andres-Lacueva, C., Waterhouse, A. & Lamuela-Raventos, R. (2012). Effect of tomato industrial processing on phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, *47*(1), 154-160.
244. van den Berg, R., Haenen, G., van den Berg, H. & Bast, A. (1999). Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, *66*(4), 511-517.
245. van het Hof, K., West, C., Weststrate, J. & Hautvast, J. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *The Journal of Nutrition*, *130*(3), 503-506.
246. van Loo-Bouwman, C., Naber, T., Minekus, M., van Breemen, R., Hulshof, P. & Schaafsma, G. (2014). Food matrix effects on bioaccessibility of  $\beta$ -carotene can be measured in an in vitro gastrointestinal model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(4), 950-955.
247. Vardi, M., Levy, N. & Levy, A. (2013). Vitamin E in the prevention of cardiovascular disease- the importance of proper patient selection. *Journal of Lipid Research*. *54*, 2307-2314
248. Villaño, D., Fernández-Pachón, M., Troncoso, A. & García-Parrilla, M. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS+ method: Influence of sample dilution and time. *Talanta*, *64*(2), 501-509.
249. Virtamo, J., Taylor, P., Kontto, J., Männistö, S., Utriainen, M., Weinstein, S. et al. (2014). Effects of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene supplementation on cancer incidence and mortality: 18-Year postintervention follow-up of the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *International Journal of Cancer*, *135*(1), 178-185.
250. Wallert, M. (2014). Dissertation: Regulation of non-antioxidative and inflammatory pathways in macrophages by long-chain metabolites of  $\alpha$ -tocopherol. *Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena*.
251. Wallert, M., Schmölz, L., Galli, F., Birringer, M. & Lorkowski, S. (2014). Regulatory metabolites of vitamin E and their putative relevance for atherogenesis. *Redox Biology*, *2*, 495-503.
252. Wang, L., Li, B., Pan, M.-X., Mo, X.-F., Chen, Y.-M. & Zhang, C.-X. (2014). Specific carotenoid intake is inversely associated with the risk of breast cancer among Chinese women. *British Journal of Nutrition*, *111*(09), 1686-1695.

253. Wang, S., Meckling, K., Marcone, M., Kakuda, Y. & Tsao, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 960-968.
254. Watzl, B. & Bub, A. (2001). Carotinoide. *Ernährungs-Umschau*, 48, Heft 2, 71-74.
255. Werner, S. (2010). Dissertation: Carotinoide und Vitamin E in Hartweizen und daraus hergestellten Teigwaren- analytische, technologische und ernährungsphysiologische Aspekte. *Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena*.
256. Werner, S. & Böhm, V. (2011). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: Evaluation of an in vitro digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1163-1170.
257. Westphal, A., Bauerfeind, J., Rohrer, C., Ernawita & Böhm, V. (2014). Analytical characterisation of the seeds of two tomato varieties as a basis for recycling of waste materials in the food industry. *European Food Research and Technology*, 1-8.
258. Wilken, H. (2003). Dissertation: Endotoxin-Status und Antioxidative Kapazität sowie ausgewählte Stoffwechselfparameter bei gesunden Milch-und Mutterkühen. *Universität Leipzig, Leipzig*.
259. Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S. & Prior, R. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026-4037.
260. Xin, X., Fan, R., Gong, Y., Yuan, F. & Gao, Y. (2014). On-line HPLC-ABTS•+ evaluation and HPLC-MS identification of bioactive compounds in hot pepper peel residues. *European Food Research and Technology*, 238(5), 837-844.
261. Yan, R., Cao, Y. & Yang, B. (2014). HPLC-DPPH screening method for evaluation of antioxidant compounds extracted from Semen Oroxyli. *Molecules*, 19(4), 4409-4417.
262. Yoshida, Y., Niki, E. & Noguchi, N. (2003). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: Chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*, 123(1), 63-75.
263. Zanfini, A., Corbini, G., La Rosa, C. & Dreassi, E. (2010). Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT - Food Science and Technology*, 43(1), 67-72.
264. Zhou, K. & Yu, L. (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 717-721.
265. Zu, K., Mucci, L., Rosner, B., Clinton, S., Loda, M., Stampfer, M. et al. (2014). Dietary lycopene, angiogenesis, and prostate cancer: A prospective study in the prostate-specific antigen era. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(2), djt430.

