universität wien

DIPLOMARBEIT

Untersuchung der Radikalfängerwirkung Österreichischer Rotweine

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag^{a}.pharm.)

Verfasserin:	Anna Waldmann
Matrikel-Nummer:	0301951
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	ao. Univ. Prof. Mag. Dr. L. Krenn

Wien, am 20.07.2008

Frau Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch und Frau Univ. Prof. Dr. Brigitte Kopp, dem Vorstand und stellvertretenden Vorstand des Departments für Pharmakognosie, möchte ich für die Möglichkeit der praktischen Durchführung meiner Diplomarbeit danken.

Ich bedanke mich bei Frau a. o. Univ. Prof. Dr. Liselotte Krenn für die interessante Themenstellung und für die umfangreiche Betreuung bei meiner Diplomarbeit.

Mein Dank gilt dem Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg und im Besonderen Herrn Dipl.-Ing. Dr. Reinhard Eder für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung und Analyse der Inhaltsstoffe der Proben.

Frau Dipl.-Ing. Mira Krasteva gilt mein Dank für die Hilfsbereitschaft bei spezifischen, die verwendeten Geräte betreffenden Fragen.

Herzlichen Dank auch an Herrn Mag. Oliver Donath für die Beantwortung aller „weinspezifischen“ Fragen.

Und Danke an alle Mitarbeiter des Departments für Pharmakognosie für das gute Arbeitsklima und die inspirierenden Gespräche.

Mein Dank gilt nicht zuletzt auch all jenen, die mir auf der einen Seite das Studium ermöglicht und auf der anderen Seite alle meine Schritte bis hier innerlich mitgetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung 1

2. Material und Methoden 9

2.1. Verwendetes Material 9

2.2. Testsysteme zur Radikalfängerwirkung 12

2.2.1 DPPH scavenging test 13

2.2.2 ABTS scavenging test 19

3. Experimenteller Teil 22

3.1. Vorversuche: 22

3.1.1 Validierung DPPH scavenging test 22

3.1.2 Validierung ABTS scavenging test 33

3.2. Vermessung der Rotweine 44

3.2.1 DPPH assay 44

3.2.2 ABTS Assay 46

3.2.3 Vergleich der TEAC im ABTS- und DPPH- Assay 47

3.2.4 Einfluss der Inhaltsstoffe auf die TEAC Österreichischer Rotweine 48

3.2.5 Vermessung von Rotweinfraktionen 51

3.3. Statistische Vergleiche der TEAC 53

3.3.1 Sortenvergleich 53

3.3.2 Vergleich verschiedener Jahrgänge 55

3.3.3 Vergleich der Sorte Blaufränkisch in verschiedenen Jahren 56

3.3.4 Weinvergleich regional und Sortenvergleich nach Anbaugebiet 57

3.3.5 Vergleich Österreichischer Rotweine mit Südafrikanischen Rotweinen 59

4. Diskussion 60

5. Zusammenfassung 66

6. Literaturverzeichnis 68

Anhang: Abbildungsverzeichnis, Tabellenverzeichnis, Lebenslauf

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
ABAP	2,2`-azinobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
ABTS	2,2`-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
BF	Blaufränkisch
DPPH	2,2-diphenylpicrylhydrazyl
EtOH	Ethanol
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
$K_2S_2O_8$	Kaliumperoxodisulfat
KHK	Koronare Herzkrankheiten
NÖ	Niederösterreich
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min.	Minute
mind.	mindestens
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MnO_2	Mangandioxid
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p.A.	pro Analysi
PP	Polyphenolfraktion
rel Abs.	relative Absorption
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Standardabweichung
TAA	Total Antioxidant Activity
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (mM Trolox)
Trolox	6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
VL	Vorlauf

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Seit Ende des 20. Jahrhunderts hat die Erforschung der Auswirkungen von freien Radikalen im menschlichen Körper großes Interesse erregt.

Freie Radikale, darunter auch Sauerstoffradikale, werden im Körper fortwährend bei Abbauprozessen gebildet. Sie spielen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse eine wichtige Rolle, unter anderem werden intrazelluläre Signalwege durch freie Radikale aktiviert. Bei der Immunabwehr kommt dem „oxidativen burst“, einer vermehrten Radikalproduktion durch die membranständige NADPH-Oxidase der Phagozyten eine wichtige Funktion zur Abtötung von Bakterien und anderen Mikroorganismen zu [1].
Im gesunden menschlichen Körper besteht ein Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und Radikalreduktion durch körpereigene Enzyme (z. B. Superoxiddismutase), Glutathion, Vitamine wie Vitamin E, β-Carotin, Ascorbinsäure oder phenolische Inhaltsstoffe aus über die Nahrung aufgenommenen Pflanzen. Ist das Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und Radikalreduktion gestört, so kommt es zu einem Überschuss von freien Radikalen im Körper. Durch Interaktionen mit der DNA, Membranproteinen, anderen Zellbestandteilen und Oxidation von LDL führt ein Überschuss an freien Radikalen besonders mit fortschreitendem Alter unter Umständen zu oxidativem Stress und begünstigt die Entstehung von Diabetes, Krebs, Gefäß- und koronaren Herzkrankheiten sowie neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson [2].

Daher wurden verschiedenste Pflanzen und ihre Extrakte auf das Vorkommen und die Konzentration von Inhaltsstoffen mit antioxidativen und/oder radikalfangenden Eigenschaften untersucht. Ein biologisches Antioxidans ist per Definition eine Substanz, die in niedriger Konzentration verglichen mit dem oxidierbaren Substrat, signifikant die Oxidation desselben verzögert

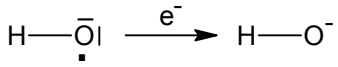
oder verhindert [2]. So wurden neben zahlreichen Arzneipflanzen, Gemüse- und Obstsorten auch Weintrauben und Weine auf ihre antioxidative Wirkung hin untersucht [3-23].

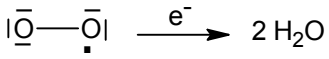
Das Phänomen des „French Paradoxons“ sorgte zusätzlich für Interesse und lenkte den Schwerpunkt der Forschung auf die Untersuchung von Rotwein. Demnach weist die französische Bevölkerung trotz reichlichem Konsum von fetthaltigen Speisen und hohem Blutcholesterinspiegel eine geringere Inzidenz von KHK als die Bevölkerung in anderen europäischen Ländern auf. Die Untersuchenden sahen eine mögliche Ursache dafür im gleichzeitig überdurchschnittlich hohen Rotweinkonsum der Franzosen [24].

Die Untersuchung von Rotwein rückte infolgedessen noch mehr in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Rotwein weist im Gegensatz zu Weißwein hohe Konzentrationen an Gerbstoffen, Anthocyanen und anderen Polyphenolen auf und hat durchschnittlich eine 10-fach höhere antioxidative Kapazität (TEAC) als Weißwein [4-6,13].
Der Unterschied im Inhaltsstoffmuster ist unter anderem auf die Weinherstellung zurückzuführen. Der Einfluss von Mazerationsdauer und Pressung auf die TEAC ist belegt [22]. Für Weißwein wird direkt durch die Pressung der Saft von den Traubenresten getrennt während bei der Rotweinherstellung nach der Quetschung alle Bestandteile der Trauben noch bis zu 4 Wochen als Maische reifen. So werden die wertvollen Kern- und Schaleninhaltsstoffe wie Polyphenole und Resveratrol [25] optimal extrahiert und finden sich schließlich im Rotwein wieder. Der Einfluss der Schaleninhaltsstoffe auf die TEAC von Rotwein konnte durch die Herstellung sowohl eines Weißweins (unter Weglassung der Traubenschalen) als auch eines Rotweins aus Trauben der Sorte Bouzy Rouge belegt werden [26].

Im Rotwein findet sich eine Vielzahl von Phenolen, die aufgrund ihrer Strukturen eine hohe radikalfangende und antioxidative Aktivität erwarten lassen.

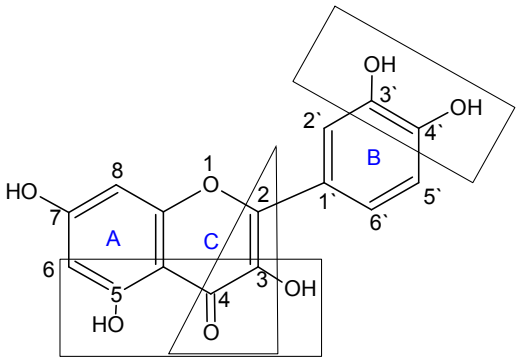
Grundsätzlich kann die Reduktion von Radikalen (Substanzen mit mindestens einem ungepaarten Elektron und daher sehr reaktionsfreudig), durch Übertragung von einem Elektron durch einen Elektronendonor erfolgen. Exemplarisch sei dies am Hydroxylradikal und Superoxidradikal dargestellt.





Drei Strukturmerkmale sind Voraussetzung für die gute antioxidative Wirkung eines Flavonoids: Erstens die Hydroxylgruppe an Stelle 3 des C- Rings, die für eine höhere Stabilität des Radikals während der Delokalisation von Elektronen sorgt. Die zweite strukturelle Voraussetzung ist eine Doppelbindung zwischen 2,3 in Konjugation mit der Oxogruppe in Pos. 4 im C-Ring, das Vorliegen einer OH-Gruppe in 3 und 5 mit einer Oxofunktion im A- und C-Ring erhöht das Radikalfängerpotential der Verbindung. Dritte Voraussetzung für ein gut antioxidativ wirkendes Flavonoid ist das Vorliegen einer o-Dihydroxystruktur im B-Ring. Eine Glykosylierung vermindert hingegen die Radikalfängerwirkung [25,26].

Abb. 1: Strukturvoraussetzungen für eine Radikalfängerwirkung von Flavonoiden



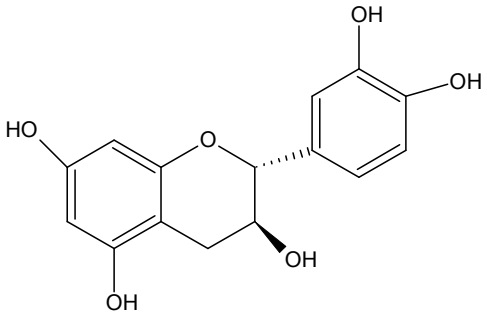
Quercetin

Zahlreiche Polyphenole sind im Rotwein enthalten, wie Catechin, Epicatechin, Gallussäure und Cyanidin. Auch Malvidin-3-glucosid, Rutin, Resveratrol und Quercetin wurden nachgewiesen (siehe Abb. 2, Seite 5) [26].

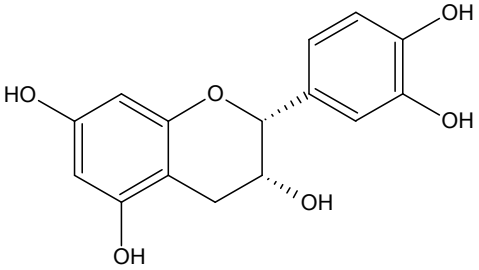
Zahlreiche in vitro Studien belegten die Radikalfängerwirkung von Rotwein aus vielen Ländern und Anbaugebieten. So wurden Studien über die antioxidative Kapazität von Rotwein aus Frankreich [6], Italien [7-9], Südafrika [3,10], Korea, Deutschland, Griechenland [11], Portugal [12,13], Chile [9,14], Slowakei [15], Kroatien [16], Bulgarien, Spanien [17-22] und Kanada [27] publiziert.
Untersuchungen von Österreichischem Rotwein waren bisher hingegen rar und beschäftigten sich vor allem mit dem Einfluss der Schwefelung auf die radikalfangenden Eigenschaften [23].

