



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Nacktgerste-Varietäten

Verfasserin

Elisabeth Kalas

Angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuer: Ao.Univ.Prof. DI Dr. Emmerich Berghofer

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle sehr herzlich bei Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Emmerich Berghofer bedanken, der es mir ermöglichte diese Arbeit am Institut durchzuführen. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Ing. Dr. Susanne Siebenhandl-Ehn, die mir im Rahmen des Projektes „Nacktgerste – wiederentdeckte Quelle für funktionelle Lebensmittel“ dieses Diplomarbeitsthema überlies und mir stets mit wertvoller und kompetenter Beratung zur Seite stand.

Großer Dank gebührt auch dem gesamten Projektteam, die mich freundlich aufnahmen und mich mit Rat und Tat unterstützten. Besonderer Dank gilt hier Herrn DI Michael Prückler der mich bei der praktischen Durchführung der Arbeit tatkräftig unterstützte.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir mit Geduld und Verständnis jederzeit zur Seite standen und mich immer wieder ermutigt hatten weiter zu machen. An dieser Stelle möchte ich über alles Thomas Hasenberger danken, der mich liebevoll unterstützt hat und mich immer wieder mit motivierenden Worten aufgebaut hat.

VIELEN DANK!

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. OXIDATIVER STRESS	3
2.1. Definition	3
2.1.1. Reaktive Sauerstoffspezies	5
2.1.2. Superoxid-Radikal $O_2^{\bullet-}$	6
2.1.3. Wasserstoffperoxid H_2O_2	6
2.1.4. Hydroxyl-Radikal $OH^{\bullet}$	7
2.1.5. Singulett-Sauerstoff $1O_2^{\bullet}$	7
2.2. Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies auf molekularer Ebene	7
3. ANTIOXIDATIVE ABWEHRSYSTEME	9
3.1. Überblick über enzymatische und nicht-enzymatische Radikalfänger	10
3.2. Phenolische Verbindungen	11
3.2.1. Biosynthese	13
3.2.2. Flavonoide	14
3.2.3. Phenolcarbonsäuren	16
3.3. Schäden und assoziierte Krankheiten	17
3.3.1. Wirkung natürlicher Polyphenole auf die Krebsentstehung	18
3.3.2. Lipid Peroxidation (LPO) und ihre Folgen	20
4. HEALTH CLAIMS	25
5. GERSTE	31
5.1. Ursprung und Verbreitung	31
5.2. Taxonomie	32
5.3. Inhaltsstoffe der Gerste	33
5.3.1. Kohlehydrate	33
5.3.2. Proteine	34
5.3.3. Lipide	35
6. AUFGABENSTELLUNG	37

7. MATERIAL UND METHODEN.....	39
7.1. Probenmaterial.....	39
7.2. Analytische Methoden.....	42
7.2.1. Isolierung der Anthocyane durch Extraktion.....	42
7.2.2. Isolierung der phenolischen Bestandteile aus Getreide	45
7.2.3. Quantifizierung der Anthocyan- und Phenolsäuren-Extrakte, HPLC	48
7.2.4. Bestimmung der gesamten phenolischen Bestandteile	53
7.2.5. Radikalfängerreaktion mit ABTS•+.....	55
7.2.6. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay – FRAP	58
7.2.7. Aufstockversuch.....	61
7.2.8. Ansäuerungsversuch	62
7.3. Statistische Methoden.....	62
7.3.1. Arithmetischer Mittelwert	63
7.3.2. Streuwerte metrischer Daten.....	63
7.3.3. Kruskal-Wallis-Test (H-Test)	65
7.3.4. Einfractionelle Varianzanalyse (ANOVA).....	65
7.3.5. Multipler Vergleich (DUNCAN-Test)	67
7.3.6. Levene-Test	68
7.3.7. Korrelation nach Spearman.....	69
8. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	71
8.1. Probenvorbereitung	71
8.2. Extraktion und Bestimmung der Anthocyane	71
8.3. Extraktion und Bestimmung der Phenolsäuren	72
8.4. Messung der antioxidativen Kapazität	72
8.4.1. TPC-Test	72
8.4.2. ABTS-Test	73
8.4.3. FRAP-Test	74
9. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	77
9.1. Bestimmung des Anthocyangehaltes	77
9.1.1. Jahresvergleiche der Einzelproben	77

9.1.1.1. Auswertung der HPLC-Daten.....	78
9.1.1.2. Auswertung der Gesamtanthocyane.....	80
9.1.2. Farbgruppenvergleiche	81
9.1.2.1. Auswertung der HPLC-Daten	81
9.1.2.2. Auswertung der Gesamtanthocyane.....	85
9.1.3. Vergleich der einzelnen Anthocyane.....	87
9.1.4. Diskussion	90
9.2. Methodenoptimierung	94
9.2.1. Aufstockversuche.....	94
9.2.2. Ansäuerungsversuche	96
9.2.3. Diskussion	98
9.3. Bestimmung des Phenolsäuregehaltes	101
9.3.1. Quantifizierung der gebundenen Phenolsäuren mittels HPLC	101
9.3.1.1. Gesamtgehalt der gebundenen Phenolsäuren in der Farbgruppe .	103
9.3.1.2. Einzelne gebundene Phenolsäuren im Farbgruppenvergleich	103
9.3.2. Quantifizierung der gebundenen Phenolsäuren mittels TPC	106
9.3.3. Quantifizierung der freien Phenolsäuren mittels HPLC.....	109
9.3.3.1. Gesamtgehalt der freien Phenolsäuren nach Farbgruppen	110
9.3.3.2. Einzelne freie Phenolsäuren in der Farbgruppe.....	111
9.3.4. Quantifizierung der freien Phenolsäuren mittels TPC.....	115
9.3.5. Diskussion	116
9.4. Bestimmung der antioxidativen Kapazität	118
9.4.1. Antioxidative Kapazität der gebundenen Phenolsäuren.....	118
9.4.1.1. ABTS nach Farbgruppen.....	118
9.4.1.2. FRAP nach Farbgruppen.....	120
9.4.2. Diskussion	122
9.4.3. Antioxidative Kapazität der freien Phenolsäuren	124
9.4.3.1. ABTS nach Farbgruppen.....	124
9.4.3.2. FRAP nach Farbgruppen.....	126
9.4.4. Diskussion	128
10. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	131

11. ZUSAMMENFASSUNG.....	137
12. LITERATURVERZEICHNIS.....	139
13. ANHANG.....	145

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Oxidativer Stress.....	4
Abb. 2.2:	Homolytische oder heterolytische Spaltung von Wasser.....	5
Abb. 3.1:	Cyanidin-3-Glycosid	14
Abb. 3.2:	Grundstruktur der Anthocyanidine.....	15
Abb. 3.3.:	Häufigste Hydroxyzimtsäuren	16
Abb. 3.4:	Häufigste Hydroxybenzoesäuren.....	17
Abb. 5.1:	Zwei- (2 r) und Sechsheilige (6 r) Gerste.....	32
Abb. 7.1:	Nacktergersten: Ähren	40
Abb. 7.2:	Nacktergersten: Farbfamilien	41
Abb. 7.3:	Schematische Darstellung der Anthocyanextraktion.....	44
Abb. 7.4:	Extraktionsschema der phenolischen Bestandteile	47
Abb. 7.5:	Bezugskurve am Beispiel Ferulasäure	49
Abb. 7.6:	HPLC-Chromatogramm: Probe mit addiertem Standard Mix.....	49
Abb. 7.7:	Kalibrationsfunktion TPC.....	56
Abb. 7.8:	Kalibrationsfunktion ABTS.....	60
Abb. 7.9:	Kalibrationsfunktion FRAP	63
Abb. 9.1:	Summe der gemessenen Anthocyane [% mas].....	81
Abb. 9.2:	Jahresvergleich der HPLC-Daten.....	82
Abb. 9.3:	Farbgruppenvergleich der Vollproben, HPLC	84
Abb. 9.4:	Farbgruppenvergleich der Kleie-Fraktion, HPLC.....	85
Abb. 9.5:	Farbgruppenvergleich der Mehl-Fraktion, HPLC.....	86
Abb. 9.6:	Vergleich der Erntejahre nach Farbgruppen, HPLC.....	87
Abb. 9.7:	Farbgruppenvergleich der Vollproben, Gesamtanthocyane, Photometer	87
Abb. 9.9:	Vergleich der Erntejahre nach Farbgruppen, Gesamtanthocyane, Photometer	89
Abb. 9.10:	Ist-Werte der Aufstockversuche von Probe 27 (HOR 4024) und 16 (C 651); HPLC.....	95
Abb. 9.11:	Photometerwerte der Probe 16 und 27, Aufstockversuche.....	95
Abb. 9.12:	Summe der gemessenen Anthocyane mittels HPLC (Probe 16, 27) Ansäuerungsversuche ...	96
Abb. 9.13:	Gehaltssteigerung/-erniedrigung durch Ansäuern, HPLC-Werte.....	97
Abb. 9.14:	Summe gebundene Phenolsäuren [% mas].....	101
Abb. 9.15:	Boxplot gebundene p-Coumarsäure nach Farbe	103
Abb. 9.16:	Boxplot der Kaffeesäure.....	104
Abb. 9.17:	Boxplot der gebundenen Phenolsäuren, TPC.....	107
Abb. 9.18:	Summe der freien Phenolsäuren [% mas]	109
Abb. 9.19:	Freie Phenolsäuren nach Farbgruppen, HPLC	109

Abb. 9.20: Boxplot der freien Kaffeesäure	110
Abb. 9.21: Boxplot der freien o-Coumarsäure.....	111
Abb. 9.22: Streudiagramm der freien 4-OH-Benzoesäure.....	112
Abb. 9.23: Boxplot freie Vanillinsäure.....	112
Abb. 9.24: Boxplot der freien p-Coumarsäure.....	113
Abb. 9.25: Boxplot freie Phenolsäuren, TPC.....	114
Abb. 9.26: Boxplot geb. Phenolsäuren, ABTS	117
Abb. 9.27: Boxplot geb. Phenolsäuren, FRAP	119
Abb. 9.28: Boxplot freie Phenolsäuren, ABTS.....	122
Abb. 9.29: Boxplot freie Phenolsäuren, FRAP.....	125

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Übersicht reaktive Sauerstoffspezies	4
Tab. 3.1: Übersicht der enzymatischen Antioxidantien	10
Tab. 3.2: Übersicht chemopräventiver Mechanismen von Polyphenolen	20
Tab. 4.1: Auszug aus der Datenbank der Artikel 13 Health Claims, Gerste und Ballaststoffe.....	27
Tab. 4.2: Auszug aus der Datenbank der Artikel 13 Health Claims, Polyphenole.....	29
Tab. 5.1: Zusammensetzung von Gerste (g/100 g), auf Basis der Trochensubstanz.....	35
Tab. 7.1: Nacktgerste-Varietäten aus dem Anbaujahr 2008 mit Ursprungsland.....	40
Tab. 7.2: Nacktgerste-Varietäten aus dem Anbaujahr 2009 mit Ursprungsland.....	40
Tab. 7.3: Bezugsfunktionen der Standards ($r = 0,999$); Detektion der Analyten	52
Tab. 7.4: Bezugsfunktionen der Standards ($r = 0,999$).....	53
Tab. 7.5: Konzentration und Volumen der zugesetzten Standards	64
Tab. 7.6: Berechnung der Abweichungsquadratur	69
Tab. 7.7: Tafel der einfachen Varianzanalyse.....	69
Tab. 8.1: Pipettierschema für den TPC-Test.....	75
Tab. 8.2: Pipettierschema für den ABTS-Test.....	76
Tab. 8.3: Pipettierschema für den FRAP-Test.....	76
Tab. 9.1: Jahresvergleich der Einzelproben des Gesamtanthocyangehalt (HPLC).....	81
Tab. 9.2: Jahresvergleich der Einzelproben des Gesamtanthocyangehalt (Photometer)	83
Tab. 9.3: Farbvergleiche der Fraktionen, HPLC-Werte	84
Tab. 9.4: Mehrfache Mittelwertvergleiche der Vollprobe aus 2008 und 2009	86
Tab. 9.5: Farbvergleiche der Fraktionen, Gesamtanthocyane	88
Tab. 9.6: Übersicht der Anthocyangehalte der Einzelproben aus 2008.....	90
Tab. 9.7: Übersicht der Anthocyangehalte der Einzelproben aus 2009.....	91

Tab. 9.8:	Summe der Anthocyane mittels HPLC, Ansäuerungsversuche.....	96
Tab. 9.9:	Gehalte an gebundenen Phenolsäuren, HPLC [mg/100 g]	101
Tab. 9.10:	Summenstatistik: gebundene Phenolsäuren.....	102
Tab. 9.11:	Zusammenfassung der Mittel- und p-Werte, geb. Phenolsäuren [mg/100 g]	105
Tab. 9.12:	Summenstatistik für gebundene Phenolsäuren: TPC [mg/100 g]	106
Tab. 9.13:	TPC-MW nach Proben sortiert, gebundene Phenolsäuren [mg/100 g].....	107
Tab. 9.14:	Gehalte an freien Phenolsäuren [mg/100 g]	108
Tab. 9.15:	Summenstatistik für freie Phenolsäuren, HPLC [mg/100 g]	110
Tab. 9.16:	Zusammenfassung der Mittel- und p-Werte, freie Phenolsäuren [mg/100 g]	113
Tab. 9.17:	Summenstatistik für freie Phenolsäuren: TPC [mg/100 g]	114
Tab. 9.18:	Summenstatistik für gebundene Phenolsäuren: ABTS [mmol TAA/100 g].....	119
Tab. 9.19:	Summenstatistik für gebundene Phenolsäuren: FRAP [mmol Fe(II)/100 g]	121
Tab. 9.20:	Summenstatistik für freie Phenolsäuren: ABTS [mmol TAA/100 g]	124
Tab. 9.21:	Summenstatistik für freie Phenolsäuren: FRAP [mmol Fe(II)/100 g]	126
Tab. 13.1:	Einzelwerte der Anthocyane aus dem Vollmehl, Erntejahr 2008, HPLC.....	149
Tab. 13.2:	Einzelwerte der Anthocyane aus dem Vollmehl, Erntejahr 2009, HPLC.....	151
Tab. 13.3:	Einzelwerte der Anthocyane aus den Fraktionene, HPLC.....	152
Tab. 13.4:	Einzelwerte der Anthocyane der Vollproben aus 2008, Photometer	154
Tab. 13.5:	Einzelwerte der Anthocyane der Vollproben aus 2009, Photometer	155
Tab. 13.6:	Einzelwerte der Anthocyane der Fraktionen, Photometer.....	156
Tab. 13.7:	Einzelproben aus der Fraktion Kleie.....	157
Tab. 13.8:	Einzelproben aus der Fraktion Futtermehl.....	157
Tab. 13.9:	Einzelproben aus der Fraktion Mehl	158
Tab. 13.10:	Farbdarstellung der einzelnen Extraktionsschritte	159
Tab. 13.11:	Einzelwerte der gebundenen Phenolsäuren mittels HPLC	160
Tab. 13.12:	Einzelwerte de freien Phenolsäuren mittels HPLC.....	161
Tab. 13.13:	Einzelwerte der gebundenen Phenolsäuren, TPC.....	162
Tab. 13.14:	Einzelwerte der freien Phenolsäuren, TPC	163

Gleichungsverzeichnis

Gl. 2.1:	Haber-Weiß-Reaktion	7
Gl. 2.2:	Fenten-Reaktion	7
Gl. 3.1:	HAT (hydrogen atom transfer).....	13
Gl. 3.2:	SET (single electron transfer).....	13
Gl. 3.3:	SPLET (sequential proton loss-electron transfer)	13

Gl. 7.1:	Kalibrationsfunktion TPC	56
Gl. 7.2:	Kalibrationsfunktion ABTS	59
Gl. 7.3:	Kalibrationsfunktion FRAP	62
Gl. 7.4:	Arithmetisches Mittel [CLAUß, 2002]	65
Gl. 7.5:	Varianz [CLAUß, 2002]	67
Gl. 7.6:	Standardabweichung [CLAUß, 2002]	67
Gl. 7.7:	Variationskoeffizient [CLAUß, 2002]	67
Gl. 7.8:	r_i [HARTUNG, 2002]	68
Gl. 7.9:	Prüfgröße H [HARTUNG, 2002]	68
Gl. 7.10:	Korrekturgröße B [HARTUNG, 2002]	68
Gl. 7.11:	SAQ_i [CLAUß, 2002]	69
Gl. 7.12:	SAQ_z [CLAUß, 2002]	69
Gl. 7.13:	SAQ_G [CLAUß, 2002]	69
Gl. 7.14:	Prüfgröße F [CLAUß, 2002]	69
Gl. 7.15:	MQ_z [CLAUß, 2002]	69
Gl. 7.16:	MQ_i [CLAUß, 2002]	69
Gl. 7.17:	Prüfgröße d_{ij} [CLAUß, 2002]	70
Gl. 7.18:	Wert d_{krit} [CLAUß, 2002]	71
Gl. 7.19:	X_{ij} [HARTUNG, 2002]	71
Gl. 7.20:	Korrelationskoeffizient r_s	72
Gl. 8.1:	Berechnung Leerwert	75
Gl. 8.2:	Berechnung mg Ferulasäure/ml Extrakt	75
Gl. 8.3:	Berechnung mg Ferulasäure/Extraktion	75
Gl. 8.4:	Berechnung mg Ferulasäure-Äqu./100 g Probe	75
Gl. 8.5:	Berechnung nM Trolox-Äqu./ml Extrakt	76
Gl. 8.6:	Berechnung nM Trolox-Äqu./Extraktion	76
Gl. 8.7:	Berechnung μmol Trolox-Äqu./100 g Probe	76
Gl. 8.8:	Berechnung μM Fe(II)-Äqu./ml Extrakt	78
Gl. 8.9:	Berechnung μM Fe(II)-Äqu./Extraktion	78
Gl. 8.10:	Berechnung mmol Fe(II)-Äqu./100 g Probe	78

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
EFSA	European Food Safety Authority
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidativ Power Assay

HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IR	Ionisierende Strahlung
LDL	Low Density Lipoprotein
LO	Alkoxydienyl Radikal
LOO	Peroxyl Radikal
LOOH	Lipidhydroperoxid
LOX	Lipoxygenase
LPO	Lipid-peroxidation
min-1	pro Minute
MW	Mittelwert
NSPs	Nicht Stärke Polysaccharide
PUFAs	Poly Unsaturated Fatty Acids
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standardabweichung
TAA	Total Antioxidant Activity
TDF	Total Dietary Fiber
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPC	Total Phenolic Content
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazine

1. EINLEITUNG

Im Laufe der vergangenen Jahre hat sich in der Bevölkerung ein immer größer werdendes Bewusstsein für eine ausgewogene Ernährung entwickelt. Speziell dem Getreide gilt eine hohe Aufmerksamkeit, denn als multifunktionales Lebensmittel ist es nicht nur in den Medien publik geworden, sondern wird auch in zahlreichen Studien aufgrund seiner gesundheitsfördernden Wirkung untersucht. Aus diesem Grund sollte Getreide die Basis einer ausgewogenen Ernährung bilden und kann in Form von Back- und Teigwaren sowie als eigene Beilage konsumiert werden.

Im Speziellen ist die Nacktgerste in den Fokus der Wissenschaft geraten, da sie in ihrer Zusammensetzung ein viel versprechendes Potential aufweist. Trotzdem findet sie nur noch zu 2 % Anwendung in der Humanernährung [BAIK und ULLRICH, 2008]. Neben dem hohen Gehalt an Kohlenhydrate, welche vorwiegend aus Stärke bestehen, enthält Nacktgerste Ballaststoffe (β -Glucan), Vitamine, Mineralstoffe und sekundäre Pflanzenstoffe, die unter anderem der oxidativer Schädigung entgegen wirken können. Besonderes Augenmerk wird dabei auf den Farbstoffgehalt gelegt, denn insbesondere Phenolsäuren und Anthocyane besitzen solch antioxidative Fähigkeiten. Das Interesse für phenolische Inhaltsstoffe in Getreide hat sich in den vergangenen Jahren aufgrund zahlreicher Studien, die den gesundheitsfördernden Effekt von Getreidekonsumation zeigen, gesteigert [HOLE et al., 2009; PÉREZ-JIMÉNEZ und SAURA-CALIXTO, 2005; MATTILA et al., 2005].

In weiterer Folge können Phytochemikalien metabolische Funktionsstörungen, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs und Diabetes, im Zuge der antioxidativen Abwehr positiv beeinflussen [FARDET, ROCK und RÉMÉSY; 2008].

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede von verschiedenen gefärbten Nacktgerstegenotypen anhand der Gehalte von Anthocyanen und Phenolsäuren zu eruieren. Die antioxidative Kapazität mittels FRAP und ABTS wurde aus den alkoholischen Extrakten ermittelt.

2. OXIDATIVER STRESS

Damit der Organismus eine adäquate Energieversorgung aufrechterhalten kann, benötigt er den aus der Photosynthese entstandenen Sauerstoff. Durch Verwendung des Sauerstoffs zur Oxidation von Nahrungsstoffen kann diese notwendige Energie zustande kommen und somit die Funktion biologischer Strukturen wahren [LÖFFLER et al., 2007; OHLENSCHLÄGER, 2000].

Sauerstoff kann in hohen Konzentrationen toxisch wirken und deshalb ein Risiko darstellen. Speziell seine reaktionsfähigen Radikale sind in der Lage wichtige Biomoleküle wie Kohlenhydrate, Fette, Proteine und Nukleinsäuren zu schädigen und können sie schwer in ihrer Funktion beeinträchtigen. Allerdings verfügen biologische Zellen über enzymatische und nicht-enzymatische Abwehrmechanismen, die solchen Beeinträchtigungen entgegenwirken können [LÖFFLER et al., 2007; HALLIWELL und GUTTERIDGE, 2007].

2.1. Definition

Während oxidativer und reduktiver Stoffwechselvorgänge werden im Organismus sehr reaktionsbereite Substanzen gebildet. Bekannt sind diese unter dem Begriff freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species). Die wichtigsten Radikale (Tab 2.1) umfassen das Superoxidanion-Radikal ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxyl-Radikal ($OH^{\bullet}$), das Stickoxyd-Radikal ($NO^{\bullet}$) und Lipid-Peroxyl-Radikale ($LOO^{\bullet}$). Andere Verbindungen wie Hydrogenperoxid (H_2O_2), Singulett Sauerstoff (1O_2), hypochlorige Säure (HOCl) oder Ozon (O_3) zählen zu den hoch reaktiven Vorstufen freier Radikale und werden auch reaktive Sauerstoffspezies ohne Radikalcharakter genannt [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Freie Radikale und ROS umfassen eine Reihe von Verbindungen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Sie sind sehr instabile Verbindungen, da ihre

freien Elektronen danach streben ein Elektronenpaar zu bilden [HALLIWELL und GUTTERIDGE, 2007].

Tab. 2.1: Übersicht reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies		Wirkung	Ref.
$O_2^{\cdot -}$	Superoxid-Radikal	Zirkuliert im Blut und greift biologische Substanzen an	1, 2
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	Kann Zellmembranen durchdringen und führt zur Bildung von $OH^{\cdot}$	2
$OH^{\cdot}$	Hydroxyl-Radikal	Reaktiver als $O_2^{\cdot -}$, führt zur Schädigung der DNA	2, 3
$HO_2^{\cdot}$	Hydroperoxyl-Radikal	Bildet durch Oxidation mit Guanin das mutagene 8-Oxoguanin	4
$^1O_2^{\cdot}$	Singulett-Sauerstoff	Kein Radikal; greift Doppelbindungssysteme wie Fettsäuren an	1
$RO_2^{\cdot}$	Peroxyl-Radikal	Induktor neurodegenerativer und anderer entzündlicher Erkrankungen	6
$NO^{\cdot}$	Stickoxyd-Radikal	Verursacht Gefäßverletzungen und eine Steigerung von Entzündungen	7

1: OHLENSCHLÄGER, 2000; 2: LÖFFLER et al., 2007; 3: HOSSEINIMEHR, 2010; 4: KUMAR et al., 2010; 6: SPITELLER, 2006; 7: HUANG et al., 2011

Entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien, wie etwa den freien Radikalen und sehr reaktionsfreudigen Sauerstoffverbindungen, und den antioxidativen Schutzmechanismen (Abb 2.1), spricht man von oxidativem Stress [OHLENSCHLÄGER, 2000]. In weiterer Folge wird die Entgiftungs- und Reparaturkapazität der Zelle von der Konzentration an ROS überschritten und eine Schädigung zellulärer und extrazellulärer Makromoleküle kann nicht ausgeschlossen werden [SCHMID und LANG, 2007].

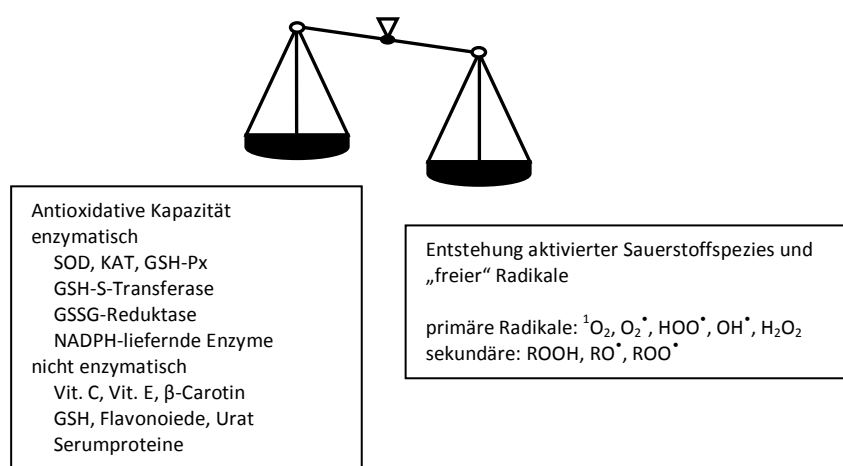


Abb.2.1: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren von oxidativem Stress [ELMADFA und LEITZMANN, 2004]

2.1.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Freie Radikale können auf unterschiedlichen Wegen gebildet werden. So kann aus einem Nicht-Radikal durch Verlust eines einzelnen Elektrons ein Radikal-Kation bzw. Radikal-Anion entstehen [HALLIWELL und GUTTERIDGE, 2007].

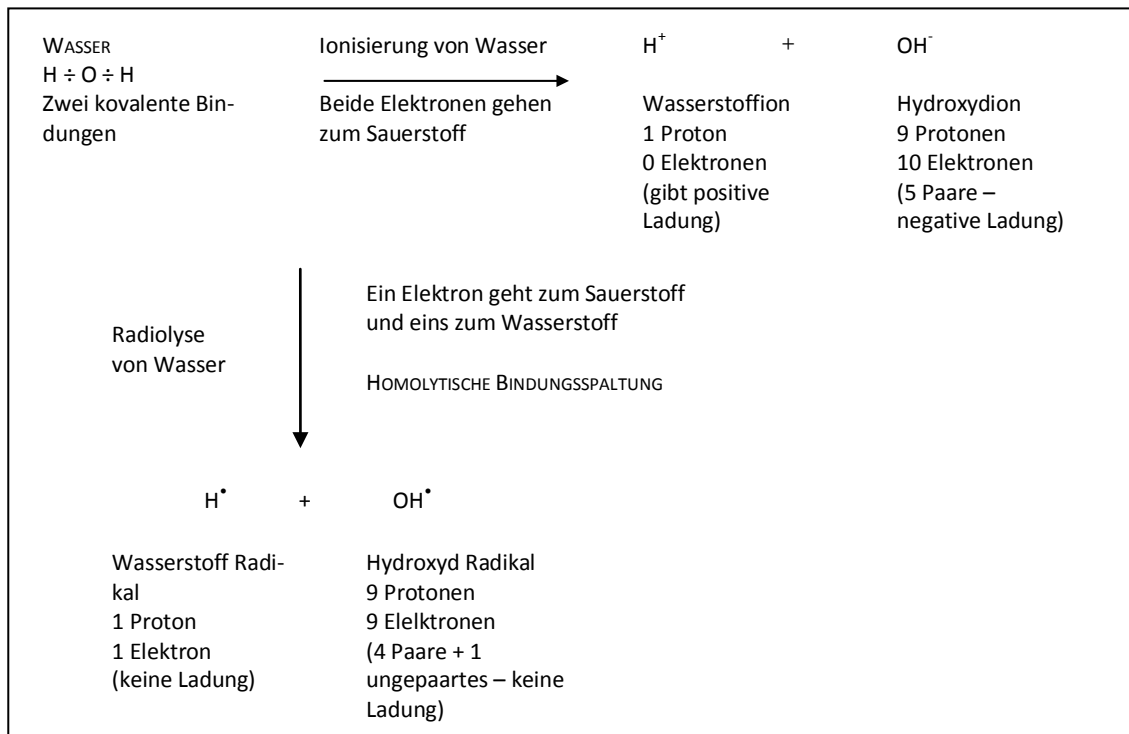


Abb. 2.2.: Homolytische oder heterolytische Spaltung von Wasser [HALLIWELL und GUTTERIDGE, 2007]. Wasser kann in Ionen oder freie Radikale gespalten werden. Moleküle können natürlich auch beides sein, Radikale und Ionen; sie heißen dann Radikal-Kationen und Radikal-Anionen.

Wird eine kovalente Bindung aufgebrochen und ein Elektron des bindenden Elektronenpaar bleibt auf jedem der getrennten Atome zurück, so spricht man von homolytischer Spaltung ($\text{A} : \text{B} \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{B}^\bullet$). Die benötigte Energie um kovalente Bindungen zu trennen kann von Hitze, Ultraviolettes Licht oder ionisierender Strahlung bereitgestellt werden (Abb. 2.2) [HALLIWELL und GUTTERIDGE, 2007].

Das Gegenteil der homolytischen Spaltung ist die heterolytische Spaltung (Abb. 2.2), bei welcher ein Atom beide Elektronen behält, wenn eine kovalente Bindung bricht ($\text{A} : \text{B} \rightarrow \text{A}^- + \text{B}^+$). In diesem Fall bekommt eines der Atome (A) dadurch eine

negative Ladung, das andere Atom (B) gibt beide Elektronen ab und bleibt mit einer positiven Ladung übrig. Allerdings ist keins von beiden ein Radikal [HALLIWELL und GUTTERIDGE, 2007].

2.1.2. Superoxid-Radikal $O_2^{\bullet-}$

Dieses Radikal wird durch reduktiven 1-Elektronen-Übergang aus dem molekularen Sauerstoff O_2 gebildet und stellt die erste aktivierte Sauerstoffstufe dar. Es wird in allen Zellen oxidierender Systeme und enzymatisch durch Oxidasereaktionen von Aldehyd-, Xanthin- oder NAD(P)H-Oxidasen sowie Lipoxigenasereaktionen gebildet. Durch spontane Oxidation können aus Hydrochinonen, reduzierten Flavinen, reduzierten Ferredoxinen und Katecholaminen ebenso Superoxid-Radikale entstehen [OHLENSCHLÄGER, 2000].

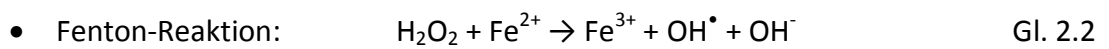
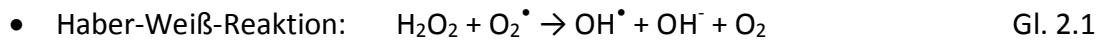
Oxidationsreaktionen des Superoxid-Radikals, und dessen Folgeprodukte, mit Struktur- und Enzymproteinen sowie Abbau von SH-Gruppen, wirken stark zellschädigend. Durch Superoxid-Dismutasen (SOD's) dismutieren $O_2^{\bullet-}$ -Radikale rascher als im Gegensatz zur spontanen Dismutation, bei der aber auch Singulett-Sauerstoff $^1O_2^{\bullet}$ gebildet werden kann. Beide Dismutationen führen wiederum zur Bildung von Wasserstoffperoxid, das in der Zelle toxisch wirkt, und durch Katalasen oder Peroxidasen unschädlich gemacht werden muss [OHLENSCHLÄGER, 2000].

Eine mangelhafte Ausbildung an SOD's, entweder erblich oder altersbedingt, kann vorzeitiges Altern und Alterungsprozesse beschleunigen [OHLENSCHLÄGER, 2000].

2.1.3. Wasserstoffperoxid H_2O_2

Das durch Dismutation von $O_2^{\bullet-}$ gebildete Wasserstoffperoxid ist intrazellulär am meisten vertreten. Vor allem treten in den Leberzellen bei oxidativen Stresszuständen in den Mitochondrien H_2O_2 -Moleküle erhöht auf.

Neben der substanz eigenen Toxizität des Wasserstoffperoxids kann durch die Haber-Weiß- oder Fenton-Reaktion (Gl. 2.1 und 2.2) das sehr reaktive und gefährliche Hydroxyl-Radikal gebildet werden [OHLENSCHLÄGER, 2000].



2.1.4. Hydroxyl-Radikal $\text{OH}^{\bullet}$

Das reaktivste und zerstörerische Hydroxyl-Radikal, das wie oben beschrieben aus Wasserstoffperoxid durch die Haber-Weiß- oder Fenton-Reaktion gebildet wird, kann alle biologischen Strukturen angreifen.

Da keine speziellen Schutzmechanismen gegenüber $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikalen existieren, müssen gute Radikalfänger, wie Mannit, Harnsäure, Vitamin E, reduzierendes Glutathion aber auch L-Cystein, vorhanden sein. Am besten ist die Entstehung aus H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet}$ auf dieser Ebene zu verhindern [OHLENSCHLÄGER, 2000].

2.1.5. Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2^{\bullet}$

Singulett-Sauerstoff zählt zu den reaktiven Sauerstoffspezies ist aber kein Radikal, da er zwei gepaarte Elektronen aufweist. Dennoch besitzt er eine relativ hohe Reaktivität und kann besonders Doppelbindungssysteme im Organismus wie Fettsäuren in Membranen und Lipoproteinen, Nukleinsäuren und auch Aminosäuren angreifen [OHLENSCHLÄGER, 2000].

2.2. Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies auf molekularer Ebene

Wie zuvor im Kapitel 2.2. besprochen entstehen Radikale und ROS durch Verlust eines einzelnen Elektrons. In den Organismus gelangen sie einerseits über exogene Quellen oder entstehen endogen bei metabolischen Prozessen.

Großteils werden ROS durch die Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff gebildet. Diese Radikalentstehung kann aber auch durch Autoxidation reduzierter Zwischenprodukte wie zum Beispiel Semichinone erfolgen, bei denen durch Nebenreaktionen des Cytochrom P₄₅₀ freies Superoxid entstehen kann [LÖFFLER et al., 2007]. Die Superoxid-Radikal $O_2^{\bullet -}$ Bildung wird beispielsweise durch UV-Licht oder Strahlung induziert [OHLENSCHLÄGER, 2000].

Eine wesentliche endogene Quelle für Oxidantien entsteht in den Mitochondrien während der oxidativen Phosphorylierung [LÖFFLER et al., 2007].

Innerhalb der mitochondrialen Elektronentransportkette kann mit Hilfe der oxidativen Phosphorylierung der auf NAD^+ oder FAD übertragene und gebundene Wasserstoff oxidiert werden. In der inneren Mitochondrienmembran wird zunächst die Redoxenergie von der Atmungskette durch Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff umgewandelt und zur ATP-Synthese genutzt. Dabei helfen vier Atmungskettenkomplexe, die einen elektronischen Protonengradienten bilden um die Elektronen über die mobilen Substrate Ubichinon (Q/QH₂) und Cytochrom c zu transportieren [LÖFFLER et al., 2007].

Das stark hydrophobe Ubichinon kann durch Wechsel zwischen dem oxidierten Chinon und dem reduzierten Hydrochinon zwei Elektronen aufnehmen und abgeben. Dazwischen liegt das einfach reduzierte Ubisemichinon, welches unter extremen Stoffwechselbedingungen und bei vorgeschädigtem Atmungskettenkomplexen den molekularen Sauerstoff zum Superoxid-Radikal reduzieren kann [LÖFFLER et al., 2007].

3. ANTIOXIDATIVE ABWEHRSYSTEME

Sauerstoff und seine reaktiven Verbindungen sind in übermäßiger Konzentration schädlich für Gewebe und deren Zellen. Da aber aus Gründen einer besseren Energiebilanz die meisten Organismen zu der „biologischen Oxidation“ wechseln, spielt eine effiziente Abwehr eine wichtige pathobiochemische Rolle [OHLENSCHLÄGER, 2000].

Aus diesem Grund besitzt der menschliche Organismus die Fähigkeit Angriffe direkt im Körper abzuwehren, wie beispielsweise die enzymatische Abwehr. Der Körper ist aber auch in der Lage selbst Stoffe zu synthetisieren, die in die oxidativen Vorgänge eingreifen können. Um jedoch einen ausreichenden und optimalen Schutz zu gewährleisten, müssen dem Körper von außen antioxidativ wirkende Substanzen zugeführt werden. Neben den allbekannten ACE-Vitaminen besitzen Naturstoffe, wie z.B. Polyphenole, solche Fähigkeiten.

Diese Abwehrsysteme können radikalische Reaktionen verhindern, beenden oder in Kettenreaktionen eingreifen. Für einen optimalen Schutz müssen Radikalfänger zur richtigen Zeit, am richtigen Ort und in ausreichender Menge vorhanden sein, sowie eine schnelle Reaktionsgeschwindigkeit besitzen [OHLENSCHLÄGER, 2000].

Neben der schädigenden Wirkung können ROS im Körper zusätzlich einen positiven Nutzen zeigen. Beispielsweise wird in Granulozyten im Zuge des oxidativen Bursts von einer membranständigen NADPH-Oxidase extrazellulär Superoxid gebildet, das weiter mittels der Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid reagiert. Diese Sauerstoffverbindungen dienen der Abwehr von Bakterien, indem sie durch Peroxidation die Membranlipide des Bakteriums schädigen [LÖFFLER et al., 2007].

Oxidative Schäden lassen sich aber schon im Vorfeld durch Führen eines bestimmten Lebensstils minimieren. So können durch ausreichende Bewegung, eine ausgewogene Ernährung und ein Verzicht auf Zigaretten und Alkohol bestimmte antioxidative Prinzipien bewahrt und erhalten bleiben [OHLENSCHLÄGER, 2000].

3.1. Überblick über enzymatische und nicht-enzymatische Radikalfänger

Antioxidantien umfassen eine Reihe von Substanzen, die den Körper vor oxidativer Schädigung schützen können. Sie werden in enzymatische und nicht-enzymatische Abwehrmechanismen eingeteilt [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Tab. 3.1 zeigt einen Überblick der enzymatischen Systemmedie als integralen Bestandteil einen Mineralstoff tragen und somit auch Metalloenzyme genannt werden.

Tab. 3.1: Übersicht der enzymatischen Antioxidantien [OHLENSCHLÄGER, 2000]

Enzym	Metall/Ort	Beschreibung	Reaktion
Superoxid-Dismutasen (SOD)	- Fe-haltige SOD in Bakterien - Mg-haltige SOD in Mitochondrien - CuZn-haltige SOD im Zytoplasma	Wandeln das Peroxid-Radikal ($O\bullet 2'$) in Wasserstoffperoxid um	$2 O^{\bullet 2} + 2 H^+ = H_2O_2 + O_2$
Katalasen (CAT)	- CAT im Zytoplasma - CAT in Peroxisomen	Wandeln Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Wasser und molekularen Sauerstoff um.	$H_2O_2 + H_2O_2 = 2 H_2O + O_2$
Peroxidasen (Px)	- Selenabhängige Glutathion-Peroxidase - Selen-abhängige Phospholipid-hydroperoxid-GSH-Peroxidase - Selen-unabhängige Peroxidasen	Vergleichbare Reaktionen, wie bei Katalasen	$RH_2 + H_2O_2 = R + 2 H_2O$
Weitere Enzyme des Glutathionsystems	- Gamma-Glutamylcystein-Synthetase - Glutathion-Synthetase - Glutathion-Reduktase (GSSG-Reduktase) - Mehrere Gutathion-S-Transferasen		

Im Organismus kann die Superoxid-Dismutase (SOD) Peroxid-Radikale in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umwandeln. Das entstandene toxische Wasserstoffperoxid kann durch die Katalase (KAT) weiter zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden. Ne-

ben Katalasen können auch andere Peroxidasen entgiftende Oxidationen katalysieren. Beispielsweise reagiert die Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) neben Wasserstoffperoxid auch mit organischen Peroxiden, wie Lipidperoxide.

Zu den nicht-enzymatischen Radikalfängern zählen Substanzen, die sowohl endogen als auch exogen entstehen können [ELMADFA und LEITZMANN, 2004]. Im Körper werden beispielsweise reduziertes Glutathion, Harnsäure, Selenocystein oder L-Cystein synthetisiert. Die folgenden Naturstoffe müssen mit der Nahrung aufgenommen werden [OHLENSCHLÄGER, 2000].

- **Vitamine:**

Vitamin A, β -Carotin und Carotinderivate, Vitamin E und Tocopherolderivate, Vitamin C und lipidlösliches Vitamin C

- **Weitere Naturstoffe:**

Phenolische Verbindungen wie Phenolsäuren, Anthocyane, Phenolester, Lignane, Tannine

- **Bioorganische Moleküle des menschlichen Organismus**

Harnsäure, Taurin, L-Cystein, Selenocystein, L-Methionon, Selenomethionin, Alpha-Liponsäure, Coenzym Q, reduziertes Glutathion (GSH), Glutathion-Derivate

- **Synthetische Radikalfänger**

Butylhydroxyanisol (BHA), Butylhydroxytoluol (BHT)

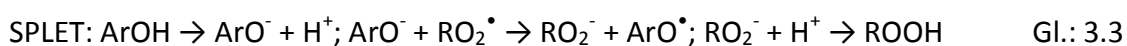
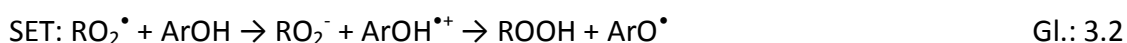
3.2. Phenolische Verbindungen

Phenole sind die am weitesten verbreiteten sekundären Metabolite im gesamten Pflanzenreich. Mit mehr als 8000 aktuell bekannten phenolischen Strukturen erstrecken sie sich von einfachen Phenolsäuren bis hin zu hoch polymerisierten Substanzen

wie Tannine. Sie sind ubiquitär in allen Pflanzenorganen enthalten und daher ein integraler Bestandteil der menschlichen Ernährung [DAI und MUMPER, 2010].

Phenolische Verbindungen besitzen eine gute antioxidative Aktivität und haben die Fähigkeit freie Radikale zu binden, radikale Kettenreaktionen zu unterbrechen und Komplexe mit Metallen zu bilden [LIU und YAO, 2007]. Ihre Wirkung beruht auf der Reduktion von Oxidationsmitteln und können dadurch selbst zu chinoiden und polymeren Verbindungen oxidiert werden. Die antioxidative Aktivität ist abhängig von den unterschiedlichen Basisstrukturen und der Anzahl und Stellung von funktionellen Gruppen, wie es Hydroxylgruppen darstellen. Flavonoide haben durch ihre C2=C3 Doppelbindung und ihr benachbartes Catechol erhöhte Radikalfänger-Wirkung [HOSSEINIMEHR, 2010]. Neben der physiologischen Wirkung fungieren sie auch als Aroma-, Farb- und Gerbstoffe in pflanzlichen Lebensmitteln [EBERMANN und ELMADFA, 2008].

Die molekulare Basis für die antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen kann eingeteilt werden in drei Mechanismen. Der erste Mechanismus (Gl. 3.1) bezieht sich auf den direkten Wasserstoff-Transfer (HAT = hydrogen atom transfer) vom Antioxidans (ArOH) auf das Radikal ($\text{ROO}^\bullet$). Der zweite (Gl. 3.2) umfasst einen Elektronen-Transfer (SET = single electron transfer) wieder vom Antioxidans zum Radikal, der indirekt zu einem Wasserstoff-Entzug führt. HAT und SET sind ähnlich der in Kapitel 2.2 beschriebenen homolytischen und heterolytischen Bindungsspaltung. Der dritte Mechanismus (Gl. 3.3) kann bezeichnet werden als „sequential proton loss-electron transfer“ (SPLET) und beginnt mit der Formung eines Anions (ArO^-) [LEOPOLDINI et al., 2011; LEOPOLDINI et al., 2004a; MOHAJERI und ASEMANI, 2009].



Diese Phytochemikalien verfügen über die Eigenschaft im Körper eine Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu erhalten und somit vor ROS induzierten Erkrankungen zu schützen [HOLE et al., 2009; ADOM und LUI, 2002]. Phenolische Bestandteile gelten als kraftvolle Antioxidantien in vitro und haben sich als potentere Antioxidantien als Vitamin C und E und Carotinoide erwiesen [RICE-EVANS et al., 1995; DAI und MUMPER, 2010].

3.2.1. Biosynthese

Die Biosynthese von phenolischen Verbindungen [JAGANATH und CROZIER, 2010] involviert ein komplexes biologisches Netzwerk und basiert prinzipiell auf drei Wegen:

- Shikimisäure Weg
- Phenylpropanoid Weg
- Flavonoid Weg

Ausgehend vom Kohlenhydratstoffwechsel entsteht die Shikimisäure über mehrere Zwischenstufen enzymatisch durch Reaktion von Erythrose-4-phosphat mit Phosphophenolpyruvat. Durch weitere enzymatische Reaktionen wird Chorismine-, Prephen- und Anthranilsäure gebildet, die wiederum Vorläufer für die essentiellen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin darstellen. Während der Biosynthese der Shikimisäure entstehen etliche weit verbreitete Säuren, wie die Chinasäure, die Protocatechusäure und die Gallussäure [NUHN, 1997].

Als ersten Schritt des Phenylpropanoid-Weges wird die Reaktion von L-Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure, katalysiert durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5), gesehen. In einer weiteren Hydroxylierungsreaktion wird die Zimtsäure in die *p*-Cumarsäure konvertiert, die durch weitere Hydroxylierungen und Methylierungen in freie (z.B. Kaffee-, Ferula-, und Sinapinsäure) und veresterte Hydroxyzimtsäuren konvertiert wird [LANDOLINO und COOK, 2010].

Die irreversible Kondensationsreaktion zwischen mit Coenzym A aktivierten Hydroxyzimtsäuren und Malonyl-CoA ergibt die Bildung eines C6-C3-C6 Chalcon Grundgerüst, welche den ersten Schritt der Flavonoid-Biosynthese darstellt. Durch eine Chalcon-Synthase (CHS, EC 2.3.1.74) katalysierte Reaktion entsteht das Naringenin-chalcon, welches durch die Chalcon-Isomerase (CHI, EC 5.5.1.6) weiter zum (2S)-Flavanon Naringenin zyklisiert wird und als Intermediat für eine Reihe von Flavonoid-Spezies fungiert (Flavone, Isoflavone, Flavonole, Anthocyanine, Phlobaphene, Flavan-3-ole und Proanthocyanidine) [LANDOLINO und COOK, 2010].

3.2.2. Flavonoide

Zurzeit sind mehr als 6000 verschiedene Flavonoide bekannt und ihre Anzahl steigt weiter an. Sie sind polyphenolische Verbindungen bestehend aus 15 Kohlenstoffen, mit zwei aromatischen Ringen verbunden über eine 3-Kohlenstoffbrücke. Gemäß der Modifikation des zentralen C-Rings, können sie in verschiedene strukturelle Klassen wie, Flavonole, Flavone, Flavan-3-ole, Flavanone, Isoflavanone und Anthocyanidine unterteilt werden [JAGANATH und CROZIER, 2010]. In dieser Arbeit wird nur auf die Anthocyane näher eingegangen.