## A Wissenschaftliche Publikationen

- **Publikationen**

**Karmowski, J.,** Enke, K., Killenberg, M., Böhm, V.: Interactions between lipophilic antioxidants measured by PCL and  $\alpha$ -TEAC as well as the influence of matrix compounds on the lipophilic antioxidant capacity. *LWT- Food Science and Technology*, eingereicht am: 19.01.2015.

**Karmowski, J.,** Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2015): Antioxidant activities of tocopherols/tocotrienols and lipophilic antioxidant capacity of wheat, vegetable oils, milk and milk cream by using photochemiluminescence. *Food Chemistry*, 175, 593-600.

**Bauerfeind, J.,** Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., & Böhm, V. (2014): Use of Photochemiluminescence for the Determination of Antioxidant Activities of Carotenoids and Antioxidant Capacities of Selected Tomato Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30), 7452-7459.

Westphal, A., **Bauerfeind, J.,** Rohrer, C., Ernowita, Böhm, V. (2014): Analytical characterization of the seeds of two tomato varieties as a basis for recycling of waste materials in the food industry. *European Food Research and Technology*, 1-8.

Endo, S., **Bauerfeind, J.,** Goss, K. U. (2012): Partitioning of neutral organic compounds to structural proteins. *Environmental Science & Technology*, 46(22), 12697-12703.

- **Poster**

**Karmowski, J.,** Killenberg, M., Böhm, V. (2014): Untersuchungen auf Interaktionen zwischen ausgewählten antioxidativ wirksamen Substanzen im Photochemolumineszenz-System und im  $\alpha$ -TEAC-Test. „43. Deutscher Lebensmittelchemikertag“, Gießen, 22.-24.09.2014.

**Bauerfeind, J.,** Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2014): Using photochemiluminescence to measure the lipophilic antioxidant capacities of carotenoid rich food products. „17th International Carotenoid Symposium“, Park City, Utah (USA), 29.06.-04.07.2014.

**Bauerfeind, J.,** Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2014): Photochemolumineszenz-Methode zur Bestimmung der lipophilen antioxidativen Kapazitäten von verschiedenen Tomatenprodukten. „51. Wissenschaftlicher Kongress der DGE“, Paderborn, 12.-14.03.2014.

**Bauerfeind J., Pataki B., Killenberg M., Böhm V. (2013):** Untersuchungen von verschiedenen Weizensorten auf antioxidative Kapazität mittels Photochemolumineszenz-Methode. „42. Deutscher Lebensmittelchemikertag“, Braunschweig, 16. - 18.09.2013.

**Bauerfeind J., Pataki B., Killenberg M., Böhm V. (2012):** Bestimmung des antioxidativen Potentials von Pflanzenölen und Tocopherolen/Tocotrienolen mittels Photochemolumineszenz-Methode. „41. Deutscher Lebensmittelchemikertag“, Münster, 10. - 12.09.2012.

**Bauerfeind, J., Hesse, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2012):** Comparison of antioxidant activities of carotenoids measured by photochemiluminescence. “15th International Meeting on Fat Soluble Vitamins”, Kalabaka (Griechenland), 22.03.-24.03.2012.

- **Vorträge bei wissenschaftlichen Tagungen**

Westphal, A., **Bauerfeind, J.**, Rohrer, C., Ernowita, Böhm, V. (2014): Analytische Charakterisierung von Samen zweier Tomatensorten als Basis einer möglichen Reststoffverwertung in der Lebensmittelindustrie. „51. Wissenschaftlicher Kongress der DGE“, Paderborn, 12.-14.03.2014 .

**Bauerfeind, J., Hesse, J. Killenberg, M., Böhm, V. (2012):** Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Carotinoiden mit einer Photo-chemolumineszenz-Methode. „22. Gemeinsame Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost und Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG)“, Jena, 29.-30.03.2012.

- **Konferenzbeiträge**

**Karmowski, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2014):** Untersuchungen auf Interaktionen zwischen ausgewählten antioxidativ wirksamen Substanzen im Photochemolumineszenz-System und im  $\alpha$ -TEAC-Test. *Kurzreferate-Band „43. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2014“*, Gießen, 22.-24.09.2014.