Viele verschiedene Methoden zur Untersuchung der antioxidativen Kapazität (TEAC) von Rotweinen wurden etabliert [28].
Der DPPH Assay ist eine Möglichkeit zur Bestimmung der TEAC:
Diphenylpicrylhydrazyl liegt als stabiles Radikal mit einer tiefvioletten Färbung vor. In Gegenwart von Radikalfängern erfolgt ein Elektronentransfer, ethanolische oder methanolische Lösungen entfärben sich proportional zur Radikalfängerintensität. Die Reaktion kann man photometrisch bei 520 nm vermessen (s. Abb. 3, Seite 6).

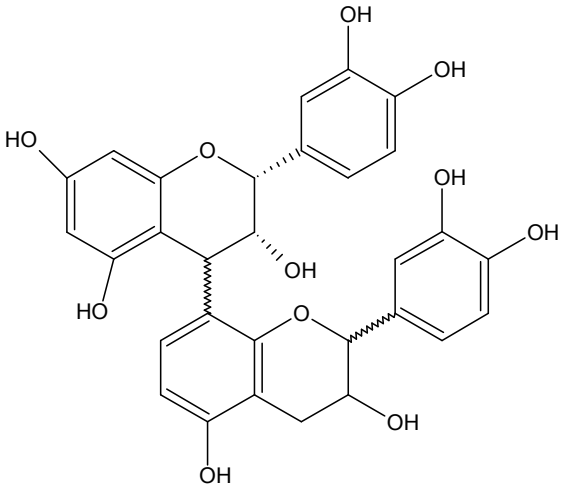
Abb. 2: Wichtige Inhaltsstoffe in Rotwein



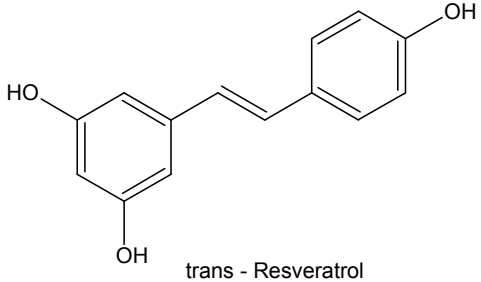
catechin



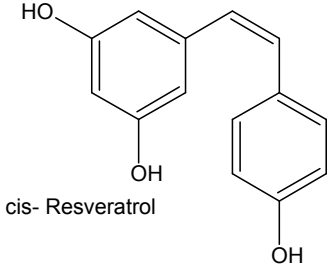
(-)-epicatechin



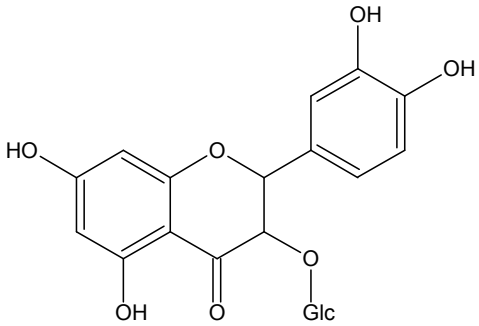
Procyanidin B_1



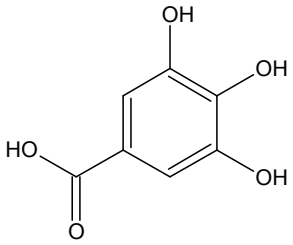
trans - Resveratrol



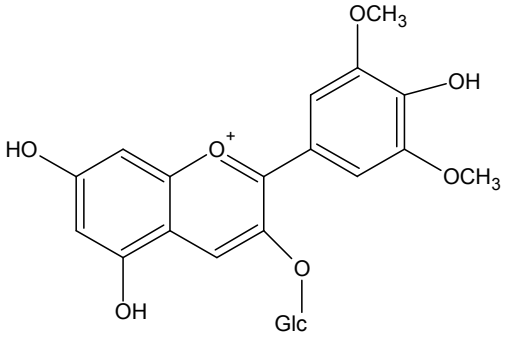
cis- Resveratrol



Quercetin-3-Glucosid

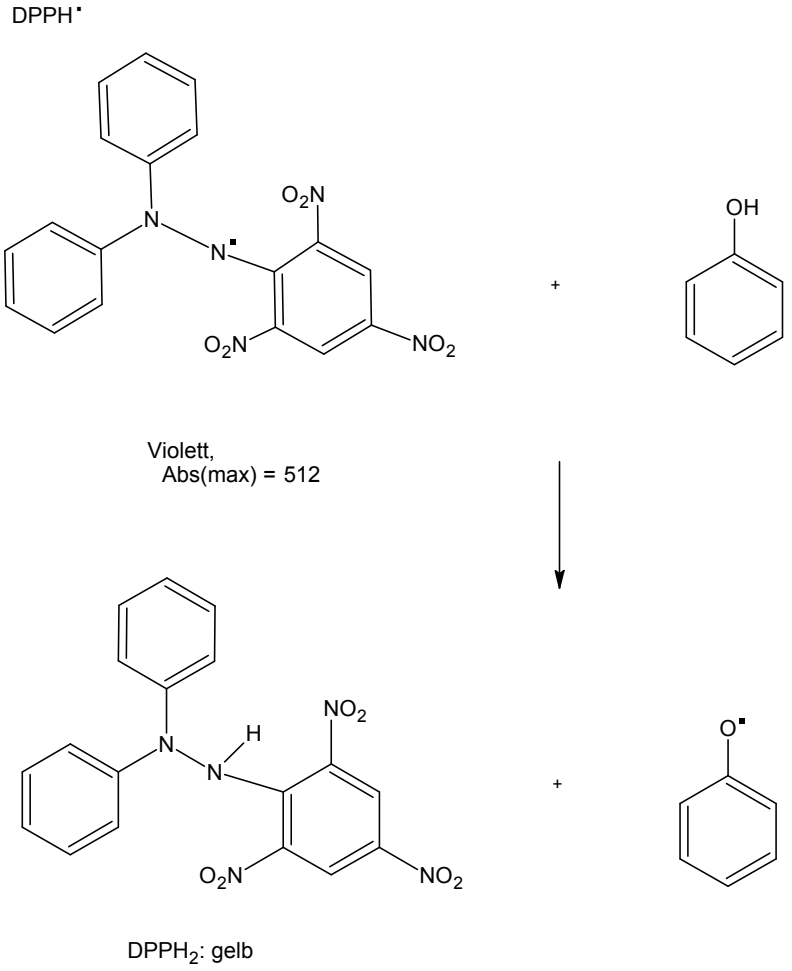


Gallussäure



Malvidin-3-Glucosid

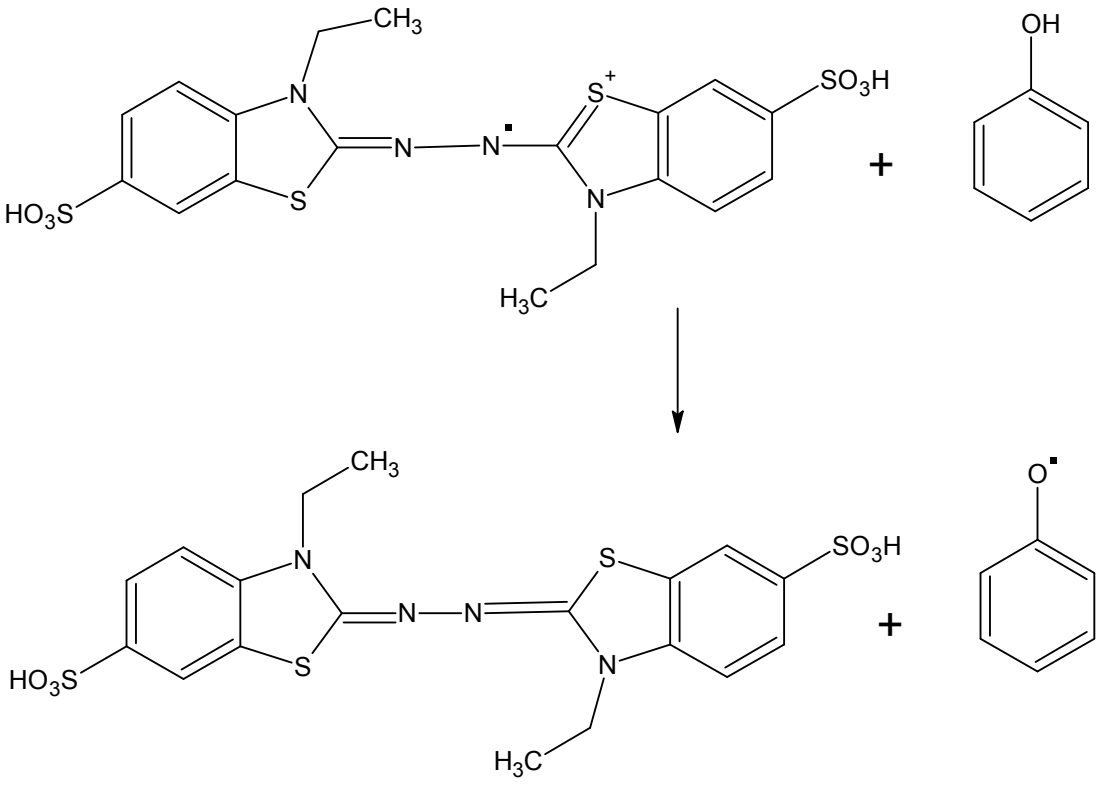
Abb. 3: Reaktionsschema DPPH· mit Phenol



Einen weiteren Assay stellt die Vermessung des ABTS-Radikalkations dar. In ethanolischer Lösung weist das ABTS-Radikal eine blaugrüne Färbung auf. In Gegenwart von Radikalfängern erfolgt wiederum ein Elektronentransfer und die Lösung entfärbt sich, was photometrisch bei 414nm oder 734nm vermessen werden kann (s. Abb. 4, S. 7).

Bei letzterem kommt der Herstellung der Radikallösung eine besondere Bedeutung zu. Bis dato wurden mehrere Möglichkeiten publiziert. Die Herstellung von ABTS kann chemisch durch Oxidation mit Hilfe von Metmyoglobin und Wasserstoffperoxid, auf enzymatischem oder elektrochemischem Weg sowie unter dem Einfluss von großer Hitze erfolgen.

Abb. 4: Reaktionsschema $ABTS^{\cdot+}$ mit Phenol



Ein Weg der $ABTS^{+}$-Herstellung erfolgt über die Oxidation mit Kaliumperoxodisulfat. ABTS reagiert mit $K_2S_2O_8$ im wässrigen Medium zum ABTS-Radikalkation, die Lösung ist nach 12-16h stabil [13,14]. Die Absorptionsmaxima liegen bei 415, 645, 734 und 815 nm (siehe Abb. 5, S. 8).