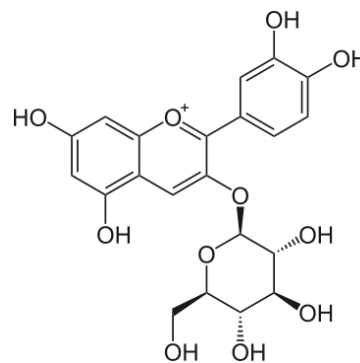


Abb 3.1.: Cyanidin-3-Glucosid

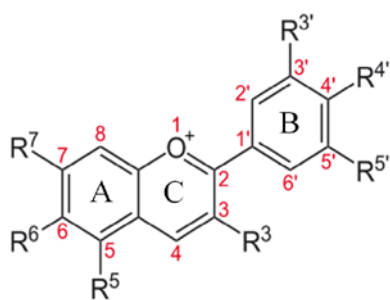
Anthocyane gehören zu den Flavonoiden und umfassen die größte Gruppe von wasserlöslichen Verbindungen im Pflanzenreich. Sie sind verantwortlich für die rote, blaue und violette Farberscheinung bei vielen Blumen, Früchten und Blätter. Diese natürlichen Pigmente sind normalerweise mit roten Früchten assoziiert zeigen sich aber auch in Gemüse, Wurzeln, Leguminosen und Zerealien [GOULD et al., 2009].

Sie erscheinen hauptsächlich als Glycoside der jeweiligen Anthocyanidin-Chromophoren, die den Zuckerrest meist in der 3-OH-Position am C-Ring (Abb 3.1) oder in 5-OH-Position am A-Ring gebunden haben (Abb.3.2).

Die Zuckerreste können variieren, sind aber üblicherweise Glucose, Rhamnose, Galaktose oder Arabinose. Sie erscheinen als Mono- oder Disaccharid-Einheiten und sind manchmal mit einer phenolischen oder aliphatischen Säure acetyliert. Diese Verbindungen können sich von dem Methoxyl- und Hydroxyl-Substitutionsmuster von Ring B unterscheiden [GOULD et al., 2009].

Die chromatischen Eigenschaften der Anthocyane sind vom Substitutionsmuster des B-Ringes bedeutend beeinträchtigt. Erhöht man beispielsweise das Hydroxylierungsmuster entsteht eine Farbvertiefung von Rot zu Violett. Auch die Art des Zuckers, acetyliert oder nicht, und die Position im Aglykon-Gerüst sind wichtige strukturelle Faktoren, die die Farbnuancierung dieser Pigmente beeinflussen können [GOULD et al., 2009].

In der Natur sind ungefähr 17 Anthocyanidine gefunden worden, jedoch sind laut Jaganatz und Crozier (2010) nur sechs ubiquitär verteilt und von diätetischer Wichtigkeit. Im Zuge dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Anthocyanidine und deren Abkömmlinge untersucht (Abb 3.2).



Anthocyanidin	R3'	R4'	R5'	R3	R5	R6	R7
Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Cyanidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delphinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Luteolinidin	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Apigeninidin	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH

Abb 3.2.: Grundstruktur der Anthocyanidine

Die Tabelle in Abb. 3.2 zeigt das Substitutionsmuster der verschiedenen Anthocyanidine, die am Aglykon-Gerüst gebunden sind.

3.2.3. Phenolcarbonsäuren

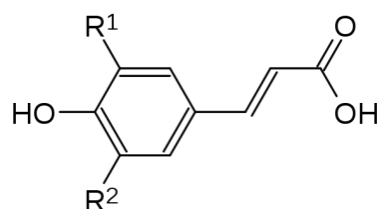
Im Getreide erscheinen Phenolsäuren in der freien und in überwiegendem Anteil in gebundener Form. Die höchste Konzentration kann in der Aleuronschicht von Getreidekörnern gefunden werden, sie sind aber auch im Embryo und der Samenschale zu finden. In den äußeren Lagen der Getreidekörner ist eine Mehrzahl an Phenolsäuren lokalisiert, die verestert mit Hemicellulosen in der Zellwand zu finden sind [NACZK und SHAHIDI, 2006; HOLE et. al., 2009].

Phenolsäuren können in zwei Klassen unterteilt werden: die Derivate der Hydroxyzimtsäuren (Abb. 3.3) und der Hydroxybenzoesäuren (Abb. 3.4) [DAI und MUMPER, 2010].

Hydroxyzimtsäuren (Abb. 3.3) erscheinen ubiquitär in höheren Pflanzen, wobei die Kaffeesäure quantitativ am meisten enthalten ist, gefolgt von der p-Cumarsäure, Ferulasäure und der Siapinsäure [PETERSEN et. al., 1999]. Laut

ANDERSSON et al. [2007] ist in Gersten jedoch die Ferulasäure in gebundener Form am höchsten enthalten.

Sie sind normalerweise aktiviert als Coenzym A Thioester und können mit Chinasäure Konjugate bilden, die als Chlorogensäuren bekannt sind. Eine gute Quelle für diverse phenolische Verbindungen sind Früchte und Gemüse, beispielsweise Äpfel, Datteln und Karotten, oder auch der rote Blattsalat Lollo Rosso. Die grünen Kaffeebohnen (*Coffea arabica*) sind eine der reichsten Quellen für Chlorogensäuren. 5-O-Caffeoylchinasäure ist die dominante Chlorogensäure und beträgt 50 % vom gesamten Gehalt [JAGANATH und CROZIER, 2010; PETERSEN et. al., 1999].

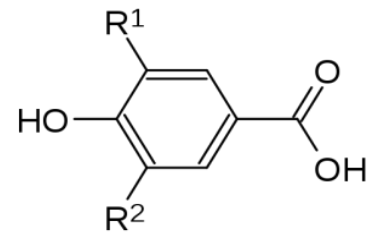


	R ₁	R ₂
p-Cumarsäure	H	H
Kaffeesäure	H	OH
Ferulasäure	H	OCH ₃
Siapinsäure	OCH ₃	OCH ₃

Abb. 3.3.: Häufigste Hydroxyzimtsäuren

Hydroxybenzoesäuren (Abb 3.4) sind normalerweise in gebundener Form enthalten und sind typische Komponenten von komplexen Strukturen wie Lignine und hydrolysierbare Tannine. Sie können auch als Derivate von Zucker und organische Säuren in Pflanzen gefunden werden.

In freier und gebundener Form sind sie in Getreide enthalten. Das können Sorghum, Hirse, Gerste, Weizen, Reis, Hafer und Roggen sein. Ebenso in Beeren und Früchte wie, Himbeeren, Erdbeeren oder auch Granatäpfel und Datteln sind sie enthalten. Glykoside der Hydroxybenzoesäure sind auch für Gewürze und Kräuter charakteristisch. Am höchsten sind sie in Zimt, Nelken, Anis, Sternanis, Dill, Fenchel, Kümmel und Petersilie enthalten [JAGANATH und CROZIER, 2010].



	R ₁	R ₂
Gallussäure	OH	OH
Protocatechusäure	OH	H
Vanillesäure	OCH ₃	H
Syringasäure	OCH ₃	OCH ₃

Abb. 3.4: Häufigste Hydroxybenzoesäuren

3.3. Schäden und assoziierte Krankheiten

Die Konsequenzen von oxidativem Stress können stark variieren und sind vom Zelltyp, sowie vom Schweregrad der oxidativen Belastung abhängig. Viele Zellen antworten auf milden oxidativen Stress mit Proliferation oder passen sich an, indem sie das Abwehrsystem verstärken. Ist jedoch die Abwehr zu schwach kann es zu Zellschäden kommen und Makromoleküle wie Lipide, Proteine, DNA oder Kohlenhydrate können negativ beeinträchtigt werden. In erster Konsequenz bewirkt es ein Altern der Zellen, auch Seneszenz genannt. Hierbei überleben die Zellen, sind aber nicht mehr teilungsfähig. Im Extremfall sterben die Zellen durch Apoptose, Nekrose oder durch einen zwischen diesen Extremen liegenden Zelltod-Mechanismus. Am stärksten betroffen ist die besonders empfindliche DNA.

Die Auswirkungen können sich im Körper in unterschiedlich starker Weise und an den verschiedensten Orten erkenntlich machen. Schädigungen können sich mit dem Alter ansammeln und tragen zur Degeneration somatischer Zellen bei, und begünsti-

gen die Pathogenese von Folgekrankheiten. Meist sind das degenerative Krankheiten, wie Krebs, kardiovaskuläre Krankheiten oder Schädigungen am Nervensystem. In dieser Arbeit wurde auf die Krebsentstehung und Entstehung der Arteriosklerose, infolge von Oxidationen der DNA und Lipid-Oxidationen, näher eingegangen [SCALBERT et al., 2005].

In den vergangenen Jahren stellte sich heraus, dass oxidative Prozesse eine wesentliche Rolle in der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer, spielen. Ein charakteristisches neuropathologisches Kennzeichen dieser Krankheit ist die Einlagerung von unlöslichen Proteinfragmenten ins Gehirn, bekannt als Amyloid- β -Peptide. Der oxidative Stress-induzierende Effekt dieses Peptides könnte in der Pathologie und Neurodegeneration eingeschlossen sein [SONNEN et al., 2008], und so den weiteren Verlauf der Krankheit begünstigen [SHIH et al., 2011; SPITELLER, 2006].

In Lebensmittel enthaltene Antioxidantien können helfen diese Schädigungen zu limitieren, indem sie direkt auf reaktive Sauerstoffspezies wirken oder das endogene Abwehrsystem stimulieren. Besonders die phenolischen Gruppen der Polyphenole können, durch Auffangen von Elektronen, in die oxidativen Ketten-Reaktionen in zellulären Komponenten eingreifen. Zusätzlich sind sie fähig die Bildung relativ stabiler Radikale zu minimieren [OHLENSCHLÄGER, 2000; LÖFFLER et al., 2007; HALLIWELL und GUTTERIDGE, 2007].

3.3.1. Wirkung natürlicher Polyphenole auf die Krebsentstehung

Krebs ist eine Krankheit, die durch eine adäquate Ernährung stark beeinflusst werden kann. Phenolische Bestandteile, die ubiquitär in der Nahrung enthalten sind, spielen eine wichtige Rolle als chemopräventive Wirkstoffe. Die tägliche Aufnahmemenge phenolischer Bestandteile ist abhängig von der Ernährung und daher stark schwankend, jedoch ist sie oft unzureichend um vor Mutagenen und Karzinogenen zu schützen [FRESCO et al., 2006]. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig funktionelle Lebensmittel zu entwickeln, die einen hohen Gehalt an phenolischen Verbindungen aufweisen.

Als kritische Stufe in der Entstehung mancher Krebsarten kann die oxidative Schädigung der DNA, induziert durch ionisierende Strahlung¹ (IR), angesehen werden. IR kann die zellulären Makromoleküle direkt aber auch indirekt angreifen. Obwohl der direkt beobachtete Effekt eher gering ist, können direkte Interaktionen der Strahlung Bindungen in Molekülen, wie die der empfindlichen DNA, aufbrechen und sie so schädigen. Da aber der Körper und seine Zellen zum größten Teil aus Wasser besteht, führt eine Ionisierung des Wassers zur Bildung hochreaktiver freier Radikale, die indirekt die Destruktion der Zelle bewirken. In letzter Konsequenz wird die DNA angegriffen und verursacht eine genomische Instabilität, die bei nicht korrekter Reparatur zu Mutation, Krebs und Zelltod führt [HOSSEINIMEHR, 2010].

Die Wirkungen von Polyphenolen sind mannigfaltig, denn neben antioxidativen und strahlenschützenden Eigenschaften weisen sie auch andere chemopräventive Wirkungen auf (Tab. 3.2).

Auch eine Blockierung oder Induktion verschiedener Enzyme kann hilfreich in der Prävention von Krebs sein [NICHENAMETLA et al., 2006]. Eine Hemmung der Ornithin Decarboxylase vermindert die Entwicklung von Tumoren in verschiedenen Organtypen, besonders im Epithelgewebe der Haut [HUANG et al., 1988]. Die Hemmung der Xanthin Oxidase verringert die Katalyse reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS), die in verschiedenen Tumoren gefunden wurden [PENCE und REINERS, 1987; CHAN et al., 1995].

¹ IR; zB Röntgenstrahlen, γ -, β -, α oder Protonen-Strahlung

Tab. 3.2: Übersicht chemopräventiver Mechanismen von Polyphenolen

Phenolische Verbindung	Chemopräventiver Mechanismus	Experiment. Model	Nahrungsquelle	Ref.
Cyanidin-3-glucoside (1) Pelargonidin (2) Pelargonidin-3-glucosid (3) Pelargonidin-3-rutinosid (4) Kaempferol (5) Quercetin (6) Kaempferol-3-(6'-coumaroyl)glucosid (7) 3,4,5-trihydroxyphenyl-acrylsäure (8) Glukoseester der (E)-p-coumarsäure (9) Ellagsäure (10)	Antioxidative Aktivität Aus Extrakt isolierte Stoffe 1,2 und 4 wirkten am stärksten antioxoxidativ Antiproliferative Aktivität: Isolierte Stoffe und unbehandelte Extrakte inhibierten das Wachstum von Dickdarm (HT-29 und HCT-116), Prostata (LNCaP und DU145) und oraler Tumor Zell-Linien	Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) Luminescent ATP cell viability assay	Erdbeeren (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch)	1
Anthocyane (Cyanidin, Pelargonidin, Delphinidin, Peonidin, Malvidin) Unbehandelter Extrakt: 2,6-7,6% Gesamtphenolgehalt 0,9-1,8% Anthocyane Konzentrat: 46,6-85,1% Gesamtphenolgehalt 17,4-32,7% Anthocyane	Signifikante Hemmung auf die NO Produktion Dosisabhängige Induzierung der TNF- α Produktion Modulatoren der Immunantwort in aktivierten Makrophagen	Untersuchung der Effekte auf Tumor Nekrose Faktor (TNF) α in LPS/IFN- γ -aktivierte Makrophagen mittels OptEIA Set mouse TNF- α	Reinsubstanz Extrasythese (Genay, Frankreich) Saskatoon-Beeren, Blau- und Schwarzebeeren, schwarze Johannisbeeren	2
Anthocyane Anthocyanidine Proanthocyane	Antioxidative Effekte Induktion der Apoptose Entzündungshemmende Effekte	Humane Krebs Zellen Lunge, Dickdarm, Brust, Uterus	Gemüse und Obst, Getreide, Wein, Bohnen, Kakao, Süßkartoffel	2 3 4 5
Flavonoide	Fördern genomische Stabilität während DNA Interaktionen	Nicht berichtet	Nicht berichtet	6

1: ZHANG et al., 2008, 2: WANG und MAZZA, 2002, 3: REN et al., 2003, 4: FRESCO et al., 2006; 5: HOU et al., 2004; 6: HOSSEINIMEHR, 2010

Während Flavonoide grundsätzlich antioxydative Aktivität zeigen, können sie in Anwesenheit von Übergangsmetallen in prooxydative Aktivität umschalten. Die Bindung phenolischer Bestandteile an Kupfer(II) oder Eisen(III) führt zur Reduktion dieser Metalle und einer gleichzeitigen Bildung eines Chelatkomplexes. Durch diese Reaktion wird dem Sauerstoffmolekül ein Elektron entzogen und ein Superoxid Radikal Anion ($O_2^{\cdot-}$) gebildet, das weiter zum Hydrogenperoxid und Hydroxylradikal umgewandelt wird und in weiterer Folge die DNA schädigt [EL AMRANI et al., 2006; HOSSEINIMEHR, 2010].

3.3.2. Lipid Peroxidation (LPO) und ihre Folgen

Die am stärksten von Lipid-Peroxidation (LPO) betroffenen Bestandteile menschlicher Zellen sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs), die in der äußersten

Schicht in Form von Phospholipiden eingebaut sind. Sie geben der Membran die nötige Flexibilität [FELLER et al., 2002; STILLWELL und WASSALL, 2003] und dienen als Speicher für Signal-Vorläufersubstanzen. Wird nun die Zellmembranstruktur verändert, entsteht ein erhöhter Einstrom von Ca^{2+} Ionen, die die phospholipidspaltenden Phospholipasen aktivieren [SARASWATHI et al., 2004; SANDOVAL et al., 2001]. Die dadurch entstandenen freien PUFAs fungieren als Substrat für eisenhaltige Enzyme, wie Lipoxigenasen (LOXs), die ihrerseits veresterte PUFAs spalten können. Nach dieser enzymatischen Bildung von LOOH Molekülen wird zu einer nichtenzymatischen LPO gewechselt [SPITELLER, 2002], bei der durch freigesetzte Eisen Ionen (aus dem Zentrum der LOXs) Alkoxydienyl-Radikale ($\text{LO}^\bullet$) gebildet werden. Diese Alkoxydienyl-Radikale attackieren schlussendlich aktivierte C-H Bindungen und bilden Peroxyl-Radikale ($\text{LOO}^\bullet$), die eine Kettenreaktion starten oder andere Moleküle attackieren.

Grundsätzlich sind ungesättigte Fettsäuren, wie Ölsäure, Linolsäure und Arachidonsäure, aufgrund des Vorhandenseins von Doppelbindungen am häufigsten betroffen und werden durch $\text{LOO}^\bullet$ Radikale zu toxischen Epoxiden umgewandelt. Ebenso mit Cholesterin veresterte PUFAs unterliegen der Lipidperoxidation, und die gebildeten Radikale der Linoleate und Arachidoneate attackieren die Doppelbindungen im Cholesterin Molekül durch Epoxidation [SPITELLER, 1998]. Oxidationsprodukte des Cholesterins können in der Leber im LDL eingebaut werden [STAPRANS et al., 2003], zu endothelialen Zellen transportiert werden und dort Zellschäden verursachen [SPITELLER, 2005; SPITELLER, 2006].

Lipidperoxidation wird ebenso durch typische ROS, wie Superoxid, Singulett-Sauerstoff und Hydroxyl Radikal, sowie durch Ozon und Triplett Sauerstoff ($^3\text{O}_2$), initiiert. Sie entziehen ungesättigten Fettsäuren Wasserstoffatome von Methylengruppen (CH_2), wodurch Peroxylradikale ($\text{LOO}^\bullet$) und andere Radikale gebildet werden [MOOD und SHIBAMOTO, 2009].

Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist ein Sammelbegriff für degenerative Veränderungen an der Arterienwand, ausgelöst durch Ablagerung von fibröser Plaque in den betroffenen Ge-

fäßen [KRAUTZIG, 2008]. Die Pathogenese umfasst eine Kaskade von entzündlichen Prozessen löslicher Mediatoren, Monocyten, endothelialer Zellen und vaskulärer glatter Muskelzellen [ROSS, 1999].

Oxidativer Stress, durch Lipid- und Protein-Oxidation verursacht, kann mit der Pathogenese der Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht werden. Ausgehend von einer endothelialen Dysfunktion werden vermehrt Makrophagen in die Arterienwand vermittelt, die verstärkt ROS (reactive oxygen species) bilden. Ein fortgesetzter Entzündungsprozess führt zu weißlichen Fettablagerungen („fatty streaks“) im Gefäß [KRAUTZIG, 2008]. Dabei wird oxidiertes LDL-Cholesterin in Makrophagen gespeichert, wodurch Schaumzellen gebildet werden und Läsionen entstehen [GIUSTARINI et al., 2009].

Ein weiterer wesentlicher Aspekt in der Pathogenese der Arteriosklerose, neben dem cytotoxischen Effekt des oxidativ modifizierten LDL, ist die Oxidation des antiatherogen wirkenden HDL (high density lipoprotein) [SHAO et al., 2010]. Es metabolisiert und transportiert Lipid-Oxidationsprodukte, sowie Cholesterin von den Zellen zur Leber [VAN LENTEN et al., 2001; SHAO und HEINECKE, 2009]. Die oxidative Modifizierung beeinträchtigt diesen Rücktransport und hemmt die antientzündliche Funktion des HDL [NAVAB et al., 2009].

Polyphenolwirkung auf Lipidperoxidation

Aus zahlreichen experimentellen Studien geht hervor, dass Polyphenole antioxidative Aktivität besitzen, und somit die Zellen vor oxidativem Stress schützen können. *In vitro* Studien zeigten eine erhöhte Resistenz gegen LDL-Oxidation durch LDL-gebundene Polyphenole [WU et al., 2009; SCALBERT et al., 2005]. In einer Studie an hypercholesterinämischen Hasen wurde eine mögliche Verzögerung der LDL-Oxidation und Erniedrigung der Gebiete mit arteriosklerotischen Läsionen in der Aorta durch Polyphenole dokumentiert [KUROSAWA et al., 2005].

Die günstigen Effekte der Polyphenole können, neben den antioxidativen Effekten, aber auch durch eine Fülle von biochemischen Wegen und Signal-Mechanismen

erscheinen. Beispielsweise verbessern sie endotheliale Funktionen [PÉREZ-JIMÉNEZ und SAURA-CALIXTO, 2008; BELL und GOCHENAUR, 2006] und beeinflussen Inflammation und Lipid Metabolismus. Sie können sich auch günstig auf atherothrombotische Episoden auswirken [BADIMON et al., 2010]. Atherothrombose ist das klinische Syndrom der Atherosklerose bei der sich an den Innenwänden der Arterien fettige Ablagerungen (Plaque) bilden. Drohen diese Plaque aufzubrechen, verstopfen sie die Arterien und führen, je nach Ort des Geschehens, zu Angina pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall oder zu einer transitorischen ischämischen Attacke [MITTERMAIER, 2007].

4. HEALTH CLAIMS

Health Claims sind Nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben, die darauf hinweisen, dass ein Lebensmittel vorteilhafte Nährwerteigenschaften besitzt (nährwertbezogen), oder dessen Verzehr zu gesundheitlichen Vorteilen führen kann (gesundheitsbezogen).

In der Verordnung über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben vom Dezember 2006 sind Nährwertprofile festgelegt, die von Lebensmittel erfüllt sein müssen, um solche Angaben tragen zu dürfen. Ziel ist es, jede Angabe auf Lebensmitteletiketten wissenschaftlich abzusichern, was von der EFSA (European Food Safety Authority) überprüft wird.

Die EFSA hat bis April 2011 263 wissenschaftliche Gutachten über gesundheitsbezogene Angaben zu „allgemeinen Funktionen“ veröffentlicht. Diese Angaben entstammen einer von der Europäischen Kommission vorgelegten Datenbank, die insgesamt 4637 Haupteinträge enthält und rund 10.500 ähnliche gesundheitsbezogene Angaben zusammenfasst. Die EFSA hat mit Ende Juni 2011 ihre ersten Bewertungen abgeschlossen und nimmt regelmäßig Aktualisierungen vor, um veröffentlichte Gutachten und Änderungen in der Liste wiederzugeben.

Nach Begutachtung der Datenbank in Bezug auf Gerste und ihrer phenolischen Inhaltsstoffe ist in Tab. 4.1 ein Auszug der nährwert- und gesundheitsbezogenen Angaben ersichtlich. Grundsätzlich enthält die Datenbank Angaben über Gerste, jedoch nur in Verbindung mit β -Glucan und Ballaststoffen. Angaben von Gerste in Verbindung mit Polyphenolen, Flavonoiden und Anthocyanen bzw. Anthocyanidinen konnten keine gefunden werden.

In Tab. 4.2 wurden Auszüge von Health Claims mit Polyphenolen ohne Bezug auf Gerste oder anderen Lebensmittel begutachtet.

Die Datenbank gibt auch Auskunft über den Bearbeitungsstatus der einzelnen Angaben (Tab 4.1 und 4.2: EFSA Deadline). Die Bearbeitung der Einträge ist bereits abgeschlossen und ein Großteil trägt den Status „published“. Vereinzelt sind auch Rücknahmen von Angaben vorgenommen worden, die in der Liste als „withdrawn“

aufscheinen, wie Beispielsweise Health Claim ID 3661. In der Datenbank wurden auch Einträge mit dem Status „on hold“ gefunden. Dazu wurden von der EFSA noch keine Gutachten veröffentlicht.

Nach Abschluss der Begutachtung und Bewertung konnten die Health Claims aus Tab. 4.1 mit der ID 755, 757, 819 und 821 genehmigt werden. Die Health Claims 755 und 757 besagen, dass das in der Gerste enthaltende β -Glucan zu einem gesunden Blutcholesterin-Spiegel beiträgt. Diese Tatsache wurde durch zahlreiche Studien belegt, in denen mit Dosen von 3-12 g/d eine signifikante Erniedrigung der Serum LDL-Cholesterol Konzentration beobachtet werden konnte [EFSA, 2009; Newman et al., 1989; McIntosh et al., 1991; Behall et al., 2004a and 2004b; Keenan et al., 2007; Shimizu et al., 2008].

Health Claim 819 beschreibt die Verbesserung der Darmfunktion durch das in der Gerste enthaltende β -Glucan. Dabei fördert das β -Glucan die Verdauung und steht in engem Zusammenhang mit dem Grad der Vergärung durch die Darmflora im Dickdarm. Die Empfehlung liegt bei >3 g β -Glucan/Tag oder der Verzehr von Backwaren die 6 g Ballaststoffe/100 g enthalten [EFSA, 2011a].

Health Claim 821 geht auf den Kohlenhydrat-Metabolismus sowie auf die Insulin Sensitivität ein. In der öffentlichen wissenschaftlichen Meinung der EFSA ist der geforderte Effekt auch beschrieben als „Reduktion der postprandialen glykämischen Antwort“ und sei ein vorteilhafter physiologischer Effekt bei Menschen mit einer geschwächten Glucose-Toleranz. Um den geforderten Effekt zu erreichen, wird empfohlen 4 g β -Glucan von Gerste für alle 30 g der verfügbaren Kohlenhydrate pro Mahlzeit zu verzehren [EFSA, 2011b].

Die Health Claims 756, 820, 852 und 4416 aus der Tab. 4.1 wurden vom Panel der EFSA abgelehnt. Der Grund für die Ablehnung ist in den meisten Fällen der fehlende Beweis durch Studien, die oftmals die in den Health Claims beschriebene Wirkung nicht bestätigt. Ebenso waren auch die in der Literatur beschriebenen Daten zu wenig aussagekräftig, aufgrund falsch gewählter Methoden oder auch aufgrund Methoden mit zu geringer Spezifität.

Tab. 4.1: Auszug aus der Datenbank der Artikel 13 Health Claims, Gerste und Ballaststoffe in Bezug auf physiologische Funktion

ID	Food	Health relationship	Example of wording	Referenz
755	Barley/ Barley β -glucan	Blood cholesterol levels	Barley contributes to healthy cholesterol level.	[EFSA, 2009]
756	Barley Trim/Barley Bran	Contribution to the maintainance of healthy blood glucose level	The inclusion of 3 grams of barley β -glucan soluble fiber from Barley Trim Barley Bran, as a part of a diet low in saturated fat and a healthy lifestyle, can help maintain healthy blood glucose and cholersterol.	[EFSA, 2010a]
757	Barley Trim/Barley Bran	Contribution to the maintainance of healthy blood cholesterol level	Barley β glucan soluble fiber from BarleyTrim™ Barley Bran, as part of a diet low in saturated fat and a healthy lifestyle, can help maintain healthy blood cholesterol levels.	[EFSA, 2009]
819	Barley grain fiber	Gut health	Promotes gut functioning.	[EFSA, 2011a]
820	Barley grain fiber	Weight control	Helps with weight control. For longlasting sense of satiety. Frees energy slowly.	[EFSA, 2009]
821	Barley grain fiber	Carbohydrate metabolism and insulin sensitivity.	Stabilises sugar metabolism	[EFSA, 2011b]
852	Barley β -glucan	B-glucan increases satiety, prolongs satiety.	Consuming barley β -glucan increases satiety. Consuming oats β -glucan prolongs the feeling of satiety.	[EFSA, 2011b]
3661	Barley (Hordeum vulgare)	Physical well-being	Possesses high nutritive value. Helps to achieve the daily micronutrients need for the good general functions of the body.	Withdrawn
4416	Hordeum vulgare - Herba - Barley	Antioxidant Activity	Protection of body tissues and cells from oxidative damage.	[EFSA, 2010b]
4417	Hordeum vulgare - Seeds - Barley	Liver and Gall Bladder Health	Contributes to normal choleresis	on hold

(Stand: Juli 2011)

Das in Tab. 4.2 aufgelistete Health Claim ID 1445 wurde in der Datenbank mit dem Status „published“ gefunden, allerdings waren keine Veröffentlichungen beziehungsweise öffentliche wissenschaftliche Meinungen auffindbar.

Die Health Claims ID 1787, 1788, 1789, 1790 und 1791 der Tab. 4.2 wurden vom Panel der EFSA abgelehnt. Das Panel bezog sich auf die mitgeltende Literatur, die narrative Reviews, Tier und Human Studien, sowie *in vitro* Experimente einschloss, jedoch zum größten Teil ohne Bezug zu dem geforderten Effekt war. Es wurde auch zu wenig Information über die Quelle oder die Zusammensetzung der Anthocyanidine und Proanthocyanidine geliefert. Darüber hinaus wurden die Lebensmittelbestandteile, Anthocyanidine und Proanthocyanidine, die Gegenstand der Claims 1787, 1788, 1789, 1790 und 1791 sind, nicht ausreichend charakterisiert in Relation zu den geforderten Effekten beschrieben in Tab. 4.2 [EFSA, 2011c].

Die Health Claims ID 652 und 3143 wurden auch abgelehnt. Der in den Claims geforderte Effekt bezog sich auf die Reduktion von oxidativem Stress beziehungsweise auf den Schutz von Körperlipiden durch oxidative Schädigung. Das Panel zog in Betracht, dass bei einem Großteil der zahlreichen Referenzen für eine wissenschaftliche Untermauerung des geforderten Effekts keine Schlussfolgerungen gezogen werden konnten. Grund dafür war oft eine Unzuverlässigkeit der verwendeten Methoden oder auch nicht aussagekräftige Daten [EFSA, 2010c].

Tab. 4.2: Auszug aus der Datenbank der Artikel 13 Health Claims, Polyphenole

ID	Food	Health relationship	Example of wording	Referenz
1445	Anthocyanins	Antioxidant	Contains naturally occurring antioxidants, which may help to protect against the damage caused by free radicals, as part of a healthy life-style.	published
1787	Anthocyanidins + Proanthocyanidins	Cardiovascular system	Good for the cardiovascular system.	[EFSA, 2011c]
1788	Anthocyanidins + Proanthocyanidins	Blood fat levels	Can help to normalize blood fat levels.	[EFSA, 2011c]
1789	Anthocyanidins + Proanthocyanidins	Carbohydrate metabolism and insulin sensitivity	Can help to normalize blood sugar levels.	[EFSA, 2011c]
1790	Anthocyanidins + Proanthocyanidins	Gut health	For stomach health.	[EFSA, 2011c]
1791	Anthocyanidins + Proanthocyanidins	Eyes	Especially for the eye health of older people.	[EFSA, 2011c]
652/ 3143	Polyphenols	Oxidative stress reduction	Polyphenols are antioxidants, which naturally occur in cocoa and therefore in dark chocolate. They help to protect our body cells against free radicals.	[EFSA, 2010c]

(Stand: Juli 2011)

5. GERSTE

5.1. Ursprung und Verbreitung

Gerste (*Hordeum vulgare* L) ist eine der ältesten Getreidearten und wurde vermutlich als erste Getreideart domestiziert. Sie war eine der wichtigsten Nahrungsgetreidearten von alters her bis zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Ihren Ursprung hat sie mit hoher Wahrscheinlichkeit im Gebiet des Fruchtbaren Halbmonds im mittleren Osten. Dieses umfasst das heutige Israel, das nördliche Syrien, den Süden der Türkei, den östlichen Irak und den westlichen Iran. In einer 23000 Jahre alten Grabstätte an der südwestlichen Küste des Sees Genezareth in Nordisrael konnten Reste von Gerstenkörnern der Wildform *Hordeum spontaneum* gefunden werden [NADEL et al., 2004] und macht es zur ältesten bekannten Stätte für den Gebrauch von Gerste durch die Menschen. Die durch Mutation und Hybridisierung entstandene 6-reihige Nacktgerste erschien um 7000 bis 6000 v. Chr. in Ali Kosh und zwei anatolischen Grabstätten, Hacilar und Catal Huyuk [HARLAN, 1978]. Etwas später waren weitere Anbauggebiete für Gerste Äthiopien, China und Korea. Durch Völkerwanderungen verbreitete sich die Gerste auch im europäischen Raum. Von den Griechen und Römern wurde sie als heilendes und stärkendes Lebensmittel angesehen und in verschiedenster Form verzehrt. Skandinavien kultivierte sie während der Bronzezeit um ungefähr 2000 v. Chr., da die dortigen klimatischen Bedingungen den Weizenanbau erschwerten. In der heutigen Zeit ist die Gerste in der Weltproduktion unter den sieben wichtigsten Getreidearten auf Platz vier hinter Mais, Weizen und Reis. Grundsätzlich war sie in der Vergangenheit immer Hauptnahrungsbestandteil, wurde jedoch vom Weizen, aufgrund der besseren Textur, Beschaffenheit und Farbe von Weizenbrot, abgelöst. In der heutigen Zeit wird Gerste in den westlichen Ländern zu 60 % in der Tierfutterproduktion und zu 30 % in der Malzproduktion eingesetzt. In der menschlichen Ernährung wird sie nur noch zu 3 % verwendet. In Teilen von Asien und Nord Afrika zählt sie dennoch als wichtiger

Bestandteil der täglichen Ernährung und wird in größeren Mengen konsumiert [NEWMAN und NEWMAN, 2008; ANDERSSON und AMAN, 2008; HUBER, 2009].

5.2. Taxonomie

Die Gerste zählt zu der Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und wird in Stamm *Triticeae* und Gattung *Hordeum* eingeteilt. Insgesamt existieren 32 *Hordeum* Spezies, von denen eine als die kultivierte Form gilt (*H. vulgare* ssp. *vulgare*). Sie hat sich über Ewigkeiten von der zweizeiligen Wildform *H. vulgare spontaneum* entwickelt, von der sie sich in der Belastbarkeit der Blattspindel und der Hauptachse der Ähre charakteristisch unterscheidet. Die grundlegende Chromosomenzahl von $x = 7$ kann als diploid ($2n = 2x = 14$), tetraploid ($2n = 4x = 28$) und hexaploid ($2n = 6x = 42$) dargestellt werden. Zusätzlich kann *H. vulgare* zwei- oder sechszeilige Ähren besitzen (Abb 5.1). Laut Nilan und Ullrich [1993] entstand die sechszeilige Gerste durch Mutation und Hybridisierung aus der zweizeiligen Gerste und ist von der Anzahl an fruchtbaren Ährchen abhängig. Eine weitere Unterteilung kann in Sommer- oder Winter-Typen sowie Gersten mit Spelzen oder ohne Spelzen, sogenannte Nacktgersten, erfolgen [NEWMAN und NEWMAN, 2008; BAIK und ULLRICH 2008; HUBER, 2009].



Abb. 5.1: Zwei- (2 r) und Sechszellige (6 r) Gerste [CHANG, 2008]

5.3. Inhaltsstoffe der Gerste

5.3.1. Kohlehydrate

Der größte Anteil des Gerstenkorns sind Kohlenhydrate und liegen im Bereich von 78 bis 83 % [MacGREGOR und FINCHER, 1993]. Hochmolekulare Verbindungen wie Stärke und Zellulose sind auch bekannt als komplexe Kohlehydrate, gegenüber einfachen Zucker wie Glukose, Fruktose und Saccharose. Komplexe Kohlehydrate, welche die Masse der Getreide Kohlehydrate ausmachen, sind allgemein bekannt als Polysaccheride, die in Gerste und anderen Getreidesorten unterteilt sind in Stärke (lösliche Polysaccheride) und Nicht-Stärke- oder unlösliche Polysaccheride. Die Stärke ist mit rund 60 % am meisten enthalten. Der Gehalt der Nicht-Stärke Polysaccharide (NSP) variiert von 12 bis 23 %, je nachdem ob das Korn bespelzt oder unbespelzt ist [NEWMAN und NEWMAN, 2008].

Nicht-Stärke-Polysaccheride

Die Zellwände des Gersten Korns enthalten Nicht-Stärke-Polysaccheride als strukturelle Komponenten und befinden sich in der Schale, Aleuron und endospermalem Gewebe. Die dominanten Nichtstärke Polysaccheride von Gerste beinhalten β -Glucan, Arabinoxylan, Zellulose sowie Glukomannan und sind bezeichnet als Ballaststoffe (TDF = total dietary fiber). Verglichen zu Stärke und Zucker sind Nichtstärke Polysaccheride unverdaulich im menschlichen Verdauungssystem und spenden wenig bis keine Energie. Neben Hafer ist die Gerste das einzige Getreide, dass β -Glucane in signifikanten Mengen enthält (Tab 5.1 aus Kapitel 5.3.3) und könnte ein Grund dafür sein, dass die Gerste in letzter Zeit wieder mehr in den Fokus gerät [NEWMAN und NEWMAN, 2008].

Von allen Komponenten der Ballaststoffe in Gerste sind β -Glucane vermutlich die wichtigsten in Bezug auf die menschliche Ernährung und eine gesundheitliche Verbesserung [NEWMAN und NEWMAN, 2008]. Sie bestehen aus linearen Ketten von β -Glucosyl-Resten, die über (1 $\rightarrow$ 3) und (1 $\rightarrow$ 4) Bindungen verknüpft sind. Sie gehören

zu einer Familie von Polysaccheriden, die unterschiedlich in Größe, Löslichkeit und molekularer Struktur sind [MacGREGOR und FINCHER, 1993]. Im Gegensatz zu Zellulose sind sie zum Teil löslich in wässriger Lösung. Das kann auf die zusätzlichen β -(1,3) Bindungen zurückgeführt werden [NEWMAN und NEWMAN, 2008]. Die Viskositätseigenschaften von Gersten Extrakte werden auch beeinflusst durch die β -(1,3) und (1,4)-Bindungen und stehen im positiven Zusammenhang mit dem Molekulargewicht. Sowohl hoch- als auch niedermolekulare β -Glucane beeinflussen die physiologische Antwort, allerdings ist die Wirksamkeit bei hochmolekularen β -Glucanen besser aufgrund der erhöhten Viskosität der Ballaststoffe. In einer Reihe von klinischen und epidemiologischen Studien konnte ein positiver Effekt von einer β -Glucanreichen Ernährung beobachtet werden. Beispielsweise hilft es kardiovaskuläre Krankheiten zu kontrollieren. Es wurde ebenso eine Beziehung zwischen dem Konsum von β -Glucan und einem niedrigem Blutglucose Level beobachtet [TIWARI und CUMMINS, 2012].

Ähnlich den β -Glucanen stammen die Arabinoxylane aus einer Familie von Polysaccheriden, die unterschiedlich in Größe, Löslichkeit und molekularer Struktur sind. Sie bestehen hauptsächlich aus Arabinose und Xylose. Sie befinden sich vorwiegend in Aleuron und endospermalen Zellwänden, erscheinen aber auch in der Schale. Ihr (1 $\rightarrow$ 4)- β -xylopyranosyl Gerüst trägt einzelne α -L-arabinofuranosyl Reste an C(O)3 sowie C(O)2 Position. Phenolsäuren, hauptsächlich Ferulasäure aber auch *p*-Coumarsäure, können über Esterbindungen kovalent an Arabinoxylane gebunden sein [MacGREGOR und FINCHER, 1993].

5.3.2. Proteine

Der Proteingehalt in Gerste kann stark variieren und ist auf die Umgebung des Standortes der Aufzucht zurückzuführen. Grundsätzlich hat Gerste, die in trockenen Gebieten aufgewachsen ist einen geringeren Gehalt an Proteinen als Gerste in feuchteren Gebieten. Ebenso erhöht sich der Gehalt an Proteinen durch Entfernen der Spelzen, wie es auch bei anderen Nährstoffen, außer Ballaststoffen, der Fall ist. Der Gehalt

schwankt zwischen 12,5 und 16,6 g/100 g Trockengewicht (Tab 5.1 aus Kapitel 5.3.3) [NEWMAN und NEWMAN, 2008].

5.3.3. Lipide

Lipide befinden sich durchgehend im ganzen Korn und können in Nichtstärke und Stärke, sowie polare und unpolare Lipide unterteilt werden. Durchschnittliche Gehalte liegen im Bereich von 2 bis 3 %. Eine weitere wichtige Gruppe von Nährstoffen, die in Beziehung zur Lipidlöslichkeit stehen, sind die Tocopherole und Tocotrienole, auch Tocale oder Vitamin E-Komplex genannt [NEWMAN und NEWMAN, 2008; MORRISON, 1993].

Tab. 5.1: Zusammensetzung von Gerste (g/100 g), auf Basis der Trockensubstanz

Komponente	Gerste mit Spelzen		Gerste ohne Spelzen	
	Durchschnitt ¹	Bereich	Durchschnitt ¹	Bereich
Stärke	58,2	57,1 – 59,5	63,4	60,5 – 65,2
Zucker ²	3,0	2,8 – 3,3	2,9	2,0 – 4,2
Protein ³	13,7	12,5 – 15,4	14,1	12,1 – 16,6
Lipide	2,2	1,9 – 2,4	3,1	2,7 – 3,9
Ballaststoffe	20,2	18,8 – 22,6	13,8	12,6 – 15,6
Minerale	2,7	2,3 – 3,0	2,8	2,3 – 3,5

[NEWMAN und NEWMAN, 2008, ÅMAN und NEWMAN, 1986]

¹n = 3, ²Glucose, Fruktose, Saccharose, und Fruktane, ³N x 6,25.

6. AUFGABENSTELLUNG

Diese Arbeit wurde im Zuge eines umfangreichen Forschungsprojektes durchgeführt. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf die Gerstenvarietäten aus konventioneller Züchtung gelegt, die durch einen besonders hohen ernährungsphysiologischen Wert und vielversprechenden lebensmitteltechnologischen Eigenschaften herausragen.

Das globale Ziel dieser Arbeit war es die zu untersuchenden Nacktgerstengenotypen auf deren Gehalt an phenolischen Verbindungen und der damit korrelierenden antioxidativen Kapazität zu untersuchen. Der Schwerpunkt war auf die freien und gebundenen Phenolsäuren sowie die Anthocyane gerichtet.

7. MATERIAL UND METHODEN

7.1. Probenmaterial

Das zu untersuchende Probenmaterial umfasste insgesamt 29 konventionell angebaute Sommernacktgerste-Varietäten aus dem Anbaujahr 2008. Aus diesem Set wurden 12 Varietäten auch im darauffolgenden Jahr (2009) angebaut und zur Untersuchung vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, des Departments für Angewandte Pflanzenzüchtung und Pflanzenbiotechnologie, der Universität für Bodenkultur Wien zur Verfügung gestellt (Versuchswirtschaft Großenzersdorf, (16°35' E; 48°13' N)) (Tab. 7.1.)

Das Probenmaterial beider Anbaujahre bestand aus schwarz, gelb, blau und violett gefärbten Varietäten (Abb. 7.1 und 7.2). Zur Gehaltsbestimmung der Anthocyane wurden ausschließlich die schwarz, blau oder violett gefärbten Varietäten herangezogen (23 Varietäten aus 2008 und 9 aus 2009). Die Gehaltsbestimmung der Phenolsäuren wurde mit 12 Varietäten aus 2009 von allen Farbgruppen durchgeführt (Tab. 7.2).

Die Vermahlung der vollen Körner wurde mit der Labormühle (IKA, MF10 basic, SN: 01662681, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden bis zur Verarbeitung bei 4°C gelagert und kurz vor den Analysen vermahlen.

Innerhalb der neun Varietäten aus 2009 (Varietäten aus Tab. 7.2 ohne der gelben Farbgruppe) wurden auch die Mahlfraktionen Mehl, Futtermehl und der Kleie hergestellt. Die Trennung wurde auf dem Labormahlautomaten Bühler-MLU 202 durchgeführt. Die Kleie wurde einer weiteren Zerkleinerung mittels Retsch Ultrazentrifugalmühle (0,5 mm Siebeinsatz, Typ ZM 200, Deutschland) unterzogen, um eine bessere Extraktion zu erzielen [POISINGER, 2011]. Bis zur Extraktion wurden die Mehle bei 4°C gelagert.

Tab. 7.1: Nacktgerste-Varietäten aus dem Anbaujahr 2008 mit Ursprungsland

Schwarzkörnig			Blaukörnig			Violettkörnig		
1	BOKU SNG 04	AT	16	C651	CN	24	HOR2199	DE
2	BVAL358117	ET	17	E515	ET	25	HOR2593	DE
3	BVAL358163	ET	18	E550	ET	26	HOR3727	DE
4	C661	CN	19	E632	ET	27	HOR4024	IN
5	E360	ET	20	GE040 Sel blau BOKU	AT	28	HOR4940	US
6	E604	ET	21	I311	IN	29	HOR11402	CN
7	Icarda Black Naked	SY	22	N308	NP	30	N023	NP
8	U347 (vermutlich I307)	JP	23	N602	NP			

Abkürzungen: AT Austria, CA Canada, CN China, DE Germany, ET Ethiopia, IN India, IT Italy, JP Japan, NP Nepal, US United States of America, SY Syria, [PRÜCKLER, 2009]

Tab. 7.2: Nacktgerste-Varietäten aus dem Anbaujahr 2009 mit Ursprungsland

Schwarzkörnig					Gelbkörnig				
4	C661	CN	A	P	9	BVAL350010 (HORA)	DE		P
5	E360	ET	A	P	12	HB803 (waxy)	CA		P
7	Icarda Black Naked	SY	A	P	13	Lawina	DE		P
Blaukörnig					Violettkörnig				
16	C651	CN	A	P	25	HOR2593	DE	A	P
18	E550	ET	A	P	27	HOR4024	IN	A	P
22	N308	NP	A	P	30	N023	NP	A	P

Abkürzungen: AT Austria, CA Canada, CN China, DE Germany, ET Ethiopia, IN India, IT Italy, JP Japan, NP Nepal, US United States of America, SY Syria; A = Untersuchung auf Anthocyane, P = Untersuchung auf Phenolsäuren, [PRÜCKLER, 2009]



Abb. 7.1: Nacktgersten: Ähren
(von links nach rechts – violett-, gelb-, schwarz- und blaukörnig)
[PRÜCKLER, 2009]



Abb. 7.2: Nacktgersten: Farbfamilien (von links nach rechts – gelbe, blaue, violette und schwarze Körner)

7.2. Analytische Methoden

7.2.1. Isolierung der Anthocyane durch Extraktion (nach Leopold, 2008)

Prinzip

Die in Getreide enthaltenen Anthocyane werden mit HCl angesäuertem Methanol (85:15 v/v) extrahiert und mittels Hochleistungsflüssigchromatographie aufgetrennt und quantifiziert.