**Bauerfeind, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2014):** Using photochemiluminescence to measure the lipophilic antioxidant capacities of carotenoid rich food products. *Carotenoid Sci.* 18 (2014) 85.

**Bauerfeind, J., Hintze, V., Kschonsek, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2014):** Photochemolumineszenz-Methode zur Bestimmung der lipophilen antioxidativen Kapazitäten von verschiedenen Tomatenprodukten. *Proceedings of the German Nutrition Society* 19 (2014) 8., Paderborn, 12.-14. März 2014.

Westphal, A., **Bauerfeind, J.**, Rohrer, C., Ernawita, Böhm, V. (2014): Analytische Charakterisierung von Samen zweier Tomatensorten als Basis einer möglichen Reststoffverwertung in der Lebensmittelindustrie. *Proceedings of the German Nutrition Society* 19 (2014) 8.

**Bauerfeind J.**, Pataki B., Killenberg M., Böhm V. (2013): Untersuchungen von verschiedenen Weizensorten auf antioxidative Kapazität mittels Photochemolumineszenz-Methode. „Kurzreferate-band: „42. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2013“, Braunschweig, 16. - 18.09.2013.

**Bauerfeind J.**, Pataki B., Killenberg M., Böhm V. (2012): Bestimmung des antioxidativen Potentials von Pflanzenölen und Tocopherolen/Tocotrienolen mittels Photochemolumineszenz-Methode. *Kurzreferate-band: „41. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2012“, Münster, 10. - 12.09.2012.*

**Bauerfeind, J.**, Hesse, J. Killenberg, M., Böhm, V. (2012): Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Carotinoiden mit einer Photochemolumineszenz-Methode. *Lebensmittelchemie* 66 (2012) 88.

**Bauerfeind, J.**, Hesse, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2012): Comparison of antioxidant activities of carotenoids measured by photochemiluminescence. *Ann. Nutr. Metab.* 60 (2012) 132.

**Bauerfeind, J.**, Hesse, J., Killenberg, M., Böhm, V. (2012): Comparison of antioxidant activities of carotenoids measured by photochemiluminescence. *Abstract-Book “15th International Meeting on Fat Soluble Vitamins”, Kalabaka (Griechenland), 22.03.-24.03.2012.*

## **B Danksagung**

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Volker Böhm für die Bereitstellung des interessanten Themas und seinem Interesse an den Ergebnissen dieser Arbeit bedanken. Während meiner Promotionszeit unterstützte mich PD Dr. Volker Böhm mit konstruktiven Hinweisen, die meinem wissenschaftlichen Fortschreiten dienten. Großer Dank gebührt ihm für die Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Arbeit auf nationalen und internationalen Tagungen vorstellen zu können.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bioaktive Pflanzenstoffe des Instituts für Ernährungswissenschaften in Jena danke ich für die Zusammenarbeit, insbesondere Katrin Erler, Dr. Lars Müller sowie Josephine Kschonsek. Den Mitarbeitern der Biochemie der Ernährung danke ich für die kleinen Ablenkungen während der gesamten Promotionszeit.

Kathleen Enke, Viktoria Hintze und Josephine Kschonsek danke ich für die Unterstützung an diversen Erkenntnissen, welche zum Teil auch in meine Dissertation einfließen.

Ein besonderer Dank geht an meine fleißigen Korrekturleser Josephine Kschonsek, Dr. Maria Wallert und Dr. Lars Müller.

Meinen Freunden danke ich von Herzen für ihr offenes Ohr meiner persönlichen Anliegen und Probleme. Besonders danke ich Dr. Maria Wallert für ihre aufmunternden Worte, Kraft und Zuversicht, die sie mir stets gegeben hat. Josephine Kschonsek danke ich sehr für die moralische Unterstützung in der Endphase meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die langjährige Unterstützung. Ohne ihr grenzenloses Vertrauen in mich, wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Christoph für seine Geduld und sein Verständnis sowie die unendliche Unterstützung auf unserem gemeinsamen Weg.

**Vielen Dank!**

## C Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass:

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.
- ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben habe.
- mich lediglich die in den Manuskripten angegebenen Personen bei der Auswahl und der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung der Manuskripte unterstützt haben.
- ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe.
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.
- ich diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.
- ich weder die gleiche oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche, noch eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 22. Januar 2015

---

Jasmin Karmowski