Abb. 5: Absorptionsmaxima ABTS [29]

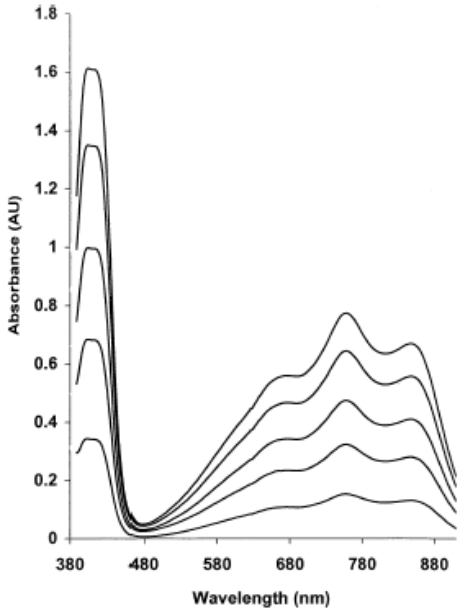


Fig. 1. Absorption spectrum of the ABTS radical cation.

Da es eine einfache, schnelle, kostengünstige und mit wenig präparativem Aufwand verbundene Methode ist, bildete sie den Ausgangspunkt zur Weiterentwicklung und Evaluierung in der vorliegenden Arbeit.

Die photometrische Vermessung der Analysenlösungen erfolgt üblicherweise in Küvetten [3,5,6-12,14,16-23,27,29] oder in Geräten mit flow-injection-analysis [13,30]. Methoden zur zeit- und kostensparenden Vermessung für Serienanalysen von Rotwein in Mikrotiterplatten mit kleinen Probenvolumina waren unseres Wissens bisher nicht verfügbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung und Validierung von zwei Messmethoden (in Anlehnung an [3]) zur Untersuchung der Radikalfängerwirkung von Rotwein in Mikrotiterplatten und die Untersuchung speziell österreichischer Rotweine auf ihre antioxidative Kapazität (TEAC) in vitro. Hierbei lag das Augenmerk auf der TEAC von österreichischem Rotwein im internationalen Vergleich. Der Einfluss von Jahrgang, Region, Sorte und Inhaltsstoffmuster auf die antioxidative Kapazität sollte untersucht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendetes Material

Weine

30 verschiedene österreichische Rotweine aus den Jahren 2004 bis 2006 wurden für die Untersuchungen eingesetzt (s.Tab.1, S. 10). Es wurden Rotweine verschiedener Sorten, Jahrgänge und Anbauregionen ausgewählt, um etwaige Einflüsse dieser Parameter auf die antioxidative Kapazität feststellen zu können. Die Auswahl basierte auf der zuvor vom „Bundesamt für Obst- und Weinbau Klosterneuburg“ analysierten und quantifizierten Inhaltsstoffe der Rotweine, um auch eine Korrelation zwischen bestimmten Inhaltsstoffen des Rotweins und dem Ausmaß der antioxidativen Kapazität zu überprüfen. Die Daten wurden uns dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Tab. 1: Weine Zuordnung

Nr.	Sorte	Winzer	Gegend
1*	St Laurent 2005	Stift Klosterneuburg	NÖ
2*	Blaufränkisch 2005	Stift Klosterneuburg	NÖ
3*	Merlot 2005	Wiederstein	NÖ
4*	Zweigelt 2005	Böheim	NÖ
5	Lagrein 2004	Alto Adige	Südtirol
6*	Blaufränkisch 2006	Weber-Arkadenhof	Burgenland
7*	Blaufränkisch 2005	Kirnbauer	Burgenland
8*	Blaufränkisch 2006	Wiederstein	NÖ
9	Blaufränkisch 2005	Markowitsch	NÖ
10*	Blaufränkisch 2004	Weber-Arkadenhof	Burgenland
11*	Blaufränkisch 2004	Kirnbauer	Burgenland
12	Blaufränkisch 2005	Vereinte Winzer	Burgenland
13*	Zweigelt 2006	Wiederstein	NÖ
14*	Zweigelt 2005	Stift Klosterneuburg	NÖ
15*	Zweigelt 2005	Pitnauer	NÖ
16*	Zweigelt 2005	Pitnauer	NÖ
17*	Pinot noir 2005	Wiederstein	NÖ
18*	Pinot noir 2004	Wieninger	Wien
19*	Blauburger 2004	Leopold	Wien
20	Blauburger 2004	Klager	Wien
21	Zweigelt 2005	Cobenzl	Wien
22	Pinot noir 2004	Cobenzl	Wien
23*	Wiener Trilogie 2005	Wieninger	Wien
24	St Laurent 2005	Strauch	Wien
25*	St Laurent 2004	Mayer	NÖ
26*	Merlot 2004	Steinklammer	Wien
27*	Zweigelt-Merlot 2004	Leopold	Wien
28	Zweigelt 2004	Cobenzl	Wien
29	Zweigelt 2005	Schilling	Wien
30	Blaufränkisch 2004	Strauch	Wien
31	Blaufränkisch 2005	Iby	Burgenland

* Die Rotweinmuster wurden uns von den Winzern dankenswerter Weise kostenlos zur Verfügung gestellt.

Reagenzien oder Chemikalien

- DPPH (2,2- Diphenylpicrylhydrazyl)
  Firma Fluka Chemika
  Buchs, Schweiz
  Nr.: 43180

- ABTS (2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
  als Diammoniumsalz
  Firma Sigma Aldrich
  Wien, Österreich
  Nr.: 11557

- $K_2S_2O_8$ (Potassium peroxodisulfate)
  Firma Fluka Chemika
  Buchs, Schweiz
  Nr.: 60489

- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)
  Firma Fluka Chemika
  Buchs, Schweiz
  Nr.: 56510

Alle anderen Reagenzien und Lösungsmittel wurden in p.A. Qualität eingesetzt.

2.2. Testsysteme zur Radikalfängerwirkung

Für beide Testsysteme kam folgendes Gerät zum Einsatz:

GENios multi-Detektionsreader (Fa. Tecan, Gröding/Salzburg)
über Magellan – Software gesteuert

Lichtquelle:	Hochenergie-Xenon-Blitzlampe
Detektor:	PMT
Messungsmodus:	Absorption
Mikrotiterplatte:	96 well plates transparent, flat bottom, Fa. Greiner, Kremsmünster

Die Berechnung der TEAC erfolgte in Excel mit Hilfe eines erstellten Makros.
Statistikprogramm: Graph pad prism, students T-Test, two tailed

2.2.1 DPPH scavenging Test

Messparameter:

Messungsmodus:	Absorption
Messwellenlänge:	520nm
Mikrotiterplatte:	siehe oben
Anzahl der Blitze:	5
Messbereich:	A1-H5
	A6-H7
	A8-H9
	A10-H11
	A12-H12
Mischmodus:	a) sofort nach dem Befüllen 300s kreisförmig/hoch
	b) nach 2h nochmals 120s kreisförmig/normal
Temperatur:	RT

30,4 µM $DPPH^{\bullet}$ - Lösung:

Pro Platte wurden ca. 19,5ml Lösung benötigt. 2,500mg DPPH (MG=394,32) wurden mit 70,00ml EtOH 96% versetzt, am Vortex kurz gemischt und anschließend unter Lichtschutz 15min. am Ultraschallbad vollständig gelöst.
Nach der Herstellung wurde die Lösung unter Lichtschutz aufbewahrt und möglichst bald verwendet.
Die Lösung wurde jeden Tag frisch zubereitet.

0,4 mM Troloxstammlösung:

Für die Stammlösung wurden 1,00mg Trolox (MG=250,29) mit 10,00ml 96%EtOH gemischt und 5min. am Ultraschallbad unter Lichtschutz gelöst. Fünf weitere Verdünnungen wurden nach einem Verdünnungsschema hergestellt (siehe Tab. 2, S. 14).

Die Lösungen wurden jeweils kurz am Vortex und anschließend am Ultraschallbad gemischt, um eine optimale Mischung zu gewährleisten. Unter Lagerung im Kühlschrank waren die Standardlösungen mindestens 4 Tage stabil.

Tab. 2: Verdünnungsschema der Troloxstammlösung

Standardlösung	Stammlösung	EtOH 96%
1	1000,0µl	
2	750,0µl	250,0µl
3	500,0µl	500,0µl
4	250,0µl	750,0µl
5	125,0µl	875,0µl
6	62,5µl	937,5µl

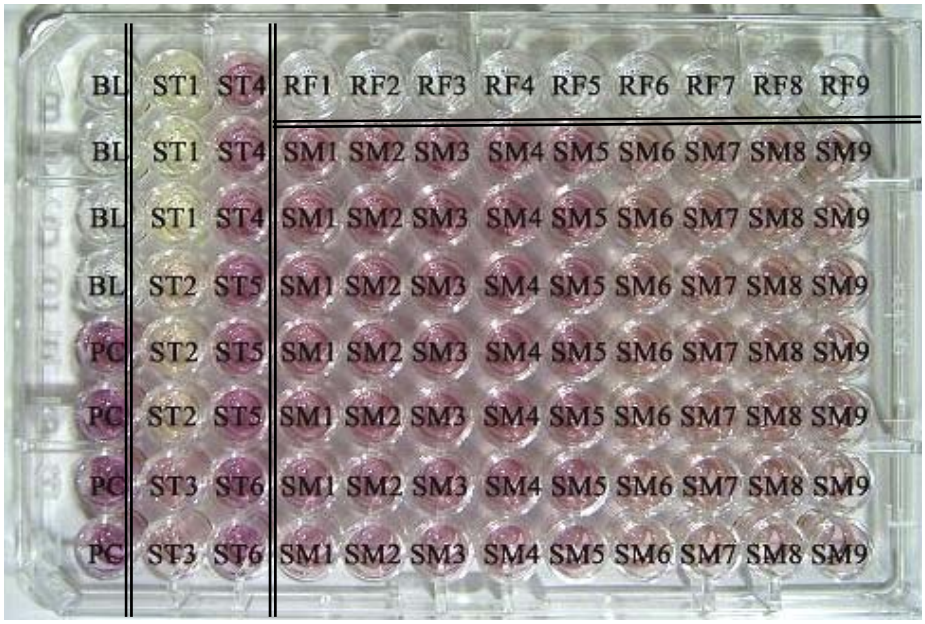
Probenlösung:

Um eine Absorption durch die Eigenfarbe der Rotweinproben auszuschließen, wurden 20µl des jeweiligen Rotweins mit 980µl EtOH10% 5min am Ultraschallbad gemischt (Verdünnung 1:50).

Zur Messung wurden die Lösungen auf Raumtemperatur gebracht und wie folgt in die Platte gefüllt (Abb. 6, S. 15):

BL (Blindwert) ...	200µl EtOH96%	+ 15µl EtOH10%
ST (Standard)1-6 ...	200µl DPPH$^{\bullet}$-Lösung	+ 15µl Trolox
	in absteigender Konzentration:	
	ST1=0,400mM	
	ST2=0,300mM	
	ST3=0,200mM	
	ST4=0,100mM	
	ST5=0,050mM	
	ST6=0,025mM	
PC (Positivkontrolle) ...	200µl DPPH$^{\bullet}$-Lösung	+ 15µl EtOH10%
RF (Referenz) ...	200µl EtOH96%	+ 15µl Probe
SM (Sample Messgruppen) ...	200µl DPPH$^{\bullet}$-Lösung	+ 15µl Probe

Abb. 6: Befüllung der Mikrotiterplatte im DPPH Assay



BL...Blindwert, ST...Standard 1-6, PC...Positivkontrolle, RF...Referenz, SM... Sample Messgruppen

Bei der Befüllung kam folgendes zeitliches Schema zur Anwendung:
200µl der entsprechenden Lösung wurden jeweils vorgelegt und mit einer 8-fach Pipette zu festgesetzten Zeiten 15 µl Probe bzw. Troloxstandard-lösung oder 10% EtOH zugesetzt (s. Tab. 3).