Material

Geräte

- Analysenwaage Genauigkeit: $\pm 0,1$ mg, Sartorius, Deutschland, A200S, SN: 35100310
- Schraubeprouvetten aus Glas
- Diverse Kolbenhubpipetten, Fa. Eppendorf, Deutschland
- Vortex-Mixer, Fa. IKA, Deutschland, Typ VF 2
- Schüttler
- Vakuumpumpe, Fa. Vaccubrand, Deutschland, Typ: CVC 2
- Keramikfilter
- Falcon-Röhrchen (40 ml, 20 ml)
- Zentrifuge (Eppendorf, centrifuge 5810, SN: 10497, Deutschland)
- Rundkolben mit Schliff NS 19/26, 50 ml und 250 ml
- Glaskügelchen
- Rotavapor, Fa. Heidolph Instruments, Deutschland, Typ: 4010-digital
- Paraffinfilm
- Ultraschallbad
- Photometer, Fa. Hitachi, Japan, Typ: U-1100
- Standardreaktionsgefäß 2 ml, Fa. Eppendorf, Deutschland, Nr. 3810

Chemikalien

- Chloroform
- Methanol (HPLC-Grade), Fa. Merck, Deutschland, Nr. 1.06018
- HCl rauchend 37 %, Fa. Fluka, Nr. 84422, Deutschland
Extraktionslösung: 85 % Methanol + 15 % 0,1 M HCl
- Destilliertes Wasser
- HQ-Wasser, Fa. Filter und Lufttechnik, Österreich, Typ: HQ-5

Durchführung

Es wurden für jede Bestimmung $2 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$ Probenmaterial, jeweils im Doppelansatz, in eine verschraubbare Glaseprouvette eingewogen und zur Entfettung des Mehles mit 7 ml Chloroform versetzt. Anschließend wurde im Vortex gut gemischt und 30 min im Schüttler inkubiert.

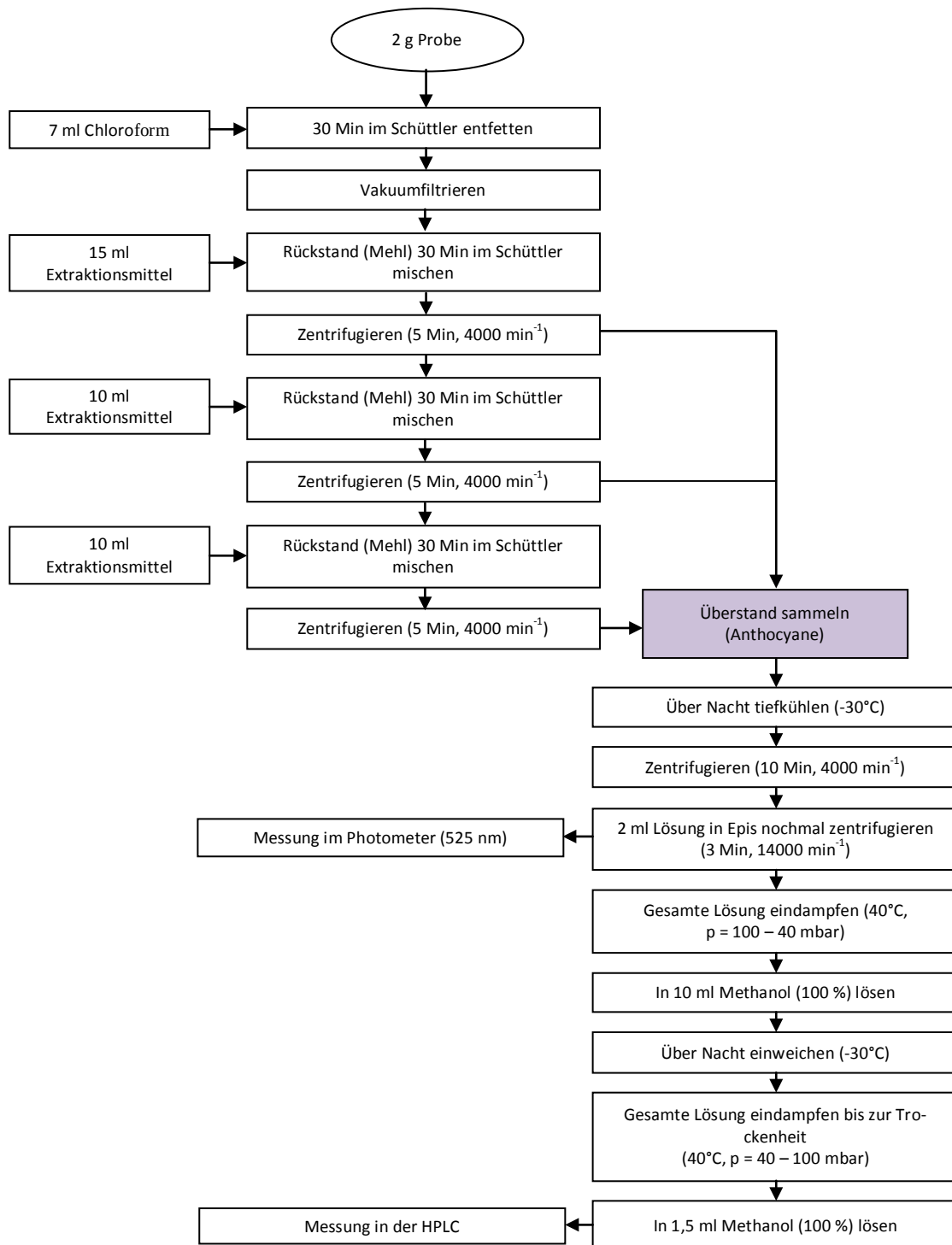
Nach Ende der Inkubationszeit wurde mittels Vakuumpumpe und Keramikfilter das Chloroform abgesaugt und der Rückstand in Falcon-Probenröhrchen überführt. Anschließend wurde das Mehl mit 15 ml Extraktionslösung vermischt, im Vortex gemischt und zur Extraktion 30 min im Schüttler inkubiert. Danach wurde 5 min bei 4000 min^{-1} zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und sofort tiefgekühlt. Der Extraktionsschritt wiederholte sich insgesamt dreimal, allerdings wurde bei den letzten beiden Schritten mit 10 ml Extraktionslösung extrahiert.

Der gesammelte Überstand wurde über Nacht bei -30°C gelagert um enthaltene Proteine zu fällen. Der dadurch entstandene Niederschlag wurde 10 min bei 4000 min^{-1} zentrifugiert und der Überstand in einen 250 ml Rundkolben überführt. Zuvor wurde aus der zentrifugierten Lösung 2 ml entnommen, in Eppendorf Hüschen überführt und nochmals bei 14000 min^{-1} 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung in Küvetten überführt und im Photometer bei 525 nm gemessen. Der Inhalt der Küvetten wurde in die Kolben zum Rest dazugegeben.

Der Extrakt wurde im Wasserbad mit einer Vakuumpumpe ($p = 200 - 50 \text{ mbar}$ bei 40°C) eingedampft und der Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen und gut im Ultraschallbad gelöst. Da die Proteinrückstände nach dem Eindampfen noch Farbe enthielten wurde die Lösung nochmals über Nacht bei -30°C extrahiert. Der Extrakt wurde in Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 4000 min^{-1} zentrifugiert, wieder in 100 ml Rundkolben überführt und bei 40°C eingedampft.

Der trockene Rückstand wurde in 1,5 ml HPLC-Methanol mithilfe eines Ultraschallbads gelöst und in Vials abgefüllt. Bis zur HPLC Analyse wurden die Proben bei -30°C gelagert.

In Abb. 7.3 ist die Extraktion der Anthocyane schematisch dargestellt.

**Abb. 7.3:** Schematische Darstellung der Anthocyanextraktion

7.2.2. Isolierung der phenolischen Bestandteile aus Getreide (nach MATTILA et al., 2005)

Prinzip

Die in Getreide enthaltenen phenolischen Bestandteile werden durch Lösungsmittel extrahiert. Durch Extraktion mit 80 %igem Methanol werden zuerst freie und durch anschließende Alkali-Hydrolyse gebundene Phenolsäuren aus der Probenmatrix extrahiert.

Material

Geräte:

- Analysenwaage Genauigkeit: $\pm 0,1$ mg, Sartorius, Deutschland, A200S, SN: 35100310
- Falcon-Röhrchen (20 ml, 40 ml)
- Vortex-Mixer, Fa. IKA, Deutschland, Typ: VF 2
- pH-Meter
- Glasstab
- Diverse Kolbenhubpipetten, Fa. Eppendorf, Deutschland
- Schüttler
- Glastrichter
- Watte
- Rundkolben mit Schliff NS 19/26
- Rotavapor, Fa. Heidolph Instruments, Deutschland, Typ: 4010-digital
- Paraffinfilm
- Ultraschallbad
- Alufolie
- Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Deutschland Typ: Centrifuge 5810
- Stickstoff, Fa. Linde

Chemikalien

- Methanol (HPLC Grade), Fa. Merck, Deutschland, Nr. 1.06018
- HQ-Wasser, Fa. Filter und Lufttechnik, Österreich, Typ: HQ-5
- NaOH 32%, Fa. Merck, Deutschland, Nr. 106498
- HCl rauchend 37%, Fa. Fluka, Deutschland, Nr. 84422
- Ethylacetat, ACS, Fa. Merck, Deutschland, Nr. 1.09623
- Natriumsulfat p.a., Fa. Merck, Deutschland, Nr. 1.06649

Durchführung

Es wurde $1 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ Probe in ein Falcon-Röhrchen eingewogen (im Doppelansatz), 10 ml Lösungsmittel hinzugefügt und im Vortex gut durchgemischt. Anschließend wurden die Probenröhrchen 30 min im Schüttler bei Zimmertemperatur gemischt. Danach wurde 5 min bei 4000 min^{-1} zentrifugiert. Der entstandene Überstand (freie Phenolsäuren) wurde in neues Probenröhrchen überführt. Dem Rückstand wurden weitere 5 ml Lösungsmittel hinzugefügt und nochmals 15 min im Schüttler gemischt. Anschließend wurde wieder 5 min bei 4000 min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereint und bei -30°C gelagert.

Zur Extraktion der gebundenen Phenolsäuren wurde dem Rückstand 9 ml Lösungsmittel, 10 ml HQ-Wasser zugegeben und gut durchgemischt. Vorsichtig wurde der Probe 5 ml einer 10 M NaOH zugegeben und wieder gut durchgemischt. Zur alkalischen Hydrolyse wurden die Probenröhrchen in Alufolie gepackt und für 16 Stunden im Dunkeln aufbewahrt (über Nacht bei -30°C).

Die Lösungen wurden mit Hilfe eines pH-Meters mit einer 8 M HCl auf pH 2,0 eingestellt. Anschließend wurde den angesäuerten Lösungen 15 ml Ethylacetat zugesetzt, gut im Vortex gemischt und 10 min bei 4000 min^{-1} zentrifugiert. Mit Hilfe einer Kolbenhubpipette wurde die obere Ethylacetatschicht abgehoben und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Die gesammelten Ethylacetatphasen wurden zum Trocknen über Natriumsulfat in Rundkolben filtriert. Das Filtrat wurde am Rotorvapor eingedampft ($p = 160 - 40 \text{ mbar}$ bei 40°C) und mit N_2 vollständig getrocknet.

Der trockene Rückstand (gebundene Phenolsäuren) wurde insgesamt in 6 ml Methanol (50 %) stufenweise gelöst und in neue Probenröhrchen überführt. Ein Teil davon (1,5 ml) wurde in Vials für die HPLC Analyse abgefüllt. Anschließend wurden die Extrakte bei -30°C gelagert.

Das gesamte Extraktionsschema ist in Abb. 7.4 zu sehen.

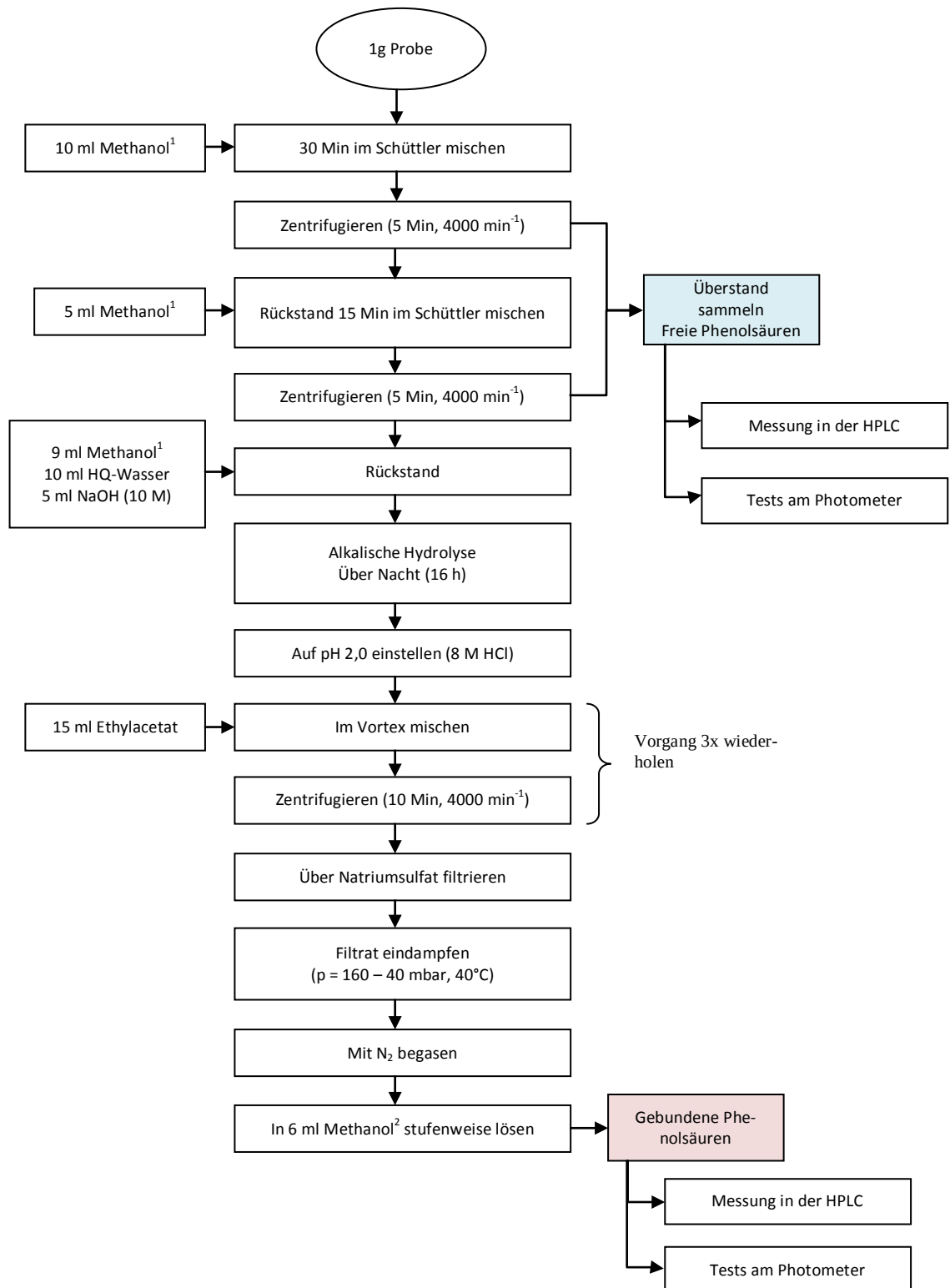


Abb. 7.4: Extraktionsschema der phenolischen Bestandteile

1: 80%Methanol (80 Teile Methanol + 20 Teile HQ-Wasser); 2: 50%Methanol (Methanol:HQ-Wasser = 1:1)

7.2.3. Quantifizierung der Anthocyan- und Phenolsäuren-Extrakte mittels HPLC

Prinzip

Die HPLC (High Pressure/Performance Liquid Chromatography) ist eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenchromatographie, bei der die mobile Phase unter Druck (Pumpe: 20-200 bar) eingespritzt wird. Es erfolgt eine Stofftrennung durch Verteilung zwischen einer ruhenden (stationär) und sich bewegenden (mobilen) Phase. Die Probenkomponenten treten dabei in Wechselwirkung mit der stationären Phase und werden verschieden stark zurückgehalten (Retention).

Es kann je nach Zusammensetzung der mobilen und stationären Phase in Normal Phasen Chromatographie (NP) und Umkehr- bzw. Reversed Phase Chromatographie (RP) unterschieden werden. Bei der NP-HPLC ist die stationäre Phase polar (Silica-gel/Kieselgel) und die mobile Phase unpolar. Dabei gilt je polarer die mobile Phase, desto schneller wird eine Substanz eluiert. Bei der RP-HPLC wird eine unpolare stationäre Phase (zB C18 Octadecyl) verwendet und eine polare mobile Phase. Wird während der Trennung die Zusammensetzung der mobilen Phase geändert, kann eine bessere Trennleistung erzielt werden (Gradiententrennung).

Eine qualitative Auswertung erfolgt über das UV-Spektrum eines Diodenarray-Detektors durch Vergleichen der Retentionszeit der Proben mit der eines Standards. Die Quantifizierung erfolgt über eine Peakfläche (Area) bei einer bestimmten Wellenlänge (Abb. 7.6), die der eingespritzten Stoffmenge proportional ist. Es wird eine Bezugsgerade aus Standards mit bekannten Konzentrationen erstellt (Abb. 7.5), wovon die Peakflächen der Substanz einer Probe abgelesen werden können.

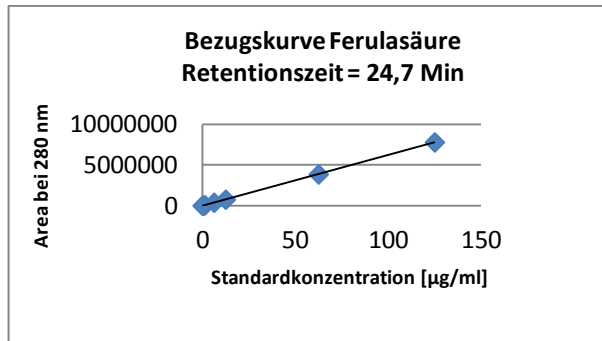


Abb. 7.5: Bezugskurve am Beispiel Ferulasäure [PRÜCKLER, 2009]

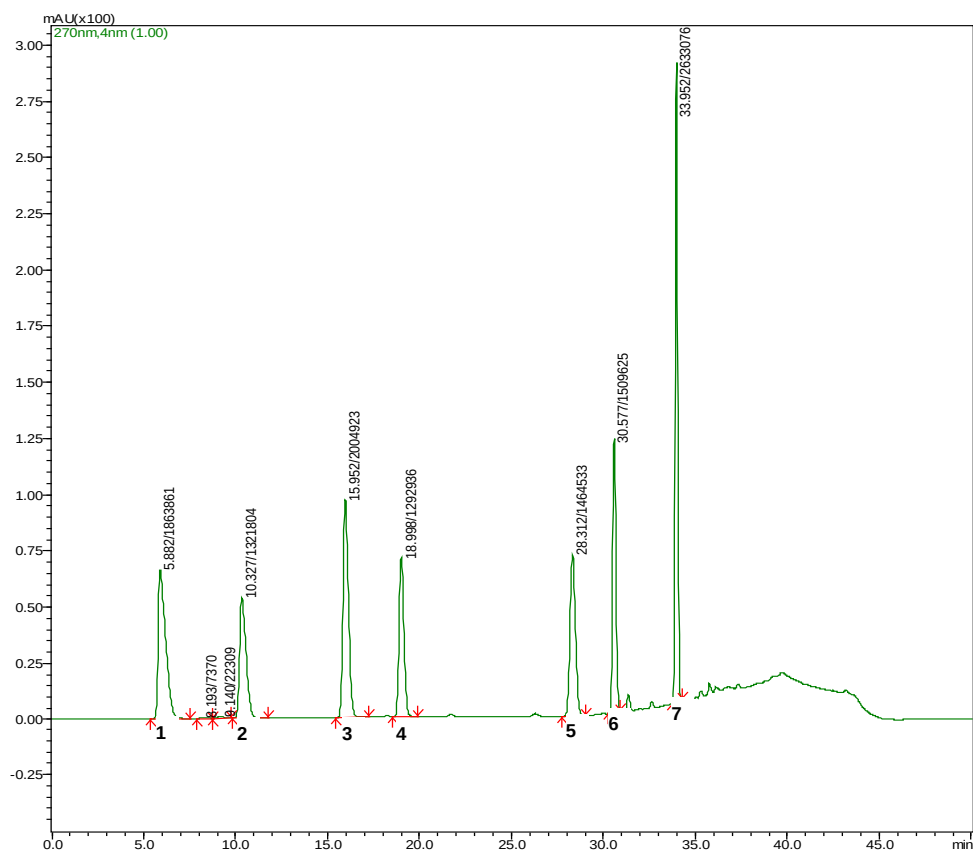


Abb. 7.6: HPLC-Chromatogramm: Probe (gebundene Phenolsäure) mit ad-
diertem Standard Mix (62,5 µg/ml – je Substanz) [PRÜCKLER, 2009]

Peaks: (1) Gallussäure bei 5,9 min, (2) Protocatechinsäure bei 10,3 min, (3) 4-OH-Benzoessäure bei 16 min, (4) Vanillinsäure bei 19 min, (5) p-Coumarsäure bei 28,3 min, (6) Ferulasäure bei 30,6 min, (7) o-Coumarsäure bei 34 min

Material

Geräte

- HPLC-Anlage
SCL-10AVP System Controller (Shimadzu, Österreich, SN: C21014113832LP)
SIL-10ADVP Autoinjector (Shimadzu, Österreich, SN: C21054109753SA)
LC-10ADVP Solvent Delivery Module (Shimadzu, Österreich, SN: 20964130360CS)
DGU-14A Degasser (Shimadzu, Österreich)
CTO-10ACVP Column Oven (Shimadzu, Österreich, SN: C21034330204CS)
Phenomenex Luna 250 mm x 4,6 mm, 5µm (HPLC Services, Österreich, SN: 265039-49)
SPD-M10AVP Diode Array Detector (Shimadzu, Österreich, SN: C20904170790US)
Auswertung mit LabSolutions LC Solution Software (Shimadzu, Österreich, VN: 1.03 SP3)
- HPLC-Vials und PVC-Verschlüsse
- Diverse Kolbenhubpipetten, Fa. Eppendorf, Deutschland

Chemikalien

- Methanol, Fa. Merck, LiChrosolv®, HPLC-Grade, Deutschland, 1.06007
- HQ-Wasser, Fa. Filter und Lufttechnik, Österreich, Typ: HQ-5
- Trifluoressigsäure, Fa. Aldrich, 99 %, Spec.photometric Grade, 302031, USA
- Acetonitril, HPLC grade, Fa. Lactan Roth, 8825.2
- Ameisensäure

Standardsubstanzen Phenolsäuren:

- Gallussäure, Fa. Fluka, >98 %, purum, HPLC-Grade, 48630, Spanien
- 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechinsäure), Fa. Fluka, >97 %, purum, 37580, China
- 4-Hydroxybenzoesäure, Fa. Fluka, >99 %, puriss., 54630, Spanien
- Vanillinsäure, Fa. Fluka, >97 %, purum, HPLC-Grade, 94770, Frankreich
- *p*-Coumarsäure, Fa. Fluka, >98 %, purum, HPLC-Grade, 28200, Deutschland
- Ferulasäure, Fa. Fluka, >98 %, purum, 46280, Japan
- *o*-Coumarsäure, Fa. Fluka, >97 %, purum, HPLC-Grade, 28170, USA

Standardsubstanzen Anthocyane: (Fa. Extrasynthese, Frankreich, Genay Cedex)

- Delphin (Delphinidin-3,5-di-O-Glykosid Chlorid), 0941 S
- Myrtillin (Delphinidin-3-O-Glucosid Chlorid), 0938
- Cyanidin-3-O-Galactosid Chlorid, 0923 S
- Cyanidin-3-O-Glucosid Chlorid, 0915 S
- Delphinidin-3-O-Rhamnosid Chlorid, 0940
- Pelargonidin-3-O-Glucosid Chlorid, 0907 S
- Delphinidin Chlorid, 0904 S
- Malvidin-3-O-Glucosid Chlorid, 0911 S
- Luteolinidin Chlorid, 0925 S
- Cyanidin Chlorid, 0909 S
- Apigeninidin Chlorid, 0921 S
- Peonidin Chlorid, 0906 S
- Malvidin Chlorid, 0913 S

Durchführung

Phenolsäuren

Die Bestimmung der Phenolsäuren wurde nach der Methode von SIEBENHANDL et al. [2007] und nach der Anleitung aus der Diplomarbeit von PRÜCKLER [2009] durchgeführt.

Die Laufmittel A (Wasser + 0,05 % Trifluoressigsäure) und B (Acetonitril + 0,05 % Trifluoressigsäure) wurden hergestellt, 10 min gerührt und anschließend 10 min im Ultraschallbad entgast. Gefrorene Extrakte wurden vor der Messung bei 37°C aufgetaut. Die Proben wurden mit einem Injektionsvolumen von 20 µl bei gebundenen Phenolsäuren, und 40 µl bei freien Phenolsäuren, bei einer Flussrate von 1 ml/min eingespritzt. Pro Lauf wurden für Laufmittel A 39,1 ml und Laufmittel B 13,9 ml verbraucht. Die Säule hatte während der Messung eine Temperatur von 30°C.

Die Messung wurde nach folgendem Gradienten durchgeführt: von 0 bis 3 min: 10% B; 15 min: 15% B; 25 min: 20% B; 30 min: 40% B; 36 min: 80% B; 40 min: 80% B; 43 min: 10 % B; 53 min: 10 % B

Die Stammlösungen (Konzentration = 1 mg/ml) der Standards wurden hergestellt und eine Verdünnungsreihe mit einem Konzentrationsbereich von 0,06 bis 125,0 µg/ml erstellt. Zur Ermittlung der Bezugsfunktionen (Tab. 7.3) wurden die Standards in die HPLC injiziert und die Flächen gemessen.

Tab. 7.3: Bezugsfunktionen der Standards ($r = 0,999$); Detektion der Analyten

Phenolsäure	Steigung	Achsenabschnitt	Analytendetektion
Gallussäure	62680,6009	3113,07638	270 nm
Protocatechinsäure	79882,6513	-4295,19772	260 nm
4-OH-Benzoesäure	117027,195	6845,90938	260 nm
Vanillinsäure	70566,1357	876,786498	260 nm
Kaffeesäure	65733,5047	-1666,29586	280 nm
p-Coumarsäure	97153,0303	2843,70846	280 nm
Ferulasäure	62397,2091	-5838,56709	280 nm
o-Coumarsäure	93830,2122	-44711,1751	270 nm

Anthocyane

Die Herstellung der Laufmittel A (Wasser + 4,5% Ameisensäure) und B (Acetonitril) erfolgte nach dem gleichen Schema, wie die der Phenolsäuren. Gefrorene

Extrakte wurden vor der Messung bei 37°C aufgetaut. Die Proben wurden mit einem Injektionsvolumen von 40 µl bei einer Flussrate von 1 ml/min eingespritzt, und das Chromatogramm wurde bei 520 nm gemessen. Pro Lauf wurden für Laufmittel A 24,9 ml und Laufmittel B 19,1 ml verbraucht. Die Säule hatte während der Messung eine Temperatur von 30°C.

Die Messung wurde nach folgendem Gradienten durchgeführt: 10% bei 0 min; erhöht auf 12% innerhalb 9 min; auf 13% innerhalb 7,5 min; 25% innerhalb 13,5 min; 90% innerhalb 15 min; gehalten bei 90% die nächsten 5 min; gefolgt von einer Erniedrigung auf 10% die innerhalb 5 min.

Aus Stammlösungen der Standards wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 40,0 µg/ml hergestellt. Zur Ermittlung der Bezugsfunktionen (Tab. 7.4) wurden die Standards mit einem Injektionsvolumen von 20 µl in die HPLC injiziert und die Flächen gemessen.

Tab. 7.4: Bezugsfunktionen der Standards ($r = 0,999$)

Anthocyane	Steigung	Achsenabschnitt
Delphin (Delphinidin-3,5-di-O-Glucosid Chlorid)	54072	-19379
Myrtillin (Delphinidin-3-O-Glucosid Chlorid)	165618,853	-53868,132
Cyanidin-3-O-Galactosid Chlorid	99529,8352	-56384,4934
Cyanidin-3-O-Glucosid Chlorid	116400,745	-59348,2348
Delphinidin-3-O-Rhamnosid Chlorid	88485,5231	-49508,7044
Pelargonidin-3-O-Glucosid Chlorid	74391,6862	-50858,0811
Delphinidin Chlorid	148569,304	-138279,725
Malvidin-3-O-Glucosid Chlorid	77728,4627	-62156,8415
Luteolinidin Chlorid	56138,298	-39399,7194
Cyanidin Chlorid	133172,635	-108739,979
Apigeninidin Chlorid	22384,7616	-14710,2992
Peonidin Chlorid	148676,49	-63679,7231
Malvidin Chlorid	139364	-118130

Die Proben beider Messungen waren Nacktgerstekörner aus dem Anbaujahr 2008 und 2009. Die Extrakte wurden nach den Punkten 7.2.1 und 7.2.2 hergestellt.

7.2.4. Bestimmung der gesamten phenolischen Bestandteile (nach Singleton et al., 1999)

Prinzip

Durch Reaktion der phenolischen Bestandteile mit dem Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz, bestehend aus einer Mischung Natriummolybdat und Natriumwolframat, kommt es zu einer Blaufärbung, die photometrisch (760 nm) gemessen wird.

Material

Geräte:

- Analysenwaage Genauigkeit: $\pm 0,1$ mg, Sartorius, Deutschland, A200S, SN: 35100310
- Einmal-Makroküvetten, Schichtdicke 1 cm
- Photometer, Fa. Hitachi, Japan, Typ: U-1100
- Standardreaktionsgefäß 2 ml, Fa. Eppendorf, Deutschland
- Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Deutschland Typ: Centrifuge 5810
- Wasserbad
- Vortex-Mixer, Fa. IKA, Deutschland, Typ: VF 2
- Diverse Erlenmeyerkolben mit Schliff
- Diverse Pipetten, Fa. Eppendorf, Deutschland
- Stoppuhr
- Messkolben
- Alufolie
- Standardreaktionsgefäß 2 ml, Fa. Eppendorf, Deutschland, Nr. 3810

Chemikalien

- Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz, Fa. Sigma, Deutschland, Nr. F-9252
- Natriumcarbonat wasserfrei, Fa. Merck, Deutschland, Nr. 106392
- Ferulasäure, Fa. Sigma, Deutschland, Nr. F-3500
- HQ-Wasser, Fa. Filter und Lufttechnik, Österreich, Typ: HQ-5

Herstellung der Reagenzien:

- Natriumcarbonat-Lösung 7,5 % (m/v)
- Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:10 verdünnen mit HQ-Wasser)

Die Lösungen wurden nach dem geschätzten Verbrauch immer frisch hergestellt und dunkel aufbewahrt. Vor Beginn der Herstellung der Reagenzien wurden das Photometer und das Wasserbad (50°C) eingeschaltet.

Durchführung

Zur Messung der Inkubationszeiten lag eine Stoppuhr bereit. In einem Standardreaktionsgefäß wurden 0,1 ml Probe im Doppelansatz vorgelegt. Die Proben wurden mit 0,5 ml Folin-Ciocalteu's-Reagenz versetzt und gut am Vortex gemischt. Nach Ablauf der 2 min wurden 0,8 ml Na_2CO_3 -Lösung hinzugefügt und am Vortex gut gemischt. Die Proben wurden 5 min im 50°C Wasserbad inkubiert, wobei eine deutliche Blaufärbung zu sehen war. Die Proben kühlten ein klein wenig ab und wurden nochmals am Vortex gemischt. Vor Beginn der Messung wurde das Photometer gegen eine leere Küvette auf null gestellt. Die Proben wurden in Makroküvetten überführt und bei 760 nm am Photometer gemessen.

Der Blindwert wurde mit dem jeweiligen Lösungsmittel des Extraktes hergestellt. Der Blindwert wurde ebenfalls gemessen und notiert.

Bei Absorptionen die über den Wert 2 gingen wurde die Probe entsprechend verdünnt und nochmal nach dem Pipettierschema gemessen.

Berechnung und Auswertung

Anhand einer Kalibrationsgerade mit Ferulasäure konnte die Auswertung erfolgen. Es wurden 6 Verdünnungsstufen, jeweils im Doppelansatz, im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 mg/ml aus einer Ferulasäure-Stammlösung ($c = 0,2 \text{ mg/ml}$) hergestellt. Als Lösungsmittel wurden Methanol und HQ-Wasser im Verhältnis 1:1 verwendet.

Zur Erstellung der Kalibrationsfunktion (Abb. 7.7) wurden die gemessenen Absorptionen gegen die Konzentration der Verdünnungsstufen aufgetragen und so eine Gerade gebildet.

Mit Hilfe der aus der Steigung erhaltenen Gleichung (Gl. 7.1) konnte die Konzentration der phenolischen Bestandteile errechnet werden und als mg Ferulasäure-Äquivalente/100 g Probe angegeben werden. Es wurden die von den Probenextrakten ermittelten Absorptionen eingesetzt. Die Gerade ist in Abb. 7.7 zu sehen und zeigt die y-Achse mit der Absorption im Bereich von 0 bis 0,6, sowie die Konzentrationen der Ferulasäure auf der x-Achse von 0 bis 0,12 mg/ml Probe.

$$y = 5,191x + 0,026$$

Gl. 7.1

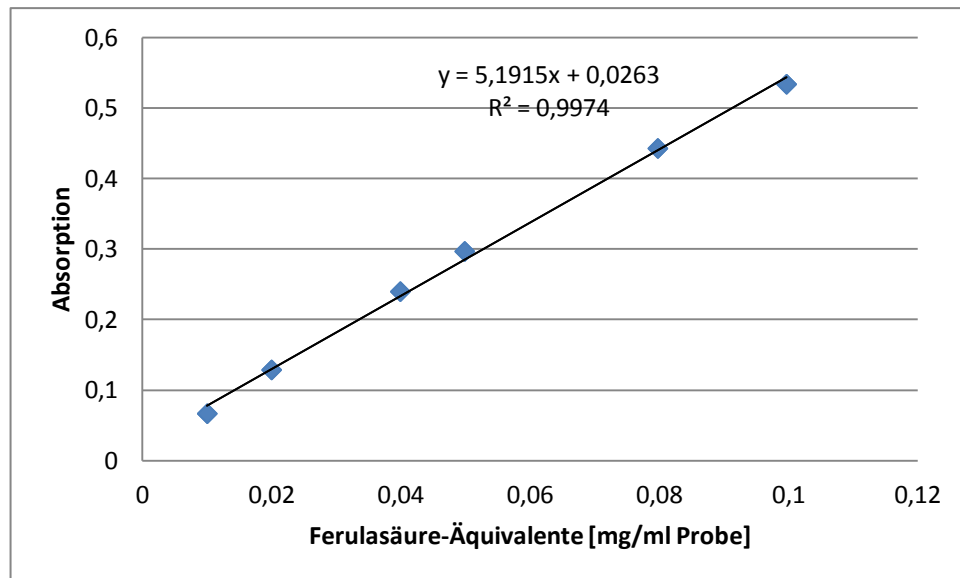


Abb. 7.7: Kalibrationsfunktion „Total Phenolic Content (TPC)“ = Gesamte phenolische Bestandteile

7.2.5. Radikalfängerreaktion mit $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (nach Pellegrini et al., 2003 und Moore et al., 2005)

Prinzip

Diese Methode basiert auf der Möglichkeit von Antioxidantien Radikale abzufangen. Nach Zugabe eines Antioxidans kann die Abnahme einer $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Radikal-Lösung, die blau-grün gefärbt ist und ihre charakteristische Absorption bei 734 nm hat, gemessen werden. Diese Abnahme ist wiederum proportional zur Konzentration und Aktivität der Antioxidantien und kann mit Hilfe eines Standards aus Trolox unter denselben Bedingungen berechnet werden.

Material

Geräte:

- Analysenwaage Genauigkeit: $\pm 0,1$ mg, Sartorius, Deutschland, A200S, SN: 35100310
- Einmal-Makroküvetten, Schichtdicke 1 cm

- Photometer, Fa. Hitachi, Japan, Typ: U-1100
- Standardreaktionsgefäß 2 ml, Fa. Eppendorf, Deutschland
- Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Deutschland Typ: Centrifuge 5810
- Vortex-Mixer, Fa. IKA, Deutschland, Typ: VF 2
- Diverse Erlenmeyerkolben mit Schliff
- Diverse Pipetten, Fa. Eppendorf, Deutschland
- Stoppuhr
- Messkolben
- Alufolie
- Standardreaktionsgefäß 2 ml, Fa. Eppendorf, Deutschland, Nr. 3810

Chemikalien

- ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)Diammoniumsalz], Fa. Sigma, Deutschland, Nr. A 1888
- TROLOX [6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-methyl-chroman-2-carbonsäure], Fa. Fluka, Schweiz, Nr. 56510
- Kaliumpersulfat kristallisiert, $K_2S_2O_8$, Fa. Merck, Deutschland, Nr. 5091
- Ethanol
- HQ-Wasser, Fa. Filter und Lufttechnik, Österreich, Typ: HQ-5

Herstellung der Reagenzien:

Am Vortag der Analyse:

- **ABTS Stammlösung; 7 mM:** 0,0192 g ABTS werden in 5 ml HQ-Wasser gelöst
- **$K_2S_2O_8$ Stammlösung; 140 mM:** 0,1892 g $K_2S_2O_8$ werden in 5 ml HQ-Wasser gelöst

Die Lösungen werden bis zur vollständigen Lösung ins Ultraschallbad gegeben.

- **Aktivierung der ABTS^{•+}-Lösung:** 88 µl vom $K_2S_2O_8$ Stammlösung werden in die ABTS Stammlösung dazugegeben. Der Messkolben wird in Alufolie gewickelt und über Nacht (12 bis 16 h) inkubiert.

Am Tag der Analyse:

Das Photometer wurde mindestens 20 min vor der ersten Messung eingeschaltet um auf Betriebstemperatur zu kommen.

- **ABTS^{•+}-Arbeitsreagenz:** 100 µl der aktivierten ABTS^{•+}-Lösung werden in 10 ml Natriumphosphatpuffer (5 mM, pH 7,4) gelöst. Der in Alufolie gewickelte Messkolben wird für 10 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wird am Photometer gemessen und sollte bei $0,7 \pm 0,02$ liegen.

Durchführung

Es wurde eine Stoppuhr zur Messung der Inkubationszeit bereit gelegt. Vor Beginn der Messung wurde das Photometer gegen eine leere Küvette auf null gestellt. In einem Standardreaktionsgefäß wurden 0,8 ml Probe im Doppelansatz vorgelegt. Danach wurden 1,0 ml ABTS^{•+}-Arbeitslösung mit einer Pipette dazugegeben und am Vortex gut gemischt. Nach einer Minute wurden die Proben in eine Makroküvette überführt und am Photometer bei 734 nm gemessen.

Es wurde ein Blindwert erstellt, wobei anstatt der Probe, 0,8 ml des jeweiligen Lösungsmittels verwendet wurde. Der Blindwert wurde im Photometer gemessen und notiert.

Bei Absorptionen, die über den Wert 2 gingen wurde die Probe verdünnt und nochmal nach dem Pipettierschema gemessen.

Berechnung und Auswertung

Die Berechnung erfolgte anhand einer Kalibrationsfunktion. Es wurden 5 Verdünnungsstufen, jeweils im Doppelansatz, aus einer Trolox-Stammlösung in den Konzentrationen 300, 200, 100, 50 und 10 µM hergestellt. Die Lösungen wurden mit Ethanol verdünnt.

Zur Erstellung der Kalibrationsfunktion (Abb. 7.8) wurden die gemessenen Absorptionen gegen die Konzentration der Verdünnungsstufen aufgetragen und so eine Gerade gebildet.

Mit Hilfe der erhaltenen Gleichung (Gl. 2) konnte die antioxidative Kapazität errechnet werden und als mmol Trolox-Äquivalente/100 g Probe angegeben werden. Die Graphik in Abb. 7.8 zeigt die Absorption auf der y-Achse mit Werten von 0 bis 0,8, sowie Trolox-Konzentration auf der x-Achse im Bereich von 0 bis 350 µM.

$$y = -0,001x + 0,734$$

Gl. 7.2

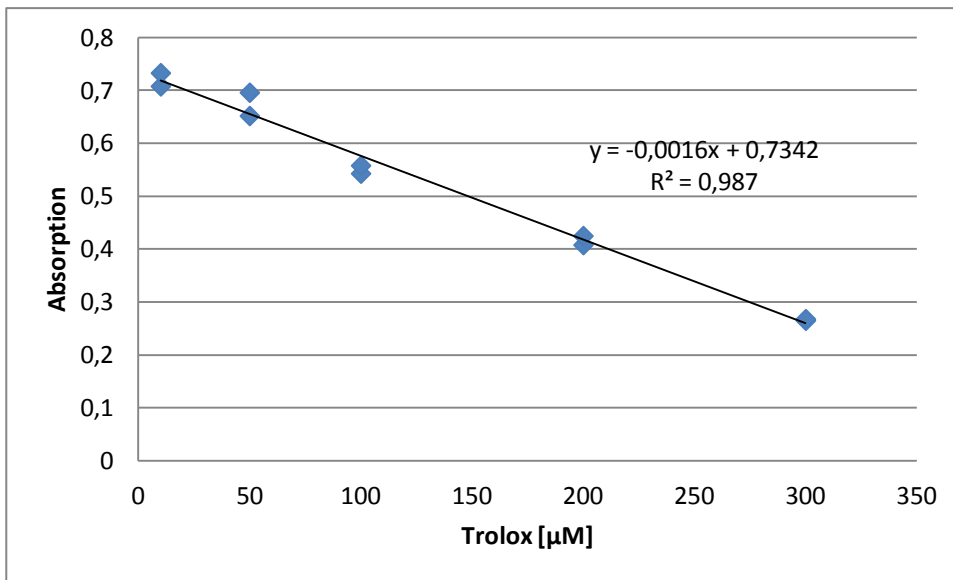


Abb. 7.8: Kalibrationsfunktion ABTS

7.2.6. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay – FRAP (nach Benzie und Strain, 1999)

Prinzip

Die Reduktion von Fe(III)-TPTZ zum Fe(II) bei niedrigem pH-Wert erzeugt eine intensive Blaufärbung, die photometrisch bei 595 nm gemessen werden kann. Die Änderung der Absorption ist direkt bezogen auf die reduzierende Kraft elektronenabgebender Antioxidantien der Reaktionslösung.

Material

Geräte:

- Analysenwaage Genauigkeit: $\pm 0,1$ mg, Sartorius, Deutschland, A200S, SN: 35100310
- Einmal-Makroküvetten, Schichtdicke 1 cm
- Photometer, Fa. Hitachi, Japan, Typ: U-1100
- Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Deutschland Typ: Centrifuge 5810
- Vortex-Mixer, Fa. IKA, Deutschland, Typ: VF 2
- Diverse Erlenmeyerkolben mit Schliff
- Diverse Pipetten, Fa. Eppendorf, Deutschland

- Wasserbad (37°C), Fa. GFL, Deutschland, Typ 1086
- Messkolben
- Alufolie
- Standardreaktionsgefäß 2 ml, Fa. Eppendorf, Deutschland, Nr. 3810

Chemikalien

- HCl rauchend 37%, Fa. Fluka, Deutschland, Nr. 84422
- Eisessig, Fa. Roth, Deutschland, Nr. 3738.5
- HQ-Wasser, Fa. Filter und Lufttechnik, Österreich, Typ: HQ-5
- Natrium-Acetat-Trihydrat, Fa. Merck, Deutschland, Nr. 6267
- TPTZ [2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazin], Fa. Fluka, Schweiz, Nr. 93285
- $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, Fa. Fluka, Schweiz, Nr. 44944
- $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, Fa. Fluka, Schweiz, Nr. 44980

Herstellung der Reagenzien:

- Acetat-Puffer; 0,3 M: 3,1 g Natrium-Acetat-Trihydrat wurden mit 16 ml Eisessig auf 1 L mit HQ-Wasser aufgefüllt.
- $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$; 20 mM: 0,5410 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ wurden in 100 ml HQ-Wasser gelöst.
- HCl; 40 mM: 330 μl wurden mit HQ-Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
- TPTZ; 10 mM: 0,0312 g TPTZ wurden in 10 ml HCl (40 mM) gelöst.
- FRAP-Arbeitsreagenz: Acetat-Puffer (0,3 M), TPTZ (10 mM) und $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (20 mM) wurden im Verhältnis 10:1:1 gemischt (Lösung braun gefärbt).
- Standard (1 mM $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$): 0,0278 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ wurden in 100 ml HQ-Wasser gelöst.

Durchführung

In einem Standardreaktionsgefäß wurde 0,2 ml Probe im Doppelansatz vorgelegt. Es wurden 1,3 ml FRAP-Arbeitsreagenz hinzugefügt und am Vortex gut durchgemischt. Anschließend wurden die Ansätze 30 Min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden in Makroküvetten überführt und bei 595 nm im Photometer gemessen. Vor der Messung wurde das Photometer gegen eine leere Küvette auf null gestellt.

Es wurde ein Blindwert erstellt, wobei anstatt der Probe, 0,2 ml des jeweiligen Lösungsmittels verwendet wurde. Der Blindwert wurde im Photometer gemessen und notiert.

Bei Absorptionen die über den Wert 2 gingen wurde die Probe verdünnt und nochmal nach dem Pipettierschema gemessen.

Berechnung und Auswertung

Die Berechnung erfolgte anhand einer Kalibrationsfunktion. Es wurden sechs Verdünnungsstufen, jeweils im Dreifachansatz, aus einer Eisensulfat-Heptahydrat-Stammlösung ($c = 1000 \mu\text{M}$) in den Konzentrationen 750, 500, 250, 100, 50 und 25 μM hergestellt. Die Verdünnungen wurden mit HQ-Wasser hergestellt.

Zur Erstellung der Kalibrationsfunktion (Abb. 7.9) wurden die gemessenen Absorptionen gegen die Konzentration der Verdünnungsstufen aufgetragen und so eine Gerade gebildet.

Mit Hilfe der erhaltenen Gleichung (Gl. 3) konnte die Konzentration der phenolischen Bestandteile errechnet werden und als mmol Trolox-Äquivalente/100 g Probe angegeben werden. Die in Abb. 7.9 abgebildete Graphik zeigt auf der y-Achse die Konzentration des Eisensulfat-Heptahydrat im Bereich von 0 bis 800 μM , sowie die Absorption im Bereich von 0 bis 3 auf der x-Achse.

$$y = 299,3x + 0,252$$

Gl. 7.3

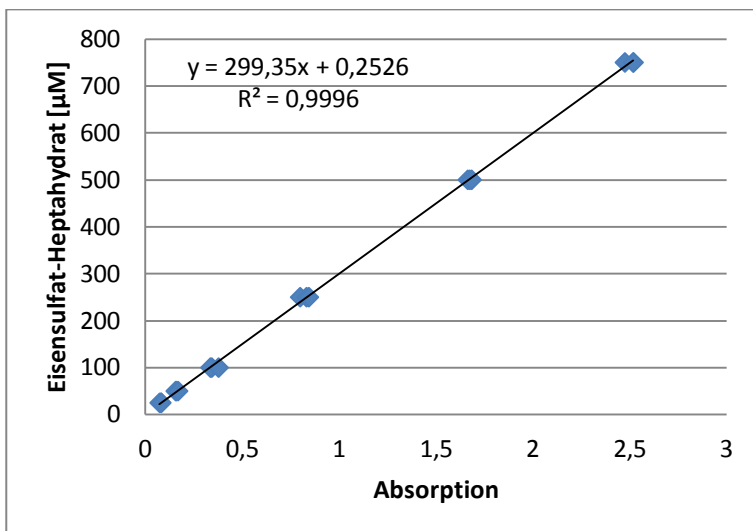


Abb. 7.9: Kalibrationsfunktion FRAP

7.2.7. Aufstockversuch

Prinzip

Mit Hilfe des Aufstockversuches kann, durch Zusetzen einer definierte Menge Anthocyan-Standard-Mix vor Beginn der Extraktion, die Wiederfindung untersucht werden.