Tab. 3: Befüllung der Titerplatte im DPPH-Assay

Zeit(mm:ss)	Bereich
00:00	A1-H5
04:00	A6-H7
08:00	A8-H9
12:00	A10-H11
16:00	A12-H12

Anschließend erfolgte Mischschritt a) (siehe Kap. 2.2.1, S. 13). Die Platte verblieb, mit Deckel versehen, bis zum Zeitpunkt: 1:56:50 im auf 20°C thermostatisierten Gerät. Der Deckel wurde entfernt, der zweite Mischschritt aktiviert b) (siehe Kap. 2.2.1, S. 13) und die Messung der Absorption zu festgesetzten Zeitpunkten ausgeführt (s. Tab. 4).

Tab. 4: Messung DPPH-Assay

Zeit (hh:min:sec):	Bereich:
02:00:00	A1-H5
02:04:00	A6-H7
02:08:00	A8-H9
02:12:00	A10-H11
02:16:00	A12-H12

Berechnung:

Mit den Messergebnissen der Standards (ST1-6) wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, mit der man unter der Berücksichtigung der Verdünnung die TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) der Probe berechnen konnte.

Von den Mittelwerten der jeweiligen Standardverdünnungen wurde der gemittelte Blindwert subtrahiert und die Relative Absorption (Rel. Abs) nach der Formel

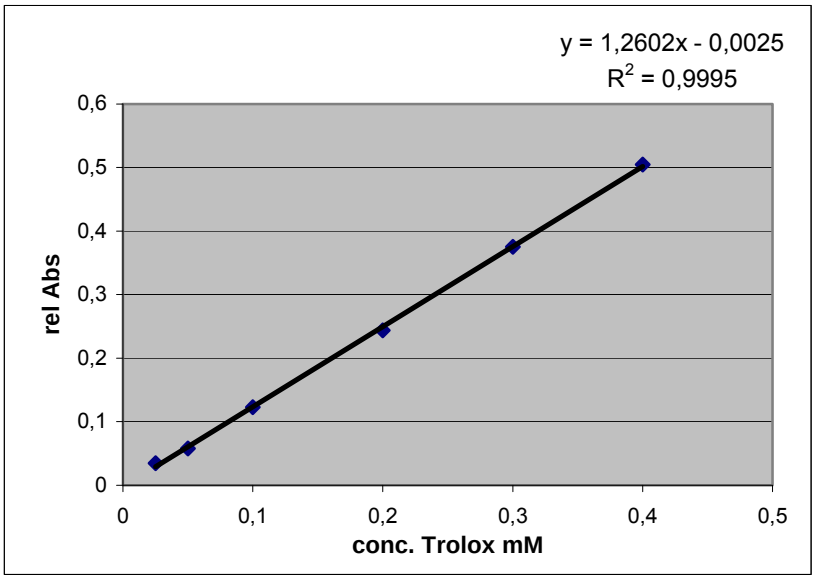
Rel. OD = $(X_0 - X_1)/X_0$ X_0... Mittelwert PC – Mittelwert BL

X_1... Mittelwert ST – Mittelwert BL

berechnet.

Dann wurde mit der relativen Absorption (Rel Abs) der Standardlösungen die oben genannte Kalibrationsgerade erstellt (s. Abb. 7).

Abb. 7: Kalibrationsgerade zur Berechnung der TEAC



Vom Mittelwert der Probenmessungen wurde der RF- Wert abgezogen und die relative Absorption (Rel Abs). nach der obigen Formel berechnet.

Durch Einsetzen des Ergebnisses in die Funktion der Kalibrationsgeraden unter Berücksichtigung der Verdünnung (Ergebnis * 50) erhielt man die TEAC (in mM Trolox) der Probe.

2.2.2 ABTS scavenging Test

Messparameter:

Messungsmodus:	Absorption
Messwellenlänge:	734 nm
Mikrotiterplatte:	siehe oben
Anzahl der Blitze:	5
Messbereich:	A1-H5
	A6-H7
	A8-H9
	A10-H11
	A12-H12
Mischmodus:	240s kreisförmig/hoch
Temperatur:	36,5-37,5°C

7mM $ABTS^{\bullet+}$-Lösung:

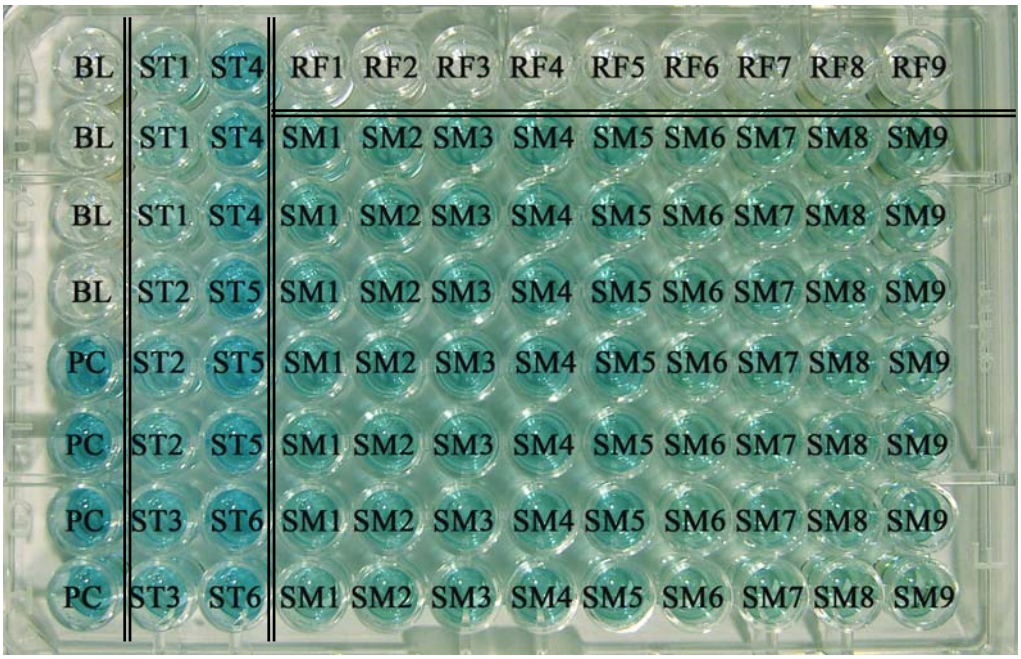
Stammlösung:

7mM ABTS (MG=548,68) und 2,45mM $K_2S_2O_8$ (MG=270,32) wurden in destilliertem. Wasser gelöst, kurz am Vortex, dann 5min. am Ultraschallbad gemischt und bei Raumtemperatur unter Lichtschutz mindestens 12h stehen gelassen. Die so erhaltene Stammlösung war bei Lagerung unter Lichtschutz bei RT mindestens 6 Tage verwendbar.
Für die Anwendung verdünnte man die Stammlösung ca. 1:49 mit EtOH96% bis zu einer Absorption von 0,7(± 0,02) bei 734nm und equilibrierte bei 30°C. Diese Lösung war jeden Tag frisch zuzubereiten.

Die Herstellung der Troloxstammlösung, der Standardlösungen und die Vorbereitung der Rotweinproben erfolgten wie beim DPPH scavenging Test.

Die Mikrotiterplatte wurde wie folgt befüllt:

Abb. 8: Befüllung der Mikrotiterplatte im ABTS-Assay



BL (Blindwert) ...	200µl EtOH96%	+ 10µl EtOH10%
ST (Standard)1-6 ...	200µl $ABTS^{\bullet+}$-Lösung	+ 10µlTrolox in
	absteigender Konzentration:	
	ST1=0,400mM Trolox	
	ST2=0,300mM	
	ST3=0,200mM	
	ST4=0,100mM	
	ST5=0,050mM	
	ST6=0,025mM	
PC (Positivkontrolle) ...	200µl $ABTS^{\bullet+}$-Lösung	+ 10µl EtOH10%
RF (Referenz) ...	200µl EtOH96%	+ 10µl Probe
SM (Sample Messgruppen) ...	200µl $ABTS^{\bullet+}$-Lösung	+ 10µl Probe

Um die Dauer der Befüllung möglichst kurz zu halten und damit die Reproduzierbarkeit der Messungen nicht zu beeinflussen, wurde jeweils nur ein Teil der Platte befüllt (s. Tab. 5).

Tab. 5: Messbereiche im ABTS-Assay

Messung	Bereich
1	A1-H5
2	A6-H7
3	A8-H9
4	A10-H11
5	A12-H12

Die Messung erfolgte nach exakt 4min. Inkubation bei 37°C.

Berechnet wurde die TEAC der Proben analog dem DPPH Scavenging Test.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

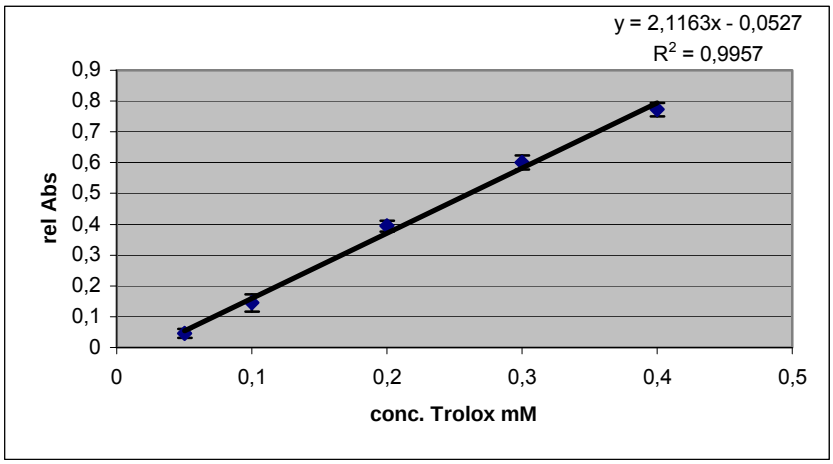
3.1. Vorversuche

Ausgangspunkt beider Methoden zur Messung der Radikalfängerwirkung bildete die Studie von De Beer et al. [3]. Sie war aufgrund des einfachen Versuchsaufbaus und der Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewählt worden. Wie in vielen anderen Studien war auch hier zur Vermessung ein Spektrophotometer mit 1cm Quarzküvetten verwendet worden.
Um die Probenvorbereitung und den Messvorgang zu beschleunigen, eine bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen, den Kostenaufwand für die Reagenzien zu verringern und vor allem einen höheren Probendurchsatz pro Zeiteinheit zu erzielen, wurden beide Methoden für ein Mikrotiterplattenlesegerät adaptiert und validiert. Dazu waren folgende Vorversuche notwendig.

3.1.1 Validierung DPPH scavenging Test

Standard:
Es wurde das wasserlösliche Vitamin E- Analogon Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) als Standardsubstanz verwendet, welches sich besonders bei der Vermessung von Weinen etabliert hatte. Drei unabhängige Versuche mit der Standardsubstanz wurden an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Sie bestätigten durch eine gute Linearität und Reproduzierbarkeit die Eignung dieser Substanz als Standard (siehe Abb. 9 und Tab. 6, S. 23).

Abb. 9: Linearität der Messwerte von Troloxlösungen im DPPH-Assay



Tab. 6: Wiederholpräzision bei der Vermessung von Troloxlösungen im DPPH-Assay

Trolox conc. mM	Rel Abs Messung1	Rel Abs Messung2	Rel Abs Messung3	avg rel Abs	SA (±)
0,4	0,7530	0,7971	0,7673	0,7725	0,0225
0,3	0,5739	0,6122	0,6161	0,6007	0,0233
0,2	0,3850	0,4141	0,3838	0,3943	0,0172
0,1	0,1133	0,1570	0,1648	0,1451	0,0278
0,05	0,0294	0,0554	0,0539	0,0462	0,0146

Messungszeitpunkt:

In der Studie von De Beer et al. [3] war nach 2h gemessen worden. Kinetikversuche mit der Standardsubstanz Trolox und drei verschiedenen Weinen zeigten, dass die Reaktion mit dem Standard schon innerhalb einer Minute ihren Endpunkt weitgehend erreichte (s. Tab. 7, Abb. 10 S. 24), während die Reaktion des DPPH -Radikals mit den Rotweinproben erst nach 2 Stunden annähernd zum Stillstand kam (s. Abb. 11 und Tab. 8, S. 24).

Tab. 7: Kinetik von Troloxlösungen im DPPH-Assay

	Trolox conc.					
min	0,3mM	0,2mM	0,15mM	0,1mM	0,05mM	0,025mM
1	0,6746	0,4450	0,3154	0,1887	0,0932	0,0434
2	0,6772	0,4452	0,3132	0,1872	0,0920	0,0430
3	0,6877	0,4452	0,3158	0,1884	0,0934	0,0441
4	0,6902	0,4485	0,3174	0,1895	0,0932	0,0442
5	0,6920	0,4495	0,3181	0,1912	0,0935	0,0435

Abb. 10: Kinetik von Troloxlösungen im DPPH-Assay

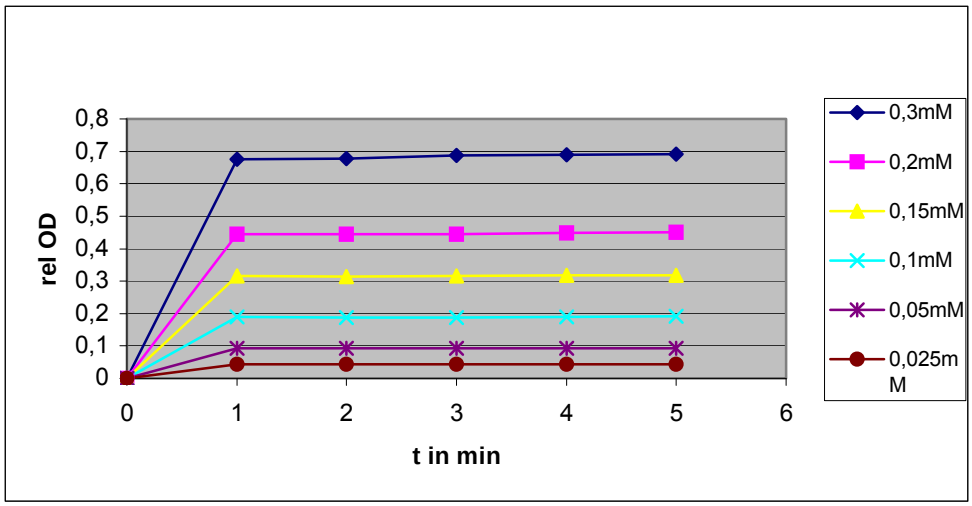
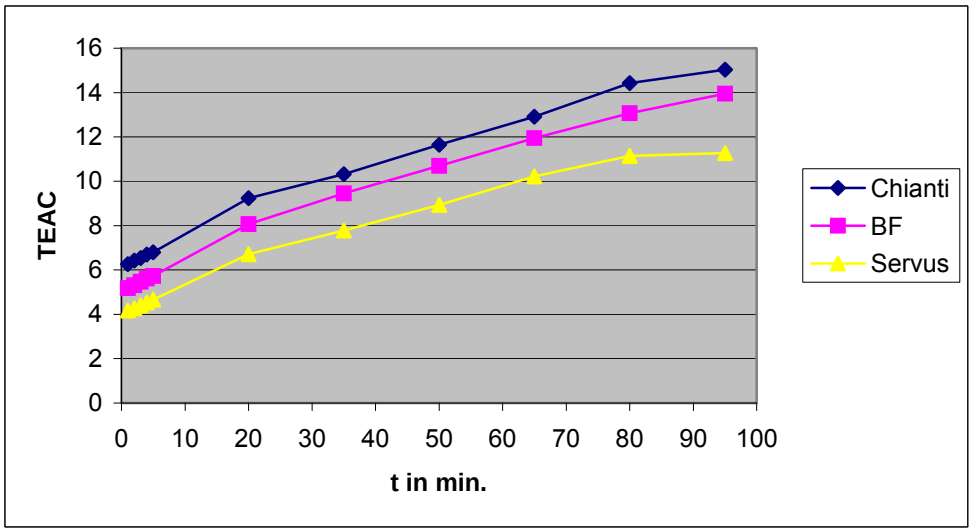


Abb. 11: Kinetik von drei Rotweinproben im DPPH-Assay



Tab. 8: Kinetik von drei Rotweinproben im DPPH-Assay

TEAC min	Chianti	BF	Servus
1	6,2550	5,1846	4,1751
2	6,4142	5,3033	4,2776
3	6,5342	5,4635	4,4035
4	6,7006	5,6159	4,5272
5	6,7973	5,7299	4,6599
20	9,2360	8,0626	6,7029
35	10,3181	9,4562	7,7738
50	11,6493	10,6966	8,9290
65	12,9091	11,9494	10,2131
80	14,4283	13,0756	11,1334
95	15,0310	13,9563	11,2674

Um die Resultate der österreichischen Weine mit jenen der südafrikanischen Weine [3] vergleichen zu können, wurde der Messzeitpunkt nach 2 Stunden übernommen.

Plattenfüllung und Reproduzierbarkeit:

Es zeigte sich im Laufe der Vorversuche, dass trotz der Verwendung einer 8-fach Pipette vom Zeitpunkt der Befüllung der ersten wells bis zur vollständigen Füllung der Platte mit ca. 12 Minuten Arbeitszeit zu rechnen war. Bei der Messung nach 2 Stunden ergab sich daraus ein Trend der Ergebnisse, wonach Proben des gleichen Weins in den zuerst gefüllten wells einen niedrigeren TEAC-Wert aufwiesen als die Proben in den zuletzt gefüllten. Um eine bessere Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurden schließlich nur Teile der Platte jeweils 4min. zeitversetzt befüllt und gemessen (siehe Kap.2.2.1 Tab. 3 und Tab. 4, S. 16). Die Abweichung der Ergebnisse innerhalb einer Platte lag bei dieser Vorgangsweise unter 5% (s. Tab. 9).

Tab. 9: Vermessung einer Rotweinprobe innerhalb einer Platte im DPPH-Assay

Position	W4 rel Abs	TEAC
avg B4-H4	0,4557	13,0054
avg B5-H5	0,5103	14,3850
avg B6-H6	0,4992	14,1064
avg B7-H7	0,4831	13,6994
avg B8-H8	0,4813	13,6518
avg B9-H9	0,4328	12,4274
avg B10-H10	0,4482	12,8161
avg B11-H11	0,4608	13,1347
avg B12-H12	0,4796	13,6093
	Mittelwert	13,4262
	SA (±)	0,6298
	Variationskoeffizient	4,69%

Deckel:

Eine Inkubationszeit von 2h, in der die gefüllte Platte bei RT im Gerät verbleibt, barg die Gefahr des Verdunstens eines Teils des Lösungsmittels und infolgedessen eine schlechtere Reproduzierbarkeit. Bei entsprechenden Vorversuchen war ein Verlust von bis zu 50% beobachtet worden. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Aufsetzen eines Deckels auf die Titerplatten während der Inkubation unbedingt erforderlich ist.

Mischmodus:

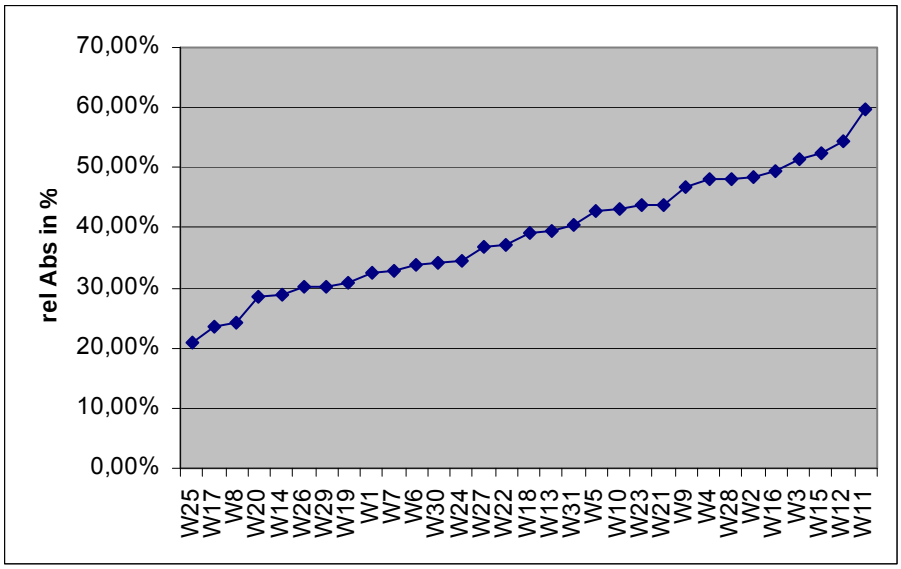
Um eine gute Durchmischung der Lösungen in den wells zu erreichen, wurde ein initialer Schüttelschritt von 300s, bei dem die Titerplatte kreisförmig mit hoher Frequenz bewegt wurde, gewählt. Zusätzlich sollte ein weiterer Schüttelschritt von 120s ebenfalls kreisförmig „normal“ kurz vor der Messung einer etwaigen Entmischung der Messlösungen vorbeugen.

Verdünnung der Rotweine:

In der Studie von De Beer et al. [3] war eine Verdünnung der Weine von 1:50 eingesetzt worden, um die Störung der photometrischen Messung durch die Eigenfarbe der Rotweine auszuschließen.

Als Verdünnungslösung wurde 10%iges Ethanol gewählt, um das „Lösungsmittel“ von unverdünntem Rotwein annähernd beizubehalten. Da die so verdünnten Rotweinproben nach Umsetzung mit DPPH alle eine relative Absorption im linearen Bereich des Assays zeigten (zwischen 20 und 80% relative Absorption) und um eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten, wurde 1:50 mit 10%igem Ethanol beibehalten (s. Abb.12 und Tab. 10, S. 27).