In Tab. 7.5 sind die Konzentrationen der Standards sowie deren zugesetztes Volumen und die Konzentration nach Quantifizierung mittels HPLC ersichtlich.

Durchführung

Der Test wurde an zwei Proben (C 661 und HOR 4024) aus dem Erntejahr 2009 durchgeführt. Es wurden von jeder Probe insgesamt sechs Ansätze hergestellt. Drei Ansätzen wurden vor Extraktion 0,03 ml eines Standards (Tab. 7.5) dem Lösungsmittel zugesetzt. Den restlichen drei Ansätzen wurden nur das Lösungsmittel zugesetzt und anschließend alle sechs unter den gleichen Bedingungen extrahiert (siehe Kapitel 7.2.1). Nach Extraktion wurden die Proben mit dem Volumen (end) 1,5 ml (Tab. 7.5) in Vials abgefüllt und zur Quantifizierung der Stoffe in die HPLC eingespritzt. Um die Wiederfindung zu eruieren wurden die quantifizierten Stoffe den Sollwerten (Konz (end) in Tab. 7.5) gegenübergestellt.

Tab. 7.5: Konzentration und Volumen der zugesetzten Standards

Anthocyane	Konz (StMix) [µg/ml]	Zugesetztes Volumen [ml]	Volumen (end) [ml]	Konz (end) [µg/ml]
Delphin	6,1	0,03	1,5	0,122
Myrtillin	4,5	0,03	1,5	0,090
Cyanidin-Gal	8,3	0,03	1,5	0,166
Cyanidin-Glu	6,4	0,03	1,5	0,128
Delphinidin-Rha	7,8	0,03	1,5	0,156
Pelargonidin-Glu	9,1	0,03	1,5	0,182
Delphinidin	9,9	0,03	1,5	0,198
Malvidin-Glu	11,3	0,03	1,5	0,226
Luteolidin	9,3	0,03	1,5	0,186
Cyanidin	9,9	0,03	1,5	0,198
Apigeninidin	10	0,03	1,5	0,200
Peonidin	3,7	0,03	1,5	0,074
Malvidin	8,1	0,03	1,5	0,162

7.2.8. Ansäuerungsversuch

Prinzip

Die charakteristische Farbe der Anthocyane wird aufgrund ihrer chemischen Struktur im sauren pH-Wert intensiver und dadurch sichtbarer.

Die in dieser Arbeit angewandte Extraktionsmethode verwendet, nach Eindampfen der Probe ins Trockene, Methanol ohne Zusatz von 0,1 M HCl. Anhand des Ansäuerungsversuches wird getestet, ob durch Verwendung von (mit 0,1 M HCl) angesäuertem Methanol die Farbe intensiver wird und dadurch höhere Absorptionen gemessen werden können.

Durchführung

Der Versuch wurde anhand zweier Proben (C 661 und HOR 4024) durchgeführt. Es wurden insgesamt sechs Ansätze hergestellt, wobei nach Extraktion (Kapitel 7.2.1) drei der sechs Ansätze 1,5 ml (mit 0,1 M HCl) angesäuerter Methanol zugesetzt wurde. Die restlichen drei Ansätze wurden in 1,5 ml reinem Methanol gelöst. Alle sechs Ansätze wurden in Vials abgefüllt und zur Quantifizierung der Anthocyane in die HPLC eingespritzt.

7.3. Statistische Methoden

Im Zuge dieser Arbeit häufte sich eine große Datenmenge an, die mit Hilfe geeigneter Prozeduren der Statistik übersichtlich gemacht wurde. Diese statistischen Berechnungen wurden anhand der Programme STATGRAPHICS Centurion XVI.I und Microsoft Office Excel 2007 vorgenommen und die Ergebnisse aus den jeweiligen Prüfverfahren entnommen.

7.3.1. Arithmetischer Mittelwert

Prinzip

Der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$, auch Durchschnittswert bezeichnet, ist das am meisten verwendete Lagemaß. Voraussetzung für die Berechnung sind metrische Daten. Zur Berechnung (Gl. 7.4) wird die Summe aller beobachteten Werte $x_1, x_2, \dots, x_n$ gebildet und durch deren Anzahl dividiert. [CLAUß et al., 2002]

Durchführung

Die zu berechnenden Werte wurden summiert und durch deren Anzahl dividiert (Gl. 7.4). Im Excel wurde der Mittelwert anhand der Formel =MITTELWERT() berechnet. Die Mittelwerte konnten ebenfalls aus der Zusammenfassung des Statgraphics Centurion XVI.I -Statistikprogrammes entnommen werden.

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{Gl. 7.4}$$

7.3.2. Streuwerte metrischer Daten

Prinzip

Zusätzlich zum Mittelwert ist die Betrachtung eines weiteren Parameters, dem Streuwert, nötig. Allgemein beschreiben Streuwerte Maßzahlen zur Bewertung der „Breite“ einer Verteilung. Liegt eine niedrige Streuung vor, kann von einem hohen Maß an Zuverlässigkeit der Messung ausgegangen werden.

Eine Form des Streuwertes ist die empirische Varianz s^2 . Sie ist die Summe der quadrierten Abweichungen aller Messwerte vom arithmetischen Mittelwert, geteilt durch die um 1 reduzierte Anzahl n aller Messwerte (Gl. 7.5). [CLAUß et al., 2002]

Als nicht quadratische Maßzahl eignet sich am besten die Standardabweichung als Maß für die Variabilität, da sie die gleiche Dimension wie Werte und deren Mittelwert aufweist. Sie ist die Quadratwurzel der Varianz (Gl. 7.6). [CLAUß et al., 2002]

Für bessere Vergleichsmöglichkeiten von Streuwerte eignet sich der empirische Variationskoeffizient V . Er ist eine dimensionslose Zahl und ist der Anteil der empirischen Standardabweichung am Mittelwert und wird in Prozent angegeben (Gl. 7.7). Er ist nur sinnvoll bei positiven x_i und ist bei $\bar{x}$ in der Nähe von Null nur wenig aussagekräftig. [CLAUß et al., 2002]

Durchführung

Zur Berechnung der Standardabweichung wurde zuerst die Varianz anhand Gl. 7.5 errechnet. Hierbei wurde der zuvor errechnete Mittelwert von den Einzelwerten subtrahiert und quadriert. Anschließend wurde die Summe dieser gebildet und durch die Anzahl der Einzelwerte minus eins gerechnet (Gl. 7.5). Die Quadratwurzel aus der Varianz bildet die Standardabweichung (Gl. 7.6).

Der Variationskoeffizient errechnete sich durch Division der Standardabweichung durch den Mittelwert und Multiplikation mit 100 (Gl. 7.7).

Die Berechnungen der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten wurden im Programm Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Im Excel konnte anhand der Formel `=STABW()` die Standardabweichung und mit der Formel `=STABW() / MITTELWERT()` der Variationskoeffizient berechnet werden. Die Streuwerte konnten außerdem aus dem Statistikprogramm Statgraphics Centurion entnommen werden.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Gl. 7.5}$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Gl. 7.6}$$

$$VK[\%] = s / \bar{x} \times 100 \quad \text{Gl. 7.7}$$

7.3.3. Kruskal-Wallis-Test (H-Test)

Prinzip

Beim H-Test von KRUSKAL und WALLIS werden mehr als zwei Verteilungen auf der Grundlage von Rangdaten oder metrischen Daten ohne Normalverteilung verglichen. Damit kann beurteilt werden ob die zu untersuchenden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen und ob sie sich hinsichtlich der zentralen Tendenz unterscheiden [CLAUß et al., 2002].

Durchführung

Es werden den N Messwerten $Y_{11}, \dots, Y_{pn_p}$ Rangzahlen r_{ij} zugeordnet. Sind mehrere Messwerte gleich, werden jeweils die mittleren Ränge zugeordnet. Anschließend werden für jede der Messreihen die Summe der Ränge berechnet, die den Messwerten der betreffenden Reihe zugeordnet sind (Gl. 7.8). Daraus errechnet sich die Prüfgröße H (Gl. 7.9) wobei B eine Korrekturgröße ist, die in Vorliegen von t_l (= Zahl der gleichen Messwerte) den Wert $B = 1$ annimmt (Gl. 7.10). [HARTUNG, 2002]

Die Ergebnisse wurden aus dem Statgraphics-Kruskall-Wallis-Test entnommen.

$$r_i = \sum_{j=1}^{n_j} r_{ij}, 1 \leq i \leq p \quad \text{Gl. 7.8}$$

$$H = \frac{1}{B} \left[\frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^p \frac{1}{n_i} r_i^2 - 3(N+1) \right] \quad \text{Gl. 7.9}$$

$$B = 1 - \frac{1}{N^3 - N} \sum_{l=1}^g (t_l^3 - t_l) \quad \text{Gl. 7.10}$$

7.3.4. Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Prinzip

Im Wesentlichen wird die Varianzanalyse (ANOVA = Analysis of Variance) zur Prüfung von Mittelwertunterschieden bei metrischen Daten mit Normalverteilung eingesetzt. Außerdem müssen homogene Varianzen vorliegen die anhand des Levene-Tests (siehe Kapitel 7.3.6) geprüft werden. Grundsätzlich beruht dieses Verfahren darauf

eine Prüfgröße F (Gl. 7.14) mit einem kritischen Bereich $F_{\alpha;(l-1);(N-l)}$ zu vergleichen. Ist $F \geq F_{\alpha;(l-1);(N-l)}$, wird H_0 abgelehnt, d. h. es besteht ein Unterschied zwischen den Mittelwerten der untersuchten Stufen [CLAUß et al., 2002].

Durchführung

Es sind zuerst einige Hilfsgrößen, bestimmte Summen von Abweichungsquadraten (SAQ), zu berechnen [CLAUß et al., 2002].

Tab. 7.6: Berechnung der Abweichungsquadrate [CLAUß et al., 2002]

SAQ	Summe der Abweichungsquadrate	Formel
SAQ_I	innerhalb der Stichproben	$SAQ_I = \sum_{k=1}^l \sum_{i=1}^{n_k} (x_{ik} - \bar{x}_k)^2$ Gl. 7.11
SAQ_Z	zwischen den Stichproben	$SAQ_Z = \sum_{k=1}^l n_k (\bar{x}_k - \bar{x})^2$ Gl. 7.12
SAQ_G	für alle Messwerte insgesamt	$SAQ_G = SAQ_I + SAQ_Z$ Gl. 7.13

x_{ik} = Messwerte (empirisches Untersuchungsergebnis)

$\bar{x}_k$ = arithmetischer Mittelwert der k -ten Stichprobe, d. h. der Messwerte $x_{1k}, x_{2k}, \dots, x_{nnk}$

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert aller Messwerte x_{ik}

Anschließend werden die mittlere Varianz MQ_I innerhalb der Stichproben und die mittlere Varianz MQ_Z zwischen den Stichproben mittels der zuvor berechneten Abweichungsquadratsummen ermittelt (Tab. 7.6). Anhand dieser mittleren Varianzen kann die Prüfgröße F errechnet werden (Gl. 7.14) [CLAUß et al., 2002].

$$F = \frac{MQ_Z}{MQ_I} \quad \text{Gl. 7.14}$$

Mit Hilfe einer Tafel kann die Berechnungen der Varianzanalyse vereinfacht werden (Tab. 7.7).

Tab. 7.7: Tafel der einfachen Varianzanalyse [CLAUß et al., 2002]

Varianz	SAQ	Freiheitsgrade	MQ	F
Gesamt	SAQ_G	$N - 1$		
Zwischen den Gruppen	SAQ_Z	$l - 1$	$MQ_Z = \frac{SAQ_Z}{l - 1}$ Gl. 7.15	$F = \frac{MQ_Z}{MQ_I}$
Innerhalb der Gruppen	SAQ_I	$N - l$	$MQ_I = \frac{SAQ_I}{N - l}$ Gl. 7.16	

 N = gesamte Messwerte l = Messwerte der einzelnen Gruppen

Die Ergebnisse wurden aus der Statgraphics-ANOVA Tabelle entnommen.

7.3.5. Multipler Vergleich (DUNCAN-Test)

Prinzip

Bei diesem Verfahren werden mehr als zwei unabhängige Stichproben mit metrischen Daten und Normalverteilung miteinander verglichen. Voraussetzung zur Anwendung dieses Prüfverfahrens sind homogene Varianzen (siehe Kapitel. 7.3.6). Es muss auch bei der in Kapitel 7.3.4 besprochenen Varianzanalyse die Nullhypothese abgelehnt werden, d. h. zwischen den Stichproben sind Mittelwertunterschiede zu erkennen. So kann durch paarweisen Vergleich herausgefunden werden welche der l Stichproben signifikante Mittelwertunterschiede aufweisen. Es werden also sämtliche $\frac{l(l-1)}{2}$ Paare $i; j$ von Stichproben miteinander verglichen [CLAUß et al., 2002].

Die Nullhypothese $H_{0(i,j)}$ wird so formuliert, dass paarweise kein Unterschied zwischen zwei beliebigen Stichprobenmitteln besteht. Entsprechend dazu besagt die Alternativhypothese $H_{1(i,j)}$, dass zwischen Stichprobenpaare Mittelwertunterschiede existieren [CLAUß et al., 2002].

Durchführung

Es wird die Prüfgröße d_{ij} ermittelt (Gl. 7.17). Sie bildet die Differenz der Stichprobenmittelwerte der Stichprobe i und der Stichprobe j für jedes Paar $(i; j)$. An-

schließlich wird die Prüfgröße mit einem Wert d_{krit} (Gl. 7.18) verglichen und entschieden, ob die Nullhypothese angenommen oder abgelehnt wird [CLAUß et al., 2002].

Ist $|d_{ij}| \geq d_{krit}$, wird $H_{0(i;j)}$ abgelehnt und somit bestehen zwischen dem berechneten Stichprobenpaar signifikante Differenzen der Mittelwerte.

Die Ergebnisse des multiplen Vergleichs wurden aus dem Statgraphics-Test Mehrfache Mittelwertvergleiche entnommen [CLAUß et al., 2002].

$$d_{ij} = \bar{x}_i - \bar{x}_j \quad \text{Gl. 7.17}$$

$$d_{krit} = q_\alpha(p; N - l) \times \sqrt{\frac{MQ_I}{2} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} \quad \text{Gl. 7.18}$$

7.3.6. Levene-Test

Prinzip

Bei diesem Test wird überprüft, ob die Varianzen von p Messreihen signifikant unterschiedlich sind. Er verzichtet auf die Normalverteilung und setzt eine stetige Verteilung der p Messreihen zugrundeliegenden Gesamtheit voraus [HARTUNG et al., 2002].

Durchführung

Den aus dem arithmetischen Mittel $\bar{Y}_i$ berechneten transformierten Werten X_{ij} werden Rangzahlen zugeordnet (Gl. 7.19). Haben mehrere der X_{ij} gleiche Werte, werden die mittleren Ränge zugewiesen. Auf diese Rangzahlen wird der Kruskal-Wallis Test angewendet. Ergibt die Prüfgröße zu einem bestimmten Niveau α eine Signifikanz, so kann man mit der Irrtumswahrscheinlichkeit α schließen, dass nicht alle Varianzen gleich sind. [HARTUNG et al., 2002]

Aus der Statgraphics-Varianzprüfung wurden die Ergebnisse des Levene-Tests entnommen. Zu beachten war, dass die mit diesem Test überprüfte Varianzenhomogenität Voraussetzung für den Duncan-Test (siehe Kapitel 7.) und der Varianzanalyse (siehe Kapitel 7.) ist und daher bei nicht homogenen Varianzen weitere Tests nicht aussagekräftig waren.

$$X_{ij} = |Y_{ij} - \bar{Y}_i|, \text{ für } 1 \leq j \leq n_i, 1 \leq i \leq p \quad \text{Gl. 7.19}$$

7.3.7. Korrelation nach Spearman

Prinzip

Anhand der Korrelation ist es möglich den Grad der Abhängigkeit verschiedener Merkmale zu messen. Wird die Korrelation zwischen zwei Merkmalen gemessen, wird der Grad des linearen Zusammenhangs zwischen den beiden Merkmalen wiedergegeben. [HARTUNG et al., 2002]

Mit Hilfe des Rankkorrelationskoeffizienten von Spearman (r_s) kann die Korrelation der Zufallsvariablen X und Y , die nicht normalverteilt sind, geschätzt werden. [HARTUNG et al., 2002]

Durchführung

Es werden Rangzahlen $R_{(x_i)}$ bzw. $R_{(y_i)}$ für die je n Realisationen der Zufallsvariablen X und Y so vergeben, dass in jeder der beiden Reihen die kleinste Realisation den Rang 1 und die größte Realisation den Rang n erhält. So ergibt sich der Spearmansche Korrelationskoeffizient r_s durch Einsetzen der Rangzahlen in die Formel zur Berechnung von r_{xy} (Gl. 7.20). Kommen mehrere gleiche Realisationen in einer Zufallsvariable vor, so wird als Rang das arithmetische Mittel der in Frage stehenden Ränge zugeordnet [HARTUNG et al., 2002].

$$r_s = \frac{\sum_{i=1}^n (R(x_i) - \overline{R(x)}) (R(y_i) - \overline{R(y)})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (R(x_i) - \overline{R(x)})^2 \sum_{i=1}^n (R(y_i) - \overline{R(y)})^2}} \quad \text{Gl. 7.20}$$

Die Ergebnisse der Korrelation nach Spearman wurden aus der Statgraphics Spearmans Rangkorrelation entnommen.

8. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

8.1. Probenvorbereitung

Die Gerstenkörner wurden bis zur Vermahlung bei 4°C gelagert. Mit der Labormühle (IKA, MF10 basic, SN: 01662681, Deutschland) wurde das Probenmaterial (Gerstenkörner) mit verschiedenen Siebeinsätzen vermahlen. Zunächst wurde mit einem 1 mm Siebeinsatz vermahlen. Aufgrund der groben Vermahlung wurde anschließend mit einem 0,5 mm Siebeinsatz die Vermahlung nochmals wiederholt. Im Durchschnitt wurden pro Vermahlung in etwa 100 g Gerstenvollkörner bei einer Umdrehung von 3500 min⁻¹ vermahlen. Das Mehl der einzelnen Proben wurde zum Teil sofort verwendet, gegebenenfalls aber auch bis zur nächsten Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Herstellung der einzelnen Mahlfractionen wurde anhand des Labormühlautomaten Bühler-MLU 202 durchgeführt. Die während der Vermahlung ausgetragenen Fractionen werden als Kleie, Futtermehl und Mehl bezeichnet. Um eine bessere Extraktion zu erzielen wurde die Kleie mittels Retsch Ultrazentrifugalmühle (0,5 mm Siebeinsatz, Typ ZM 200, Deutschland) nochmals zerkleinert [POISINGER, 2011].

8.2. Extraktion und Bestimmung der Anthocyane

Die Extraktion wurde nach der Methode von LEOPOLD [2008] mit einigen Modifikationen durchgeführt und an die Probenmenge und Probenmatrix angepasst. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 7.2.1 beschrieben.

Die Gehaltsbestimmung wurde einerseits mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 525 nm durchgeführt, andererseits mittels HPLC (siehe Kapitel 7.2.3). Die Messung mittels HPLC diente neben der Quantifizierung auch der Identifizierung der einzelnen Stoffe der erhaltenen Extrakte.

8.3. Extraktion und Bestimmung der Phenolsäuren

Die Extraktion wurde nach der Methode von MATILLA et al. [2005] mit einigen Modifikationen durchgeführt und an die Probenmenge und Probenmatrix angepasst. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 7.2.2 beschrieben.

Die erhaltenen Extrakte wurden zu weiteren Messungen verwendet. Mittels HPLC (siehe Kapitel 7.2.3) wurden die einzelnen Stoffe identifiziert und quantifiziert. Zur Bestimmung der gesamten phenolischen Bestandteile wurde die Methode nach SINGLETON et al. [2008] verwendet. Die antioxidative Kapazität wurde anhand der Tests FRAP und TEAC gemessen.

8.4. Messung der antioxidativen Kapazität

Die Testmethoden wurden der jeweiligen Probenmenge und Probenmatrix angepasst. Alle drei Tests wurden nur an den Extrakten der gebundenen und freien Phenolsäuren angewandt.

Aufgrund von Überschreitungen der Absorptionsbereiche wurden zum Teil die Extrakte verdünnt um eine bessere Genauigkeit der Ergebnisse zu erzielen.

Eine Übersicht der jeweiligen Pipettierschemata wird im Folgenden dargestellt (Tab. 8.1 bis 8.3).

8.4.1. TPC-Test

Der Test zur Bestimmung der gesamten phenolischen Bestandteile wurde nach der Methode von SINGLETON et al. [1999] durchgeführt. Die genaue Testdurchführung ist in Kapitel 7.2.4 beschrieben.

Tab. 8.1: Pipettierschema für den TPC-Test

Volumen	Reagenz	Arbeitsschritt
0,1 ml	Probe	in 2 ml Standardreaktionsgefäß vorlegen
0,5 ml	Folin-Ciocalteu	hinzufügen und am Vortex gut durchmischen
		2 min Inkubationszeit
0,8 ml	Na ₂ CO ₃ -Lösung	hinzufügen und am Vortex gut durchmischen
		für 5 min im Wasserbad bei 50°C inkubieren
		bei Vorhandensein von Phenolen ist deutliche Blaufärbung zu sehen
		am Vortex gut durchmischen und in Makroküvetten überführen
		bei 760 nm im Photometer Absorption messen

Die Berechnung wird im Folgenden dargestellt. Die Berechnung der Absorptionen der Proben unter Berücksichtigung des Leerwerts wird in Gl. 8.1 dargestellt. Gl. 8.2 bis 8.4 beschreibt die Umrechnung von der Absorption auf die Gehaltsmengen in mg Ferulasäure-Äquivalente/100 g Probe mit Hilfe der Steigung und dem Achsenabschnitt (siehe Kalibrationsfunktion in Kapitel 7.2.4), sowie dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen der Extraktionsphase.

$$Abs_{(Probe)} - Abs_{(Leerwert)} = x \quad Gl. 8.1$$

$$\frac{(x-0,0263)}{5,1915} = mg \text{ Ferulasäure/ml Extrakt} \quad Gl. 8.2$$

$$mg/ml \times ml_{(Volumen)} \times Faktor_{Verdünnung} = mg \text{ Ferulasäure/Extraktion} \quad Gl. 8.3$$

$$\frac{mg/Extraktion}{Einwaage} \times 100 = mg \text{ Ferulasäureäquivalente /100g Probe} \quad Gl. 8.4$$

8.4.2. ABTS-Test

Die Messung der antioxidativen Kapazität wurde mittels der Methode nach PELLEGRINI et al. [2003] und MOORE et al. [2005] durchgeführt. In Kapitel 7.2.5 wird die genaue Durchführung dargestellt.

Tab. 8.2: Pipettierschema für den ABTS-Test

Volumen	Reagenz	Arbeitsschritt
0,8 ml	Probe	in 2 ml Standardreaktionsgefäß vorlegen
1,0 ml	ABTS ^{•+} - Arbeitslösung	hinzufügen und am Vortex gut durchmischen
		für 1 min inkubieren
		nochmals am Vortex gut durchmischen und in Makro- küvetten überführen
		bei 734 nm im Photometer Absorption messen

Die Berechnung der Gehaltsmengen erfolgte ähnlich wie in Kapitel 8.4.1 beschrieben. Nach Berücksichtigung des Leerwerts (siehe Gl. 8.1) wird in Gl. 8.5 bis 8.7 die Umrechnung von der Absorption auf die Gehaltsmengen in $\mu\text{mol Trolox-Äquivalente}/100\text{ g Probe}$ mit Hilfe der Steigung und dem Achsenabschnitt (siehe Kalibrationsfunktion in Kapitel 7.2.5), sowie dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen der Extraktionsphase, dargestellt.

$$\frac{(x-0,7342)}{-0,0016} = \text{nM Trolox} - \text{Äqu./ml Extrakt} \quad \text{Gl. 8.5}$$

$$\text{nM/ml} \times \text{ml}_{(\text{Volumen})} \times \text{Faktor}_{\text{Verdünnung}} = \text{nM Trolox} - \text{Äqu./Extraktion} \quad \text{Gl. 8.6}$$

$$\frac{\text{nM/Extraktion}}{\text{Einwaage}} \times 100 = \mu\text{mol Trolox} - \text{Äqu./100g Probe} \quad \text{Gl. 8.7}$$

8.4.3. FRAP-Test

Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität wurde ein weiterer Test nach der Methode von BENZIE und STRAIN [1999] durchgeführt. Die genaue Beschreibung der Durchführung ist in Kapitel 7.2.6 nachzulesen.

Tab. 8.3: Pipettierschema für den FRAP-Test

Volumen	Reagenz	Arbeitsschritt
0,2 ml	Probe	in 2 ml Standardreaktionsgefäß vorlegen
1,3 ml	FRAP-Arbeitslösung	hinzufügen und am Vortex gut durchmischen
		für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubieren
		nochmals am Vortex gut durchmischen und in Makroküvetten überführen
		bei 595 nm im Photometer Absorption messen

Die Berechnung wird im Folgenden dargestellt. Die Berücksichtigung des Leerwertes erfolgt wie in Gl. 8.1 beschrieben. Gl. 8.8 bis 8.10 beschreibt die Umrechnung von der Absorption auf die Gehaltsmengen in mmol Fe(II)-Äquivalente/100 g Probe mit Hilfe der Kalibrationsfunktion aus Kapitel 7.2.6 (Abb. 7.9).

$$x \times 299,35 + 0,2526 = \mu\text{M Fe(II)} - \text{Äqu.}/\text{ml Extrakt} \quad \text{Gl. 8.8}$$

$$\mu\text{M}/\text{ml} \times \text{ml}_{(\text{volumen})} \times \text{Faktor}_{\text{Verdünnung}} = \mu\text{M Fe(II)} - \text{Äqu.}/\text{Extraktion} \quad \text{Gl. 8.9}$$

$$\frac{\mu\text{M}/\text{Extraktion}}{\text{Einwaage}} \times 100 = \text{mmol Fe(II)} - \text{Äqu.}/100\text{g Probe} \quad \text{Gl. 8.10}$$

8.5. Aufstock- und Ansäuerungsversuche

Die Durchführung der Aufstock- und Ansäuerungsversuchen ist im Kapitel 7.2.7 und Kapitel 7.2.8 genau beschrieben. Die Auswertung dieser Versuche wird in den Kapiteln 9.2.1 und 9.2.2 diskutiert.

9. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

9.1. Bestimmung des Anthocyangehaltes

Untersucht wurden 23 Nacktgerste-Varietäten aus dem Anbaujahr 2008 und weitere neun Varietäten aus dem Anbaujahr 2009. Die Proben wurden in Doppelbestimmung untersucht und bis zur Verwendung unvermahlen bei 4° C, sowie die erhaltenen Extrakte bei -30°C gelagert.

Der gesamte Probenumfang wurde aus zwei Erntejahren erhoben, sowie neben dem Vollmehl auch die einzelnen Fraktionen (Kleie, Futtermehl und Mehl) untersucht. Die Gehaltsangaben sind stets auf die Einwaage bezogen. Bei Ergebnissen aus der HPLC-Analyse wurden die Gehaltsmengen in mg Anthocyane/100 g, sowie bei Ergebnissen aus der spektroskopischen Analyse in mg Cyanidin-3-Glu-Äquivalente/100 g angegeben.

Es wurde beobachtet, dass für beide Analysemethoden zum Teil hohe Variationskoeffizienten errechnet wurden. Diese Problematik kann viele Ursachen haben, die in den Schlussfolgerungen (Kapitel 10) näher betrachtet werden.

Die statistische Auswertung der Datensätze wurde mittels Statgraphics Centurion XVI.I und Excel 2007 durchgeführt.

9.1.1. Jahresvergleiche der Einzelproben

Um die beiden Erntejahre 2008 und 2009 miteinander vergleichen zu können, wurde im Jahr 2008 der Probenumfang eingegrenzt, da aus dem Jahr 2008 eine größere Auswahl an Proben untersucht wurde. Es wurden somit die gleichen Probennummern aus zwei verschiedenen Jahren miteinander verglichen. Im Jahresvergleich der Einzelproben wurden ausschließlich Ergebnisse der Vollproben untersucht.

9.1.1.1. Auswertung der HPLC-Daten

Für die weitere Auswertung der Daten wurden die folgenden Werte aus der Quantifizierung der Anthocyane mittels HPLC entnommen (siehe Kapitel 7.2.3.). In Tab. 9.1 werden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus dem Jahr 2009 den Bestimmungen aus dem Jahr 2008 gegenüber gestellt. Um die Werte besser veranschaulichen zu können, wurden die Einzelstoffe addiert und als Summe der gemessenen Anthocyane dargestellt. Das vereinfacht auch die Gegenüberstellung der Daten aus der spektroskopischen Messung, die als Gesamtanthocyane beziehungsweise Cyanidin-3-glucosid Äquivalente dargestellt werden.

Der Anthocyangehalt der Einzelproben der beiden Erntejahre variierte stark (Tab.9.1). Besonders auffällig waren die schwarzen Varietäten, die grundsätzlich sehr niedrige Gehalte zeigten. Probe 5, mit einem Wert von 0,08 mg/100 g im Jahr 2008 und 0,15 mg/100 g im Jahr 2009, zeigte sehr niedrige Gehalte. Bei Probe 4 konnte 2009 ein sehr hoher Variationskoeffizient von 45 % beobachtet werden. Ebenso auffällig war Probe 7, die in beiden Jahren aufgrund zu geringer Gehalte nicht quantifiziert werden konnte. Die Ergebnisse aus den HPLC-Messungen deckten sich teils mit den Ergebnissen von BELLIDO und BETA [2009], die weder chemisch noch visuell Anthocyan-Stoffe in den schwarzen Varietäten detektieren konnten.

Bei Probe 16 und 18 der blauen Varietäten konnte in beiden Erntejahren sehr hohe Variationskoeffizienten beobachtet werden. Grundsätzlich zeigten sich die blauen Varietäten im Jahresvergleich sehr unterschiedlich, lediglich Probe 22 war ähnlich in den Werten der beiden Erntejahre.

Entsprechend der blauen Varietäten zeigten auch die violetten Varietäten sehr uneinheitliche Ergebnisse. Ihre Werte lagen ein wenig höher verglichen mit den anderen Farbgruppen. Der Mittelwert von Probe 27 aus dem Jahr 2008 mit 2,39 mg/100 g

lag deutlich über dem Mittelwert aus 2009 mit 1,70 mg/100 g, und bewies sich als Probe mit dem höchsten Anthocyangehalt.

Tab. 9.1: Jahresvergleich der Einzelproben des Gesamtanthocyangehalt (HPLC)

	Proben	4	5	7	16	18	22	25	27	30
2008	MW	0,67	0,08	nd	0,71	0,91	0,74	1,49	2,39	1,01
	SD	0,00	0,01	nd	0,40	0,10	0,00	0,01	0,03	0,03
	VK	0,21	6,90	nd	56,41	10,94	0,29	1,00	1,21	2,74
2009	MW	1,01	0,15	nd	0,50	1,72	0,62	0,93	1,70	0,56
	SD	0,46	0,00	nd	0,00	0,64	0,03	0,05	0,05	0,02
	VK	45,64	0,00	nd	0,28	37,11	5,57	4,96	2,83	2,79

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

*Angaben in mg/100 g; nd = nicht detektierbar

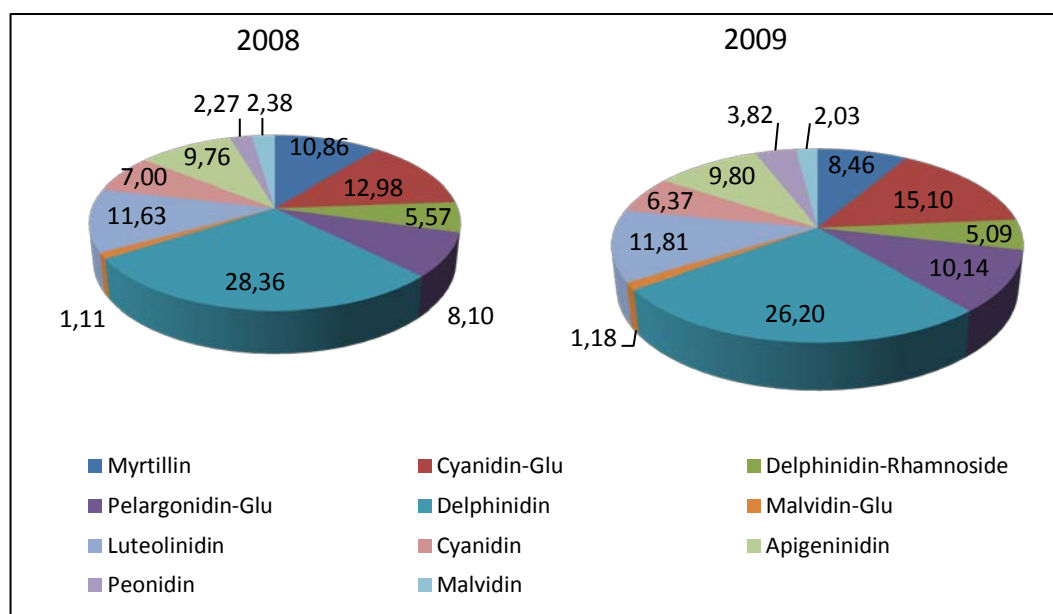


Abb. 9.1: Summe der gemessenen Anthocyane [% mas]

Wird der Gesamtanthocyangehalt betrachtet (Abb. 9.1), d. h. die Summe der gemessenen Einzelwerte jedes Anthocyan-Stoffes, so kann kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3747$) in den Mittelwerten beider Erntejahre beobachtet werden.

Auffällig waren die Unterschiede in den Streubreiten (Abb. 9.2). Im Jahr 2008 waren auch Ausreißer zu beobachten, die im hohen Bereich auf die Probe 27 zurück zu führen sind. Im unteren Bereich sind Probe 5 und 7 als Ausreißer detektiert worden.

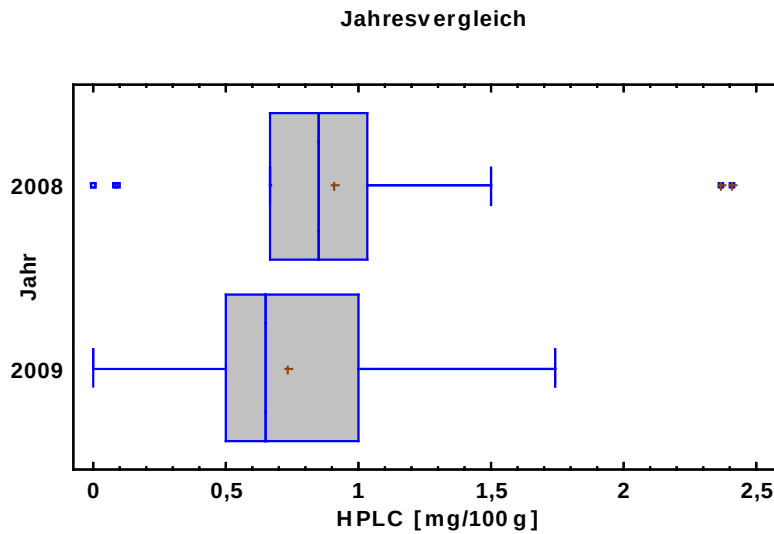


Abb. 9.2: Jahresvergleich der HPLC-Daten

9.1.1.2. Auswertung der Gesamtanthocyane

Parallel zur Quantifizierung der Anthocyane mittels HPLC wurden die Proben auch mittels Spektroskopie gemessen, die eine unterstützende Analyse zu den HPLC-Daten darstellt. Die erhaltenen Daten stellen den Gesamtanthocyangehalt dar und werden in mg Cyanidin-3-Glu-Äquivalente/100 g angegeben.

Wie schon im Jahresvergleich der HPLC-Daten (Kapitel 9.1.1.1) beobachtet, waren auch die Gesamtanthocyangehalte im Jahresvergleich sehr unterschiedlich (Tab. 9.2). Wenngleich sich der Anthocyangehalt beider Erntejahre im Mittel nicht signifikant ($p = 0,8431$) voneinander unterschieden, waren zwischen den Einzelproben große Unterschiede zu erkennen ($r = 0,465$ bei $p = 0,049$).

Bei den schwarzen Proben hat Probe 4 im Jahr 2009 mehr als das Doppelte vom gemessenen Wert aus 2008, ganz im Gegenteil zu Probe 5, die im Vorjahr mehr als das Dreifache misst verglichen zum Jahr 2009. Probe 7 zeigt als einzige Probe sehr ähnliche Werte im Jahresvergleich.

Innerhalb der blauen Varietäten waren keine Probenpaare ähnlich im Gehalt. Hier zeigten die Proben aus 2008 durchgehend höhere Werte verglichen mit 2009.

Bei den violetten Varietäten zeigten Probe 25 und 27 ähnlich hohe Werte in beiden Erntejahren. Sie waren auch die Proben mit den höchsten Anthocyangehalten, speziell Probe 27, die auch in der HPLC Messung die höchsten Werte zeigte.

Tab. 9.2: Jahresvergleich der Einzelproben des Gesamtanthocyangehalts (Photometer)

	Proben	4	5	7	16	18	22	25	27	30
2008	MW	1,06	1,78	1,29	2,07	1,42	1,03	2,92	5,75	1,09
	SD	0,02	0,11	0,66	0,19	0,00	0,00	0,02	0,16	0,07
	VK	1,57	6,29	51,23	8,93	0,03	0,12	0,63	2,86	6,55
2009	MW	2,40	0,45	1,23	1,06	0,23	0,48	2,67	6,53	0,67
	SD	0,09	0,05	0,14	0,12	0,00	0,20	0,09	0,13	0,03
	VK	3,64	10,75	11,70	11,67	0,14	41,09	3,28	2,01	4,78

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

*Angaben in mg/100 g

Zwischen den beiden Messmethoden HPLC und Spektroskopie konnte im Erntejahr 2008 kein signifikanter ($p = 0,061$) Zusammenhang erkannt werden ($r = 0,441$). Die Messungen aus dem Jahr 2009 zeigten nur sehr geringe Korrelationen ($r = 0,700$) bei $p = 0,003$.

9.1.2. Farbgruppenvergleiche

In weiterer Folge wurden die Farbgruppen beider Jahre miteinander verglichen. In der Auswertung wurden vorerst die Vollproben anschließend die einzelnen Fraktionen untersucht. Innerhalb der Vollproben und Fraktionen wurden auch Jahresvergleiche gezogen.

9.1.2.1. Auswertung der HPLC-Daten

Vollproben

Im Farbgruppenvergleich war ersichtlich, dass der Gehalt an Anthocyanen ausgehend von den violetten Varietäten, über die blauen bis hin zu den schwarzen Varietäten abnahm (Abb. 9.3).

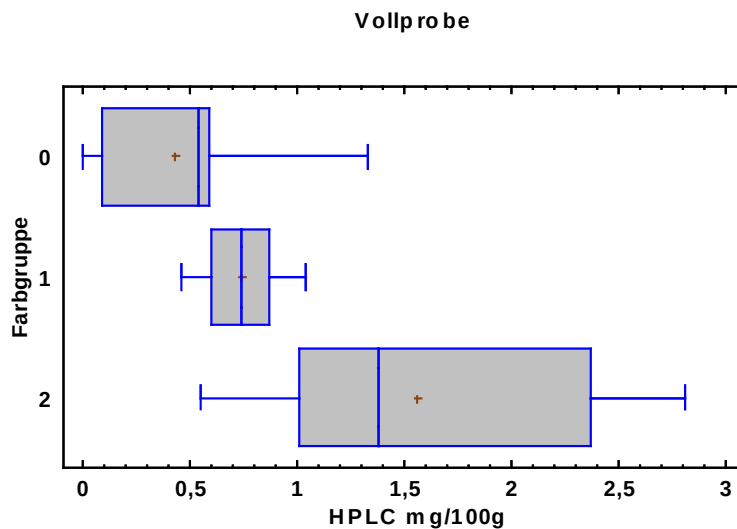


Abb. 9.3: Farbgruppenvergleich der Vollproben, HPLC
Farbkodierung: 0 = schwarz; 1 = blau; 2 = violett

Die Werte der violetten Varietäten lagen im Mittel bei 1,56 mg/100 g, die blauen bei 0,74 mg/100 g und die schwarzen bei 0,43 mg/100 g (Tab 9.3). Die Farbgruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) voneinander, jedoch zeigten alle drei Gruppen innerhalb große Unterschiede im Vergleich der Varianzen (Abb. 9.3).

Tab. 9.3: Farbvergleiche der Fraktionen, HPLC-Werte

Farbgruppe	Vollmehl		Kleie		Futtermehl		Mehl	
	MW	Min - Max	MW	Min - Max	MW	Min - Max	MW	Min - Max
Schwarz	0,43	0-1,33	0,65	0-1,55	0,55	0-1,27	0,4	0-0,89
Blau	0,74	0,46-1,04	1,03	0,9-1,23	0,74	0,64-0,85	0,54	0,43-0,65
Violett	1,56	0,55-2,81	1,83	0,97-2,43	1,15	0,69-1,46	1,2	0,59-1,93

Angabe in mg/100 g; MW = Mittelwert, Min = Minimal-Wert, Max = Maximal-Wert

Fraktionen

Grundsätzlich nimmt der Anthocyan Gehalt von der Kleie bis hin zum Mehl ab. In den untersuchten Proben waren die höchsten Werte in der Kleie der violetten Farbgruppe zu finden, während die Mehlfraction der schwarzkörnigen Farbgruppe den niedrigsten Wert aufwies. (Tab. 9.3).

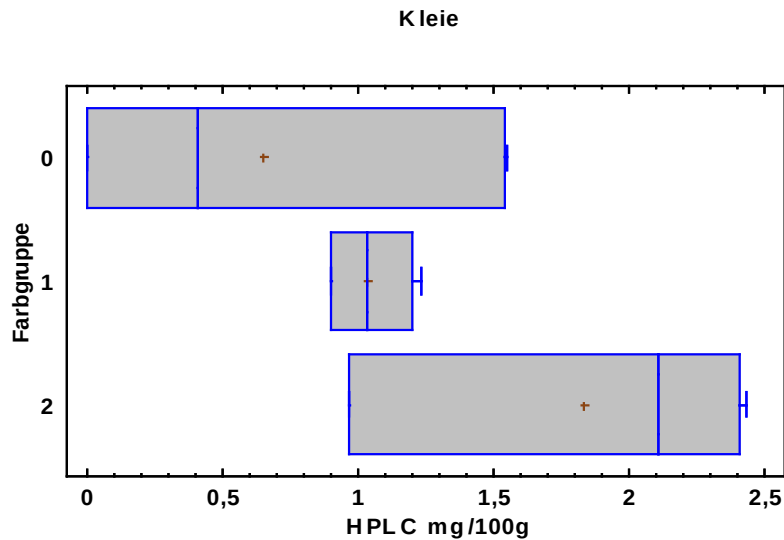


Abb. 9.4: Farbgruppenvergleich der Kleie-Fraktion, HPLC
Farbkodierung: 0 = schwarz; 1 = blau; 2 = violett

Die statistischen Untersuchungen zeigten bei der Fraktion Futtermehl keinen signifikanten ($p \geq 0,05$) Unterschied im Vergleich der Farbgruppen. Grund dafür sind die hohen Varianzen innerhalb der Farbgruppe (Tab. 9.3).

Die Analyse der Mehl- und Kleie-Fraktion deutete allerdings auf signifikante Unterschiede hin ($p = 0,0118$), obwohl auch hier hohe Varianzen innerhalb der Farbgruppen herrschten (Abb. 9.4 und 9.5, sowie Tab. 9.3).

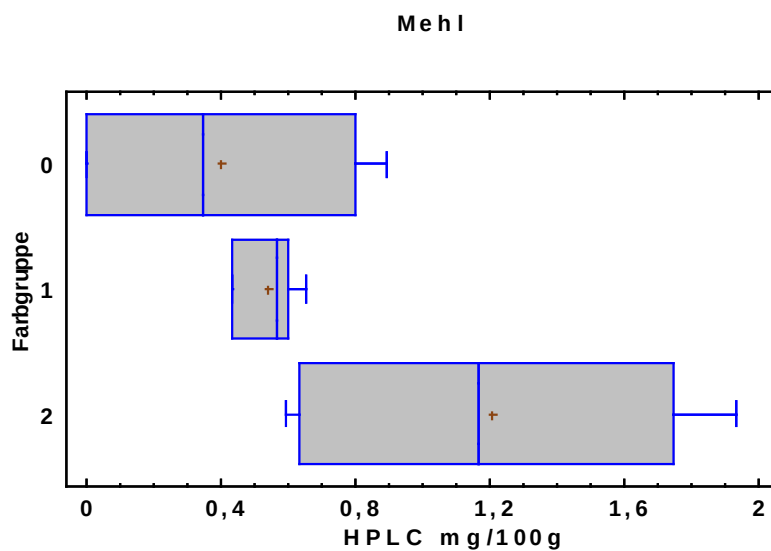


Abb. 9.5: Farbgruppenvergleich der Mehl-Fraktion, HPLC
Farbkodierung: 0 = schwarz; 1 = blau; 2 = violett

Jahresvergleich

Im mehrfachen Mittelwertvergleich der beiden Erntejahre war die unterschiedliche Einteilung der Gruppen auffallend. Im Jahr 2008 konnten die Farbgruppen eindeutig in drei einzelne Gruppen A, B und C unterteilt werden. Im Gegensatz dazu wurde im Jahr 2009 in Gruppe A und B eingeteilt und die dritte Gruppe liegt überlappend (AB) zwischen den anderen beiden Gruppen A und B (Tab. 9.4).

Im Kruskal-Wallis-Test der Vollproben aus 2008 unterschieden sich die Mediane der Farbgruppen signifikant ($p = 0,0003$) voneinander. Die Mediane der Farbgruppen aus 2009 unterschieden sich jedoch nicht voneinander ($p = 0,1229$). Auch Abb. 9.6 zeigt hier klare Unterschiede in der Einteilung der Farbgruppen zwischen 2008 und 2009.