Abb. 12: Relative Absorption der Proben im DPPH-Assay



Tab. 10: Relative Absorption der Proben im DPPH-Assay

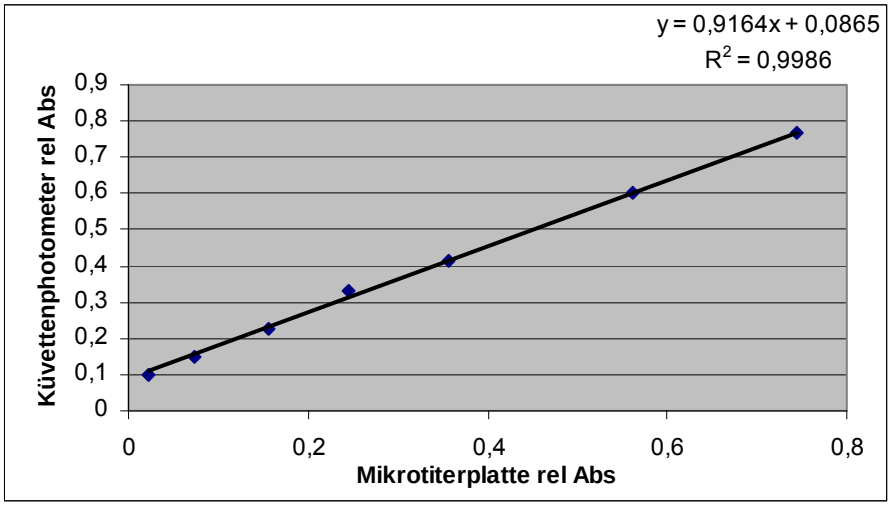
Probe	avg rel Abs	Probe	avg rel Abs
W1	32,57%	W16	49,45%
W2	48,49%	W17	23,50%
W3	51,34%	W18	39,17%
W4	48,09%	W19	31,01%
W5	42,92%	W20	28,58%
W6	34,00%	W21	43,82%
W7	32,95%	W22	37,17%
W8	24,30%	W23	43,76%
W9	46,66%	W24	34,34%
W10	43,02%	W25	20,81%
W11	59,87%	W26	30,06%
W12	54,45%	W27	36,96%
W13	39,41%	W28	48,13%
W14	28,73%	W29	30,14%
W15	52,44%	W30	34,27%
		W31	40,49%

Vergleichbarkeit der Geräte:

Es stellte sich schließlich auch die Frage, ob die Messergebnisse in Mikrotiterplatten mit der Vermessung in Quarzglasküvetten korrelierten. Mehrere Versuche der gleichen Probe auf dem oben beschriebenen Gerät (s. Kap. 2.2, S. 12) und einem Küvettenmessgerät ergaben eine Korrelation von 1,098 (±0,102).

Zusätzlich wurden die Messergebnisse der Troloxstandardlösungen an beiden Geräten miteinander verglichen (n=5). Die gute Korrelation zeigte sich hier durch eine Linearität von R^2=0,9986, wobei die Messung in Mikrotiterplatten etwas empfindlicher war (y=ax+b, a=Steigung=0,9164) (s. Abb.13 und Tab. 11, S. 29). Die Vermessung von Rotweinproben auf beiden Geräten bestätigte die gute Vergleichbarkeit (R^2=0,9727) (s. Abb: 14 und Tab. 12, S. 29). Eine Vergleichbarkeit mit Messungen auf Küvettenmessgeräten war somit gewährleistet.

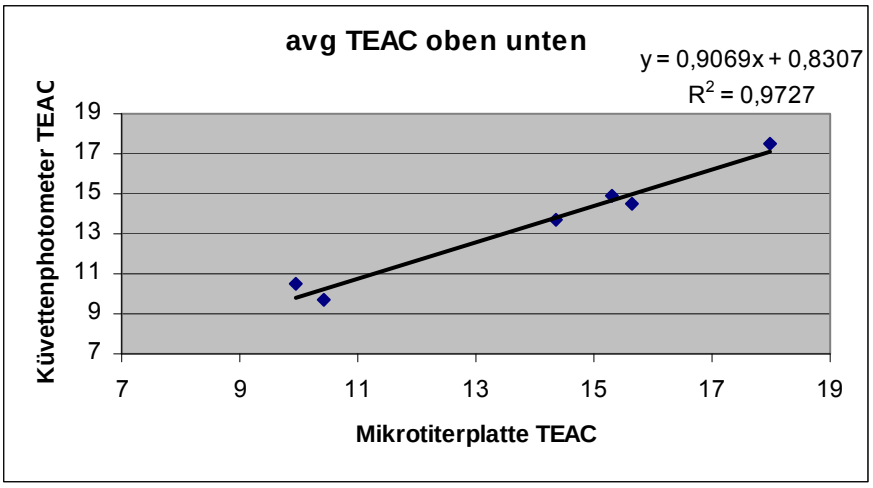
Abb. 13: Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten



Tab. 11: Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten

Tr. conc. mM	X	Y
0,4	0,7444	0,7651
0,3	0,5616	0,5995
0,2	0,3557	0,4116
0,15	0,2457	0,3319
0,1	0,1560	0,2253
0,05	0,0742	0,1506
0,025	0,0231	0,1016

Abb. 14: Vergleich der TEAC einiger Rotweinproben im DPPH-Assay auf unterschiedlichen Messgeräten



Tab. 12: Vergleich der TEAC einiger Rotweinproben im DPPH-Assay auf unterschiedlichen Messgeräten

TEAC avg	X	Y
WS*	10,4249	9,7442
WC*	17,9862	17,4729
WB*	14,3397	13,6625
W1	9,9431	10,5049
W4	15,3112	14,9294
W5	15,6574	14,5434

*Rotweinmuster für Vorversuche

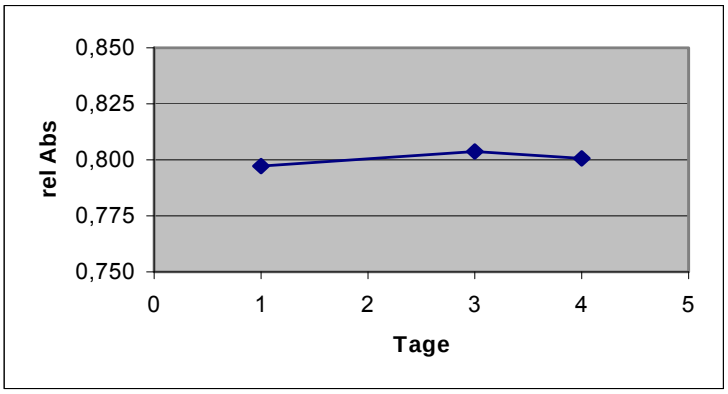
Haltbarkeit der DPPH-Lösung:

Versuche zur Haltbarkeit der DPPH-Radikallösung zeigten eine starke Entfärbung der Lösung nach 24 Stunden. Die Lösung mit EtOH 96% war daher jeden Tag frisch zuzubereiten, unter Lichtschutz im Kühlschrank aufzubewahren und möglichst rasch zu verwenden.

Haltbarkeit der Troloxstammlösung

Versuche zeigten, dass die Trolox-Stammlösung bei Lagerung im Kühlschrank über mindestens 4 Tage hinweg stabil war (der Variationskoeffizient der Messergebnisse lag innerhalb dieser Zeit unter 5%), die weiteren Verdünnungen sollten jeden Tag neu hergestellt werden (s. Abb. 15 ,Tab. 13).

Abb. 15: Stabilität der Troloxstammlösung im DPPH-Assay



Tab. 13: Stabilität der Troloxstammlösung im DPPH-Assay

Tage	rel Abs
1	0,7971
3	0,8037
4	0,8005
avg rel Abs	0,7971
SA (±)	0,0033
Variationskoeffizient	0,4133%

Lagerung und Haltbarkeit der Proben:

In der Literatur fanden sich unterschiedliche Angaben zur Lagerung der Proben. Bei der Lagerung im Kühlschrank unter Lichtschutz in einem dicht verschlossenen Gefäß zeigte sich durch olfaktorische, geschmackliche und optische Überprüfung, dass die Rotweine durchschnittlich nach 14 Tagen verdarben (saurer Geschmack, schlechter Geruch, Bodensatz). Einfrieren der Probe direkt nach Entnahme aus der Flasche und Lagerung im Gefrierfach hatte zur Folge, dass die Proben nach dem Auftauen einen unlöslichen Bodensatz zeigten, der die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messergebnisse beeinträchtigte. Die Lagerung im Kühlschrank unter Lichtschutz und dicht verschlossen wurde daher gewählt.

Intraday-Reproduzierbarkeit im DPPH-Assay:

Um die Reproduzierbarkeit der Probenmessungen innerhalb eines Tages (Intraday-Reproduzierbarkeit) feststellen zu können, wurden von drei verschiedenen Rotweinen jeweils fünf Messungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient lag im Mittel bei 1,88% (s. Tab. 14). Eine gute Intraday-Reproduzierbarkeit war somit gegeben.

Tab. 14: Intraday-Reproduzierbarkeit der TEAC im DPPH-Assay

Messung	W12	W14	W24
1	14,996	7,327	9,596
2	14,260	7,253	9,315
3	14,729	7,597	9,786
4	14,453	7,435	9,742
5	14,621	7,481	9,686
Mittelwert	14,612	7,418	9,625
SA (±)	0,279	0,134	0,187
Variationskoeffizient in %	1,907	1,806	1,945

Interday-Reproduzierbarkeit

Auch die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse über mehrere Tage hinweg (Interday-Reproduzierbarkeit) sollte gemessen werden. Dafür wurden von zwei Rotweinproben an zwei verschiedenen Tagen je mindestens vier Messungen gemacht. Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden berechnet. Schließlich wurden die Wertereihen mittels Students-T-test und F-Test auf einem 95%-Signifikanzniveau verglichen. Es zeigte sich, dass beide Wertereihen der gleichen Grundgesamtheit angehörten (T- und F-Test nicht signifikant). Der Variationskoeffizient lag im Mittel bei 4,05% (s. Tab. 15).

Tab. 15: Interday-Reproduzierbarkeit der TEAC im DPPH-Assay

Messung	W14	W14	W26	W26
1	7,986	7,327	7,635	7,869
2	7,788	7,253	7,738	8,242
3	7,331	7,597	7,740	7,872
4	8,070	7,435	7,816	8,210
5		7,481	8,672	
Mittelwert	7,585		7,977	
SA (±)	0,298		0,333	
Variationskoeffizient	3,935%		4,170%	
T-test	0,103	ns	0,576	ns
F-test	0,114	ns	0,263	ns

3.1.2 Validierung ABTS scavenging Test

Es finden sich viele verschiedene Methoden zur Herstellung des ABTS-Radikalkations in der Literatur, die sich sowohl bezüglich Radikalbildung als auch Zeitpunkt der Probenzugabe unterscheiden. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über die Möglichkeiten gegeben werden, auf die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden wird in der Diskussion (Kap. 4, S. 60 ff.) näher eingegangen.

Bei älteren Assays wie z. B. dem Ferrylmyoglobinassay (siehe unten) verhinderte die Probe die Radikalbildung, das heisst die Probe wurde in der lag-Phase zugegeben. Bei anderen Methoden wurde die Probe der fertigen Radikallösung zugesetzt und die Radikalreduktion gemessen [28,31].

Die älteste und wohl umstrittenste Methode der ABTS-Radikalgewinnung erfolgt über die Bildung eines Zwischenradikals mit Metmyoglobin. Metmyoglobin reagiert mit Wasserstoffperoxid zum Ferrylmyoglobinradikal, welches ABTS zum $ABTS^{\bullet+}$-Radikal oxidiert [6-8,18,23,27].

Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung des $ABTS^{\bullet+}$ mit Hilfe einer thermolabilen Azoverbindung. ABAP (2,2`-azinobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid) wird einer ABTS-Stammlösung zugesetzt und die Lösung erhitzt. Durch die Hitze zerfällt ABAP und oxidiert ABTS zum Radikal [14, 32].
Weiters wurde in der Literatur die Herstellung des ABTS-Radikals mit Mangandioxid (MnO_2) beschrieben. ABTS reagiert in Lösung mit MnO_2 als oxidierendes Agens zum gewünschten ABTS-Radikalkation [28].

Die Oxidation von ABTS mittels H_2O_2 und Meerrettichperoxidase stellt eine weitere Möglichkeit zur Bildung des Radikals dar [19,21,22]. Diese etablierte enzymatische Methode ist allerdings präparativ und finanziell um einiges aufwändiger als die chemischen Herstellungsverfahren.

Auch mit Hilfe von Elektrizität lässt sich das ABTS-Radikal generieren. Eine Lösung von ABTS wird hierbei elektrochemisch in einer „Spektroelektrochemischen Dünnschichtzelle“ bei 650-725mV zum $ABTS^{\bullet+}$ oxidiert [30].

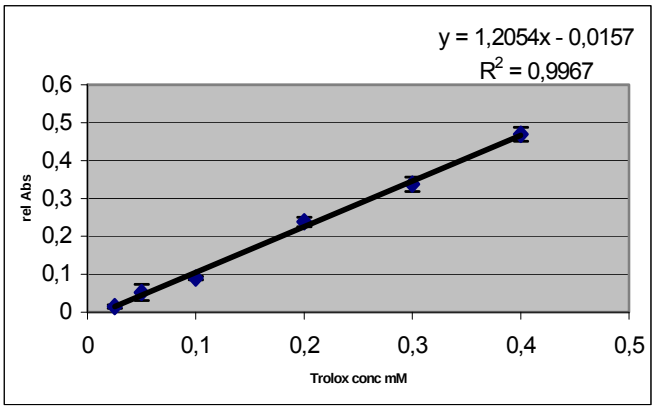
Ein anderer Weg der ABTS-Radikalherstellung erfolgt über die Oxidation mit Kaliumperoxodisulfat. ABTS reagiert mit $K_2S_2O_8$ im wässrigen Medium zum ABTS-Radikal und die Lösung war nach 12-16h stabil [3, 10,12,13,20,24,29].
Die Absorptionsmaxima lagen bei 415, 645, 734 und 815nm [29]. Da es eine einfache schnelle, kostengünstige und mit wenig präparativem Aufwand verbundene Methode ist, bildete dieses Verfahren den Ausgangspunkt zur Weiterentwicklung und Evaluierung in der vorliegenden Arbeit.

Auch diese Methode wurde für ein Mikrotiterplattenlesegerät adaptiert und folgende Versuche durchgeführt.

Standard:

Es wurde das wasserlösliche Vitamin E- Analogon Trolox als Standardsubstanz verwendet. Drei unabhängige Versuche mit der Standardsubstanz wurden an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Sie bestätigten durch eine gute Linearität und Reproduzierbarkeit die Eignung dieser Substanz als Standard (s. Abb. 16, Tab. 16, S. 35).

Abb. 16: Linearität der Messwerte von Troloxlösungen im ABTS-Assay



Tab. 16: Wiederholpräzision bei der Vermessung Troloxlösungen im ABTS-Assay

Tr. conc. mM	Rel Abs Messung1	Rel Abs Messung2	Rel Abs Messung3	Avg	SA (±)
0,4	0,4618	0,4906	0,4561	0,4695	0,0185
0,3	0,3406	0,3163	0,3545	0,3371	0,0194
0,2	0,2258	0,2365	0,2514	0,2379	0,0129
0,1	0,0933	0,0845	0,0916	0,0898	0,0046
0,05	0,0414	0,0769	0,0375	0,0520	0,0217
0,025	0,0159	0,0102	0,0193	0,0151	0,0046

Mischmodus:

Es wurden verschiedene „Schüttelarten“ und unterschiedliche Mischungszeiten ausprobiert. Händisches Mischen wurde aus Gründen der Reproduzierbarkeit nicht in Betracht gezogen. Eine Mischdauer von 240s bei kreisförmiger Bewegung der Platte mit hoher Frequenz stellte die effizienteste Mischvariante dar und wurde für die Versuche eingesetzt.

Verdünnungen der Rotweinproben:

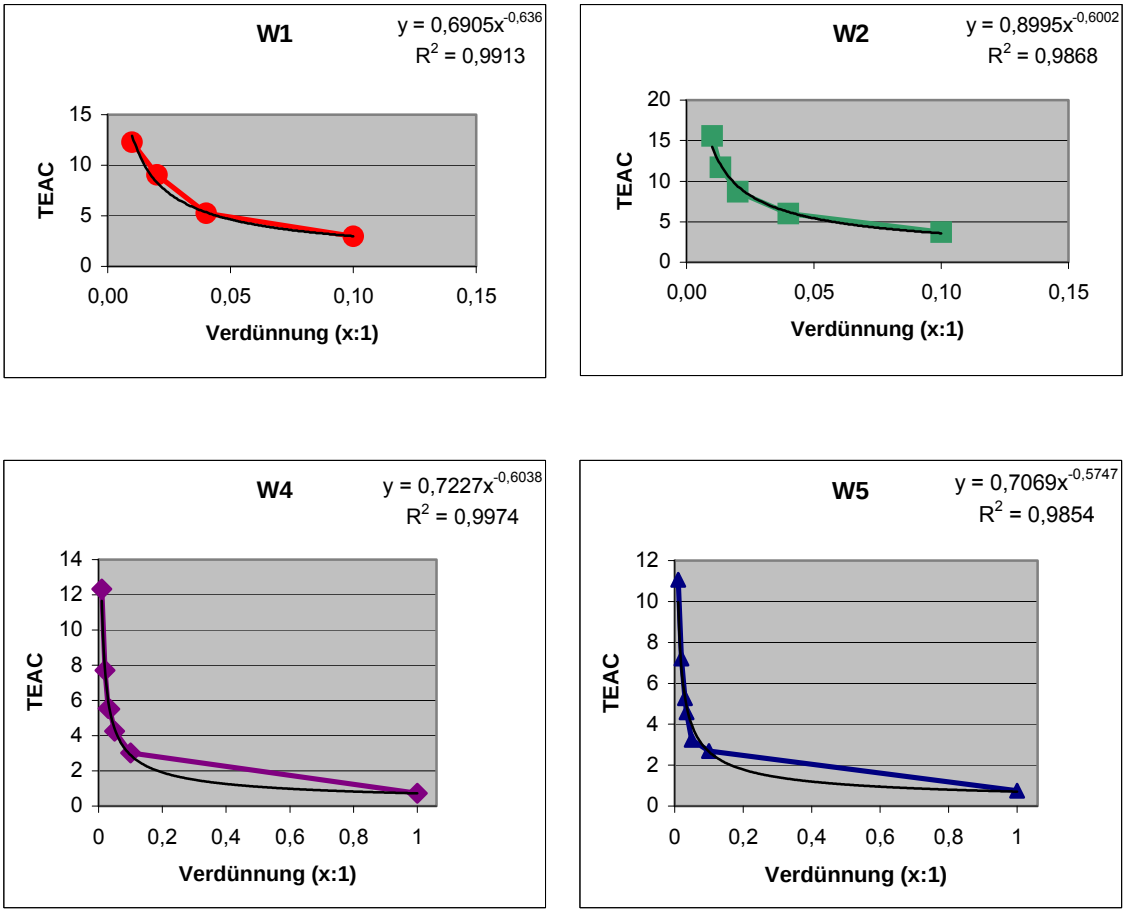
In der Studie von De Beer et al. [3] war eine Verdünnung von 1:50 mit Ethanol 10% angegeben worden. In vorliegender Arbeit wurden verschiedene Verdünnungen untersucht (siehe Tab. 17 und Abb. 17, S. 36). Es zeigte sich dabei, dass sowohl Konzentrationen unter 0,02 als auch unverdünnter Rotwein außerhalb des linearen Konzentrationsbereiches lagen. Im Einklang mit der Literatur [32] war ein Trend war zu beobachten, dass die stärksten Verdünnungen eine höhere antioxidative Kapazität aufwiesen als die weniger stark verdünnten Proben. Daher wurde, wie für solche Untersuchungen an Rotweinen üblich [3,10,13], die Verdünnung 1:50 mit EtOH 10% für die weiteren Messungen eingesetzt.

Tab. 17: TEAC verschiedener Verdünnungen von vier Rotweinproben im ABTS-Assay

	TEAC	
Verdünnung (x:1)	W1	W2
0,10	2,946	3,748
0,04	5,247	6,010
0,02	9,043	8,732
0,0133	n.b.	11,736
0,01	12,272	15,539

	TEAC	
Verdünnung (x:1)	W4	W5
1	0,729	0,757
0,1	3,024	2,693
0,05	4,255	3,237
0,035	5,511	4,585
0,03	5,546	5,275
0,02	7,702	7,220
0,01	12,319	11,068

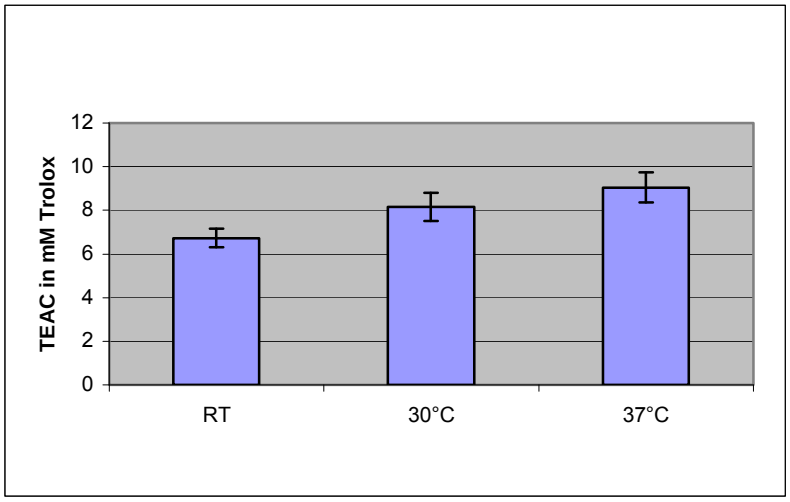
Abb. 17: TEAC verschiedener Verdünnungen von vier Rotweinproben im ABTS-Assay



Temperatur:

Es wurden Messungen (n=3) bei RT, 30°C und 37°C durchgeführt, um den Einfluss der Messtemperatur auf das Ergebnis im ABTS Assay feststellen zu können. Es zeigte sich, dass mit steigender Temperatur die antioxidative Kapazität der Probe zunimmt (s. Abb. 18).

Abb. 18: Einfluss der Temperatur im ABTS Assay



Das könnte möglicherweise an einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen gelegen haben. Es wurde die Messtemperatur von 37°C gewählt, um Bedingungen zu schaffen, die den Gegebenheiten im menschlichen Körper möglichst nahe kommen.

Verdünnung von ABTS und Haltbarkeit der Stammlösung:

Wie in Kapitel 2.2.2, Seite 19 beschrieben, wurde zunächst eine ABTS-Stammlösung hergestellt, die nach mindestens 12 Stunden Reaktionszeit bei RT unter Lichtschutz eine stabile ABTS-Radikalkationlösung darstellte.

Die Inkubationszeit war notwendig, weil sich zwar sofort nach dem Lösen von ABTS und $K_2S_2O_8$ in destilliertem Wasser ABTS-Radikalkationen bildeten,

das Gleichgewicht zwischen radikalisiertem ABTS und nichtradikalisiertem ABTS jedoch erst nach 12 Stunden stabil war [29].
Dann wurde mit EtOH96% soweit verdünnt, bis die Lösung eine Absorption von 0,7±0,02 bei 30°C und 734nm aufwies (= gebrauchsfertige Messlösung). Messungen der Absorption der verdünnten Stammlösung an aufeinanderfolgenden Tagen ergaben pro Tag einen Absorptionsverlust von 0,217 bzw. über drei Tage einen relativen Absorptionsverlust von 56,20% (siehe Tab. 18). Die Verdünnung der Stammlösung musste daher jeden Tag frisch erfolgen. Die Messlösung war unter Lichtschutz zu lagern und möglichst bald zu verbrauchen.