Tab. 9.4.: Mehrfache Mittelwertvergleiche der Vollprobe aus 2008 und 2009

	2008			2009		
Farbgruppe	Anzahl	MW*	HG	Anzahl	MW*	HG
Schwarz	6	0,25	A	6	0,39	A
Blau	7	0,85	B	7	0,75	AB
Violett	6	1,63	C	6	1,07	B

MW = Mittelwert, HG = Homogene Gruppen

* Angaben in mg/100 g

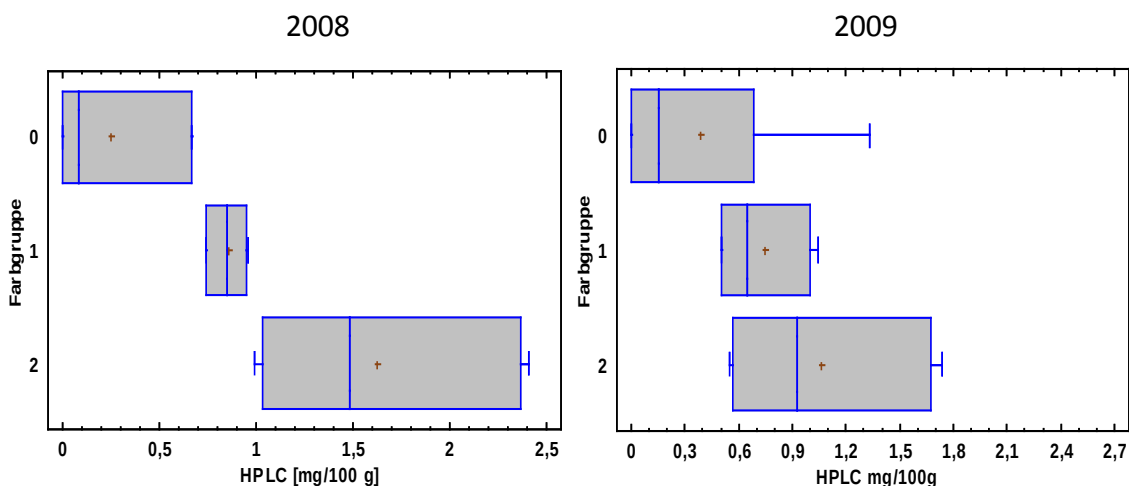


Abb. 9.6: Vergleich der Erntejahre nach Farbgruppen, HPLC
Farbkodierung: 0 = schwarz; 1 = blau; 2 = violett

9.1.2.2. Auswertung der Gesamtanthocyane

Vollproben

In der Auswertung der Vollproben war auffallend, dass verglichen zu den HPLC-Daten die Proben enger beieinander lagen (Abb. 9.7). Lediglich die violetten Varietäten streuten breiter und zeigten in hohen Konzentrationen häufiger Ausreißer (Abb. 9.7). Etwas näher betrachtet handelt es sich bei den Ausreißern um die Probe HOR 4024. Sie zeigte bei den spektroskopischen Messungen extrem hohe Werte, sowohl 2008 als auch 2009. Trotz unterschiedlicher Varianzen innerhalb der Gruppen ($p < 0,05$) konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen den Farbgruppen erkannt werden. (Tab. 9.5)

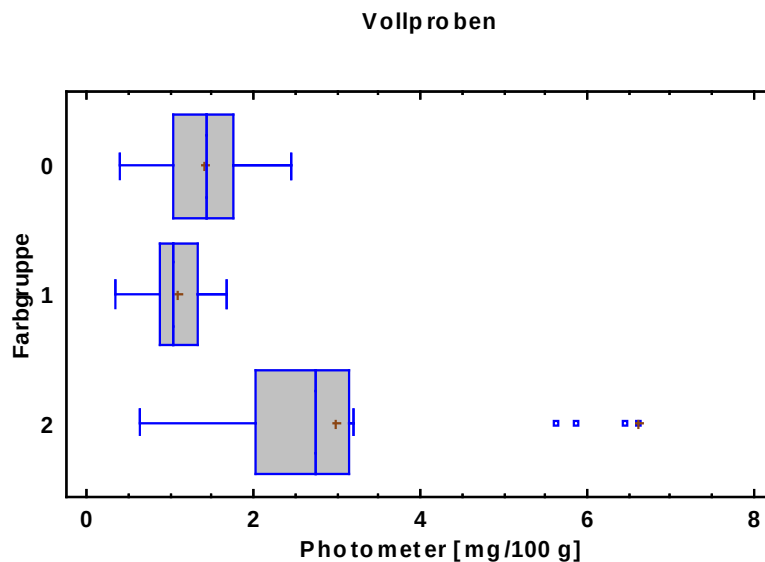


Abb. 9.7: Farbgruppenvergleich der Vollproben, Gesamtanthocyane
Farbkodierung: 0 = schwarz; 1 = blau; 2 = violett

Fraktionen

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den einzelnen Fraktionen (Mehl, Futtermehl und Kleie) mit den Ergebnissen aus dem Vollmehl konnte ein ähnliches Muster erkannt werden. Innerhalb der schwarzen und blauen Farbgruppe konnten keine hohen Varianzen erkannt werden, mit Ausnahme der violetten Farbgruppe, die eine sehr breite Streuung zeigte (Tab. 9.5). Es ist auch hier Probe 27 (HOR 4024) für die hohen Varianzen maßgeblich. Sie zeigte bei den Fraktionen Kleie

(MW = 6,14 mg/100 g) und Futtermehl (MW = 5,56 mg/100 g) sehr hohe Werte, jedoch bei der Fraktion Mehl (MW = 2,5 mg/100 g) die niedrigeren Werte. Dies bestätigt die Tatsache, dass sich die Anthocyane in den äußersten Schichten des Kornes befinden. Aufgrund der niedrigen Gehalte im Mehl gilt insbesondere für die Probe 27, dass hier die Auftrennung zwischen Kleie und Endosperm (Mehl) sehr gut gelang.

Tab. 9.5: Farbvergleiche der Fraktionen, Gesamtanthocyane

Farbgruppe	Vollmehl		Kleie		Futtermehl		Mehl	
	MW	Min - Max	MW	Min - Max	MW	Min - Max	MW	Min - Max
Schwarz	1,41	0,41-2,46	1,37	1,17-1,60	0,74	0,37-1,01	0,37	0,12-0,65
Blau	1,08	0,34-1,67	1,52	1,22-1,78	0,88	0,53-1,18	0,35	0,12-0,54
Violett	2,98	0,65-6,62	3,59	1,56-6,30	3,03	0,93-5,62	1,64	0,45-2,81

Angabe in mg Cyanidin-3-Glu-Äquivalente/100 g; MW = Mittelwert, Min = Minimal-Wert, Max = Maximal-Wert

Jahresvergleich

Im Jahresvergleich der Photometer-Daten konnten Ähnlichkeiten in den Streubreiten beider Erntejahre beobachtet werden (Abb. 9.8). Ein Unterschied war zu erkennen in den Spannweiten der Minimal- und Maximal-Werte im Vergleich beider Jahre. Im Jahr 2008 reichten die Werte von 0,82 mg/100 g bis 5,78 mg/100 g, wobei die Werte aus 2009 zwischen 0,34 mg/100 g und 6,62 mg/100 g lagen.

Ein Vergleich der Mittelwerte konnte hier nicht durchgeführt werden, da die Varianzen innerhalb der Farbgruppen beider Erntejahre zu große Unterschiede zeigten ($p < 0,05$). So wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt und ergab im Vergleich der Farbgruppen beider Jahre keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

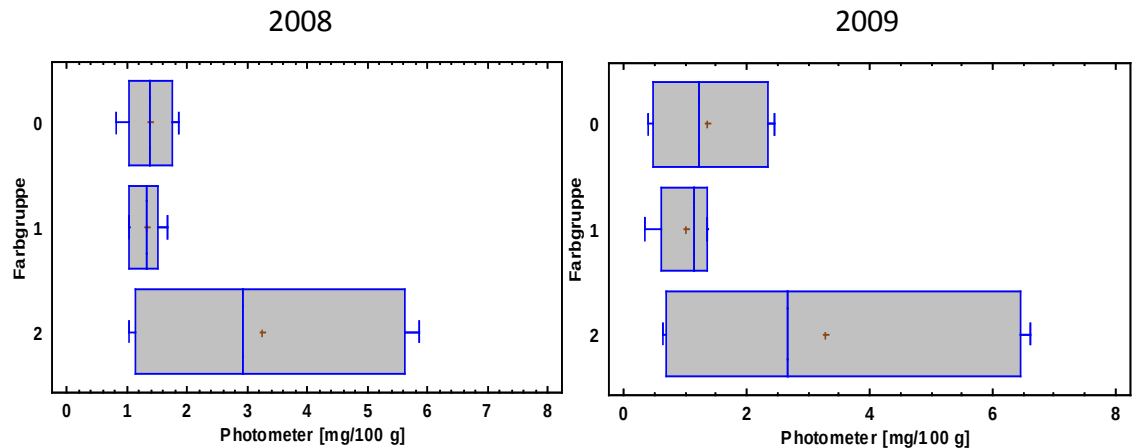


Abb. 9.8.: Vergleich der Erntejahre nach Farbgruppen, Gesamtanthocyane
Farbkodierung: 0 = schwarz; 1 = blau; 2 = violett

9.1.3. Vergleich der einzelnen Anthocyane

Im folgenden Kapitel werden die vorkommenden Anthocyane beschrieben und im Detail analysiert. Hierzu wurden die Farbstoffe mittels HPLC quantifiziert (Kapitel 7.2.3).

Im Zuge dieser Arbeit wurden insgesamt dreizehn Anthocyane untersucht. Delphin und Cyanidin-Galaktosid wurden in der Auswertung vernachlässigt, da sie in keiner Probe nachweisbar waren. Malvidin-Glucosid trat nur vereinzelt in den violetten Varietäten auf, und etwas öfter aber auch selten enthalten war Malvidin.

Die Gehalte der Substanzen schwankten im Vollmehl zwischen 0,00 und 0,98 mg/100 g Nacktgerstenkorn. Tab. 9.6 und 9.7 stellen einen Überblick über die Gehalte der Anthocyane in den einzelnen Proben dar.

Die höchsten Mengen wurden in den violetten Varietäten aus 2008 gefunden. Probe 28 (HOR 4940) und 29 (HOR 11402) zeigten die höchsten Gehalte an Delphinidin (Tab. 9.6). Auch Probe 27 (HOR 4024) zeigte in beiden Jahren hohe Gehalte und enthielt, bis auf Cyanidin-Galaktosid und Delphin, alle Anthocyane.

Die schwarzen Varietäten wiesen, wie schon in den vorangegangenen Kapiteln erörtert, sehr niedrige Gehalte auf. Probe Icarda Black Naked konnte in beiden Erntejahren keine messbaren Gehalte nachgewiesen werden. Niedrig im Gehalt war auch Probe E 360 aus 2008, die ausschließlich Myrtillin und Pelargonidin-Glucosid in niedrigen Konzentrationen enthielt. Bei den Messungen von 2009 wurden wiederum Cyanidin-Glucosid, Delphinidin und Peonidin, aber auch nur in geringen Gehalten, gefunden. Grund dafür sind höchstwahrscheinlich die generell niedrigen Gehalte in den schwarzen Varietäten und die Tatsache, dass einen weiterer Farbstoff enthalten ist, der möglicherweise die Anthocyane überlagert.

Tab. 9.6: Übersicht der Anthocyangehalte der Einzelproben aus 2008

Proben-Nr	Myrtillin	Cyanidin-Glu	Delphinidin-Rha	Pelargonidin-Glu	Delphinidin	Malvidin-Glu	Luteoldin	Cyanidin	Apigeninidin	Peonidin	Malvidin
1	•	•	•	•	+			•	•		
2	•	•	•	•	+			•	•		
3	•	•	•	•	+			•	•		
4	+	•	•	•	++		+	+	+		
5	•			•							
6	•	•	•		+		•	•	•		
7											
8	•	•	•								
16	+	•	•	•	+		+		•	•	•
17	•	•	•	•	+			•	•		
18	+	•	•	•	+		•	•	•	•	•
19	+	•	•	•	+			•	•		
20	+	•	•	•	++		+	•	•		
21	•	•	•	•	+		•	•	•	•	
22	•	•	•	•	+		•	•	•	•	
23	•	•	•	•	+		•	•	•		
24	•	+	•	•	+		+	•	+	•	•
25	+	+	•	+	++		+	•	++	•	•
26	•	++	•	+	+		+	•		•	•
27	•	++	+	+	+	•	++	+	++	•	•
28	++	++	•	+	+++		++	+	+	•	•
29	+	++	•	+	+++		+	•	•	•	•
30	+	•	•	•	+	+	+	•	•	•	

• < 0,1 mg/100 g, + = 0,1 – 0,3 mg/100 g, ++ = 0,31 – 0,5 mg/100 g, +++ = > 0,5 mg/100 g

Tab. 9.7: Übersicht der Anthocyangehalte der Einzelproben aus 2009

Proben-Nr	Myrtillin	Cyanidin-Glu	Delphinidin-Rha	Pelargonidin-Glu	Delphinidin	Malvidin-Glu	Luteolidin	Cyanidin	Apigeninidin	Peonidin	Malvidin
4	+	•	•	•	++		+	•	•		
5		•			•					•	
7											
16	•	•	•	•	+		•		•		
18	+	•	•	•	++		+	•	•	•	•
22	•	•	•	•	+		+	•	•	•	
25	•	+	•	•	+		•	•	+	•	
27	•	++	•	+	+	•	+	•	+	•	•
30	•	•	•	•	+		•	•	•		

• < 0,1 mg/100 g, + = 0,1 – 0,3 mg/100 g, ++ = 0,31 – 0,5 mg/100 g, +++ = > 0,5 mg/100 g

In den einzelnen Fraktionen (siehe Tab. 13.7, 13.8 und 13.9 im Anhang) spiegeln sich die eben beschriebenen Strukturen der Einzelproben wider. Die Gehalte waren im Mehl am niedrigsten, im Futtermehl mittelmäßig und in der Kleie-Fraktion am höchsten enthalten.

9.1.4. Diskussion

Der Gesamtgehalt der Anthocyane lag in beiden Jahren zwischen 0,0 und 2,76 mg/100 g mittels HPLC-Messung und zwischen 0,23 und 6,62 mg/100 g mittels Spektroskopie. KIM et al. [2007] konnte jedoch Gesamtgehalte von 13 bis 1037,80 µg/g (1,3 bis 103,78 mg/100 g) messen, die deutlich höher liegen. Zwischen den Erntejahren unterscheiden sich die Einzelproben stark voneinander. Besonders die spektroskopisch gemessenen Werte zeigten hohe Schwankungen zwischen 2008 und 2009.

Im Vergleich der Farbgruppen konnten signifikante ($p < 0,001$) Unterschiede erkannt werden, sowohl aus der Messung mittels HPLC als auch aus der spektroskopischen Messung. Die einzelnen Extrakte wurden zudem auch fotografisch abgebildet wo

die Unterschiede auch deutlich visuell ersichtlich sind. Die Bilder können im Anhang (Tab. 13.10) nachgeschlagen werden.

Die violetten Varietäten zeigten mit durchschnittlich $1,56 \pm 0,72$ mg Anthocyane/100 g Vollkorn aus (HPLC) und $2,98 \pm 1,8$ mg Cyanidin-3-Glycosid-Äquivalente/100 g Vollkorn (Spektroskopie) den höchsten Gehalt an Farbstoff. Der höchste Anthocyangehalt wurde in Probe 28 (HOR 4940) aus 2008 nachgewiesen, allerdings nur in der HPLC-Analyse. Probe 27 (HOR 4024) hingegen zeigte die höchsten Werte in der spektroskopischen Messung bei der Ernte aus 2008. Bei den Ergebnissen beider Messmethoden aus 2009 zeigte Probe 27 sowohl im Vollmehl als auch in den einzelnen Fraktionen die höchsten Werte. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Studie von BELLIDO und BETA [2009] zeigte einen wesentlichen Unterschied zu den Gehalten der violetten Farbgruppe dieser Arbeit, denn der Mittelwert der violetten Nacktgerste Varietäten von 573 ± 264 $\mu\text{g/g}$ ($57,3 \pm 26,4$ mg/100 g) liegt um ein Vielfaches höher.

In den schwarzen Varietäten war mit $0,43 \pm 0,37$ mg Anthocyane/100 g Vollkorn (HPLC) und $1,41 \pm 0,52$ mg Cyanidin-3-Glycosid-Äquivalente/100 g (Spektroskopie) am wenigsten enthalten. Grund für die niedrigen Werte in den schwarzen Varietäten könnte der Farbstoff Melanin sein, der die Anthocyane maskiert und als braun/schwarze Farbe erscheinen lässt. Diese Erkenntnis konnte auch schon in einer Studie von SIEBENHANDL et al. [2007] beobachtet werden.

Zwischen den violetten und schwarzen Varietäten reihten sich die blauen Varietäten mit einem Durchschnittsgehalt von $0,74 \pm 0,18$ mg Anthocyane/100 g (HPLC) und $1,08 \pm 0,31$ mg Cyanidin-3-Glycosid-Äquivalente/100 g (Spektroskopie). Diese Werte waren ähnlich der Ergebnisse aus der Studie von ABDEL-AAL et al. [2006], die einen Mittelwert von $34,6 \pm 0,5$ $\mu\text{g/g}$ ($3,46 \pm 0,05$ mg/100 g) für die blauen Gerstegenotypen ermittelten.

Eine Analyse der Fraktionen zeigte bei beiden Testmethoden die Gehalte absteigend von Kleie (HPLC: $1,39 \pm 0,59$ mg/100 g, Spektroskopie: $2,69 \pm 1,88$ mg/100 g), Futtermehl (HPLC: $0,78 \pm 0,24$ mg/100 g, Spektroskopie: $0,95 \pm 0,54$ mg/100 g) bis Mehl (HPLC: $0,53 \pm 0,55$ mg/100 g, Spektroskopie: $0,83 \pm 0,48$ mg/100 g). Innerhalb der

Fraktionen konnten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Farbgruppen beobachtet werden. Eine Ausnahme war die Fraktion Futtermehl aus der HPLC-Analyse, die keinen signifikanten ($p = 0,054$) Unterschied zeigte. Grund dafür waren die hohen Streubreiten der schwarzen und violetten Varietäten. Durchschnittlich wiesen in jeder Fraktion die violetten Varietäten den höchsten Gehalt auf, gefolgt von den blauen Varietäten und den schwarzen Varietäten mit dem niedrigsten Gehalt.

Anhand der HPLC-Analyse konnten die einzelnen Anthocyanstoffe bestimmt werden. Im gesamten Probenumfang war Delphinidin der dominante Anthocyanstoff, wobei er in Probe 28 (HOR 4940) mit $0,94 \pm 0,04$ mg/100 g und Probe 29 (HOR 11402) mit $0,96 \pm 0,03$ mg/100 g der violetten Varietäten aus dem Jahr 2008 am höchsten enthalten war. Delphin und Cyanidin-Galaktosid konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Malvidin-Glukosid war nur in Probe 27 (HOR 4024) in beiden Jahren und in Probe 30 (N 023) im Jahr 2008 enthalten. Innerhalb der schwarzen Varietäten konnten nur sehr geringe Gehalte gemessen werden. Probe 7 (Icarda Black Naked) wies in beiden Jahren, sowohl im Vollmehl als auch innerhalb der Fraktionen, keine messbaren Werte auf. Ähnlich zeigte sich auch Probe 5 (E 360), die nur vereinzelt Anthocyane in geringen Mengen enthielt. Die Werte waren nicht vergleichbar mit den Ergebnissen von KIM et al. [2007]. Dort konnte in den violetten Varietäten als dominanter Anthocyanstoff Cyanidin-3-Glucosid gemessen werden, und innerhalb der blauen und schwarzen Varietäten das Glucosid Delphinidin. In der gegenwärtigen Arbeit war jedoch das Aglykon Delphinidin als dominanter Anthocyanstoff gemessen worden.

BELLIDO und BETA [2009] untersuchten neben den violetten Varietäten auch schwarze Nacktgerstegenotypen auf ihre Anthocyanin Zusammensetzung. Auch sie konnten keine messbaren Werte für die schwarzen Varietäten ermitteln. In den violetten Varietäten waren das Cyanidin-3-Glucosid mit $99 \mu\text{g/g}$ ($9,9$ mg/100 g) und Delphinidin-3-Glucosid $93 \mu\text{g/g}$ ($9,3$ mg/100 g) am meisten enthalten. Innerhalb der Kleie Fraktion der violetten Varietäten war ebenfalls das Cyanidin-3-Glucosid mit $505 \mu\text{g/g}$ ($50,5$ mg/100 g) am meisten enthalten. In der Kleie Fraktion unserer Proben

war jedoch das Delphinidin Aglykon am höchsten enthalten. Anthocyane kommen in der Pflanze großteils in glykosilierter Form vor. Die Tatsache, dass in den Proben ein hoher Anteil an Aglykonen gefunden wurde lässt vermuten, dass es während der Extraktion und Aufbereitung zum Verlust der Zuckerreste kam, da die Zuckerreste durch saure Hydrolyse vom Anthocyan abgespalten werden können. Die Bedingungen für Hydrolysereaktionen könnten in der Aufbereitung der Probe erreicht worden sein, nämlich wenn der Rohextrakt bis zur Trockene eingeeengt wurde. Aus diesem Grund wurde die Extraktion mit wenig angesäuertem Methanol durchgeführt, um den Eintrag an Säure möglichst gering zu halten und so die Abspaltung der Zuckerreste zu vermeiden.

9.2. Methodenoptimierung

Zur Eruierung der Methodengenauigkeit wurden zwei Tests durchgeführt. Mit dem Aufstockversuch wird nachgeprüft inwieweit Anthocyane einer aufwändigen Extraktion mit weiterer Bearbeitung (siehe Kapitel 7.2.1: Isolierung der Anthocyane) standhalten können. Einflussfaktoren während der gesamten Prozedur könnten hier Licht und Sauerstoff sein. Die Temperatureinwirkung sowie die veränderten Konzentrationen an Säure während dem Einengen der Extrakte könnten auch eine wesentliche Rolle in der Gehaltsminderung der Anthocyane spielen.

Der Ansäuerungsversuch gibt Auskunft darüber, ob Anthocyane in angesäuertem Milieu in der HPLC-Messung einen höheren Gehalt aufweisen, da sie aufgrund ihrer Struktur in saurer Umgebung stabiler sind.

Die Tests wurden an Probe 16 (C 661) und Probe 27 (HOR 4024) vom Erntejahr 2009 in je sechs Ansätzen durchgeführt.

9.2.1. Aufstockversuche

Die Ergebnisse beider Proben sind sehr unterschiedlich ausgefallen. Auffallend war, dass die Wiederfindung der unterschiedlichen Anthocyane bei beiden Proben besser oder schlechter war.

Abb. 9.10 zeigt die Abweichungen der einzelnen Anthocyane vom Soll. Das Soll ist hier definiert mit 100 %, das die zur Probe zugesetzte Menge an Anthocyan-Standard beschreibt (Kapitel 7.2.7 Aufstockversuch: Tab. 7.5).

Luteolinidin ist hier bei beiden Proben am niedrigsten enthalten, und es wurde bei Probe 27 10% und bei Probe 16 nur noch 5% der zugesetzten Soll-Menge gemessen. Die gemessenen Gehälter der Probe 16 waren grundsätzlich sehr niedrig und zeigten, dass die zugesetzten Standards der Extraktion schlecht standhalten konnten. Im Gegensatz dazu zeigte Probe 27 sehr hohe Schwankungen rund um den Soll-Wert. Der höchste Gehalt wurde bei Cyanidin-Glucosid gemessen, der 189% über dem Soll-Wert

liegt. Delphin konnte nur in Probe 16 nachgewiesen werden, während in Probe 27 keine nachweisbaren Gehalte gemessen werden konnte. Malvidin und Peonidin wurden wiederum nur in Probe 27 detektiert. Generell konnten diese drei Stoffe im gesamten Probenumfang wenig bis gar nicht nachgewiesen werden.

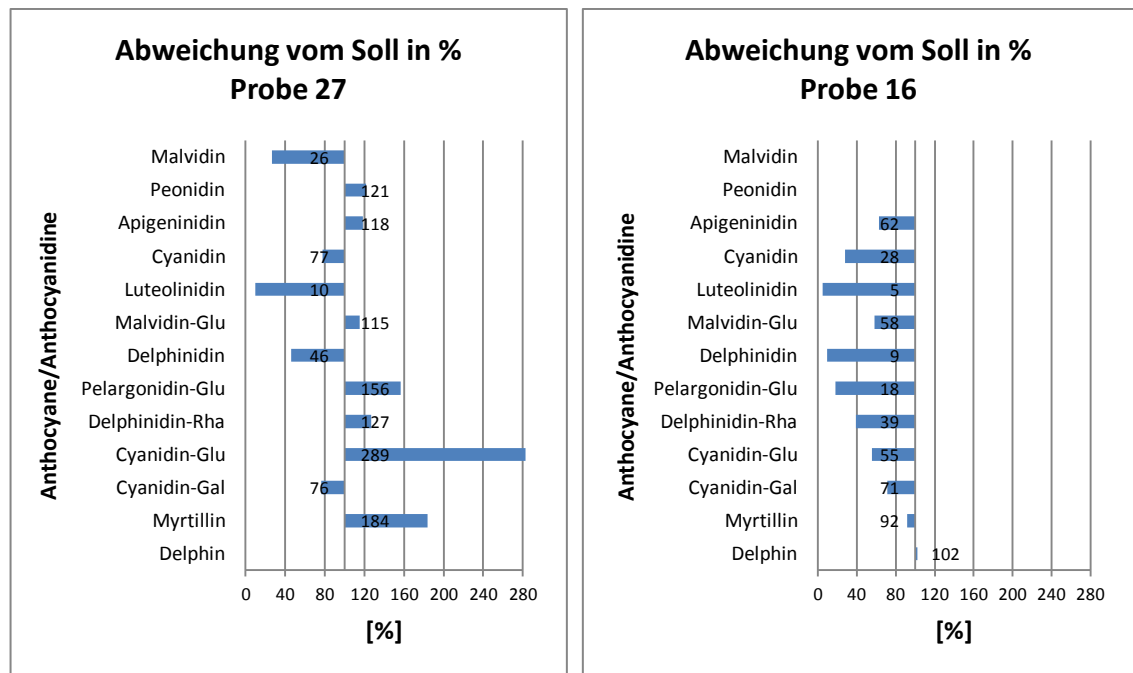


Abb. 9.10: Ist-Werte der Aufstockversuche von Probe 27 (HOR 4024) und 16 (C 651); HPLC; Abkürzungen: Glu = Glucose, Gal = Galaktose, Rha = Rhamnose

Anhand der Photometer-Messungen ist ersichtlich, dass der Anthocyan-Gehalt von Probe 16 nach Zusatz des Standards in etwa gleich liegt als vor Zusatz (Abb. 9.11). Es konnte kein Anstieg der Extinktion bemerkt werden. Das bedeutet, dass die zugesetzten Anthocyane des Standards nicht messbar waren, und somit während der Extraktion verloren gegangen sind.

Bei Probe 27 konnte eine Gehaltssteigerung verzeichnet werden (Abb. 9.11). Hier wurde ein deutlicher Anstieg der Extinktion bemerkt. Das konnte auch in der HPLC-Analyse festgestellt werden (Abb. 9.10).

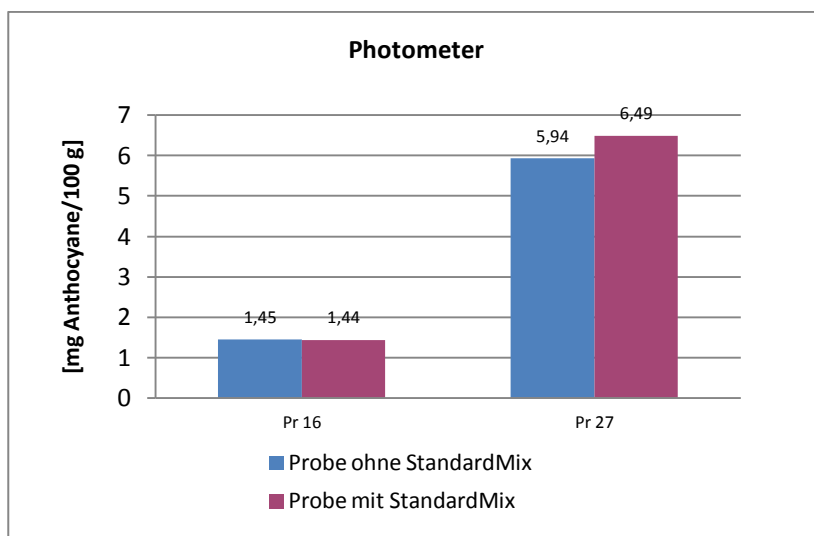
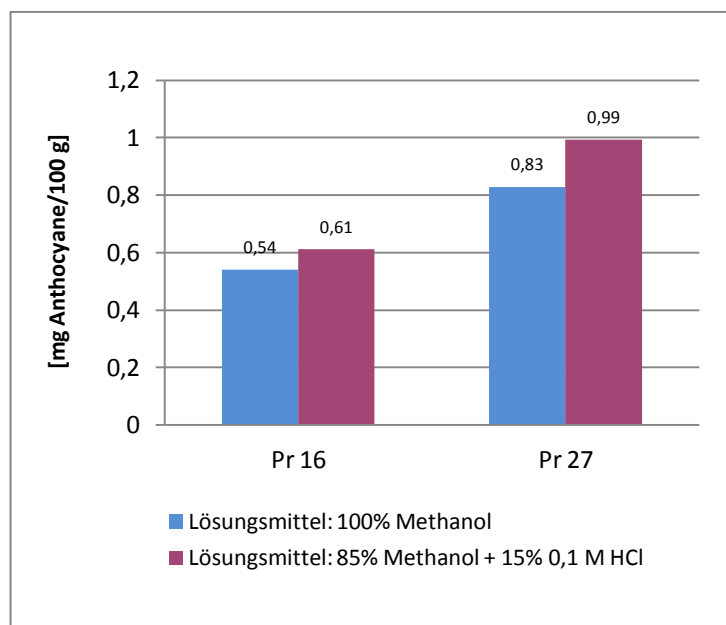


Abb. 9.11: Photometerwerte der Probe 16 und 27, Aufstockversuche

9.2.2. Ansäuerungsversuche

Nach Extraktion der Farbstoffe (Kapitel 7.2.1) wurden die Proben ins Trockene eingedampft. Der trockene Rückstand wurde anschließend nochmals entweder in angesäuertem MeOH oder reinem MeOH aufgenommen (Kapitel 7.2.8) und mittels HPLC bestimmt.

Bei den Ansäuerungsversuchen konnten geringe Änderungen der Anthocyanengehalte durch Ansäuern des Lösungsmittels mit 0,1 M HCl beobachtet werden. Bei beiden Proben konnte eine Gehaltssteigerung von 13 und 20 Prozent beobachtet werden (Tab. 9.8 und Abb. 9.12). Auffallend war, dass Probe 27 bei Lösung mit angesäuertem Methanol eine prozentuell höhere Gehaltssteigerung hatte als Probe 16. Eine ähnliche Ungleichheit der beiden Proben konnte schon im Aufstockversuch beobachtet werden.



Tab. 9.8: Summe der Anthocyane mittels HPLC, Ansäuerungsversuche

	Pr 16	Pr 27
Ohne HCl*	0,54	0,83
Mit HCl*	0,61	0,99
Steigerung [%]	13,07	19,68

*Mittelwerte in mg/100 g

Abb. 9.12: Summe der gemessenen Anthocyane mittels HPLC (Probe 16, 27), Ansäuerungsversuche

Die Abb. 9.13 zeigt die mittels HPLC gemessenen Gehälter der Testproben, mit und ohne Ansäuern des Lösungsmittels. Hier sind im Detail die Gehaltssteigerungen und –erniedrigungen der einzelnen Anthocyan-Stoffe abgebildet, d. h. es wurde die Differenz der extrahierten Proben ohne Ansäuern und mit Ansäuern dargestellt. Peonidin (10) und Malvidin (11) konnten bei Probe 16 aufgrund zu niedriger Gehalte nicht mehr gemessen werden, und wurden in der Abbildung nicht gezeigt. In Probe 27 war Cyanidin-Galaktosid (2) nicht messbar.

Die höchste Gehaltssteigerung konnte bei Probe 27 beobachtet werden. Hier zeigte Cyanidin-Glucosid (3) eine Steigerung von 0,137 µg/g. Myrtillin (1) war in Probe 16 mit 0,111 µg/g am höchsten enthalten. Delphinidin-Rhamnosid (4) zeigte bei beiden Proben keine Veränderung nach Ansäuern des Lösungsmittels. Delphinidin (6), Luteolinidin (7) und Cyanidin (8) zeigten in den beiden Proben ähnlich hohe Steigerungen. Apigeninidin (9) zeigte bei Probe 16 eine Erniedrigung, d. h. nach Ansäuern mit HCl wurde weniger Anthocyanidin gefunden als in der Probe ohne Ansäuern. Im Gegensatz dazu konnte in Probe 27 eine Gehaltssteigerung von 0,034 µg/g beobachtet werden.

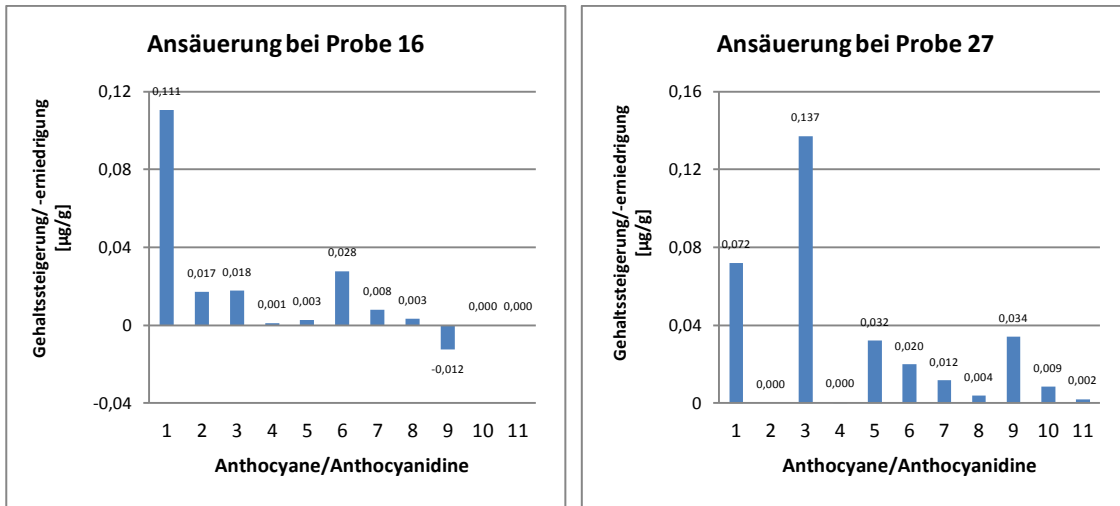


Abb. 9.13: Gehaltssteigerung/-erniedrigung durch Ansäuern, HPLC-Werte Anthocyane/Anthocyanidine: (1) Myrtillin, (2) Cyanidin-Galaktosid, (3) Cyanidin-Glucosid, (4) Delphinidin-Rhamnosid, (5) Pelargonidin-Glucosid, (6) Delphinidin, (7) Luteolinidin, (8) Cyanidin, (9) Apigeninidin, (10) Peonidin, (11) Malvidin

9.2.3. Diskussion

Ziel dieser Tests war es herauszufinden, ob Anthocyane nach Extraktion und Isolierung in gleicher Quantität und Qualität detektiert werden können. Dabei wurden Versuche mit Zusatz von einer bestimmten Menge von Anthocyanen und Versuche mit unterschiedlich sauren Lösungsmitteln durchgeführt.

Die Ergebnisse der Aufstockversuche zeigten, dass die aufwändigen Etappen der Extraktion zum Verlust von Anthocyanen führten, weil die in der Probe gemessenen Mengen der Anthocyan-Standards nicht den tatsächlich zugesetzten Mengen entsprachen. Die einzelnen Etappen sind oft mit Hitzeinwirkung (Konzentrierung der Extrakte) verbunden, die ein potentieller Grund für den Verlust von Anthocyanen sein könnten.

In einem ausführlichen Überblick von DELGADO-VARGAS et al. [2000] über natürliche Pigmente wurde die Instabilität von Anthocyanen gegenüber Licht und Hitze diskutiert und auf Degradationen der natürlichen Stoffe durch solche Einflüsse hingewiesen. Grund dafür sei ihre chemische Struktur, die sich bei längerer Hitzeinwirkung öffnet, Chalcone formt und zu braunen Produkten abgebaut wird. Zusätzlich sind Anthocyane in Lösung in einem Gleichgewicht zwischen der farbzeigenden kationischen

Form und der farblosen Pseudobase, das durch den pH direkt beeinflusst wird. Das Vorliegen der kationischen Form ist demnach abhängig von einem sauren pH-Wert [DELGADO-VARGAS et al., 2000]. ZHAO und YU [2010] konnten anhand Stabilitätstests an Pigmenten von Nacktgerste erneut zeigen, dass die Anthocyane bei niedrigem pH stabiler sind. Nach einer fünfzehntägigen Aussetzung mit natürlichem Licht bei einem pH-Wert von eins konnten mehr als 85 % der Anthocyane erhalten bleiben. Bei einem pH-Wert zwischen drei und fünf reduzierte sich der Anthocyan Gehalt bereits auf 65 bis 70 %. Zusätzlich konnten bei jedem getesteten pH-Wert Erniedrigungen nach Behandlung mit Licht beobachtet werden, somit hat die Aussetzung mit Licht grundsätzlich negative Effekte auf die Anthocyan-Stabilität. Die thermalen Stabilitätstests zeigten ähnliche Ergebnisse. Bei niedrigem pH-Wert waren Anthocyane stabiler gegen Hitze verglichen mit höheren pH-Werten.

Da innerhalb des Extraktionsprozesses eine Aufkonzentrierung der Extrakte nötig ist, kann nur eine bestimmte Menge an Säure den Extraktionsmitteln zugesetzt werden. Andernfalls wären während der Extraktion die pH-Werte in den Extrakten zu niedrig geworden und hätten den Extrakt geschädigt. So wird den Anthocyanen lediglich während der „Wartezeiten“ zwischen Extraktion und Messung der nötige Schutz geboten. Auffallend war auch, dass die einzelnen Anthocyane unterschiedlich stark auf die pH-Änderungen reagierten. Das würde darauf hinweisen, dass die Stoffe unterschiedliche pH-Optima besitzen. Die höchste Gehaltssteigerung konnte bei Probe 27 verzeichnet werden beim Stoff Cyanidin-Glucosid. Die zweithöchste Gehaltssteigerung konnte beim Stoff Myrtillin detektiert werden, wobei dieser bei Probe 16 die höchste Steigerung zeigte.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass die Messung mittels HPLC bereits unter optimalen Bedingungen durchgeführt wurde. Für eine maximale Extinktion der Anthocyane wurden angesäuerte Laufmittel mit einem pH-Wert von ungefähr 2 verwendet. Es konnten dennoch Gehaltssteigerungen gemessen werden. So wurde die Vermutung angestellt, dass eine Erniedrigung des pH-Wertes während der gesamten Extraktion für die Stabilität der Farbstoffe nötig wäre. Demnach können die gemessenen Gehaltsstei-

gerungen aus den Ansäuerungsversuchen auf die verbesserten Lagerbedingungen zwischen Extraktion und Messung zurück geführt werden.

9.3. Bestimmung des Phenolsäuregehaltes

Für die Bestimmung des Phenolsäuregehaltes wurden zwölf Nacktgerste-Varietäten aus dem Jahr 2009 untersucht. Die Proben wurden in vier Farbgruppen eingeteilt, den schwarzen (0), den gelben (1), den blauen (2) und den violetten Varietäten (3). Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Extrakte hergestellt, um die freien und gebundenen Phenolsäuren zu untersuchen.

Zur Quantifizierung der gesamten phenolischen Bestandteile (TPC) wurden die Extrakte mittels Photometer gemessen. Zur Identifizierung der einzelnen Phenolsäuren und deren Mengen wurde eine Messung mittels HPLC durchgeführt.

Neben der Quantifizierung des Phenolsäuregehalts wurde auch das antioxidative Potential näher betrachtet.

9.3.1. Quantifizierung der gebundenen Phenolsäuren mittels HPLC

In Tab. 9.9 ist ein Überblick der Gehalte der einzelnen gebundenen Phenolsäuren jeder Probe ersichtlich. Die Proben sind geordnet nach ihrer Gesamtmenge an Phenolsäuren und in mg/100 g angegeben.

Probe 27 (HOR 4024) hatte mit 125,43 mg/100 g den höchsten und Probe 5 (E 360) mit 45,79 mg/100 g den niedrigsten Gesamtgehalt an Phenolsäuren. Der Anteil am Gesamtgehalt aus der Tab. 9.9 beschreibt den Gehalt an gebundener Phenolsäuren am gesamten Phenolsäuregehalt (= Gesamtgehalt der freien und gebundenen Phenolsäuren) in Prozent. Hier nahmen die gebundenen Phenolsäuren zwischen 91,48 % und 97,75 % ein.

Die dominante Phenolsäure war die Ferulasäure. Mit einem Gehalt zwischen 41,88 und 117,35 mg/100 g lag sie etwas höher als der in der Literatur beschriebene Gehalt von 30 bis 100 mg/100 g. Im Durchschnitt war sie mit 90 % mas enthalten und auch in der Literatur so beschrieben. Die *p*-Coumarsäure war am zweitmeisten enthal-

ten und hatte einen Gehalt von 4,45 % mas gefolgt von der *o*-Coumarsäure mit 2,80 % mas. Vanillin-, Kaffee- und 4-OH-Benzoesäure waren am wenigsten enthalten und lagen im Bereich zwischen 0,49 und 1,10 % mas. Die Protocatechin- und Gallussäure konnten nicht gefunden werden. (Abb. 9.14)

Tab. 9.9: Gehalte an gebundenen Phenolsäuren, HPLC [mg/100 g]

Probe	Farbgruppe	4-OH-Benzoe	Vanillin	<i>p</i> -Coumar	Ferula	<i>o</i> -Coumar	Kaffee	Summe der gebundenen Phenolsäuren	Anteil am Gesamtgehalt [%]
27	3	0,84	1,65	1,82	117,35	2,96	0,82	125,43	96,83
16	2	0,21	0,62	1,40	73,17	2,13	0,46	77,98	96,23
4	0	0,22	0,86	0,77	67,89	2,85	0,91	73,50	97,75
22	2	0,30	0,64	1,72	67,16	2,52	0,80	73,13	91,48
12	1	0,31	0,67	14,69	51,88	1,35	0,49	69,38	93,72
25	3	0,38	0,77	1,27	64,17	2,17	0,62	69,37	92,96
9	1	0,38	0,95	9,18	55,96	1,64	0,79	68,89	96,96
7	0	0,33	0,74	1,65	59,29	2,32	1,03	65,35	96,12
30	3	0,21	0,57	1,32	55,81	0,64	0,68	59,22	92,05
18	2	0,22	0,46	1,12	54,06	1,74	0,98	58,57	92,94
13	1	0,43	0,63	1,65	45,15	1,46	0,90	50,21	95,42
5	0	0,22	0,57	0,67	41,88	1,72	0,73	45,79	95,72

(Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett)

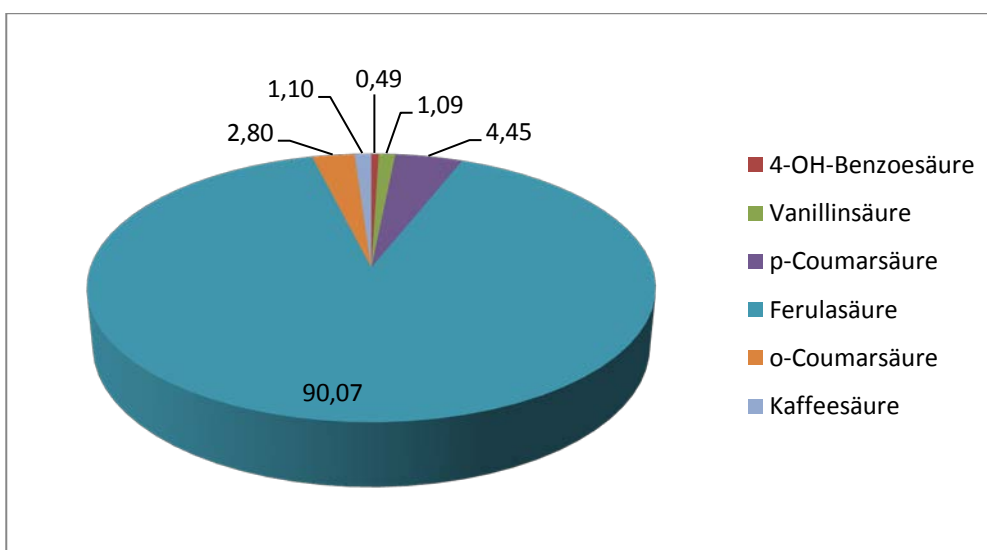


Abb. 9.14: Summe gebundene Phenolsäuren [% mas]

9.3.1.1. Gesamtgehalt der gebundenen Phenolsäuren in der Farbgruppe

Es wurden die Einzelstoffe aus der HPLC-Analyse addiert und als Summer der gebundenen Phenolsäuren angegeben.

Der Gesamtgehalt der gebundenen Phenolsäuren lag im Bereich von 44,86 und 128,74 mg/100 g und hatte einen Mittelwert von 69,73 mg/100 g. Er war aufsteigend gereiht vom niedrigsten bis zum höchsten Gehalt: Schwarz – Gelb – Blau – Violett (Tab. 9.10).

Ein signifikanter Unterschied in den Varianzen konnte zwischen den vier Gruppen nicht beobachtet werden ($p = 0,192$), aber im Vergleich von jedem Stichprobenpaar bei den Gruppen 1/3 und 2/3 waren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu erkennen. Der Farbgruppenvergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,478$).

Tab. 9.10: Summenstatistik: gebundene Phenolsäuren

<i>Farbgruppe</i>	<i>Anzahl</i>	<i>MW</i>	<i>Sd</i>	<i>VK</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Schwarz	6	61,55	13,396	21,77%	44,86	79,85
Gelb	6	62,83	9,933	15,81%	48,97	71,4
Blau	6	69,89	9,167	13,12%	58,3	78,95
Violett	6	84,67	32,065	37,87%	59,12	128,74
Total	24	69,73	19,759	28,33%	44,86	128,74

9.3.1.2. Einzelne gebundene Phenolsäuren im Farbgruppenvergleich

Im Folgenden wird jede Phenolsäure einzeln untersucht und der Gehalt der jeweiligen Farbgruppen bewertet. In Tab. 9.11 ist eine Übersicht der Mittelwerte jeder gebundenen Phenolsäure sortiert nach Farbgruppen ersichtlich. Im Weiteren sind die p-Werte des Kruskal-Wallis-Tests angeführt und zeigen ob zwischen den Gruppen Unterschiede bestehen. Die detaillierten Ergebnisse über die Einzel- und Mittelwerte der gebundenen Phenolsäuren können im Anhang (Tab. 13.11) nachgeschlagen werden.

Die am höchsten enthaltene gebundene Phenolsäure war die Ferulasäure. Die Mittelwerte der einzelnen Farbgruppen stiegen von den gelben Varietäten mit

50,99 mg/100 g, den schwarzen Varietäten mit 56,35 mg/100 g, den blauen Varietäten mit 64,80 mg/100 g zu den violetten Varietäten mit 79,11 mg/100 g an. Bei einem p -Wert von $< 0,05$ konnten Unterschiede zwischen den Farbgruppen erkannt werden (Tab. 9.11).

Die p -Coumarsäure war nach der Ferulasäure im Bereich von 1,03 bis 8,50 mg/100 g am zweithäufigsten enthalten (Tab. 9.11). Die Mittelwerte ergaben eine Reihung beginnend mit schwarzen, blauen, violetten bis hin zu den gelben Varietäten, die den höchsten Gehalt aufwiesen. Stark auffallend war hier die Datenverteilung der gelben Farbgruppe, die bei Probe 9 (8,69 und 9,66 mg/100 g) und 12 (13,03 und 16,34 mg/100 g) sehr hohe Werte zeigte (Abb. 9.15). Probe 13 lag mit Werten von 1,55 bis 1,74 mg/100 g im Bereich der anderen Farbgruppen, die mit ihren Mittelwerten von 1,03 bis 1,47 mg/100 g reichten. Aus diesem Grund zeigte die Varianzprüfung zwischen den vier Farbgruppen einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0005$).

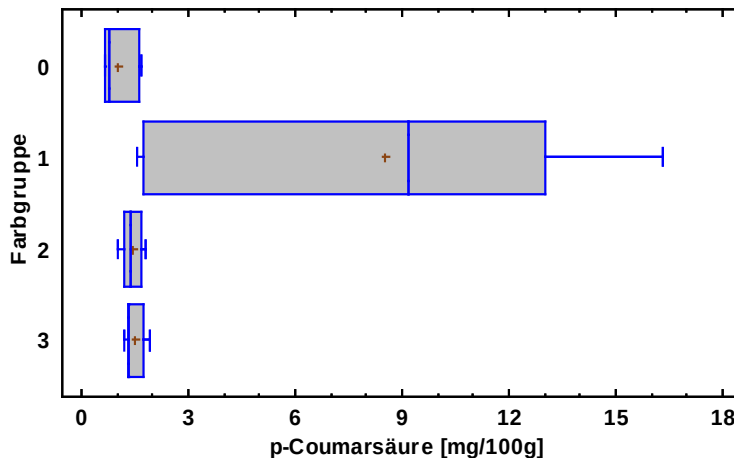


Abb. 9.15: Boxplot gebundene p -Coumarsäure nach Farbe
 Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

In den Ergebnissen der o -Coumarsäure konnten keine wesentlichen Extremwerte gefunden werden. Sie lag mit ihren Farbgruppenmittelwerten (Tab. 9.11) im Bereich von 1,48 bis 2,29 mg/100 g und war ansteigend gereiht von gelben, violetten, blauen zu den schwarzen Varietäten. Die Varianzen innerhalb der vier Gruppen waren relativ

hoch, dennoch konnten signifikante Unterschiede ($p = 0,0355$) zwischen den Farbgruppen beobachtet werden.

Die Vanillinsäure war innerhalb der Farbgruppen mit Mittelwerten im Bereich von 0,57 bis 1,00 mg/100 g niedrig enthalten (Tab. 9.11). Die violetten Varietäten waren durch Probe 27 mit einem Maximalwert von 1,67 mg/100 g jedoch auffallend. Den niedrigsten Gehalt hatten die blauen Varietäten mit einem Wert von 0,42 mg/100 g. In den Ergebnissen der Vanillinsäure konnte im Farbgruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,1504$) erkannt werden.

Die Kaffeesäure war im Bereich von 0,45 bis 1,04 mg/100 g gefunden worden und lag mit ihrem Gehalt eher im unteren Bereich. Es konnten zwischen den Farbgruppen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,2433$) gefunden werden (Tab. 9.11). Zusätzlich

waren die Varianzen innerhalb der Farbgruppen, besonders bei der gelben und blauen Gruppe, sehr groß. Das konnte auch im Boxplot (Abb. 9.16) beobachtet werden konnte.

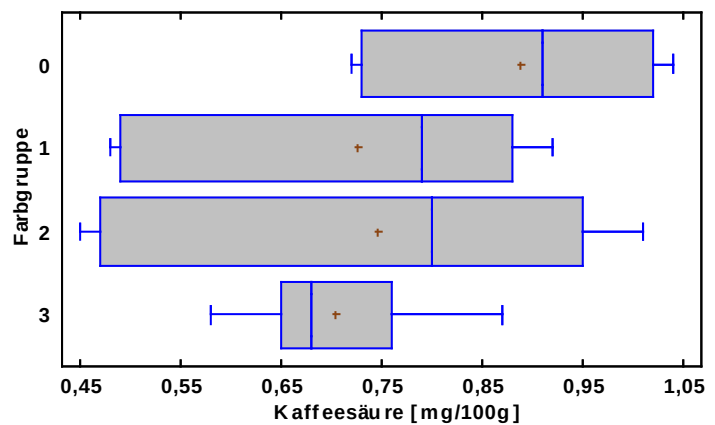


Abb. 9.16: Boxplot der Kaffeesäure

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violette

Die 4-OH-Benzoesäure lag mit ihrem Gehalt der Einzelwerte im Bereich von 0,20 bis 0,89 mg/100 g. Sie war daher, mit Ausnahme der violetten Varietäten, im Vollmehl eher wenig enthalten. Im Farbgruppenvergleich konnten signifikante Unterschiede ($p = 0,0354$) beobachtet werden (Tab. 9.11).

Tab 9.11: Zusammenfassung der Mittel- und p-Werte, geb. Phenolsäuren [mg/100 g]

Phenolsäuren	Schwarz	Gelb	Blau	Violett	p-Werte
Ferulasäure	56,35	50,99	64,80	79,11	0,0457
<i>p</i> -Coumarsäure	1,03	8,50	1,41	1,47	0,01
<i>o</i> -Coumarsäure	2,29	1,48	2,13	1,918	0,0355
Vanillinsäure	0,72	0,75	0,57	1,00	0,1504
Kaffeesäure	0,89	0,73	0,75	0,70	0,2433
4-OH-Benzoesäure	0,26	0,37	0,25	0,48	0,0354

9.3.2. Quantifizierung der gebundenen Phenolsäuren mittels TPC

Der Gesamtphenolsäuregehalt der verschiedenen Extrakte wurde als mg Ferulasäureäquivalente (FA) pro 100 g Probe ausgedrückt.

In Tab. 9.12 sind die TPC-Farbgruppenmittelwerte der gebundenen Phenolsäuren nach Farbgruppen sortiert aufgelistet. Die Werte lagen im Bereich von 101,35 und 291,45 mg FA/100 g mit einem Mittelwert von 170,71 mg FA /100 g. Die Reihung der Farbgruppen-Mittelwerte war aufsteigend von schwarz, gelb, blau zu violett und waren signifikant unterschiedlich. Die schwarze Farbgruppe umfasste im Mittel den niedrigsten Gehalt und war, wie auch im Streudiagramm beobachtet (Abb. 9.17), die Gruppe mit der niedrigsten Streuung. Innerhalb der gelben Varietäten erstreckten sich die Werte von 101,35 bis 212,80 mg/100 g, das auf eine hohe Varianz innerhalb der Gruppe hinweist. Die blaue Farbgruppe enthielt mit durchschnittlich 177,84 mg/100 g am zweitmeisten reihte sich jedoch mit einem Maximalwert von 211,92 hinter den Maximalwert der gelben Farbgruppe. Den höchsten Gehalt zeigte die violette Gruppe mit einem Mittelwert von 217,37 mg/100 g. Innerhalb der Gruppe konnten jedoch die höchsten Schwankungen beobachtet werden mit einem Minimalwert von 144,56 mg/100 g und einem Maximalwert von 291,45 mg/100 g (Tab. 9.12).

Tab. 9.12: Summenstatistik für gebundene Phenolsäuren: TPC [mg FA/100 g]

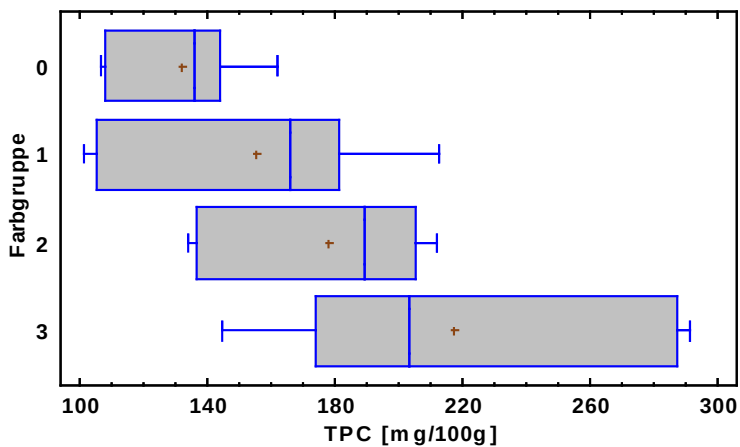
Farbgruppe	Anzahl	MW	Sd	VK	Minimum	Maximum	Spannweite
Schwarz	6	132,05	21,56	16,33%	106,68	161,95	55,27
Gelb	6	155,58	43,88	28,20%	101,35	212,8	111,45
Blau	6	177,84	34,60	19,45%	133,98	211,92	77,94
Violett	6	217,37	60,30	27,74%	144,56	291,45	146,89
Total	24	170,71	51,00	29,88%	101,35	291,45	190,10

Tab. 9.13 zeigt die Mittelwerte der Doppelansätze von allen gemessenen Proben. Den mit Abstand höchsten Gehalt wies Probe 27 (HOR 4024) auf mit einem Mittelwert von 289,41 mg/100 g. Auch im Boxplot der Abb. 9.17 ist die Probe 27 verantwortlich für die hohe Streubreite der violetten Gruppe. Der hohe Gehalt der Probe 27 kann auf die Ferulasäure rückgeschlossen werden. Diese zeigte ebenso bei den Ergebnissen aus der HPLC-Messung extrem hohe Werte. Die restlichen Messungen der violetten Farbgruppe lagen innerhalb der Bereiche der anderen Farbgruppenwerte, allerdings konnte bei Probe 30 mit einem Variationskoeffizienten von 27,32 % kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Der Grund für die hohen Schwankungen konnte nicht ermittelt werden. Da jedoch die restlichen Variationskoeffizienten durchwegs und 10 % liegen, kann von einer hohen Aussagekraft der restlichen Ergebnisse ausgegangen werden. In der Tabelle ist auch zu beobachten, dass sich die violetten Varietäten (4) in der oberen und die schwarzen Varietäten (1) in der unteren Hälfte einreihen. Probe 13 der gelben Varietäten zeigte den niedrigsten Mittelwert mit 103,51 mg/100 g. Die Gehalte der blauen Varietäten konnte in allen Niveaus gefunden werden.

Tab 9.13: TPC-MW nach Proben sortiert, gebundene Phenolsäuren [mg/100 g]

Proben	Farbgruppe	Mittelwerte	VK	sd
27	4	289,41	1,00	2,883
16	3	208,60	2,25	4,703
12	2	197,21	11,19	22,058
22	3	189,54	7,22	13,683
25	4	183,51	7,41	13,601
30	4	179,17	27,32	48,954
9	2	166,04	2,88	4,778
4	1	151,37	9,88	14,963
7	1	137,33	6,75	9,268
18	3	135,38	1,46	1,979
5	1	107,45	1,01	1,085
13	2	103,51	2,95	3,052

(Farbgruppen: 1=schwarz, 2=gelb, 3=blau, 4=violett)

**Abb. 9.17:** Boxplot der gebundenen Phenolsäuren, TPC

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

Im Vergleich der beiden Analysemethoden HPLC und TPC der gebundenen Phenolsäuren konnten geringe Korrelationen ($r = 0,776$) bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,0002$ gefunden werden. Die geringen Zusammenhänge können auch auf einen zu niedrigen Probenumfang rückgeführt werden.

9.3.3. Quantifizierung der freien Phenolsäuren mittels HPLC

Die dominante freie Phenolsäure war die Kaffeesäure mit einem Gehalt von 22,3 % mas. Sie war in allen Proben enthalten und reichte von 0,16 bis 2,33 mg/100 g. Ein wesentlicher Bestandteil der gesamten freien Phenolsäuren machte im Mittel der untersuchten Proben die *o*-Coumarsäure aus (19,03 % mas), gefolgt von der Gallus- (18,68 % mas), der 4-OH-Benzoe- (15,47 % mas) und der Ferulasäure (15,22 % mas). (Abb. 9.18)

Im Vergleich mit den gebundenen Phenolsäuren nahmen die freien Phenolsäuren einen kleineren Anteil (2,25 bis 8,52 %) am gesamten Phenolsäuregehalt ein. Mit einem Gesamtgehalt von 6,81 mg/100 g waren sie in Probe 22 am höchsten enthalten. Die höchsten Werte konnten in den violett- und blaukörnigen Varietäten gefunden werden. Probe 12, eine der gelben Farbgruppe, lag mit einem Gesamtgehalt von 4,65 mg/100 g daher im höheren Bereich. (Tab 9.14)

Tab. 9.14: Gehalte an freien Phenolsäuren, HPLC [mg/100 g]

Probe	Farbgruppe	Gallussäure	4-OH-Benzoesäure	Vanillinensäure	p-Coumarsäure	Ferulasäure	o-Coumarsäure	Kaffeesäure	Summe der freien Phenolsäuren	Anteil am Gesamtgehalt [%]
22	3	1,86	1,09	0,21	0,05	0,36	0,98	2,27	6,81	8,52
25	4	0,49	0,85	0,16	0,21	0,93	1,27	1,35	5,25	7,04
30	4	0,98	1,06	0,66	0,15	0,61	0,58	1,09	5,11	7,95
12	2	0,55	1,37	0,35	0,22	0,55	0,55	1,06	4,65	6,28
18	3	1,61	1,14	0,31	0,02	0,49	0,39	0,49	4,45	7,06
27	4	0,00	0,73	0,44	0,08	0,58	1,13	1,13	4,10	3,17
16	3	0,38	0,63	0,27	0,04	0,32	0,65	0,76	3,05	3,77
7	1	1,18	0,00	0,16	0,03	0,40	0,59	0,27	2,64	3,88
13	2	0,00	0,00	0,16	0,13	0,92	0,64	0,55	2,41	4,58
9	2	0,51	0,00	0,07	0,02	0,51	0,77	0,27	2,16	3,04
5	1	0,00	0,00	0,06	0,11	0,87	0,52	0,48	2,05	4,28
4	1	0,72	0,00	0,15	0,04	0,22	0,38	0,17	1,69	2,25

(Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett)

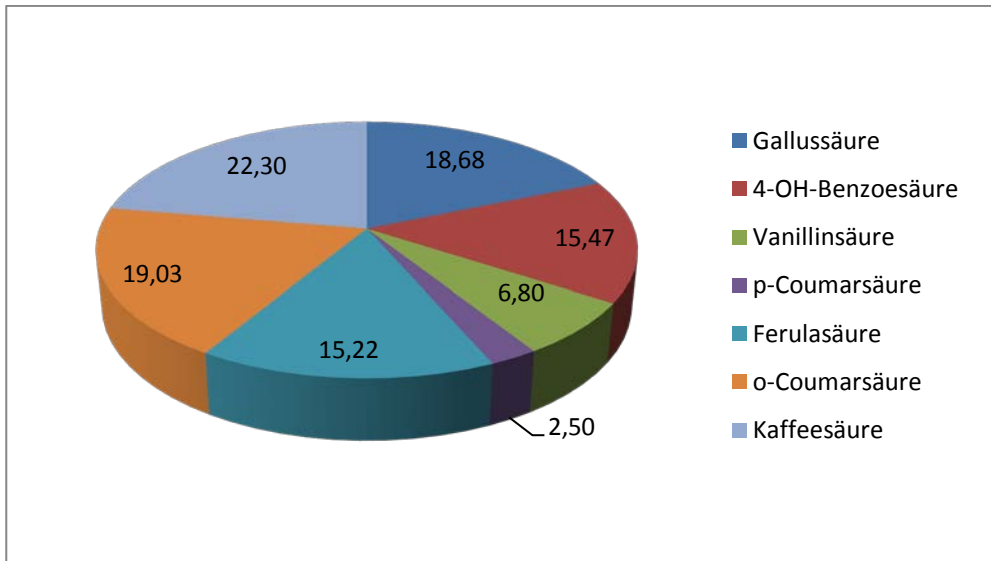


Abb. 9.18: Summe der freien Phenolsäuren [% mas]

9.3.3.1. Gesamtgehalt der freien Phenolsäuren nach Farbgruppen

Die Werte der freien Phenolsäuren aus der HPLC-Analyse wurden addiert und als Summe der freien Phenolsäuren angegeben.

Ihr Gehalt reichte von 1,68 bis 6,85 mg/100 g mit einem Mittelwert von 3,7 mg/100 g. Die Mittelwerte der untersuchten Farbgruppen ergaben folgende Rangfolge: schwarz – gelb – violett – blau. Zwischen den Gruppen zeigten sich unterschiedliche Streubreiten. So waren auch im Vergleich der Mediane signifikante Unterschiede ($p = 0,003$) zu erkennen (Tab. 9.15 und Abb. 9.19).

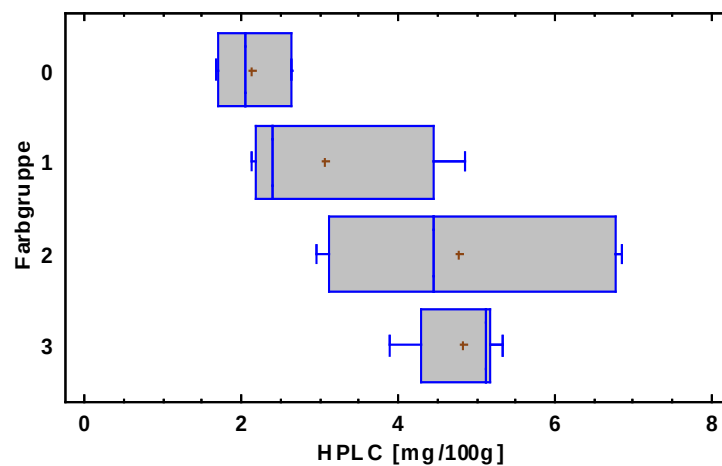


Abb. 9.19: Freie Phenolsäuren nach Farbgruppen, HPLC
Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violette

Tab. 9.15: Summenstatistik für freie Phenolsäuren, HPLC [mg/100 g]

Farbgruppe	Anzahl	MW	Sd	VK	Minimum	Maximum	Spannweite
Schwarz	6	2,13	0,43	20,26%	1,68	2,65	0,97
Gelb	6	3,07	1,24	40,21%	2,14	4,86	2,72
Blau	6	4,77	1,70	35,64%	2,97	6,85	3,87
Violett	6	4,82	0,58	12,00%	3,90	5,34	1,44
Total	24	3,70	1,57	42,34%	1,68	6,85	5,17

9.3.3.2. Einzelne freie Phenolsäuren in der Farbgruppe

Im Farbvergleich der einzelnen freien Phenolsäuren konnte in den Ergebnissen keine einheitlichen Strukturen gefunden werden. Statistisch gesehen waren bei fast allen Phenolsäuren signifikante Unterschiede zwischen den Farbgruppen zu erkennen. In Tab. 9.16 sind die Gruppen-Mittelwerte und die p-Werte des Kruskal-Wallis-Testes angeführt. Für detaillierte Ergebnisse können im Anhang (Tab. 13.12) Einzel- und Mittelwerte der gemessenen Proben nachgeschlagen werden.

Kaffeensäure war die am höchsten enthaltene freie Phenolsäure und reichte von 0,16 bis 2,33 mg/100 g. Die Mittelwerte lagen im Bereich von 0,31 bis

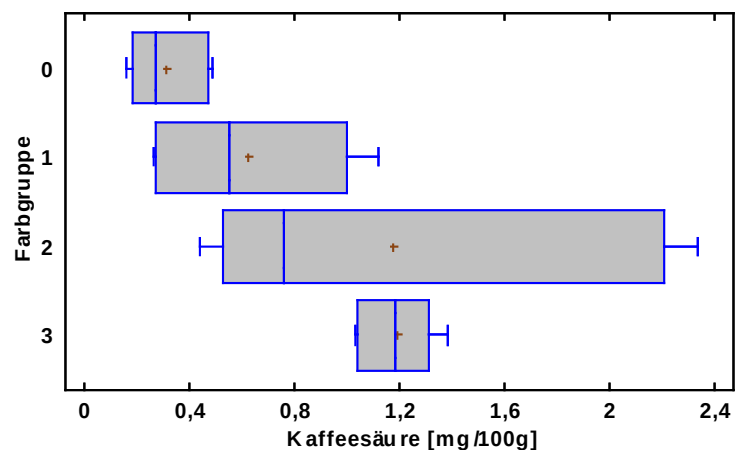


Abb. 9.20: Streudiagramm der freien Kaffeensäure
Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

wies, gefolgt von gelb und blau. Die höchsten Werte konnten in der violetten Farbgruppe ermittelt werden. Alle Farbgruppen unterschieden sich signifikant voneinander (Tab. 9.16). Auffallend waren die blauen Varietäten mit Spannweiten von 1,893, die durch Probe 22 mit einem Maximalwert von 2,33 mg/100 g verursacht wurden. Diese Extremwerte sind auch im Boxplot der Abb. 9.20 gut ersichtlich.

Mit Farbgruppen-Mittelwerten im Bereich von 0,50 bis 0,99 mg/100 g waren auch die Werte der *o*-Coumarsäure aufsteigend von schwarzen bis violetten Varietäten gereiht (Tab. 9.16). Im Boxplot konnte ein Unterschied zwischen den jeweiligen Farb-

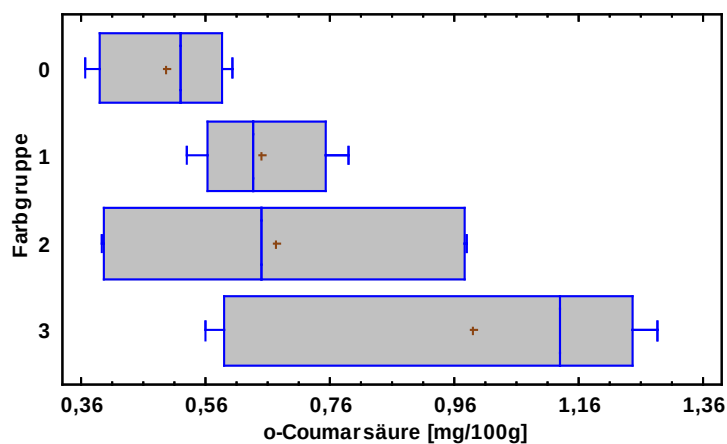


Abb. 9.21: Streudiagramm der freien *o*-Coumarsäure
Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

gruppen beobachtet werden (Abb. 9.21). Das war auch statistisch zu erkennen, mit $p = 0,034$ waren die Gruppen signifikant unterschiedlich. Auffälligkeiten waren bei den blauen und violetten Varietäten zu erkennen, die sehr hohe Streuweiten zeigten. Probe 30 der violetten Varietäten war mit 0,56 mg/100 g sehr niedrig enthalten.

Die Messwerte der Gallussäure waren stark schwankend. Innerhalb der Farbgruppen hatten ihre Werte sehr hohe Schwankungen. Sie war die einzige freie Phenolsäure, bei der zwischen den Farbgruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnte. Auffällig waren die blauen Varietäten mit dem höchsten Mittelwert von 1,28 mg/100 g und zeigten mit einer Schwankung von 1,50 mg/100 g die größte Streubreite.

Sehr unterschiedlich in den Gehalten war auch 4-OH-Benzoesäure. Ihre Farbgruppen-Mittelwerte reichten von 0,00 bis 0,95 mg/100 g (Tab. 9.16). Hier waren in den schwarzen Varietäten keine messbaren Werte zu finden. Ebenso zeigten die gelben Varietäten Auffälligkeiten. In Probe 12 konnte der höchste Gehalt ermittelt werden mit einem Maximal-Wert von 1,37 mg/100 g und hatte die höchste Streubreite von 1,37 mg/100 g (Abb. 9.22). Zwischen den Farbgruppen ergaben sich signifikante Unterschiede (Tab 9.16).

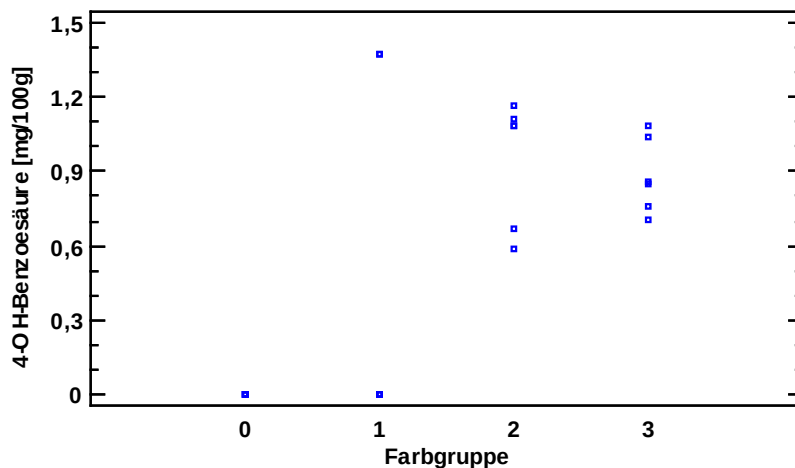


Abb. 9.22: Streudiagramm der freien 4-OH-Benzoessäure
Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

Verglichen zu den Ergebnissen der anderen freien Phenolsäuren zeigte die Ferulasäure niedrige Werte bei den blauen Varietäten mit einem Mittelwert von 0,39 mg/100 g. Die Farbgruppen-Mittelwerte reiheten sich aufsteigend vom niedrigsten zum größten Gehalt von blau, schwarz, gelb zu violetten Varietäten. Zwischen den Farbgruppen konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden (Tab. 9.16).

Die Vanillinsäure war mit einem Gehalt im Bereich von 0,06 und 0,67 mg/100 g eher niedrig enthalten. Auffallend waren die großen Streuweiten der gelben und violetten Varietäten (Abb. 9.23). Die Mittelwerte reiheten sich aufsteigend von schwarz, gelb, blau zu violet-

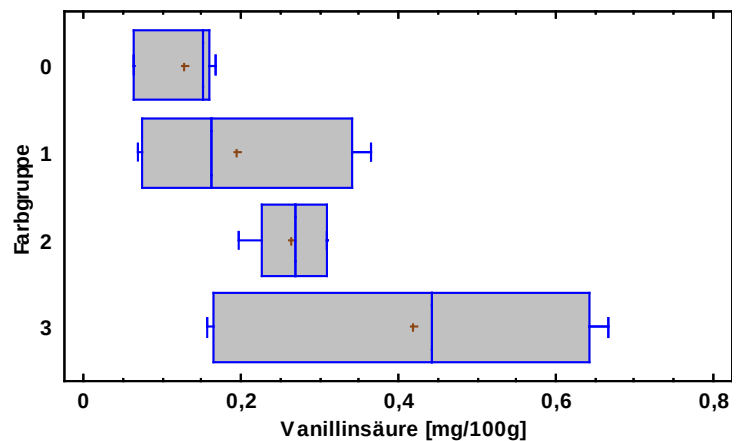


Abb. 9.23: Boxplot freie Vanillinsäure
Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

ten Varietäten. Zwischen den Farbgruppen konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden (Tab. 9.16).

Als am wenigsten enthaltene freie Phenolsäure reichte der Gehalt der *p*-Coumarsäure von 0,02 bis 0,23 mg/100 g. Stark auffallend waren die gelben Varietäten mit Minimalwerten von 0,03 und 0,23 mg/100 g und daraus resultierenden hohen Spannweiten von 0,2 mg/100 g (Abb. 9.24). Ähnlich wie bei der freien Ferulasäure zeigten auch hier die blauen Varietäten bei der *p*-Coumarsäure sehr niedrige Werte und waren mit Gehalten zwischen 0,02 und 0,05 mg/100 g am niedrigsten enthalten. Zwischen den Farbgruppen konnten signifikante Unterschiede erkannt werden (Tab. 9.16).

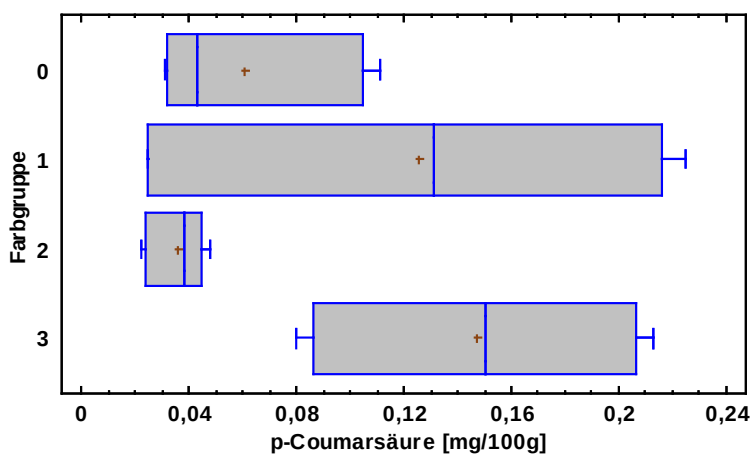


Abb. 9.24: Boxplot der freien *p*-Coumarsäure

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

Tab. 9.16: Zusammenfassung der Mittel- und p-Werte, freie Phenolsäuren [mg/100 g]

Phenolsäuren	Schwarz	Gelb	Blau	Violett	p-Werte
Kaffeesäure	0,31	0,63	1,17	1,19	0,004
<i>o</i> -Coumarsäure	0,50	0,65	0,67	0,99	0,034
Gallussäure	0,63	0,35	1,28	0,49	0,175
4-OH-Benzoesäure	0,00	0,46	0,95	0,88	0,013
Ferulasäure	0,50	0,66	0,39	0,70	0,011
Vanillinsäure	0,13	0,20	0,26	0,42	0,014
<i>p</i> -Coumarsäure	0,06	0,13	0,04	0,15	0,028

9.3.4. Quantifizierung der freien Phenolsäuren mittels TPC

Der Gesamtphenolsäuregehalt der verschiedenen Extrakte wurde in mg Ferulasäureäquivalente (FA) pro 100 g Probe ausgedrückt.

Die höchsten Gehalte wurden in den gelben Varietäten in Probe 13 mit durchschnittlich 178,79 mg FA/100 g gefunden (Abb. 9.25). Verglichen mit den Proben 9 und 12 war Probe 13 sehr hoch im Gehalt, wodurch innerhalb der gelben Farbgruppe eine sehr hohe Spannweite (67,84) verursacht wurde (Tab. 9.17). Ähnlich, jedoch nicht so stark, streuten die schwarzen Varietäten. Probe 7 hatte mit 148,48 mg FA/100 g den höchsten Gehalt und Probe 5 mit 104,53 mg FA/100 g den niedrigsten Gehalt (Abb. 9.25). Im Durchschnitt war in den violetten Varietäten mit 144,83 mg FA/100 g am meisten enthalten (Tab. 9.17). Generell konnte zwischen den Farbgruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden ($p = 0,198$).

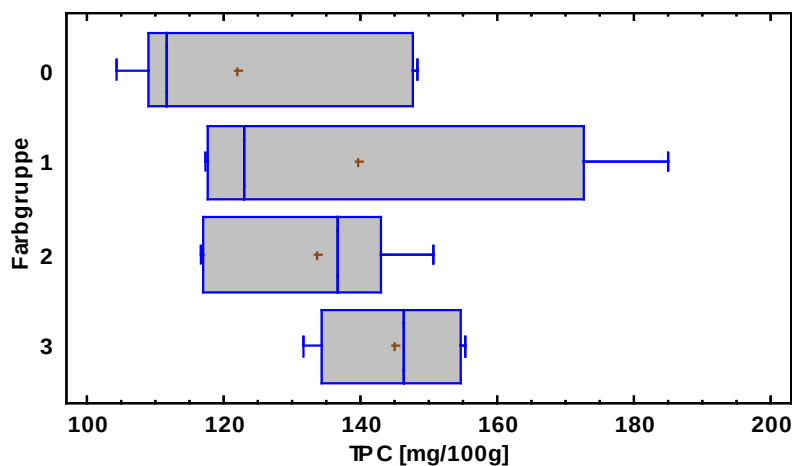


Abb. 9.25: Streudiagramm freie Phenolsäuren, TPC

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

Tab 9.17: Summenstatistik für freie Phenolsäuren: TPC [mg/100 g]

Farbgruppe	Anzahl	MW	Sd	VK	Minimum	Maximum	Spannweite
Schwarz	6	122,14	20,33	16,64%	104,35	148,48	44,13
Gelb	6	139,72	30,63	21,93%	117,19	185,03	67,84
Blau	6	133,50	13,91	10,42%	116,73	150,61	33,88
Violett	6	144,83	10,01	6,913%	131,81	155,49	23,68
Total	24	135,05	20,80	15,40%	104,35	185,03	80,68

9.3.5. Diskussion

Der Gesamtgehalt der gebundenen Phenolsäuren reichte von 45,79 bis 125,43 mg/100 g, gemessen mittels HPLC, wobei Probe 27 (HOR 4024) der violetten Varietäten den höchsten Gehalt aufwies. Sie nahmen am gesamten Phenolsäuregehalt zwischen 91 und 98 % ein. Ein Vergleich mit den Nacktgerstegentypen aus dem HEALTHGRAIN Diversity Screen zeigte deutliche Unterschiede im Gehalt (13,29 mg/100 g und 21,2 mg/100 g) [ANDERSSON et al., 2008]. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Wahl der Extraktionsmethode sein.

Die TPC-Messung ergab Gesamtgehalte zwischen 103,51 und 289,41 mg FA/100 g, wobei auch hier wieder Probe 27 (HOR 4024) am meisten enthielt. Die Werte aus den TPC-Tests waren zum Teil vergleichbar mit den gemessenen Gehalten von LIU und YAO [2007], die durchschnittlich einen Gesamtwert von 132 ± 9 mg/100 g ermittelten.

Innerhalb der Farbgruppen konnte in den violetten Varietäten mit durchschnittlich $84,67 \pm 32,07$ mg/100 g in der HPLC-Analyse und $217,37 \pm 60,30$ mg FA/100 g mittels TPC-Testung am meisten der gebundenen Phenolsäuren nachgewiesen werden, wobei am höchsten die Ferulasäure- ($79,11 \pm 30,03$ mg/100 g), die Vanillinsäure- ($1,00 \pm 0,51$ mg/100 g) und die 4-OH-Benzoesäure ($0,48 \pm 0,29$ mg/100 g) enthalten war. Es zeigten alle gebundenen Phenolsäuren, bis auf Vanillin- und Kaffeesäure, signifikanten Unterschiede zwischen den Farbgruppen. Stark auffallend waren die gelben Varietäten. Sie zeigten bei Probe 9 und 12 extrem hohe Gehalte an *p*-Coumarsäure, die verglichen zum restlichen Probenumfang eher niedrig im Gehalt war. Die vorherrschende gebundene Phenolsäure ist die Ferulasäure und war in Probe 27 (HOR 4024)

mit $117,35 \pm 4,87$ mg/100 g am höchsten enthalten. Die Ergebnisse der gebundenen Ferulasäure lagen verglichen mit der Literatur deutlich höher. Die dort beschriebenen Werte reichten von 10 bis 50 mg/100 g [ANDERSSON et al., 2008; HOLTEKJØLEN et al., 2006; QUINDE-AXTELL und BAIK, 2006].

Mit einem Anteil von 2 bis 9 % am gesamten Phenolsäuregehalt zeigten sich die freien Phenolsäuren niedrig im Gehalt. Im HEALTHGRAIN Diversity Screen waren die freien Phenolsäuren ähnlich im Gehalt, welche rund 3 % der Gesamtphenolsäuren ausmachten [ANDERSSON et al., 2008]. Die in dieser Arbeit mittels HPLC gemessenen Werte reichten von 1,69 bis 6,81 mg/100 g, wobei Probe 22 (N 308) der blauen Varietäten den höchsten Gehalt zeigte. Die Ergebnisse des HEALTHGRAIN Diversity Screen mit Werten von 4,60 bis 7,60 mg/100 g [ANDERSSON et al., 2008] waren durchaus vergleichbar.

Im Farbgruppenvergleich konnte nur in der HPLC-Analyse ein signifikanter Unterschied erkannt werden. Innerhalb der Farbgruppen waren die freien Phenolsäuren in den violetten ($4,82 \pm 0,58$ mg/100 g) und den blauen Varietäten ($4,77 \pm 1,70$ mg/100 g) beinahe gleich hoch enthalten. In den Ergebnissen der TPC-Messungen lag allerdings die violette Farbgruppe mit einem Mittelwert von $144,83 \pm 10,01$ mg FA/100 g an erster Stelle. Probe 13 (Lawina) der gelben Varietäten war die Probe mit dem höchsten Gehalt an freien Phenolsäuren und enthielt 172,54 und 185,03 mg FA/100 g. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von MADHUJITH und SHAHIDI [2009] zeigte, dass ihre Werte wesentlich niedriger lagen. Sie konnten Gehalte zwischen $0,18 \pm 0,00$ und $0,42 \pm 0,02$ mg FA/g ermitteln.

Den Hauptanteil der freien Phenolsäure stellte die Kaffeesäure dar, gefolgt von *o*-Coumar- und Gallussäure, welche in Probe 22 (N 308) mit 2,27 mg/100 g am höchsten enthalten war. Die drei dominanten freien Phenolsäuren lagen sehr eng beieinander und bewegten sich zwischen 19 und 22 %. Bis auf Gallussäure zeigten alle freien Phenolsäuren signifikante Unterschiede im Farbgruppenvergleich.

9.4. Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Die freien und gebundenen Phenolsäureextrakte wurden anhand zwei Tests auf ihre antioxidative Wirkung geprüft und verglichen. Mittels ABTS-Test wurde auf freie Radikalfänger Aktivität gegen das ABTS•+ Radikal Kation untersucht und die Ergebnisse in mmol Tocopheroläquivalente (TAA) pro 100 g Probe angegeben. Die Ergebnisse des FRAP-Tests, basierend auf der Reduktion des Fe(III)-TPTZ Komplexes zu Fe(II), wurden in mmol Fe(II) pro 100 g Probe ausgedrückt.

Die Extrakte (siehe Kapitel 7.2.2) wurden bis zur Bestimmung bei -30°C im Dunkeln gelagert.

Um Aussagen über die antioxidative Wirkung der Phenolsäureextrakte treffen zu können, sollte eruiert werden inwieweit die Methoden im Zusammenhang stehen. Die Korrelationen wurden nach Farbgruppen und Testmethode bestimmt, und in den folgenden Auswertungen diskutiert.

9.4.1. Antioxidative Kapazität der gebundenen Phenolsäuren

9.4.1.1. ABTS nach Farbgruppen

Alle vier Farbgruppen zeigten mit einem Mittelwert von 0,96 mmol TAA/100 g eine antioxidative Wirkung. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten jedoch nicht beobachtet werden, da mit p-Werten > 0,05 keine statistische Signifikanz angezeigt wurde. Innerhalb der

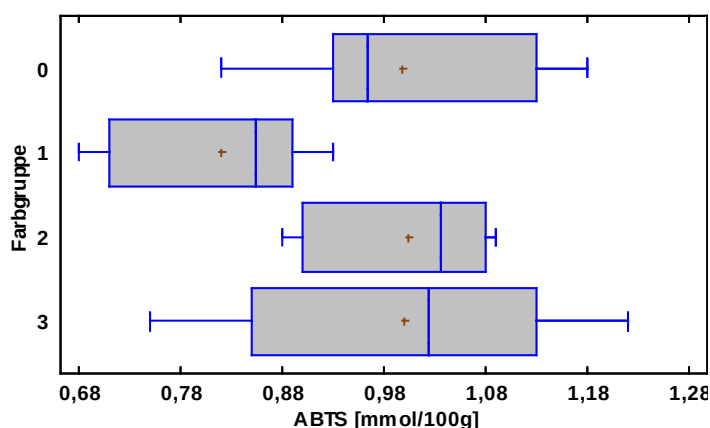


Abb. 9.26: Boxplot geb. Phenolsäuren, ABTS

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

Gruppen konnten hohe Streubreiten beobachtet werden (0,21 bis 0,47 mmol TAA/100 g). (Tab. 9.18, Abb. 9.26)

Die geringste Wirkung zeigten die gelben Varietäten, deren Werte von 0,68 bis 0,93 mmol TAA/100 g reichte (Tab 9.18). Probe 9 und 12 hatten mit einem Mittelwert von 0,88 mmol TAA/100 g die höchste Wirkung auf das ABTS-Radikal, gefolgt von Probe 13 mit 0,70 mmol TAA/100 g. Dieses Muster konnte auch schon im Kapitel 9.3 (Tab. 9.9 und 9.13) im Phenolsäuregehalt erkannt werden ($r = 0,930$ bei $p = 0,007$), woraus geschlossen werden kann, dass höhere Phenolsäuregehalte eine bessere Wirkung auf Radikale haben.

Innerhalb der schwarzen Varietäten zeigte sich in Probe 4 mit einem Mittelwert von 1,16 mmol TAA/100 g die höchste Wirkung. Im Vergleich mit dem Phenolsäuregehalt der Probe 4 aus dem Kapitel 9.3 (Tab. 9.9 und 9.13), kann beobachtet werden, dass hier ein enger Zusammenhang zwischen hohem Phenolsäuregehalt und hoher antioxidativer Wirkung besteht. Diese antioxidative Wirkung konnte auch bei Probe 5 und 7 beobachtet werden. Ihre Ergebnisse aus den ABTS-Tests zeigten eine Wirkung von 0,82 bis 0,99 mmol TAA/100 g. Im Vergleich zu den Phenolsäuregehalt waren diese in Probe 5 und 7 niedrig enthalten, somit konnte innerhalb der schwarzen Varietäten kein Zusammenhang zwischen hoher antioxidativer Wirkung und hohem Phenolsäuregehalt gefunden werden ($r = 0,447$ und $0,475$ bei $p > 0,05$).

Die blaue und violette Farbgruppe, sowie auch die schwarze Gruppe, waren mit Mittelwerten um 1,00 mmol TAA/100 g gleich hoch in ihrer Wirkung (Tab. 9.18). Die TPC-Ergebnisse der blauen Gruppe aus Kapitel 9.3.2 standen in engem Zusammenhang mit denen des ABTS-Tests ($r = 0,982$ bei $p < 0,05$). Im Genaueren wurden die Ergebnisse aus den Doppelbestimmungen beider Testverfahren gegenübergestellt. So ist auch hier ersichtlich, dass Extrakte mit hohem Phenolsäuregehalt eine hohe antioxidative Wirkung zeigten. Eine weniger enge Korrelation zeigten die Ergebnisse der HPLC-Messung verglichen mit der antioxidativen Wirkung aus dem ABTS-Test ($r = 0,889$ bei $p < 0,05$). Ein Zusammenhang der ABTS-Ergebnisse mit Werten von TPC und HPLC in-

nerhalb der violetten Farbgruppe konnte nicht gefunden werden ($r = 0,684$ und $0,650$ bei $p > 0,05$).

Tab. 9.18: Summenstatistik für gebundene Phenolsäuren: ABTS [mmol TAA/100 g]

Farbgruppe	Anzahl	MW	SD	VK	Minimum	Maximum	Spannweite
Schwarz	6	1,00	0,13	13,46%	0,82	1,18	0,36
Gelb	6	0,82	0,10	12,48%	0,68	0,93	0,25
Blau	6	1,00	0,09	9,32%	0,88	1,09	0,21
Violett	6	1,00	0,19	18,63%	0,75	1,22	0,47
Total	24	0,96	0,15	15,54%	0,68	1,22	0,54

9.4.1.2. FRAP nach Farbgruppen

Die Ergebnisse des FRAP-Tests mit einem Mittelwerte von $2,62 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ waren um mehr als das Zweifache höher als die der ABTS-Messung (Tab. 9.19). Allerdings wurden, wie auch schon bei der ABTS-Auswertung, bei den FRAP-Ergebnissen keine sig-

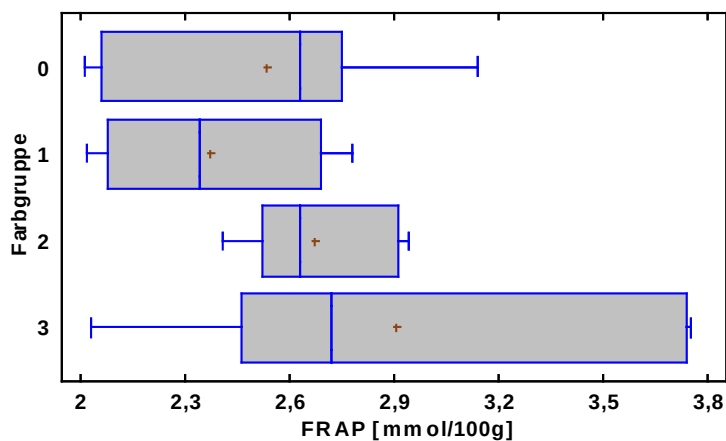


Abb. 9.27: Boxplot geb. Phenolsäuren, FRAP

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

nifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Gruppen erkannt. Innerhalb der Gruppen konnten hohe Spannweiten beobachtet werden (Abb. 9.27). Besonders auffällig waren hier die violetten Varietäten, die mit Werten von $2,03$ bis $3,75 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ am stärksten streuten. (Tab. 9.19)

Die geringste Wirkung zeigten die gelben Varietäten mit einem Mittelwert von $2,38 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ (Tab. 9.19). Die höchsten Werte der gelben Varietäten zeigte Probe 9 mit einem Mittelwert von $2,74 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$, gefolgt von Probe 12 mit $2,34$ und Probe 13 mit $2,05 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$. Im Vergleich mit den Phenolsäurege-

hälter (Kapitel 9.3, Tab. 9.9 und 9.13) war kein Zusammenhang zu erkennen (TPC: $r = 0,603$, HPLC: $r = 0,712$ jeweils bei $p > 0,05$).

Im Vergleich mit den gelben Varietäten zeigte die schwarze Farbgruppe eine etwas höhere antioxidative Wirkung mit einem Mittelwert von $2,54 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$. Die höchste Wirkung konnte in Probe 4 mit einem Mittelwert von $2,95 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ nachgewiesen werden. Die FRAP-Ergebnisse korrelierten stark mit den Phenolsäuregehalten von TPC und HPLC ($r = 0,983$ und $r = 0,997$ jeweils bei $p < 0,05$).

Innerhalb der blauen Varietäten konnten nur geringfügige Spannweiten erkannt werden (Tab. 9.19), dass auf eine hohe Homogenität innerhalb der gesamten Farbgruppe hinweist. Probe 16 war mit einer antioxidativen Kraft von $2,93 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ am stärksten wirksam, gefolgt von Probe 22 mit $2,64 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ und Probe 18 mit $2,56 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$. Die Ergebnisse korrelierten gut mit den Phenolsäuregehalten, sowohl mittels TPC als auch HPLC gemessen (TPC: $r = 0,886$, HPLC: $r = 0,877$ jeweils bei $p < 0,05$).

Die stärkste antioxidative Wirkung zeigten die violetten Varietäten mit einem Mittelwert von $2,90 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$. Probe 27 zeigte einen Maximalwert von $3,75 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ und war somit am effektivsten im FRAP-Test. Innerhalb der Farbgruppe konnten jedoch hohe Schwankungen beobachtet werden, die Werte reichten von $2,03$ bis $3,75 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ mit einer Spannweite von $1,72 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ (Tab. 9.19). Jedoch war eine sehr enge Korrelation zwischen den Phenolsäuregehalten aus Kapitel 9.3 und der antioxidativen Wirkung zu verzeichnen (TPC: $r = 0,994$, HPLC: $r = 0,945$ jeweils bei $p < 0,05$).

Zusammenfassend kann beurteilt werden, dass die antioxidative Wirkung, gemessen mittels FRAP, einen stärker signifikanten Zusammenhang zwischen hohen Phenolsäuregehalten und hoher antioxidativer Wirkung zeigten verglichen mit den Ergebnissen aus den ABTS-Tests.

Tab. 9.19: Summenstatistik für gebundene Phenolsäuren: FRAP [mmol Fe(II)/100 g]

Farbgruppe	Anzahl	MW	SD	VK	Minimum	Maximum	Spannweite
Schwarz	6	2,54	0,43	17,02%	2,01	3,14	1,13
Gelb	6	2,38	0,35	14,63%	2,02	2,78	0,76
Blau	6	2,67	0,21	7,91%	2,41	2,94	0,53
Violett	6	2,90	0,70	24,08%	2,03	3,75	1,72
Total	24	2,62	0,47	17,96%	2,01	3,75	1,74

9.4.2. Diskussion

Grundsätzlich war bei der Messung der gebundenen Phenolsäuren eine antioxidative Wirkung feststellbar und lag bei der Methode ABTS durchschnittlich bei $0,96 \pm 0,15$ mmol TAA/100 g und bei FRAP bei $2,62 \pm 0,47$ mmol Fe(II)-Äquivalente/100 g. Die Ergebnisse der Messungen zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Farbgruppen.

Die gelben Varietäten zeigten mit $0,82 \pm 0,10$ mmol TAA/100 g und $2,38 \pm 0,35$ mmol Fe(II)-Äquivalente/100 g die niedrigste Aktivität. Hier war auch ein enger Zusammenhang mit den Ergebnissen der Phenolsäuregehalten aus den HPLC- und TPC-Messungen erkennbar.

Etwas stärker wirkten die schwarzen Varietäten mit einem Mittelwert von $1,00 \pm 0,13$ mmol TAA/100 g und $2,54 \pm 0,43$ mmol Fe(II)/100 g. In beiden Messmethoden zeigte Probe 4 die höchste antioxidative Kapazität. Eine starke Korrelation zwischen den HPLC- und TPC-Ergebnissen konnte allerdings nur bei den FRAP-Werten nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit der Mehl-Fraktion schwarzer Gerstegenotypen in einer Studie von SIEBENHANDL et al. [2007] zeigte ähnliche Werte von $2,10 \pm 0,05$ bis $2,60 \pm 0,02$ mmol Fe(II)/100 g. Allerdings lagen die Werte der Kleie-Fraktion von $11,46 \pm 0,93$ bis $14,13 \pm 0,61$ mmol Fe(II)/100 g weit über den hier ermittelten Ergebnissen.

Die Wirkung der blauen Varietäten nach der ABTS-Messung waren mit 1,00 mmol TAA/100 g gleich der violetten und schwarzen Genotypen. Ihre Ergebnisse korrelieren eng mit den TPC-Werten ($r = 0,982$), jedoch weniger mit den HPLC-Werten (0,889). Korrelationen zwischen den ABTS-Ergebnissen und beiden Gehaltsmessungen HPLC und TPC der violetten Genotypen konnten nicht gefunden werden. Die antioxidative Kraft der blauen Varietäten, gemessen mit FRAP, war am zweitstärksten mit $2,67 \pm 0,21$ mmol Fe(II)/100 g. Die Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen den HPLC- und TPC-Werten.

Die wirkungsvollste Farbgruppe des gesamten Probenumfangs waren die violetten Varietäten mit einem Mittelwert von $2,90 \pm 0,70$ mmol Fe(II)/100 g. Hier ragte Probe 27 (HOR 4024) mit 3,75 mmol Fe(II)/100 g stark heraus. Im Vergleich zu den HPLC- und TPC-Ergebnissen konnte ein starker Zusammenhang beobachtet werden.

In der Studie von MADHUJITH und SHAHIDI [2009] wurden sechs nicht gefärbte Gerstevarietäten untersucht. Bei der Messung der totalen antioxidativen Kapazität wurde eine antioxidative Wirkung von $7,44 \pm 0,23$ bis $9,88 \pm 0,26$ μ mol TAA/g Probe ermittelt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind um ein Vielfaches höher. Mögliche Gründe für die Unterschiede könnten die Extraktionsmethode sein oder eine andere Ausmahlung der Körner.

9.4.3. Antioxidative Kapazität der freien Phenolsäuren

9.4.3.1. ABTS nach Farbgruppen

Innerhalb der vier Farbgruppen konnte eine antioxidative Wirkung beobachtet werden. Die Farbgruppen–Mittelwerte der Ergebnisse aus den ABTS-Tests reichten von 1,21 bis 1,43 mmol TAA/100 g und es konnte zwischen den Farbgruppen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,59$) beobachtet werden (Tab. 9.20). Mit Ausnahme der gelben Varietäten konnten innerhalb der Gruppen eine niedrige Schwankung und somit eine hohe Homogenität beobachtet werden (Tab. 9.20 und Abb. 9.28). Ein Vergleich mit den Ergebnissen der gebundenen Phenolsäuren zeigte, dass die ABTS-Werte der freien Phenolsäuren etwas höher lagen. Dieses Muster konnte jedoch innerhalb der TPC-Werte in den Kapiteln 9.3.2 und 9.3.4 nicht beobachtet werden. Hier lagen die Mengen der freien Phenolsäuren niedriger als jene der gebundenen Phenolsäuren. Die genauere Betrachtung der einzelnen Farbgruppen in den folgenden Absätzen unterstreichen dieses Erkenntnis, da wenig bis keine Zusammenhänge zwischen einer antioxidativen Wirkung und einem hohen Gehalt an Phenolsäuren erkannt werden konnte.

Die niedrigste Wirkung beim ABTS-Test hatten die schwarzen Varietäten mit einem Mittelwert von 1,21 mmol TAA/100 g. Probe 7 zeigte die stärkste Wirkung mit 1,37 mmol TAA/100 g, gefolgt von Probe 4 mit 1,24 und Probe 5 mit 1,03 mmol TAA/100 g. Es konnte keine

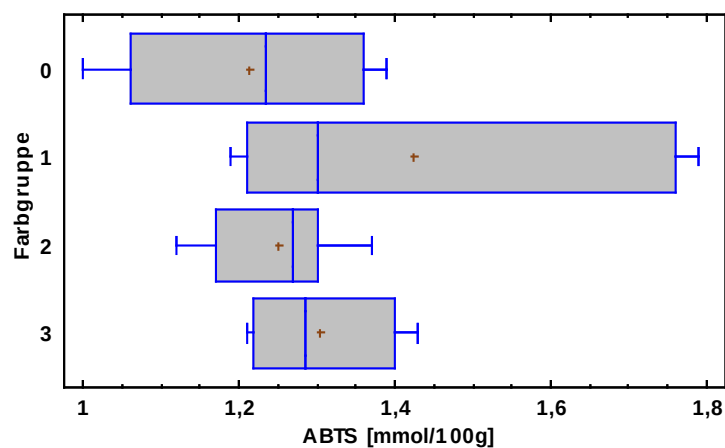


Abb. 9.28: Boxplot freie Phenolsäuren, ABTS

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

signifikante Korrelation zwischen dem Phenolsäuregehalt und der antioxidativen Wirkung festgestellt werden (TPC: $r = 0,817$ bei $p < 0,05$, HPLC: $r = 0,528$ bei $p > 0,05$).

Innerhalb der gelben Farbgruppe waren die größten Spannweiten von 0,60 mmol TAA/100 g zu beobachten (Tab. 9.20 und Abb. 9.28). Die Werte reichten von 1,19 bis 1,79 mmol TAA/100 g und waren mit einem Mittelwert von 1,43 mmol TAA/100 g die wirkungsstärkste Farbgruppe innerhalb der freien Phenolsäuren. Ein enger signifikanter Zusammenhang ($r = 0,991$ bei $p = 0,0001$) konnte nur mit den TPC-Werten beobachtet werden.

Die Werte der blauen Varietäten bewegten sich zwischen 1,12 und 1,37 mit einem Mittelwert von 1,25 mmol TAA/100 g (Tab. 9.20). Zwischen der antioxidativen Wirkung und dem Gesamtphenolgehalt (TPC) konnte kein Zusammenhang gefunden werden ($r = 0,774$ bei $p > 0,05$). Ein negativer Zusammenhang ($r = -0,926$ bei $p < 0,05$) bestand jedoch zwischen der Radikalfängereigenschaft und den Phenolgehalten, gemessen mittels HPLC. So zeigt Probe 22 mit einem hohen Gesamtphenolsäuregehalt von 6,81 mg/100 g in der ABTS-Messung die niedrigste Wirkung von 1,15 mmol TAA/100 g. Umgekehrt konnte bei Probe 16 mit einem niedrigeren Gehalt an freien Phenolsäuren von 3,05 mg/100 g mit 1,33 mmol TAA/100 g die höchste Wirkung in der ABTS-Messung beobachtet werden.

Innerhalb der violetten Farbgruppe waren die geringsten Schwankungen zu erkennen. Die Werte reichten von 1,21 bis 1,43 mmol TAA/100 g mit einem Mittelwert von 1,31 mmol TAA/100 g und zeigten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Phenolsäuregehalten (TPC: $r = 0,447$, HPLC: $r = 0,079$ jeweils bei $p > 0,05$) (Tab. 9.20).

Tab. 9.20: Summenstatistik für freie Phenolsäuren: ABTS [mmol TAA/100 g]

Farbgruppe	Anzahl	MW	SD	VK	Minimum	Maximum	Spannweite
Schwarz	6	1,21	0,16	12,91%	1,0	1,39	0,39
Gelb	6	1,43	0,28	19,34%	1,19	1,79	0,6
Blau	6	1,25	0,09	7,31%	1,12	1,37	0,25
Violett	6	1,31	0,09	7,04%	1,21	1,43	0,22
Total	24	1,30	0,18	13,82%	1,0	1,79	0,79

9.4.3.2. FRAP nach Farbgruppen

Die Ergebnisse des FRAP-Tests folgen dem Trend der ABTS-Messung und bewegten sich zwischen 0,88 und 2,10 mmol Fe(II)/100 g (Tab. 9.21). Auch hier konnten zwischen den Farbgruppen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) festgestellt werden. Hohe Spannweiten innerhalb der Farbgruppen konnten bei den schwarzen und gelben Varietäten beobachtet werden (Tab. 9.21 und Abb. 9.29).

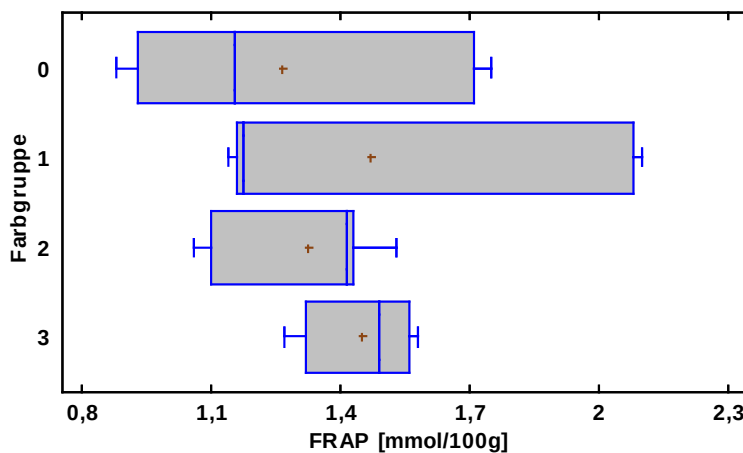


Abb. 9.29: Boxplot freie Phenolsäuren, FRAP

Farbgruppe: (0) = schwarz, (1) = gelb, (2) = blau, (3) = violett

Die schwarze Farbgruppe hatte mit einem Mittelwert von 1,26 mmol Fe(II)/100 g die niedrigste Wirkung (Tab. 9.21). Den höchsten Gehalt wies Probe 7 mit 1,33 mmol Fe(II)/100 g auf, gefolgt von Probe 4 mit 1,15 und Probe 5 mit 0,90 mmol Fe(II)/100 g. Ein enger Zusammenhang bestand zwischen den TPC-Werten ($r = 0,955$ bei $p = 0,03$)

während kein Zusammenhang zwischen den HPLC-Ergebnissen bestand ($r = 0,774$ bei $p > 0,05$).

Mit einem Mittelwert von $1,47 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ waren die gelben Varietäten am wirkungsvollsten (Tab. 9.21). Auch hier konnte Probe 13 mit $2,09 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ die höchste Wirkung erzielen, gefolgt von Probe 12 und 9. Ein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,981$ bei $p = 0,0006$) mit der ABTS-Messung konnte festgestellt werden. Zwischen den TPC-Ergebnissen und der antioxydativen Wirkung der FRAP-Messung konnte ebenso ein enger signifikanter Zusammenhang beobachtet werden ($r = 0,988$ bei $p = 0,0002$). Die HPLC-Daten korrelierten nicht mit den FRAP-Ergebnissen.

Innerhalb der blauen Farbgruppe bewegten sich die Werte zwischen $1,06$ und $1,53 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$. Den Maximalwert von $1,53 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ erreichte die Probe 18. Zwischen den TPC-Daten konnte ein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,97$ bei $p = 0,0013$) beobachtet werden, allerdings nicht mit den HPLC-Ergebnissen.

Den Maximalwert der violetten Farbgruppe erreichte Probe 30 mit $1,58 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$, und den Minimalwert Probe 25 mit $1,30 \text{ mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$ (Tab. 9.21). Diese Ergebnisse korrelierten mit denen der ABTS-Messung ($r = 0,914$ bei $p = 0,0107$). Zusammenhänge zwischen Phenolsäuregehalt und den FRAP-Ergebnissen konnte nicht gefunden werden.

Tab. 9.21: Summenstatistik für freie Phenolsäuren: FRAP [$\text{mmol Fe(II)}/100 \text{ g}$]

Farbgruppe	Anzahl	MW	SD	VK	Minimum	Maximum	Spannweite
Schwarz	6	1,26	0,38	29,99%	0,88	1,75	0,87
Gelb	6	1,47	0,48	32,56%	1,14	2,1	0,96
Blau	6	1,33	0,20	14,72%	1,06	1,53	0,47
Violett	6	1,45	0,13	8,84%	1,27	1,58	0,31
Total	24	1,38	0,32	23,05%	0,88	2,1	1,22

Im gesamten Probenumfang konnte innerhalb der drei Methoden TPC, ABTS und FRAP ein signifikanter Zusammenhang entdeckt werden. Am stärksten korrelierte FRAP und TPC mit $r = 0,920$ signifikant bei $p = 0,000$. Ebenso konnte zwischen FRAP und

ABTS ein signifikanter ($p = 0,000$) Zusammenhang errechnet werden, jedoch weniger stark als bei FRAP und TPC ($r = 0,853$). Der geringste Zusammenhang war zwischen ABTS und TPC zu erkennen ($r = 0,784$ bei $p < 0,001$).

9.4.4. Diskussion

Die Messungen der freien Phenolsäuren zeigten eine antioxidative Wirkung von durchschnittlich $1,30 \pm 0,18$ mmol TAA/100 g im ABTS-Test und $1,38 \pm 0,32$ mmol Fe(II)-Äquivalente im FRAP-Test. Gleich der Ergebnisse der gebundenen Phenolsäuren konnten auch bei den freien Phenolsäuren keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den Farbgruppen beobachtet werden.

Innerhalb der schwarzen Varietäten war mit $1,21 \pm 0,16$ mmol TAA/100 g mittels ABTS die niedrigste Wirkung ermittelt worden und zeigten geringe bis gar keine Zusammenhänge zwischen den HPLC- und TPC-Ergebnissen. Im FRAP-Test zeigten sie ebenso mit $1,26 \pm 0,38$ mmol Fe(II)/100 g die niedrigste Aktivität und korrelierten nur mit den TPC-Werten. In der Arbeit von SIEBENHANDL et al. [2007] wurden zwei schwarze Gerstegenotypen auf ihre antioxidative Wirkung untersucht. Zur Untersuchung wurden jedoch nur die Mehle und die Kleien herangezogen deren antioxidative Wirkung von $0,92 \pm 0,03$ bis $12,81 \pm 0,61$ mmol Fe(II)/100 g reichte. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden ausschließlich aus dem Vollmehl gemessen, dennoch zeigen sie Ähnlichkeiten mit dem von SIEBENHANDL et al. [2007] ermittelten antioxidativen Wirkungsbereich.

Mit durchschnittlich $1,25 \pm 0,09$ mmol TAA/100 g $1,33 \pm 0,20$ mmol Fe(II)/100 g bewegten sich die Werte der blauen Varietäten im Mittelfeld. Auffälligkeiten konnten innerhalb der ABTS-Ergebnisse wahrgenommen werden. Hier bestand ein negativer Zusammenhang zwischen HPLC- und ABTS-Werten (Kapitel 9.4.2.1.). Ein enger Zusammenhang mit den TPC-Ergebnissen war nur innerhalb der FRAP-Messung erkennbar.

Als am zweitstärksten wirkende Farbgruppe erreichten die violetten Varietäten durchschnittlich $1,31 \pm 0,09$ mmol TAA/100 g im ABTS-Test und $1,45 \pm 0,13$ mmol Fe(II)/100 g im FRAP-Test. Innerhalb der antioxidativen Messmethoden waren enge

Korrelationen zu verzeichnen, allerdings nicht im Vergleich zu den Phenolsäuregehalten.

Die gelben Varietäten zeigten mit $1,43 \pm 0,28$ mmol TAA/100 g und $1,47 \pm 0,48$ mmol Fe(II)-Äquivalente die höchste Wirkung. Hier war auch ein enger Zusammenhang mit den Ergebnissen der Phenolsäuregehalte aus den HPLC- und TPC-Messungen erkennbar.

Laut der Studie von MADHUJITH und SHAHIDI [2009] zeigten sechs verschiedene Kulturvarietäten einer Gerstenart, die Bestimmung erfolgte aus dem Vollmehl, im ABTS-Test (TEAC) eine antioxidative Wirkung von $1,89 \pm 0,05$ bis $3,11 \pm 0,02$ μ mol TAA/g Probe. Diese Ergebnisse liegen deutlich unterhalb der in dieser Arbeit erhaltenen Werte. Das untersuchte Probenmaterial der Studie bestanden zudem ausschließlich aus nicht pigmentierten Genotypen und waren keine Nacktgerstevarietäten. Gründe für diese Unterschiede können zum einen im Probematerial – wie z.B. Korngröße – in der Wahl der Extraktionsmethode, aber auch in der Analysendurchführung liegen.

10. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Im Zuge dieser Arbeit wurden 23 Nacktgerste-Varietäten aus dem Jahr 2008 und weitere zwölf Varietäten aus dem Jahr 2009 untersucht. Die 23 Genotypen aus dem Jahr 2008 bestanden aus schwarz, blau und violett gefärbten Varietäten und die zwölf Genotypen aus 2009 aus schwarz, gelb, blau und violett gefärbten. Die Varietäten aus 2009 wurden auf ihren Phenolsäuregehalt, unterteilt in freie und gebundene Phenolsäuren, sowie auf ihre antioxidative Kraft untersucht. Dazu wurden allen Farbgruppen herangezogen. Der Anthocyangehalt wurde im Vollmehl beider Jahre, sowie in den Mahlfractionen Kleie, Futtermehl und Mehl der Varietäten aus 2009 bestimmt. Die Bestimmung erfolgte nur in den Farbgruppen schwarz, blau und violett.

Bei allen Varietäten wurde das Vollkorn in der Labormühle IKA MF10 basic vermahlen. Die Mahlfractionen Mehl, Futtermehl und Kleie wurden in der Versuchsmühle der HTL-LMT Wels produziert, wobei die Kleie im Laborautomaten Bühler-MLU 202 nochmals feiner vermahlen wurde. Die Gehaltsbestimmung der Anthocyane erfolgte mittels HPLC-Methode und Spektroskopie. Die Gehalte der freien und gebundenen Phenolsäuren wurden mittels HPLC-Methode und TPC-Test ermittelt. Aus den Phenolsäureextrakten wurde zusätzlich die antioxidative Kapazität mittels der Methoden FRAP und ABTS gemessen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beim Vergleich des gesamten Probenumfangs beider Erntejahre unterschiedliche Gehaltsbereiche der Anthocyane ermittelt werden konnten. Im Speziellen zeigte die Gegenüberstellung der Genotypen aus 2008 mit denselben Genotypen aus 2009 keine Übereinstimmung. Nur bei wenigen Proben konnten Ähnlichkeiten in den Gehalten erkannt werden. Beispielsweise konnte mittels HPLC-Analyse bei Probe 7 in beiden Erntejahren keine messbaren Werte gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigte Probe 27 in beiden Jahren wiederum ähnlich hohe Gehalte. Der höchste Gehalt des gesamten Probenumfangs konnte in Probe 28 aus 2008 in der HPLC-Messung nachgewiesen werden. Im Vergleich zu ande-

ren Studienergebnissen war der Gesamtgehalt der Anthocyane beider Erntejahre deutlich geringer.

Der Farbgruppenvergleich der Anthocyane zeigte signifikante Unterschiede. Hier konnten im Vergleich beider Erntejahre Ähnlichkeiten mit den Werten innerhalb der Farbgruppen erkannt werden. In den violetten Varietäten konnte in beiden Erntejahren durchschnittlich die höchsten Werte an Anthocyanen nachgewiesen werden. Sie zeigten in der HPLC-Messung 2008 höher Ergebnisse als im Folgejahr 2009. Die schwarzen Varietäten enthielten am wenigsten, wobei hier Probe 7 bei der Gehaltsmessung mittels HPLC keine messbaren Werte gefunden werden konnten. Die blauen Varietäten rangierten in beiden Jahren im Mittelfeld und zeigten auch Ähnlichkeiten mit den Daten aus der Literatur.

Bei der Analyse der einzelnen Fraktionen konnte im gesamten Probenumfang signifikante Unterschiede erkannt werden. Bei beiden Analysemethoden zeigten sich die Farbstoffe durchschnittlich in der Kleie am höchsten, gefolgt vom Futtermehl und Mehl. Es lässt hier die Annahme zu, dass während dem Mahlprozess die Trennung zwischen den einzelnen Fraktionen gelungen ist.

Delphinidin stellte das Hauptanthocyan in den untersuchten Proben dar und zeigte in den violetten Varietäten den höchsten Gehalt. Besonders in Probe 27 konnten, bis auf Cyanidin-Galaktosid, welches in keiner Probe nachgewiesen wurde, alle Anthocyane nachgewiesen werden. Ihre Hauptanteile bestanden aus Cyanidin-Glucosid, Luteolidin und Apigeninidin.

Die gezeigten Schwankungen der Ergebnisse aus der Anthocyanbestimmung zwischen den beiden Erntejahren könnten im Zusammenhang mit wechselnden Umweltbedingungen während der Aufzucht beider Erntejahre stehen. Hierbei spielen mögliche Einflussfaktoren wie Niederschlag und Sonneneinstrahlung eine wesentliche Rolle.

Es wurde jedoch auch die Vermutung angestellt, dass die Extraktionsmethode zu den Unregelmäßigkeiten innerhalb der Gehaltsmessungen führte. In den Aufstockversuchen, die auch im Zuge dieser Arbeit durchgeführt wurden, waren Verluste während der Extraktion zu verzeichnen. Hauptgrund dafür war die Hitzeeinwir-

kung durch das Eindampfen der Konzentrate, aber auch der Einfluss von Licht und Sauerstoff. So wurden weitere Versuche mit saureren Lösungsmitteln durchgeführt, die den Farbstoffen ausreichenden Schutz während der „Wartezeiten“ bieten sollten. Anthocyane sind sehr licht- und hitzesensitiv und zeigen unterschiedliche Stabilitäten, was auch im Aufstockversuch beobachtet werden konnte. Das Ansäuern hat gezeigt, dass beim Eindampfen zur Trockene zum Teil auch die Säure sich verflüchtigt und daher beim Lösen mit angesäuertem Methanol höhere Werte gefunden wurden. Die größten Verluste werden wahrscheinlich beim Wiederaufnehmen des Rückstandes mit dem Lösungsmittel passiert sein.

Der Gehalt der gebundenen Phenolsäuren betrug 91 bis 98 % des Gesamtphenolsäuregehalts. Die Farbgruppenvergleiche zeigten signifikante Unterschiede, wobei die violetten Varietäten sowohl bei der Messung mittels HPLC als auch mittels TPC-Test die höchsten Gehalte zeigten. Hier konnten Korrelationen zur antioxidativen Wirkung erkannt werden, obwohl die Messungen zwischen den Farbgruppen nicht signifikant unterschiedlich waren. Vor allem Probe 27, mit dem höchsten Gehalt an gebundener Phenolsäuren, zeigte die stärkste antioxidative Wirkung.

Als dominante gebundene Phenolsäure konnte Ferulasäure mit rund 90 % nachgewiesen werden, gefolgt von *p*-Coumarsäure mit rund 4,5 %.

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit mit jenen aus anderen Studien zeigten sich deutlich Unterschiede. Besonders die Ergebnisse aus der HPLC-Messung waren niedriger als die in der Literatur beschriebenen.

Mit einem Anteil von 2 bis 9 % leisteten die freien Phenolsäuren einen geringeren Beitrag am gesamten Phenolsäuregehalt bei. Die gemessenen Gehalte deckten sich mit denen der Literatur. Den Hauptanteil der freien Phenolsäuren stellte die Kaffeesäure dar, gefolgt von *o*-Coumar- und Gallussäure, und wurde in den blauen Varietäten am meisten nachgewiesen. Der Farbgruppenvergleich zeigte nur in der HPLC-Analyse signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Die blauen Varietäten erreichten in der HPLC-Messung ähnlich hohe Werte wie die violetten Varietäten, die wiederum in beiden

Analysemethoden die höchsten Werte zeigten. Im Gegensatz zu den gebundenen Phenolsäuren zeigten die freien Phenolsäuren sehr schwache Zusammenhänge mit den antioxidativen Messergebnissen. Einzig auffallend war die gelbe Farbgruppe, deren Probe 13 den höchsten Gehalt an freien Phenolsäuren gemessen hatte und auch mit der antioxidativen Wirkung korrelierte.

Die gezeigten Unterschiede könnten einer Vielzahl an Faktoren zugrunde liegen. Parameter, wie beispielsweise die Größe und Härte des Kornes, die Zusammensetzung und ebenso die Regelmäßigkeit der Vermahlung, können die Extraktion und Gehaltsbestimmung maßgeblich beeinflussen. Das gilt sowohl für Phenolsäuren als auch für Anthocyane. Die Farben ansich haben weniger Auswirkung auf das antioxidative Potential. Die großen Spannweiten sind ein Indiz dafür, dass keine Farbgruppe sich von der anderen abhebt, sondern die Ausprägung der Merkmale vielmehr von den verwendeten Genotypen abhängt.

Die aus den Ergebnissen erworbenen Erkenntnisse stellen durchaus den Grundstein für die Verwendung gefärbter Nacktgersten-Varietäten in der industriellen Herstellung funktionaler Lebensmittel dar. Dabei liegt hier stark der Fokus auf den violetten Varietäten, die mit Abstand den höchsten Gehalt an Anthocyanen und Phenolsäuren zeigten, wobei besonders die äußersten Schichten des Kornes einen hohen Anteil an Anthocyanen enthielten. So können durch eine gezielte Auswahl an Nacktgerstenvarietäten Produkte mit einem hohen physiologisch wertvollen Nutzen entwickelt werden, die Erkrankungen, bedingt durch die falsche Ernährung, präventiv entgegenwirken können. Ähnliche Erkenntnisse konnten auch in der Arbeit von POISINGER [2011] gewonnen werden, in der die Farbstoffgehalte und deren antioxidative Potentiale verschiedener Mahlfraktionen der gleichen Nacktgerste-Genotypen untersucht wurden.

In weiterführenden Studien sollte allerdings der Einfluss der Weiterverarbeitung der Nacktgerstenkörner auf den Farbstoffgehalt und im Folgenden auf das

antioxidative Potential genauer untersucht werden, da, wie in den Aufstock- und Ansäuerungsversuchen beobachtet, diese wertvollen Stoffe sehr sensibel gegenüber Verarbeitung sind.

11. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden 23 schwarz, blau und violett gefärbte Nacktgerste-Varietäten aus dem Jahr 2008 und weitere zwölf schwarz, gelb, blau und violett gefärbte Varietäten aus dem Jahr 2009 untersucht. Die Anthocyane wurden aus beiden Jahren im Vollmehl und aus 2009 in den Fraktionen Kleie, Futtermehl und Mehl ohne die gelben Varietäten bestimmt. Die Phenolsäuren, unterteilt in freie und gebundene, wurden nur in den Vollproben aller Farbgruppen aus 2009 bestimmt. Die Quantifizierung aller Extrakte erfolgte mittels HPLC und Spektroskopie. Zusätzlich wurde aus allen Phenolsäureextrakten die antioxidative Kraft mittels FRAP- und ABTS-Test ermittelt.

Der Jahresvergleich der Genotypen zeigte bei den Anthocyanen unterschiedliche Gehaltsbereiche, wobei in beiden Jahren im Farbgruppenvergleich signifikant ähnliche Ergebnisse erkannt werden konnten. Der höchste Gehalt wurde in den violetten Varietäten nachgewiesen, gefolgt von den blauen und schwarzen Varietäten. Der Vergleich der Fraktionen aus 2009 war signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) hinsichtlich des Gesamtanthocyangehaltes, sowohl in der HPLC-Analyse als auch in der spektroskopischen Messung. Der höchste Gehalt wurde in der Kleie nachgewiesen, gefolgt von Futtermehl und Mehl. Delphinidin und Cyanidin-Glucosid stellten den Hauptanteil der Anthocyane dar.

Der Gesamtgehalt der Phenolsäuren teilte sich auf in 91 bis 98 % gebundene Phenolsäuren und 2 bis 9 % freie Phenolsäuren. Der Hauptanteil war bei den gebundenen Phenolsäuren die Ferulasäure und bei der freien Phenolsäuren die Kaffesäure, gefolgt von *o*-Coumar- und Gallussäure. Im Farbgruppenvergleich zeigten die Phenolsäuren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), mit Ausnahme der freien Phenolsäuren in der spektroskopischen Messung. Der höchste Gehalt an gebundenen Phenolsäuren konnte in den violetten Varietäten gefunden werden und korrelierte mit der antioxidativen Wirkung. Die freien Phenolsäuren waren in den violetten und blauen Proben am höchsten enthalten und zeigten nur schwache Zusammenhänge mit der antioxidativen Wirkung.

ABSTRACT

In the present thesis 23 black, blue and purple coloured naked barley varieties from 2008 and next 12 black, yellow, blue and purple coloured varieties from 2009 were examined. The anthocyanins were determined from both years in the wholemeal fraction. Additionally, samples from 2009 except the yellow ones were milled and separated into bran, middlings and flour and all fractions were analysed for their anthocyanin content. The content of phenolic acids, divided into free and bound ones, were determined only in the wholemeal of all colour groups from 2009. The quantification of all extracts was measured by means of HPLC and spectroscopy. In addition, the antioxidant potential was determined of all phenolic acid extracts by means of FRAP and ABTS test.

The annual comparison of the genotypes showed different content areas of anthocyanins, but in the colour group comparison, significant similar results could be recognised in both years. The highest content was found in the purple group, followed by the blue and black types. The total anthocyanins differed significantly ($p < 0,05$) between the three fractions, where the highest content was found in the bran, followed by middlings and flour. Delphinidin and cyanidin-glucosid represented the main of the anthocyanins.

The total phenolic acids were divided in 91 to 98% of bound phenolic acids and in 2 to 9% of free phenolic acids. The main constituent of the bound phenolic acids was ferulic acid and among the free phenolic acids caffeic acid, followed by *o*-coumaric and gallic acid. The phenolic acids showed in the colour group comparison significant differences ($p < 0,05$), except for the free phenolic acids in the spectroscopic measurement. The highest content in bound phenolic acids was found in the purple genotypes and correlated with the antioxidant effect. The free phenolic acids were highest in the purple and blue types and showed only weak connections to the antioxidant effect.

12. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel-Aal E. M., Young J. C., Rabalski I., Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains, *J. Agric, Food Chem.*, 2006, 54: 4696-4704
2. Adom K. K., Liu R. H., Antioxidant Activity of Grains, *J. Agric, Food Chem.* 2002, 50: 6182-6187
3. Andersson A. A. H., Åman P., Functional barley products, In: Technology of functional cereal products, Woodhead Publishing Limited, 2008, 261-280
4. Andersson A. M. A., Lampi A., Nyström L., Piironen V., Li L., Ward J. L., Gebruers K., Courtin C. M., Delcour J. A., Boros D., Fraš A., Dynkowska W., Rakszegi M., Bedő Z., Shewry P. R., Åman P., Phytochemical and Dietary Fiber Components in Barley Varieties in the HEALTHGRAIN Diversity Screen, *J. Agric, Food Chem.*, 2008, 56: 9767-9776
5. Badimon L., Vilahur G., Padro T., Nutraceuticals and Atheroscleroses: Human Trials, *Chardiovascular Therapeutics*, 2010, 28: 205-215
6. Baik B., Ullrich S. E., Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest, *Journal of Cereal Science*, 2008, 48: 233-242
7. Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch J, 2004a. Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. *Am J Clin Nutr*, 80: 1185-1193.
8. Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch J, 2004b. Lipids significantly reduced by diets containing barley in moderately hypercholesterolemic men. *J Am Coll Nutr*, 23, 55-62.
9. Bell D. R., Gochenaur K., Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts, *J Appl Physiol*, 2006, 100: 1164-1170
10. Bellido G., Beta T., Anthocyanin Composition and Oxygen Radical Scavenging Capacity (ORAC) of Milled and Pearled Purple, Black, and Common Barley, *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 1022-1028
11. Benzie, I, Strain, J., Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration, *Methods in Enzymology*, 1999, 299: 15-27
12. Chan W. S., Wen P. C., Chiang H. C., Anticancer. Res., 1995, 15: 703-707, zitiert in: Nichenametla S. N., Taruscio T. G., Barney D. L., Exon J. H., A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46: 161-183
13. Clauß G., Finze F., Partzsch L, Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner, Frankfurt am Main, Verlag Harri Deutsch, 2002
14. Dai J., Mumper R. J., Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 2010, 15: 7313-7352
15. Delgado-Vargas F., Jiménez A. R., Paredes-López O., Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, 40(3):173-289
16. Ebermann R., Elmadfa I., Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung, Wien, Springer Verlag, 2008
17. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 754, 755, 757, 801, 1465, 2934) and maintenance or achievement of a normal body weight (ID 820, 823) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 2009, 7 (9):1254, 18 pp.

18. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans and maintenance or achievement of normal blood glucose concentrations (ID 756, 802, 2935) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA Journal*, 2010a, 8 (2): 1482, 14 pp
19. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature ageing (ID 1668, 1917, 2515, 2527, 2530, 2575, 2580, 2591, 2620, 3178, 3179, 3180, 3181, 4329, 4415), antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties (ID 857, 1306, 2515, 2527, 2530, 2575, 2580, 2591, 2629, 2728, 4327, 4365, 4380, 4390, 4394, 4455, 4464, 4507, 4694, 4705), protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1196, 1211, 1216, 1306, 1312, 1440, 1441, 1666, 1668, 1692, 1900, 1914, 1948, 2023, 2158, 2517, 2522, 2527, 2575, 2591, 2620, 2637, 2639, 2663, 2860, 3079, 3276, 3564, 3818, 4324, 4329, 4351, 4397, 4416, 4424, 4507, 4527, 4528, 4542, 4611, 4629, 4659) and bioavailability of anthocyanins in black currants (ID 4220) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA Journal*, 2010b, 8 (10): 1752, 34 pp
20. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to cocoa flavanols and protection of lipids from oxidative damage (ID 652, 1372, 1506, 3143), and maintenance of normal blood pressure (ID 1507) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA Journal*, 2010c, 8 (10): 1792, 21 pp
21. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to oat and barley grain fibre and increase in faecal bulk (ID 819, 822) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA Journal*, 2011a, 9 (6): 2249, 13 pp
22. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans from oats and barley and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1236, 1299), increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 851, 852), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 821, 824), and "digestive function" (ID 850) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA Journal*, 2011b, 9 (6): 2207, 21pp
23. EFSA Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA), Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to: anthocyanidins and proanthocyanidins (ID 1787, 1788, 1789, 1790, 1791); sodium alginate and ulva (ID 1873); vitamins, minerals, trace elements and standardised ginseng G115 extract (ID 8, 1673, 1674); vitamins, minerals, lysine and/or arginine and/or taurine (ID 6, 1676, 1677); plant-based preparation for use in beverages (ID 4210, 4211); Carica papaya L. (ID 2007); "fish protein" (ID 651); acidic water-based, non-alcoholic flavoured beverages containing calcium in the range of 0.3 to 0.8 mol per mol of acid with a pH not lower than 3.7 (ID 1170); royal jelly (ID 1225, 1226, 1227, 1228, 1230, 1231, 1326, 1328, 1329, 1982, 4696, 4697); foods low in cholesterol (ID 624); and foods low in trans-fatty acids (ID 672, 4333) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA Journal*, 2011c, 9 (4): 2083, 34 pp
24. El Amrani F. B., et al., *J. Inorg. Biochem.*, 2006, 100: 1208-1218, zitiert in: Hosseinimehr S. J., Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation, *Drug Discovery Today*, 2010, 15, 21/22, 907-918
25. Fardet A., Rock E., Révész C., Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo?, *Journal of Cereal Science*, 2008, 48/2: 258-276
26. Feller S. E., Gawrisch K., MacKerell A. D., *Am. Chem. Soc.*, 2002, 124: 318-326, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
27. Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M. P. M., New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols, *Med. Res. Rev.*, 2006, 26/6: 747-766
28. Giustarini D., Dalle-Donne I., Tsikas D., Rossi R., Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 2009, 46/5-6: 241-281
29. Gould K., Davies K., Winefield C., Anthocyanins, Biosynthesis, Funktionen, and Applications, New York, Springer Verlag, 2009
30. Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Free Radicals in Biology and Medicine, fourth edition, Oxford, University Press, 2007

31. Harlan J. R., On the origin of barley, in: Barley: Origin, Botany, Culture, Winter Hardiness, Genetics, Utilization, Pests. Agriculture Handbook 338. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC, 1978, 10-36
32. Hartung J., Epelt B., Klösener K-H., Statistik, Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik, München, R. Oldenbourg Verlag, 2002
33. Hole A. S., Grimmer S., Naterstad K., Jensen M. R., Paur I., Johannsen S. G., Balstad T R., Blomhoff R., Sahlstrøm S., Activation and Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Activity by Cereal Extracts: Role of Dietary Phenolic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57: 9481-9488
34. Holtekjølen K., Kinitz C., Knutsen S. H., Flavanol and Bound Phenolic Acid Contents in Different Barley Varieties, *J. Agric, Food Chem.*, 2006, 54: 2253-2260
35. Hosseinimehr S. J., Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation, *Drug Discovery Today*, 2010, 15, 21/22, 907-918
36. Hou DX, Fujii M., Terahara N., Yoshimoto M., *J Biomed Biotechnol*, 2004: 2004: 321-325, zitiert in: Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M. P. M., New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols, *Med. Res. Rev.*, 2006, 26/6, 747-766
37. Huang M., Chang L., Sung W., Vong W., Wang B., Protective effects of three smoke flavouring phenols on oxidative damage and nitric oxid production, *Food Chemistry*, 2011, 126: 1655-1661
38. Huang M. T., Smart R. C., Wong C. Q., Conney A. H., *Cancer Res.*, 1988, 48: 5941-5946, zitiert in: Nichenametla S. N., Taruscio T. G., Barney D. L., Exon J. H., A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46: 161-183
39. Huber K., Herstellung von Mahlfraktionen aus gefärbten Nacktgerste-Genotypen zur Verwendung in Backwaren und Teigwaren, 2009, Universität für Bodenkultur, Wien
40. Jaganath I. B., Crozier A., Dietary Flavonoids and Phenolic Compounds, In: Plant phenolics and human health, John Wiley and Sons, New Jersey, 2010; 1-49
41. Kim MJ., Hyun JN., Kim JA., Park JC, Kim MY., Kim JG., Lee SJ., Chun SC., Chung IM., Relationship between Phenolic Compounds, Anthocyanins Content and Antioxidant Activity in Colored Barley Germplasm, *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 4802-4809
42. Keenan JM, Goulson M, Shamliyan T, Knutson N, Kolberg L, Curry L, 2007. The effects of concentrated barley β -glucan on blood lipids and other CVD risk factors in a population of hypercholesterolaemic men and women. *Br J Nutr*, 97, 1162-1168.
43. Kumar N., Shukla P.K., Mishra P.C., Reactions of the OOH radical with guanine: Mechanisms of formation of 8-oxoguanine and other products, *Chemical Physics*, 2010, 375: 118-129
44. Kurosawa T., Itoh F., Nozaki A., Nakano Y., Katsuda S., Osakabe N., Tsubone H., Itakura H., *J. Atheroscler Thromb.*, 2005, 12: 20-28, zitiert in: Yoshihara D., Noriko F., Keiichiro S., Antioxidants: Benefits and risks for long-term health, *Maturitas*, 2010, 67: 103-107
45. Landolino A. B., Cook D. R., Phenylpropanoid Metabolism in Plants: Biochemistry, Functional Biology, and Metabolic Engineering, In: Plant phenolics and human health, John Wiley and Sons, New Jersey, 2010; 489-563
46. Leopoldini M., Marino T., Russo N., Toscano M., Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of the Physical Chemistry A*, 2004, 108 (22): 4916-4922
47. Leopoldini M., Russo N., Toscano M., The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, 2011, 125: 288-306
48. Liu Q., Yao H., Antioxidant activities of barley seeds extracts, *Food Chemistry*, 2007, 102:732-737
49. Löffler G., Petrides P. E., Heinrich P. C., Biochemie und Pathobiochemie, Wien, Springer Verlag, 2007

50. Madhujith T., Shahidi F., Antioxidant potential of barley as affected by alkaline hydrolysis and release of insoluble-bound phenolics, *Food Chemistry*, 2009, 117: 615-620
51. Mattila P., Pihlava J. M., Hellström J., Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53: 8290-8295
52. McIntosh GH, Whyte J, McArthur R, Nestel PJ, 1991. Barley and wheat foods: Influence on plasma cholesterol concentrations in hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*, 53, 1205-1209.
53. Mittermaier N., Atherothrombose – Bindeglied zwischen Herzinfarkt, Hirnschlag und PAVK. *Ars Medici Dossier X*, 2007, 32–33
54. Mohajeri A., Asemani S.S., Theoretical investigation on antioxidant activity of vitamins and phenolic acids for designing a novel antioxidant, *Journal of Molecular Structure*, 2009, 930: 15–20
55. Moon J-K., Shibamoto T., Antioxidant Assays for Plant and Food Components, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57: 1655-1666
56. Moore, J.; Hao, Z.; Zhou, K.; Luther, M.; Costa, M. and YU, L., Carotenoid, Tocopherol, Phenolic Acid, and Antioxidant Properties of Maryland-Grown Soft Wheat, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53: 6649-6657
57. Morrison W. R., Barley lipids, In: Barley: Chemistry and Technology (MacGregor A. W., Bhatti R. S.), American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, 1993; 199-246
58. Navab M., Reddy S. T., Van Lenten B. J., Anantharamalah G. M., Fogelmann A. M., *J. Lipid Res.*, 2009, 50: 145-149, zitiert in: Niki E., Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011, 48/1: 3-7
59. Newman RK, Lewis SE, Newman CW, Boik RJ, Ramage RT, 1989. Hypocholesterolemic effect of barley foods on healthy men. *Nutr Rep Int*, 39, 749-760.
60. Nichenametla S. N., Taruscio T. G., Barney D. L., Exon J. H., A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46: 161-183
61. Nilan R. A., Ullrich S. E., Barley: Taxonomy, Origin, Distribution, Production Genetics, and Breeding, In: Barley: Chemistry and Technology (MacGregor A. W., Bhatti R. S.), American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, 1993; 1-29
62. Nuhn P., Naturstoffchemie, Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe, S. Hirzel Verlag Stuttgart, Leipzig, 1997
63. Ohlenschläger G., Freie Radikale, Oxidativer Stress und Antioxidantien. Krankheitsverursachende, präventive und reparative Prinzipien in lebenden Systemen, 2. erw. Auflage, Köln, Ralf Reglin Verlag 2000
64. Pellegrini, N.; Del Rio, D.; Colombi, B.; Bianchi, M. and Brighenti, F., Application of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Assay to Flow Injection System for the Evaluation of Antioxidant Activity of Some Pure Compounds and Beverages, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51: 260-264
65. Pence B. C., Reiners J. J., *Cancer Res.*, 1987, 47: 6388-6392, zitiert in: Nichenametla S. N., Taruscio T. G., Barney D. L., Exon J. H., A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, 46: 161-183
66. Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., Grape products and cardiovascular disease risk factors, *Nutr Res Rev*, 2008, 21: 158-173
67. Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53: 5036-5040
68. Petersen M., Strack D., Matern U., Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds, In: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Sheffield Academic Press, 1999; 151-221

69. Poisinger S., Charakterisierung des Phenolsäurespektrums und des antioxidativen Potentials verschiedener Nacktgersten Genotypen, 2011
70. Prückler M., Bestimmung der sekundären Pflanzenstoffe in Nacktgerste Varietäten – Pentosan und Phenolsäuren, 2009
71. Quinde-Axtell Z., Baik B., Phenolic Compounds of Barley Grain and Their Implication in Food Products Discoloration, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54: 9978-9984
72. Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., *Med. Res. Rev.*, 2003, 23/4: 519-534, zitiert in: Fresco P., Borges F., Diniz C., Marques M. P. M., New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols, *Med. Res. Rev.*, 2006, 26/6: 747-766
73. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20: 933-956
74. Ross R, *N. Engl. J. Med.*, 1999, 340: 115-126, zitiert in: Mon-Yuan Y., Chien-Ning H., Kuei-Chuan C., Yi-Sun Y., Chiung-Huei P., Chau-Jong W., Mulberry Leaf Polyphenols Possess Antiatherogenesis Effect via Inhibiting LDL Oxidation and Foam Cell Formation, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59: 1985-1995
75. Sandoval R., Malik A. B., Minshall R. D., Kouklis P., Ellis C. A., Tirupathi C., *J. Physiol.*, 2001, 533: 433-445, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
76. Saraswathi V., Wu G., Toborek M., Hennig B., *J. Lipid Res.*, 2004, 45: 794-804, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
77. Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45: 287-306
78. Schewe T., Halangk W., Hiebsch C. H., Rapoport S. M., *FEBS Lett.*, 1975, 60: 149-152, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
79. Schmidt R. F., Lang F., Physiologie des Menschen, Wien, Springer Verlag, 2007
80. Shahidi F., Nacz M., Phenolic Compounds in grains. In: Food Phenolics: Sources, chemistry, effects, applications, Technomic Publishing Company Inc: Lancaster, PA, 1995, 3-39
81. Shao B., Heinecke J. W., *J. Lipid Res.*, 2009, 50: 599-601, zitiert in: Niki E., Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011, 48/1: 3-7
82. Shao B., Oda M. N., Oram J. F., Heinecke J. W., *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, 23: 447-454, zitiert in: Niki E., Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011, 48/1: 3-7
83. Shih P., Wu C., Yeh C., Yen G., Protective Effects of Anthocyanins against Amyloid β -Peptide-Induced Damage in Neuro-2A Cells, *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 1683-1689
84. Shimizu C, Kihara M, Aoe S, Araki S, Ito K, Hayashi K, Watari J, Sakata Y, Ikegami S, 2008. Effect of high β -glucan barley on serum cholesterol concentrations and visceral fat area in Japanese men – a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Plant Foods Hum Nutr*, 63, 21-25.
85. Siebenhandl S., Grausgruber H., Pellegrini N., Del Rio D., Fogliano V., Pernice R., Berghofer E., Phytochemical Profile of Main Antioxidants in Different Fractions of Purple and Blue Wheat, and Black Barley, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55: 8541-8547

86. Singleton, V.; Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R., Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 1999, 25: 152-178
87. Sonnen J. A., Breitner J. C., Lovell M. A., Markesbery W. R., Quinn J. F., Montine T. J., *Free Radical Biol Med*, 2008, 45: 219-230, zitiert in: Shih P., Wu C., Yeh C., Yen G., Protective Effects of Anthocyanins against Amyloid β -Peptide-Induced Damage in Neuro-2A Cells, *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 1683-1689
88. Spiteller G., *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 95: 105-162, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
89. Spiteller G., In: The Maillard reaction: chemistry at the interface of nutrition, aging, und disease (Baynes J. W., Monnier V. M., Ames J. M., Thorpe S. R.), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2005, 1043: 355-360, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
90. Spiteller G., *Med. Hypoth.*, 2002, 60: 69-83, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
91. Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
92. Stillwell W., Wassall S. R., 2003, 126: 1-27, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
93. Straprans I., Pan X. M., Rapp J. H., Feingold K. R., *J. Lipid Res.*, 2003, 44: 705-715, zitiert in: Spiteller G., Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, 41: 326-387
94. Tiwari U., Cummins E., Dietary exposure assessment of β -glucan in a barley and oat based bread. *Food Science and Technology*, 2012, 47: 413-420
95. Van Lenten B. J., Navab M., Shis D., Fogelmann A. M., Lusis A. J., *Trends Cardiovasc. Med.*, 2001, 11: 155-161, zitiert in: Niki E., Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2011, 48/1: 3-7
96. Wang J., Mazza G., Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50: 4183-4189
97. Wu C. H., Lin J. A., Hsieh W. C., Yen G. C., *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 5058-5064, zitiert in: Yoshihara D., Noriko F., Keiichiro S., Antioxidants: Benefits and risks for long-term health, *Maturitas*, 2010, 67: 103-107
98. Zhang Y., Seeram N. P., Lee R., Feng L., Heber D., Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties, *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 670-675
99. Zhao T., Yu M., Spectrum Characteristics and Stability of Anthocyanin Pigment from Hulless Barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*), *Advanced Materials Research Vols*, 2010, 113-114: 2323-2328

13. ANHANG

13.1. Einzelwerte der Anthocyanbestimmung

Tab. 13.1: Einzelwerte der Anthocyane aus dem Vollmehl, Erntejahr 2008, HPLC

Proben-Nr	Ansatz	Myrtillin		Cyanidin-Glu		Delphinidin-Rhamnoside		Pelargonidin-Glu		Delphinidin		Malvidin-Glu		Luteolinidin		Cyanidin		Apigeninidin		Peonidin		Malvidin	
		EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
1	1	0,093	0,090	0,064	0,062	0,046	0,046	0,055	0,054	0,208	0,197	0,000	0,000	0,000	0,000	0,063	0,062	0,055	0,054	0,000	0,000	0,000	0,000
1	2	0,088		0,060		0,045		0,053		0,186		0,000		0,000		0,061		0,052		0,000		0,000	
2	1	0,088	0,091	0,058	0,061	0,044	0,044	0,055	0,055	0,194	0,203	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061	0,062	0,058	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000
2	2	0,094		0,063		0,044		0,056		0,213		0,000		0,000		0,063		0,059		0,000		0,000	
3	1	0,083	0,082	0,057	0,057	0,043	0,044	0,054	0,054	0,188	0,189	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061	0,061	0,053	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000
3	2	0,082		0,058		0,044		0,055		0,189		0,000		0,000		0,062		0,054		0,000		0,000	
4	1	0,122	0,124	0,077	0,082	0,058	0,060	0,084	0,080	0,325	0,321	0,000	0,000	0,106	0,102	0,117	0,113	0,120	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000
4	2	0,126		0,088		0,061		0,076		0,318		0,000		0,099		0,109		0,110		0,000		0,000	
5	1	0,025	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061	0,057	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
5	2	0,025		0,000		0,000		0,053		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000	
6	1	0,075	0,078	0,063	0,064	0,071	0,072	0,000	0,000	0,181	0,185	0,000	0,000	0,070	0,070	0,063	0,063	0,053	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000
6	2	0,081		0,065		0,073		0,000		0,188		0,000		0,070		0,063		0,053		0,000		0,000	
7	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
7	2	0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000	
8	1	0,076	0,076	0,055	0,056	0,067	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
8	2	0,076		0,057		0,067		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000		0,000	
16	1	0,113	0,113	0,075	0,072	0,056	0,054	0,062	0,062	0,266	0,262	0,000	0,000	0,103	0,102	0,000	0,000	0,077	0,073	0,032	0,032	0,064	0,064
16	2	0,115		0,069		0,051		0,062		0,266		0,000		0,103		0,000		0,071		0,032		0,064	
16	3	0,111		0,073		0,055		0,062		0,254		0,000		0,099		0,000		0,071		0,032		0,064	
17	1	0,054	0,051	0,053	0,052	0,043	0,043	0,054	0,055	0,151	0,143	0,000	0,000	0,000	0,000	0,070	0,069	0,063	0,062	0,000	0,000	0,000	0,000
17	2	0,047		0,050		0,043		0,055		0,135		0,000		0,000		0,068		0,061		0,000		0,000	
18	1	0,131	0,131	0,071	0,068	0,043	0,043	0,062	0,062	0,312	0,301	0,000	0,000	0,086	0,090	0,063	0,062	0,085	0,086	0,033	0,033	0,064	0,064
18	2	0,122		0,066		0,044		0,063		0,285		0,000		0,090		0,062		0,085		0,033		0,064	
18	3	0,140		0,068		0,044		0,061		0,305		0,000		0,095		0,062		0,088		0,033		0,064	
19	1	0,094	0,098	0,066	0,068	0,043	0,043	0,056	0,057	0,215	0,225	0,000	0,000	0,000	0,000	0,072	0,074	0,055	0,055	0,000	0,000	0,000	0,000

19	2	0,102		0,070		0,044		0,058		0,234		0,000		0,000		0,075		0,056		0,000		0,000	
20	1	0,107	0,106	0,064	0,065	0,049	0,050	0,051	0,052	0,346	0,349	0,000	0,000	0,112	0,113	0,061	0,062	0,066	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000
20	2	0,106		0,066		0,051		0,053		0,351		0,000		0,113		0,062		0,067		0,000		0,000	
21	1	0,093	0,092	0,064	0,064	0,045	0,044	0,056	0,055	0,216	0,210	0,000	0,000	0,079	0,079	0,062	0,061	0,054	0,053	0,033	0,033	0,000	0,000
21	2	0,091		0,063		0,043		0,054		0,205		0,000		0,079		0,060		0,052		0,032		0,000	
22	1	0,078	0,080	0,058	0,057	0,051	0,051	0,066	0,065	0,224	0,223	0,000	0,000	0,094	0,093	0,065	0,065	0,074	0,073	0,033	0,033	0,000	0,000
22	2	0,082		0,057		0,052		0,065		0,222		0,000		0,092		0,065		0,072		0,033		0,000	
23	1	0,064	0,063	0,049	0,048	0,045	0,044	0,059	0,058	0,137	0,135	0,000	0,000	0,075	0,074	0,063	0,062	0,057	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000
23	2	0,061		0,047		0,044		0,057		0,132		0,000		0,072		0,060		0,055		0,000		0,000	
24	1	0,084	0,086	0,101	0,102	0,054	0,054	0,088	0,088	0,238	0,243	0,000	0,000	0,144	0,145	0,071	0,071	0,177	0,185	0,046	0,048	0,064	0,064
24	2	0,089		0,103		0,054		0,089		0,248		0,000		0,146		0,072		0,193		0,049		0,064	
25	1	0,112	0,110	0,160	0,160	0,051	0,051	0,098	0,097	0,412	0,407	0,000	0,000	0,150	0,150	0,075	0,075	0,310	0,308	0,062	0,062	0,066	0,066
25	2	0,107		0,160		0,050		0,096		0,401		0,000		0,149		0,075		0,307		0,062		0,066	
26	1	0,057	0,058	0,466	0,454	0,043	0,044	0,170	0,168	0,173	0,172	0,000	0,000	0,169	0,172	0,077	0,078	0,000	0,000	0,068	0,068	0,063	0,063
26	2	0,058		0,442		0,044		0,166		0,172		0,000		0,175		0,079		0,000		0,067		0,064	
27	1	0,056	0,057	0,391	0,398	0,164	0,165	0,295	0,299	0,226	0,229	0,073	0,072	0,486	0,495	0,177	0,178	0,402	0,398	0,036	0,036	0,064	0,064
27	2	0,059		0,405		0,165		0,302		0,232		0,071		0,505		0,178		0,393		0,036		0,064	
28	1	0,331	0,333	0,364	0,357	0,064	0,063	0,118	0,117	0,961	0,936	0,000	0,000	0,460	0,452	0,169	0,166	0,220	0,218	0,055	0,056	0,065	0,065
28	2	0,335		0,349		0,063		0,116		0,910		0,000		0,443		0,162		0,216		0,056		0,065	
29	1	0,290	0,295	0,370	0,384	0,069	0,070	0,146	0,149	0,945	0,963	0,000	0,000	0,260	0,265	0,071	0,072	0,088	0,090	0,057	0,058	0,064	0,064
29	2	0,299		0,398		0,071		0,152		0,980		0,000		0,269		0,073		0,092		0,059		0,065	
30	1	0,115	0,113	0,075	0,080	0,057	0,056	0,069	0,069	0,251	0,252	0,148	0,167	0,121	0,118	0,063	0,063	0,055	0,056	0,033	0,033	0,000	0,000
30	2	0,111		0,084		0,054		0,068		0,253		0,187		0,115		0,062		0,056		0,034		0,000	

Tab. 13.2: Einzelwerte der Anthocyane aus dem Vollmehl, Erntejahr 2009, HPLC

Probe	Ansatz	Myrtillin		Cyanidin-Glucosid		Delphinidin-Rhamnoside		Pelargonidin-Glucosid		Delphinidin		Malvidin-Glucosid		Luteolinidin		Cyanidin		Apigeninidin		Peonidin-Chloride		Malvidin	
		EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
4	1	0,160		0,120		0,068		0,081		0,480		0,000		0,259		0,078		0,085		0,000		0,000	
4	2	0,067	0,114	0,057	0,088	0,043	0,056	0,055	0,068	0,222	0,351	0,000		0,103	0,181	0,066	0,072	0,068	0,077	0,000		0,000	
5	1	0,000		0,044		0,000		0,000		0,070		0,000		0,000		0,000		0,000		0,035		0,000	
5	2	0,000	0,000	0,044	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	0,071	0,071	0,000		0,000		0,000		0,000		0,035	0,035	0,000	
16	1	0,057		0,053		0,044		0,054		0,156		0,000		0,077		0,000		0,058		0,000		0,000	
16	2	0,057	0,057	0,053	0,053	0,043	0,044	0,053	0,054	0,161	0,159	0,000		0,078	0,077	0,000		0,055	0,056	0,000		0,000	
18	1	0,141		0,070		0,043		0,067		0,337		0,000		0,101		0,062		0,084		0,033		0,064	
18	2	0,146	0,143	0,074	0,072	0,043	0,043	0,069	0,068	0,359	0,348	0,000		0,106	0,104	0,062	0,062	0,086	0,085	0,033	0,033	0,064	0,064
18	3	0,137	0,141	0,067	0,071	0,043	0,043	0,070	0,069	0,317	0,338	0,000		0,094	0,100	0,063	0,062	0,087	0,086	0,033	0,033	0,064	0,064
22	1	0,061		0,046		0,050		0,072		0,157		0,000		0,111		0,061		0,058		0,033		0,000	
22	2	0,055	0,058	0,046	0,046	0,047	0,049	0,058	0,065	0,157	0,157	0,000		0,092	0,101	0,059	0,060	0,053	0,055	0,031	0,032	0,000	
25	1	0,067		0,134		0,044		0,100		0,246		0,000		0,098		0,066		0,170		0,036		0,000	
25	2	0,060	0,063	0,121	0,128	0,044	0,044	0,095	0,098	0,220	0,233	0,000		0,099	0,098	0,067	0,066	0,157	0,163	0,033	0,035	0,000	
27	1	0,042		0,369		0,049		0,185		0,171		0,071		0,108		0,071		0,125		0,086		0,066	
27	2	0,039	0,041	0,300	0,334	0,047	0,048	0,161	0,173	0,149	0,160	0,069	0,070	0,095	0,102	0,070	0,071	0,109	0,117	0,077	0,081	0,067	0,067
27	3	0,050		0,491		0,046		0,244		0,228		0,076		0,146		0,080		0,133		0,108		0,066	
27	4	0,051	0,050	0,513	0,502	0,046	0,046	0,254	0,249	0,238	0,233	0,078	0,077	0,149	0,148	0,081	0,081	0,138	0,136	0,117	0,112	0,069	0,067
30	1	0,063		0,045		0,047		0,052		0,149		0,000		0,058		0,070		0,060		0,000		0,000	
30	2	0,066	0,064	0,046	0,045	0,047	0,047	0,056	0,054	0,160	0,155	0,000		0,060	0,059	0,071	0,071	0,062	0,061	0,000		0,000	

Tab. 13.3: Einzelwerte der Anthocyane aus den Fraktionen, HPLC

Probe	Fraktion	Ansatz	Myrtillin		Cyanidin-Glucosid		Delphinidin-Rhamnoside		Pelargonidin-Glucosid		Delphinidin		Luteolinidin		Cyanidin		Apigeninidin		Peonidin-Chloride		Malvidin	
			EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
4	KL	1	0,167		0,105		0,082		0,091		0,524		0,231		0,062		0,181		0,035		0,000	
	KL	2	0,168	0,167	0,107	0,106	0,083	0,083	0,092	0,091	0,536	0,530	0,235	0,233	0,062	0,062	0,171	0,176	0,035	0,035	0,000	
	FM	1	0,140		0,079		0,060		0,072		0,329		0,249		0,066		0,172		0,040		0,065	
	FM	2	0,141	0,140	0,065	0,072	0,049	0,055	0,084	0,078	0,297	0,313	0,251	0,250	0,063	0,065	0,131	0,151	0,036	0,038	0,064	0,064
	ME	1	0,087		0,066		0,044		0,168		0,133		0,059		0,132		0,103		0,038		0,066	
	ME	2	0,077	0,082	0,056	0,061	0,044	0,044	0,117	0,143	0,130	0,131	0,058	0,059	0,129	0,131	0,092	0,098	0,037	0,038	0,065	0,066
5	KL	1	0,027		0,071		0,000		0,055		0,091		0,059		0,064		0,000		0,044		0,063	
	KL	2	0,027	0,027	0,072	0,072	0,000		0,055	0,055	0,091	0,091	0,059	0,059	0,064	0,064	0,000		0,045	0,045	0,063	0,063
	FM	1	0,027		0,045		0,000		0,053		0,072		0,053		0,061		0,000		0,036		0,000	
	FM	2	0,027	0,027	0,048	0,047	0,000		0,053	0,053	0,072	0,072	0,053	0,053	0,061	0,061	0,000		0,036	0,036	0,000	
	ME	1	0,037		0,067		0,000		0,112		0,000		0,000		0,066		0,000		0,034		0,065	
	ME	2	0,034	0,035	0,066	0,067	0,000		0,167	0,140	0,000	0,069	0,000	0,052	0,066	0,066	0,000		0,033	0,033	0,064	0,065
16	KL	1	0,168		0,102		0,059		0,067		0,474		0,165		0,063		0,097		0,000		0,000	
	KL	2	0,173	0,171	0,105	0,104	0,060	0,060	0,067	0,067	0,491	0,482	0,169	0,167	0,064	0,063	0,102	0,100	0,000		0,000	
	FM	1	0,086		0,066		0,047		0,057		0,261		0,104		0,062		0,068		0,000		0,000	
	FM	2	0,088		0,069		0,048		0,058		0,266		0,105		0,062		0,068		0,000		0,000	
	FM	3	0,086	0,087	0,067	0,068	0,048	0,048	0,057	0,058	0,260	0,263	0,102	0,104	0,062	0,062	0,078	0,073	0,000		0,000	
	ME	1	0,053		0,053		0,000		0,170		0,070		0,133		0,000		0,069		0,036		0,065	
	ME	2	0,053	0,053	0,052	0,052	0,000		0,116	0,143	0,070	0,070	0,140	0,137	0,000		0,070	0,070	0,036	0,036	0,065	0,065
18	KL	1	0,145		0,077		0,043		0,063		0,312		0,099		0,077		0,064		0,032		0,064	
	KL	2	0,148	0,146	0,078	0,078	0,043	0,043	0,064	0,064	0,317	0,314	0,102	0,101	0,068	0,073	0,059	0,062	0,032	0,032	0,063	0,064
	KL	3	0,140	0,144	0,076	0,077	0,043	0,043	0,063	0,064	0,318	0,316	0,102	0,101	0,000	0,073	0,061	0,062	0,032	0,032	0,063	0,064

	FM	1	0,124		0,061		0,044		0,061		0,245		0,000		0,125		0,092		0,036		0,064	
	FM	2	0,115	0,120	0,056	0,059	0,043	0,043	0,056	0,059	0,243	0,244	0,000		0,107	0,116	0,076	0,084	0,033	0,034	0,062	0,063
	ME	1	0,060		0,047		0,000		0,107		0,073		0,000		0,111		0,089		0,037		0,064	
	ME	2	0,054	0,057	0,048	0,047	0,000		0,075	0,091	0,087	0,080	0,000		0,099	0,105	0,082	0,085	0,035	0,036	0,064	0,064
22	KL	1	0,152		0,066		0,051		0,077		0,438		0,000		0,111		0,106		0,032		0,000	
	KL	2	0,154	0,153	0,067	0,067	0,053	0,052	0,079	0,078	0,449	0,444	0,000		0,114	0,113	0,108	0,107	0,032	0,032	0,000	
	FM	1	0,077		0,048		0,046		0,059		0,217		0,000		0,087		0,070		0,032		0,000	
	FM	2	0,080	0,079	0,047	0,048	0,046	0,046	0,058	0,059	0,207	0,212	0,000		0,094	0,090	0,070	0,070	0,033	0,032	0,000	
	ME	1	0,047		0,039		0,000		0,078		0,087		0,000		0,089		0,054		0,032		0,000	
	ME	2	0,044	0,046	0,040	0,040	0,000		0,076	0,077	0,092	0,089	0,000		0,085	0,087	0,056	0,055	0,032	0,032	0,000	
25	KL	1	0,186		0,249		0,047		0,111		0,789		0,333		0,156		0,225		0,072		0,000	
	KL	2	0,172	0,179	0,236	0,243	0,048	0,048	0,108	0,109	0,751	0,770	0,315	0,324	0,150	0,153	0,204	0,214	0,068	0,070	0,000	
	FM	1	0,095		0,163		0,047		0,080		0,408		0,184		0,103		0,152		0,062		0,000	
	FM	2	0,094	0,094	0,163	0,163	0,042	0,044	0,085	0,082	0,405	0,406	0,184	0,184	0,103	0,103	0,155	0,153	0,061	0,062	0,000	
	ME	1	0,052		0,068		0,000		0,097		0,080		0,066		0,128		0,437		0,045		0,072	
	ME	2	0,060	0,056	0,071	0,070	0,000		0,146	0,121	0,076	0,078	0,067	0,066	0,139	0,134	0,490	0,463	0,045	0,045	0,072	0,072
27	KL	1	0,066		0,702		0,000		0,385		0,384		0,272		0,118		0,226		0,194		0,065	
	KL	2	0,072	0,069	0,711	0,707	0,000		0,390	0,387	0,390	0,387	0,261	0,267	0,116	0,117	0,231	0,228	0,197	0,195	0,065	0,065
	FM	1	0,044		0,311		0,000		0,188		0,202		0,126		0,083		0,300		0,136		0,066	
	FM	2	0,043	0,043	0,316	0,314	0,000		0,194	0,191	0,201	0,201	0,123	0,124	0,084	0,083	0,285	0,292	0,141	0,139	0,067	0,066
	ME	1	0,033		0,114		0,042		0,127		0,084		0,064		0,067		0,661		0,044		0,078	
	ME	2	0,035	0,034	0,136	0,125	0,000	0,042	0,126	0,126	0,084	0,084	0,076	0,070	0,073	0,070	1,264	0,963	0,045	0,044	0,088	0,083
	ME	3	0,035	0,034	0,141	0,131	0,000	0,042	0,151	0,134	0,083	0,084	0,075	0,071	0,073	0,071	1,050	0,992	0,049	0,046	0,093	0,086
30	KL	1	0,125		0,071		0,057		0,067		0,323		0,095		0,099		0,105		0,033		0,000	
	KL	2	0,122	0,124	0,073	0,072	0,061	0,059	0,071	0,069	0,312	0,318	0,093	0,094	0,097	0,098	0,104	0,104	0,033	0,033	0,000	
	FM	1	0,095		0,057		0,051		0,057		0,197		0,063		0,106		0,066		0,035		0,065	
	FM	2	0,089	0,092	0,053	0,055	0,048	0,049	0,057	0,057	0,215	0,206	0,072	0,068	0,084	0,095	0,080	0,073	0,000	0,033	0,000	0,063
	ME	1	0,071		0,054		0,116		0,000		0,075		0,000		0,122		0,099		0,032		0,062	
	ME	2	0,065	0,068	0,049	0,052	0,104	0,110	0,000		0,077	0,076	0,000		0,107	0,114	0,092	0,096	0,032	0,032	0,062	0,062

Tab. 13.4: Einzelwerte der Anthocyane der Vollproben aus 2008, Photometer

	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	Äquivalent		MW	VK
Proben	A	A	A - LW	A - LW	mg/L	mg/L	V [ml]	V [ml]	EW [g]	EW [g]	mg/100g	mg/100g	mg/100g	%
BOKU SNG 04	0,104	0,100	0,140	0,136	1,869	1,812	20	20	2,003	2,058	1,866	1,761	1,813	4,125
BVAL 358117	0,077	0,083	0,113	0,119	1,480	1,567	20	20	2,066	2,004	1,433	1,564	1,499	6,168
BVAL 358163	0,094	0,075	0,130	0,111	1,725	1,452	20	20	2,075	2,030	1,663	1,430	1,547	10,622
C 661	0,020	0,021	0,056	0,057	0,659	0,674	32	32	2,007	2,006	1,051	1,075	1,063	1,568
E 360	0,093	0,105	0,129	0,141	1,711	1,884	20	20	2,012	2,027	1,701	1,859	1,780	6,285
E 604	0,037	0,033	0,073	0,069	0,904	0,846	32	32	2,012	2,002	1,438	1,353	1,395	4,315
ICARDA Black Naked	0,051	0,010	0,087	0,046	1,106	0,515	32	32	2,018	2,008	1,753	0,821	1,287	51,227
U 347 (od J 307)	0,019	0,019	0,055	0,055	0,645	0,645	32	32	2,020	2,002	1,021	1,030	1,026	0,640
C 651	0,070	0,059	0,106	0,095	1,380	1,221	32	32	2,004	2,013	2,203	1,941	2,072	8,931
E 515	0,009	0,019	0,045	0,055	0,501	0,645	32	32	2,019	2,006	0,794	1,028	0,911	18,224
E 550	0,036	0,036	0,072	0,072	0,890	0,890	32	32	2,000	2,001	1,423	1,423	1,423	0,032
E 632	0,011	0,007	0,047	0,043	0,529	0,472	32	32	2,046	2,038	0,828	0,741	0,784	7,841
GE 040 SEL blau	0,013	0,016	0,049	0,052	0,558	0,601	32	32	2,062	2,004	0,866	0,961	0,913	7,299
I 311	0,010	0,016	0,046	0,052	0,515	0,601	32	32	2,015	2,098	0,818	0,918	0,868	8,109
N 308	0,019	0,019	0,055	0,055	0,645	0,645	32	32	2,003	2,006	1,030	1,028	1,029	0,120
N 624	0,019	0,027	0,055	0,063	0,645	0,760	32	32	2,004	2,092	1,029	1,162	1,096	8,583
HOR 2199	0,075	0,072	0,111	0,108	1,452	1,408	32	32	2,004	2,010	2,318	2,243	2,280	2,324
HOR 2593	0,102	0,101	0,138	0,137	1,841	1,826	32	32	2,007	2,009	2,935	2,909	2,922	0,633
HOR 3727	0,113	0,114	0,149	0,150	1,999	2,014	32	32	2,067	2,021	3,095	3,189	3,142	2,103
HOR 4024	0,229	0,219	0,265	0,255	3,671	3,527	32	32	2,002	2,003	5,868	5,635	5,752	2,863
HOR 4940	0,095	0,095	0,131	0,131	1,740	1,740	32	32	2,015	2,016	2,763	2,761	2,762	0,049
HOR 11402	0,063	0,063	0,099	0,099	1,279	1,279	32	32	2,041	2,012	2,005	2,034	2,019	1,008
N 023	0,020	0,025	0,056	0,061	0,659	0,731	32	32	2,024	2,046	1,042	1,144	1,093	6,552

Tab. 13.5: Einzelwerte der Anthocyane der Vollproben aus 2009, Photometer

	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	Äquivalent		MW	VK
Proben	A	A	A - LW	A - LW	mg/ml	mg/ml	V [ml]	V [ml]	EW [g]	EW [g]	mg/100g	mg/100g	mg/100g	%
C 661	0,075	0,081	0,112	0,118	1,470	1,557	32	32	2,011	2,023	2,340	2,463	2,401	3,636
E 360	-0,006	-0,009	0,031	0,028	0,303	0,260	32	32	2,010	2,007	0,483	0,415	0,449	10,752
ICARDA BN	0,022	0,031	0,059	0,068	0,707	0,836	32	32	2,006	2,012	1,127	1,331	1,229	11,704
C 651	0,016	0,025	0,053	0,062	0,620	0,750	32	32	2,040	2,091	0,973	1,148	1,060	11,666
E 550	-0,017	-0,017	0,020	0,020	0,145	0,145	32	32	2,011	2,007	0,230	0,231	0,231	0,137
N 308	-0,012	0,001	0,025	0,038	0,217	0,404	32	32	2,046	2,096	0,339	0,617	0,478	41,088
HOR 2593	0,087	0,093	0,124	0,130	1,643	1,730	32	32	2,016	2,026	2,608	2,732	2,670	3,275
HOR 4024	0,180	0,213	0,217	0,250	2,983	3,459	32	32	2,006	2,003	4,759	5,525	5,142	10,540
HOR 4024	0,261	0,253	0,298	0,290	4,150	4,035	32	32	2,005	2,005	6,625	6,440	6,532	2,006
N 023	-0,003	0,010	0,034	0,047	0,346	0,534	32	32	2,073	2,019	0,535	0,846	0,690	31,879
N 023	0,001	0,003	0,038	0,040	0,404	0,433	32	32	2,002	2,005	0,646	0,691	0,668	4,785

Tab. 13.6: Einzelwerte der Anthocyane der Fraktionen, Photometer

		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	Äquivalent		MW	VK
	Proben	A	A	A - LW	A - LW	mg/ml	mg/ml	V [ml]	V [ml]	EW [g]	EW [g]	mg/100g	mg/100g	mg/100g	%
Kleie	C 661	0,035	0,034	0,070	0,069	0,854	0,840	32	32	2,032	2,029	1,345	1,324	1,335	1,085
	E 360	0,047	0,047	0,082	0,082	1,027	1,027	32	32	2,050	2,048	1,603	1,605	1,604	0,062
	ICARDA BN	0,028	0,027	0,063	0,062	0,753	0,739	32	32	2,008	2,025	1,200	1,167	1,184	1,983
	C 651	0,048	0,053	0,083	0,088	1,041	1,113	32	32	2,014	2,005	1,655	1,777	1,716	5,049
	E 550	-0,015	-0,012	0,062	0,065	0,744	0,787	32	32	2,067	2,028	1,151	1,242	1,197	5,341
	N 308	0,030	0,031	0,065	0,066	0,782	0,796	32	32	2,053	2,012	1,219	1,266	1,243	2,707
	HOR 2593	0,111	0,108	0,146	0,143	1,949	1,906	32	32	2,009	2,031	3,105	3,003	3,054	2,363
	HOR 4024	0,241	0,255	0,276	0,290	3,822	4,024	32	32	2,045	2,043	5,980	6,303	6,142	3,719
	N 023	0,045	0,045	0,080	0,080	0,998	0,998	32	32	2,050	2,029	1,558	1,574	1,566	0,707
Futtermehl	C 661	0,020	0,019	0,055	0,054	0,638	0,623	32	32	2,013	2,049	1,014	0,974	0,994	2,848
	E 360	0,018	0,010	0,053	0,045	0,609	0,494	32	32	2,054	2,050	0,949	0,771	0,860	14,640
	ICARDA BN	-0,008	-0,008	0,027	0,027	0,234	0,234	32	32	2,032	2,005	0,369	0,374	0,372	0,925
	C 651	0,027	0,027	0,062	0,062	0,739	0,739	32	32	2,011	2,010	1,176	1,176	1,176	0,004
	E 550	-0,024	-0,027	0,053	0,050	0,614	0,571	32	32	2,023	2,089	0,971	0,874	0,923	7,431
	N 308	-0,001	0,000	0,034	0,035	0,335	0,350	32	32	2,017	2,018	0,532	0,555	0,543	2,954
	HOR 2593	0,092	0,092	0,127	0,127	1,675	1,675	32	32	2,082	2,098	2,575	2,555	2,565	0,562
	HOR 4024	0,227	0,221	0,262	0,256	3,621	3,534	32	32	2,063	2,057	5,616	5,498	5,557	1,510
	N 023	0,019	0,018	0,054	0,053	0,623	0,609	32	32	2,038	2,097	0,979	0,930	0,954	3,654
Mehl	C 661	-0,005	-0,007	0,030	0,028	0,278	0,249	32	32	2,034	2,040	0,437	0,390	0,414	7,964
	E 360	0,004	-0,002	0,039	0,033	0,407	0,321	32	32	2,013	2,030	0,647	0,506	0,577	17,381
	ICARDA BN	-0,019	-0,019	0,016	0,016	0,076	0,076	32	32	2,005	2,004	0,121	0,121	0,121	0,032
	C 651	-0,005	-0,005	0,030	0,030	0,278	0,278	32	32	2,008	2,011	0,443	0,442	0,442	0,106
	E 550	-0,047	-0,043	0,030	0,034	0,282	0,340	32	32	2,019	2,019	0,448	0,539	0,493	13,084
	N 308	-0,019	-0,019	0,016	0,016	0,076	0,076	32	32	2,050	2,044	0,118	0,119	0,119	0,211
	HOR 2593	0,025	0,024	0,060	0,059	0,710	0,695	32	32	2,012	2,057	1,129	1,082	1,105	3,014
	HOR 4024	0,087	0,087	0,122	0,122	1,603	1,603	32	32	2,046	2,056	2,507	2,495	2,501	0,345
	N 023	-0,004	0,001	0,031	0,036	0,292	0,364	32	32	2,065	2,075	0,452	0,562	0,507	15,215

Tab. 13.7: Einzelproben aus der Fraktion Kleie

Proben-Nr	Myrtillin	Cyanidin-Glu	Delphinidin-Rha	Pelargonidin-Glu	Delphinidin	Malvidin-Glu	Luteolidin	Cyanidin	Apigeninidin	Peonidin	Malvidin
4	+	+	+	•	+++		+	•	+	•	
5	•	•		•	•		•	•		•	•
7											
16	+	+	•	•	++		+	•	•		
18	+	•	•	•	++		+	•	•	•	•
22	+	•	•	•	++			+	+	•	
25	+	+	•	+	+++	+	++	+	+	•	
27	•	+++		++	++	++	+	+	+	+	•
30	+	•	•	•	++		•	•	+	•	

• = in Spuren, + = 0,1 – 0,3 mg/100 g, ++ = 0,31 – 0,5 mg/100 g, +++ = > 0,5 mg/100 g

Tab. 13.8: Einzelproben aus der Fraktion Futtermehl

Proben-Nr	Myrtillin	Cyanidin-Glu	Delphinidin-Rha	Pelargonidin-Glu	Delphinidin	Malvidin-Glu	Luteolidin	Cyanidin	Apigeninidin	Peonidin	Malvidin
4	+	•	•	•	++		+	•	+	•	•
5	•	•		•	•		•	•		•	
7											
16	•	•	•	•	+		+	•	•		
18	+	•	•	•	+			•	•	•	•
22	•	•	•	•	+			•	•	•	
25	•	+	•	•	++	+	+	+	+	•	
27	•	++		+	+	+	+	•	+	+	•
30	•	•	•	•	+		•	•	•	•	

• = in Spuren, + = 0,1 – 0,3 mg/100 g, ++ = 0,31 – 0,5 mg/100 g, +++ = > 0,5 mg/100 g

Tab. 13.9: Einzelproben aus der Fraktion Mehl

Proben-Nr	Myrtillin	Cyanidin-Glu	Delphinidin-Rha	Pelargonidin-Glu	Delphinidin	Malvidin-Glu	Luteolidin	Cyanidin	Apigeninidin	Peonidin	Malvidin
4	•	•	•	+	+		•	+	•	•	•
5	•	•		+	•			•		•	•
7											
16	•	•		+	•		+	+	•	•	•
18	•	•		•	•			+	•	•	•
22	•	•		•	•			•	•	•	
25	•	•		+	•		•	+	+++	•	•
27	•	+		+	•		•	•	+++	•	•
30	•	•	+	•	•			+	•	•	•

• = in Spuren, + = 0,1 – 0,3 mg/100 g, ++ = 0,31 – 0,5 mg/100 g, +++ = > 0,5 mg/100 g

13.2. Farbdarstellung der einzelnen Extraktionsschritte

Tab. 13.10: Farbdarstellung der einzelnen Extraktionsschritte

Extraktion	Probe			Probe 27		
	27	18	7	Kleie	Futtermehl	Mehl
1. Schritt						
2. Schritt						
3. Schritt						
Gesamt						

13.3. Einzelwerte der Phenolsäurenbestimmung

Tab. 13.11: Einzelwerte der gebundenen Phenolsäuren mittels HPLC

Probe	Ansatz	4-OH-Benzoic acid		Vanilic		p-Coumar		Ferula		o-Coumar		Caffeic	
		mg/100 g	MW/VK	mg/100 g	MW/VK	mg/100 g	MW/VK	mg/100 g	MW/VK	mg/100 g	MW/VK	mg/100 g	MW/VK
C 661	1	0,243	0,225	0,888	0,858	0,829	0,771	73,893	67,893	3,042	2,849	0,960	0,912
	2	0,206	11,555	0,829	4,839	0,712	10,737	61,893	12,498	2,655	9,617	0,864	7,389
E 360	1	0,216	0,224	0,572	0,571	0,662	0,673	40,978	41,873	1,713	1,720	0,715	0,721
	2	0,233	5,406	0,570	0,254	0,684	2,325	42,768	3,022	1,726	0,549	0,726	1,112
Icarda	1	0,331	0,332	0,728	0,743	1,682	1,651	58,074	59,289	2,234	2,317	1,044	1,033
	2	0,332	0,305	0,758	2,849	1,620	2,661	60,503	2,897	2,400	5,067	1,021	1,523
Bval 350010	1	0,396	0,379	0,981	0,952	9,657	9,174	57,845	55,955	1,674	1,641	0,846	0,789
	2	0,361	6,439	0,923	4,288	8,692	7,435	54,066	4,775	1,608	2,851	0,732	10,220
HB 803	1	0,334	0,313	0,708	0,670	16,339	14,686	50,152	51,875	1,476	1,349	0,493	0,487
	2	0,292	9,446	0,631	8,112	13,033	15,916	53,599	4,699	1,221	13,365	0,482	1,480
Lawina	1	0,450	0,429	0,646	0,633	1,741	1,643	46,199	45,147	1,493	1,458	0,924	0,903
	2	0,409	6,665	0,620	2,894	1,545	8,445	44,094	3,296	1,424	3,323	0,882	3,310
C 651	1	0,212	0,211	0,622	0,617	1,364	1,404	74,158	73,171	2,154	2,129	0,452	0,460
	2	0,209	0,998	0,612	1,107	1,443	3,981	72,184	1,907	2,104	1,643	0,468	2,400
E 550	1	0,230	0,239	0,488	0,479	1,191	1,107	54,233	55,829	1,694	1,783	1,014	0,965
	2	0,209		0,424		1,045		53,892		1,788		0,953	
	3	0,246	0,111	0,482	0,085	1,108	0,056	56,546	0,040	1,781	0,040	0,962	0,037
	4	0,272		0,522		1,083		58,644		1,870		0,929	
N 308	1	0,294	0,304	0,615	0,640	1,658	1,715	65,109	67,153	2,439	2,517	0,782	0,799
	2	0,314	4,815	0,664	5,403	1,772	4,694	69,198	4,305	2,594	4,354	0,816	3,022
Hor 2593	1	0,390	0,377	0,819	0,773	1,351	1,270	67,933	64,164	2,277	2,165	0,646	0,612
	2	0,363	5,098	0,728	8,318	1,189	9,016	60,396	8,306	2,054	7,279	0,578	7,775
Hor 4024	1	0,891	0,842	1,667	1,646	1,907	1,819	113,909	117,351	2,874	2,957	0,873	0,816
	2	0,793	8,194	1,625	1,783	1,731	6,839	120,793	4,148	3,039	3,931	0,759	9,810
N 023	1	0,250	0,250	0,715	0,628	2,092	1,906	69,832	58,417	2,108	1,822	0,573	0,582
	2	0,250	0,039	0,541	19,660	1,721	13,780	47,002	27,634	1,536	22,176	0,591	2,115
WH	1	0,225	0,209	0,623	0,574	0,720	1,176	58,538	56,051	0,663	0,646	0,689	0,680
WH	2	0,187		0,538		1,345		54,051		0,649		0,674	
WH	3	0,203	0,084	0,575	0,064	1,321	0,259	55,676	0,033	0,650	0,028	0,691	0,017
WH	4	0,221		0,558		1,319		55,939		0,620		0,667	

Tab. 13.12: Einzelwerte der freien Phenolsäuren mittels HPLC

Probe	Ansatz	Gallic		4-OH-Benzoic acid		Vanilic		p-Coumar		Ferula		Caffeic		o-Coumar	
		mg/100 g	MW VK	mg/100 g	MW VK	mg/100 g	MW VK	mg/100 g	MW VK	mg/100 g	MW VK	mg/100 g	MW VK	mg/100 g	MW VK
C 661	1	0,716	0,719			0,150	0,152	0,042	0,044	0,221	0,221	0,183	0,173	0,368	0,379
	2	0,723	0,639			0,154	1,861	0,045	5,114	0,222	0,454	0,163	8,284	0,390	3,997
E 360	1					0,064	0,064	0,105	0,108	0,862	0,873	0,474	0,481	0,490	0,520
	2					0,065	1,108	0,111	3,675	0,885	1,887	0,489	2,331	0,550	8,198
Icarda	1	1,156	1,179			0,167	0,164	0,032	0,032	0,397	0,397	0,272	0,273	0,603	0,594
	2	1,202	2,791			0,160	3,052	0,031	2,357	0,397	0,055	0,274	0,503	0,585	2,080
Bval 350010	1	0,500	0,513			0,076	0,072	0,025	0,025	0,522	0,512	0,263	0,266	0,789	0,770
	2	0,526	3,611			0,068	8,067	0,025	0,601	0,501	2,919	0,270	2,040	0,752	3,366
HB 803	1	0,633	0,552	1,375	1,372	0,364	0,353	0,216	0,220	0,587	0,550	1,119	1,059	0,565	0,548
	2	0,470	20,817	1,368	0,347	0,341	4,594	0,225	3,005	0,513	9,524	0,998	8,083	0,530	4,560
Lawina	1					0,162	0,163	0,130	0,131	0,935	0,925	0,566	0,554	0,624	0,636
	2					0,164	0,887	0,133	1,727	0,914	1,576	0,541	3,300	0,647	2,583
C 651	1	0,385	0,383	0,668	0,628	0,265	0,270	0,036	0,038	0,319	0,321	0,787	0,762	0,672	0,651
	2	0,381	0,665	0,587	9,213	0,275	2,727	0,040	7,162	0,322	0,484	0,737	4,646	0,631	4,551
E 550	1	1,479	1,613	1,111	1,139	0,309	0,309	0,024	0,023	0,486	0,486	0,531	0,486	0,393	0,395
	2	1,747	11,757	1,168	3,546	0,309	0,209	0,022	6,139	0,487	0,152	0,442	12,933	0,397	0,716
N 308	1	1,833	1,858	1,085	1,086	0,226	0,212	0,045	0,047	0,348	0,356	2,335	2,273	0,975	0,977
	2	1,883	1,898	1,087	0,118	0,198	9,248	0,048	5,331	0,364	3,232	2,211	3,846	0,979	0,344
Hor 2593	1	0,513	0,493	0,848	0,853	0,165	0,160	0,213	0,209	0,972	0,926	1,383	1,347	1,246	1,266
	2	0,473	5,824	0,858	0,812	0,156	4,037	0,206	2,152	0,880	7,013	1,311	3,782	1,287	2,284
Hor 4024	1			0,755	0,731	0,463	0,442	0,086	0,083	0,595	0,583	1,220	1,132	1,184	1,132
	2			0,706	4,796	0,422	6,534	0,080	4,933	0,571	2,878	1,044	10,956	1,079	6,545
N 023	1	0,976	0,981	0,913	0,924	0,624	0,641	0,124	0,124	0,670	0,686	1,149	1,090	0,611	0,618
	2	0,986	0,712	0,934	1,615	0,657	3,712	0,125	0,597	0,701	3,143	1,030	7,682	0,624	1,540
	1			1,053	1,055	0,631	0,636	0,123	0,142	0,649	0,611			0,561	0,571
	2			1,049		0,604		0,143		0,579				0,578	
	3			1,036	0,018	0,643	0,041	0,149	0,091	0,603	0,047			0,586	0,024
	4			1,080		0,667		0,151		0,612				0,558	

Tab. 13.13: Einzelwerte der gebundenen Phenolsäuren, TPC

Proben	WH1	WH2	WH1	WH2	WH1	WH2	Volumen	Verdünnung	WH1	WH2	Ferulasäure		MW	VK
	A	A	A-LW	A-LW	mg/ml	mg/ml	ml		EW [g]	EW [g]	Äqui. [mg/100g]		[mg/100g]	[%]
C 661	1,411	1,233	1,439	1,261	0,272	0,238	6	1	1,008	1,014	161,955	140,794	151,374	9,885
E 360	0,938	0,937	0,966	0,965	0,181	0,181	6	1	1,018	1,003	106,680	108,214	107,447	1,010
Icarda	0,283	0,327	0,311	0,355	0,055	0,063	6	4	1,006	1,056	130,776	143,883	137,329	6,749
BVAL 350010	0,367	0,353	0,395	0,381	0,071	0,068	6	4	1,006	1,008	169,416	162,659	166,037	2,878
HB 803	0,461	0,392	0,489	0,420	0,089	0,076	6	4	1,005	1,002	212,803	181,608	197,205	11,185
LAWINA	0,229	0,218	0,257	0,246	0,044	0,042	6	4	1,009	1,002	105,664	101,348	103,506	2,948
C 651	0,459	0,456	0,487	0,484	0,089	0,088	6	4	1,005	1,031	211,925	205,275	208,600	2,254
E 550	0,296	0,295	0,324	0,323	0,057	0,057	6	4	1,027	1,003	133,979	136,778	135,378	1,462
E 550	0,375	0,413	0,403	0,441	0,073	0,080	6	4	1,038	1,062	167,756	180,591	174,174	5,211
N 308	0,444	0,389	0,472	0,417	0,086	0,075	6	4	1,034	1,004	199,216	179,865	189,541	7,219
HOR 2593	0,428	0,379	0,456	0,407	0,083	0,073	6	4	1,029	1,012	193,128	173,893	183,511	7,412
HOR 40 24	0,636	0,654	0,664	0,682	0,123	0,126	6	4	1,026	1,040	287,375	291,453	289,414	0,996
N 023	0,468	0,315	0,496	0,343	0,090	0,061	6	4	1,016	1,013	213,789	144,557	179,173	27,322

Tab. 13.14: Einzelwerte der freien Phenolsäuren, TPC

Proben	WH1	WH2	WH1	WH2	WH1	WH2	Volumen	Verdünnung	WH1	WH2	Ferulasäure Äqui.		MW	VK
	A	A	A-LW	A-LW	mg/ml	mg/ml	ml		EW [g]	EW [g]	mg/100g		mg/100g	%
C 661	0,379	0,384	0,407	0,412	0,073	0,074	15	1	1,008	1,014	109,104	109,948	109,526	0,545
E 360	0,366	0,391	0,394	0,419	0,071	0,076	15	1	1,018	1,003	104,353	113,172	108,762	5,733
Icarda	0,513	0,541	0,541	0,569	0,099	0,105	15	1	1,006	1,056	147,774	148,480	148,127	0,337
BVAL 350010	0,420	0,433	0,448	0,461	0,081	0,084	15	1	1,006	1,008	121,107	124,593	122,850	2,007
HB 803	0,406	0,407	0,434	0,435	0,079	0,079	15	1	1,005	1,002	117,191	117,830	117,511	0,385
LAWINA	0,601	0,640	0,629	0,668	0,116	0,124	15	1	1,009	1,002	172,543	185,029	178,786	4,938
C 651	0,496	0,493	0,524	0,521	0,096	0,095	15	1	1,005	1,031	143,091	138,669	140,880	2,220
E 550	0,478	0,521	0,506	0,549	0,092	0,101	15	1	1,027	1,003	134,935	150,609	142,772	7,763
E 550	0,514	0,567	0,542	0,595	0,099	0,110	15	1	1,038	1,062	143,539	154,787	149,163	5,332
N 308	0,417	0,404	0,445	0,432	0,081	0,078	15	1	1,034	1,004	116,967	116,732	116,849	0,142
HOR 2593	0,476	0,460	0,504	0,488	0,092	0,089	15	1	1,029	1,012	134,190	131,809	132,999	1,265
HOR 40 24	0,548	0,558	0,576	0,586	0,106	0,108	15	1	1,026	1,040	154,823	155,487	155,155	0,303
N 023	0,511	0,513	0,539	0,541	0,099	0,099	15	1	1,016	1,013	145,851	146,840	146,346	0,478

Elisabeth Kalas

Lessinggasse 22/8

A-1020 Wien

E-Mail: elisabeth_kalas@hotmail.com

Persönliches

Geboren am 23. Juni 1983

In Steyr

Ledig

Berufliche Erfahrung

Seit 05/2011	Baxter Bioscience, Orth an der Donau Quality Specialist
07/2009 – 09/2009	Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Wien Praktikant
08/2008 – 09/2008	Analyse BioLab GmbH, Linz Praktikant

Studium und Ausbildung

09/2004 – jetzt	Universität Wien, Wien Institut für Ernährungswissenschaften Diplomstudium (Diplomprüfung ausständig)
10/2001 – 06/2004	Tourismusschulen Bad Ischl, Bad Ischl Aufbaulehrgang
09/1997 – 06/2000	Höhere Bundeslehranstalt für wirtschaftliche Berufe, Steyr Fachschule
09/1993 – 06/1997	Musikhauptschule, Steyr
09/1989 – 06/1993	Volksschule, St. Ulrich