Tab. 18: Absorptionsverlust der verdünnten $ABTS^{\bullet+}$-Lösung

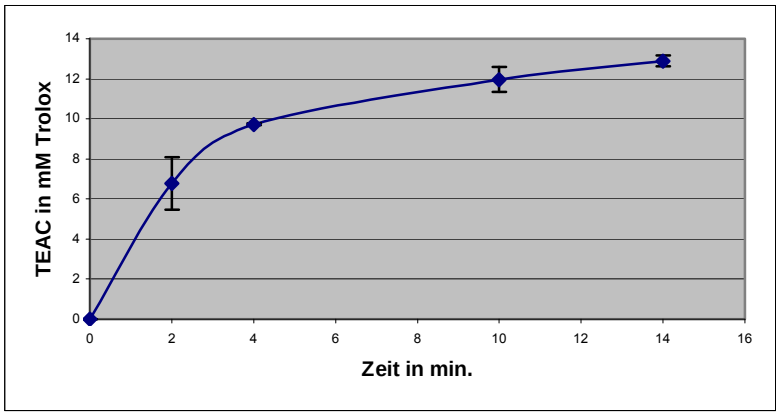
Tag	Abs	Verlust in %
0	0,714	0,00
1	0,525	26,54
2	0,313	**56,20**

Die Stammlösung selbst war, bei RT und unter Lichtschutz gelagert, mindestens 7 Tage ab Herstellung haltbar.

Messzeitpunkt:

In der Studie von De Beer et al. [3] waren die Analysenlösungen nach exakt 4 Minuten Inkubationszeit bei 37°C gemessen worden. Messungen nach 2, 4, 10 und 14min. zeigten deutlich einen logarithmischen Reaktionsverlauf (s. Abb. 19 und Tab. 19, S. 39), im Messintervall wurde kein Endpunkt der Reaktion festgestellt.

Abb. 19: Kinetik von einer Rotweinprobe im ABTS-Assay



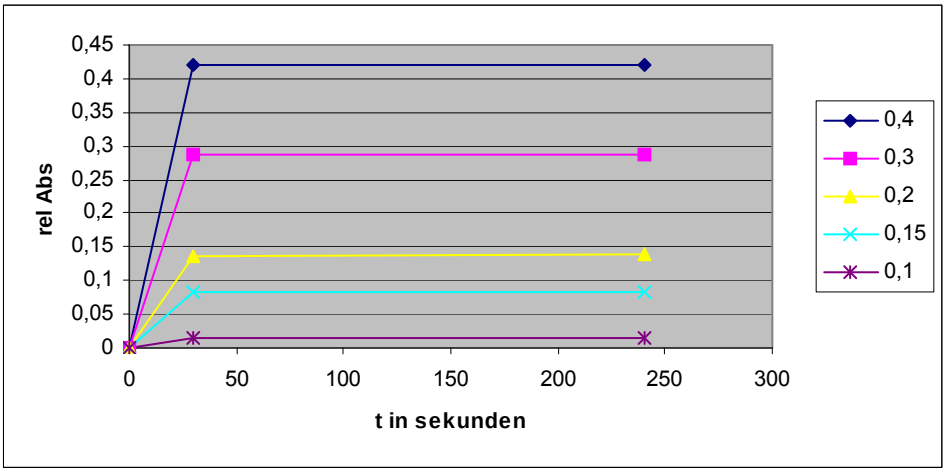
Tab. 19: Kinetik von einer Rotweinprobe im ABTS-Assay

W31 n=3		
t in min	TEAC	SA (±)
0	0,000	0,000
2	6,783	1,304
4	9,728	0,039
10	11,967	0,625
14	12,897	0,287

Die exakte Einhaltung des Messungszeitpunktes war daher beim ABTS-Assay besonders wichtig. Im Vordergrund stand hier die Messung der schnell einsetzenden Radikalfängerwirkung von Proben, wie sie auch im menschlichen Körper relevant sind [32]. Aus Gründen der besten Reproduzierbarkeit und unter Berücksichtigung der Vergleichbarkeit mit anderen Studien wurde der Messzeitpunkt nach 4min. Inkubation gewählt.

Die Reaktion von $ABTS^{\bullet+}$ mit der Standardsubstanz Trolox erreichte schon nach weniger als 30s ihren Endpunkt (s. Abb. 20 und Tab. 20, S. 40).

Abb. 20: Kinetik von Troloxlösungen im ABTS-Assay



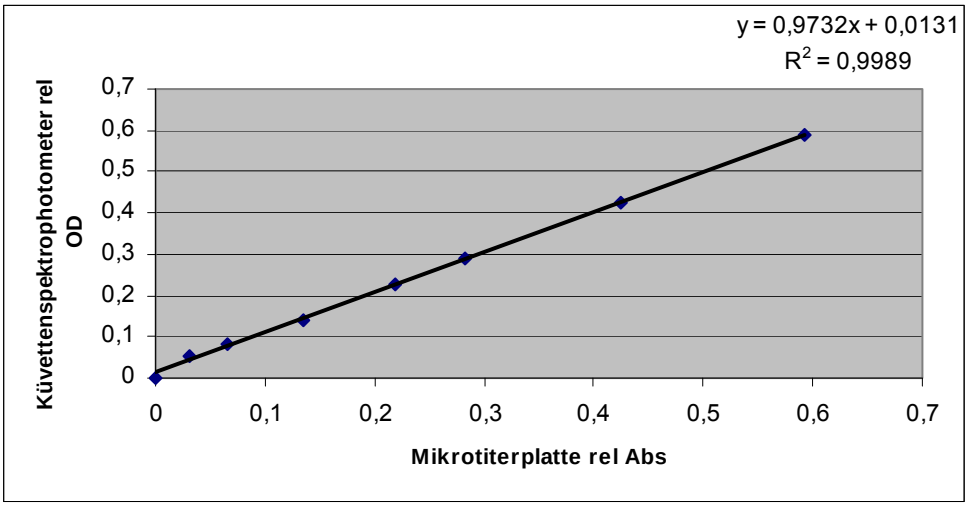
Tab. 20: Kinetik von Troloxlösungen im ABTS-Assay

Tr. conc. mM	30s	240s	SA (±)
0,4	0,4190	0,4196	0,0004
0,3	0,2868	0,2886	0,0013
0,2	0,1373	0,1384	0,0008
0,15	0,0832	0,0835	0,0002
0,1	0,0137	0,0134	0,0002

Vergleichbarkeit der Geräte:

Untersucht wurde außerdem eine etwaige Korrelation der Messergebnisse zwischen einem in der Studie von De Beer et al. [3] verwendeten Küvettenspektrophotometer und dem Mikrotiterplattenlesegerät. Es wurde eine Korrelation von 1,096±0,110 festgestellt. Zusätzlich wurden die Messergebnisse der Troloxstandardlösungen an beiden Geräten miteinander verglichen (n=3). Die gute Korrelation zeigte sich hier durch eine Linearität mit R^2=0,9989, wobei die Messung in Mikrotiterplatten etwas empfindlicher war (y=ax+b, a=Steigung=0,9732). Die Ergebnisse waren demnach sehr gut vergleichbar (s. Abb. 21 und Tab. 21, S. 41).

Abb. 21: Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten



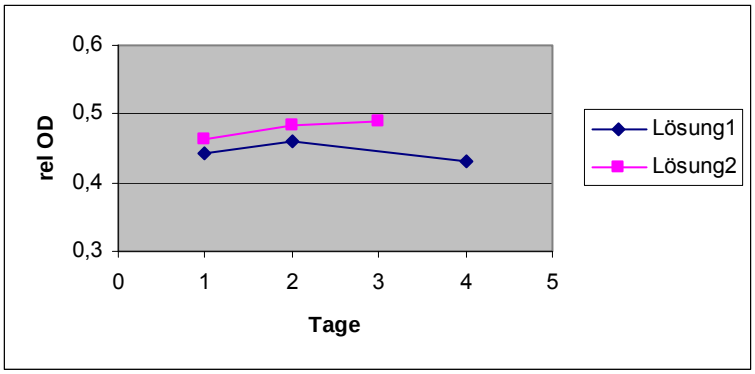
Tab. 21: Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten

Tr. conc. mM	X	Y
0,4	0,5925	0,5883
0,3	0,4248	0,4254
0,2	0,2834	0,2920
0,15	0,2184	0,2269
0,1	0,1344	0,1400
0,05	0,0663	0,0844
0,025	0,0309	0,0515
0	0,0000	0,0000

Haltbarkeit der Troloxstammlösung

Versuche zeigten, dass die Trolox-Stammlösung bei Lagerung im Kühlschrank über 4 Tage hinweg stabil war (der Variationskoeffizient der Messergebnisse lag innerhalb dieser Zeit unter 5%), die weiteren Verdünnungen sollten jeden Tag neu hergestellt werden (s. Tab. 22 und Abb. 22, S. 42).

Abb. 22: Stabilität der Troloxstammlösung im ABTS-Assay



Tab. 22: Stabilität von Troloxstammlösungen im ABTS-Assay

Tage	rel Abs Lösung1	Lösung2
1	0,4439	0,4618
2	0,4602	0,4846
3	n.b.	0,4904
4	0,4311	nb
avg rel Abs	0,4451	0,4789
SA (±)	0,0146	0,0151
Variationskoeffizient	3,27%	3,16%

Intraday-Reproduzierbarkeit:

Um die Reproduzierbarkeit der vorliegenden ABTS- Methode innerhalb eines Tages zu erfassen, wurden von drei Rotweinproben jeweils fünf Messungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient lag im Mittel bei 4,267% (s. Tab. 23).

Tab. 23: Intraday-Reproduzierbarkeit der TEAC im ABTS-Assay

Messung	W10	W17	W20
1	8,698	11,273	10,984
2	9,347	10,206	10,080
3	8,783	11,307	10,852
4	9,606	11,192	10,195
5	9,317	11,318	10,109
Mittelwert	9,150	11,059	10,444
SA (±)	0,392	0,479	0,437
Variationskoeffizient	4,279%	4,336%	4,187%

Interday-Reproduzierbarkeit:

Schließlich sollte auch die Reproduzierbarkeit über mehrere Tage hinweg ermittelt werden. Zwei Weine wurden dafür an zwei verschiedenen Tagen jeweils mindestens vier Mal vermessen. Mittelwert der Messergebnisse, Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden berechnet und die Wertegruppen der jeweiligen Tage mittels Students T- Test und F- Test auf 95% Signifikanzniveau miteinander verglichen. Es zeigte sich wie erwartet, dass die Wertegruppen der gleichen Grundgesamtheit angehörten (T- und F-Test nicht signifikant). Der Variationskoeffizient lag im Mittel bei 5,01% (s. Tab. 24).

Tab. 24: Interday-Reproduzierbarkeit im ABTS-Assay

Messung	W14	W14	W17	W17
1	6,974	7,278	9,969	11,273
2	7,289	6,428	11,210	10,206
3	6,552	6,831	10,834	11,307
4	7,445	6,904	11,510	11,192
5	7,316			11,318
Mittelwert	7,002		10,980	
SA (±)	0,358		0,539	
Variationskoeffizient	5,113%		4,913%	
T-test	0,319	ns	0,671	ns
F-test	0,999	ns	0,530	ns

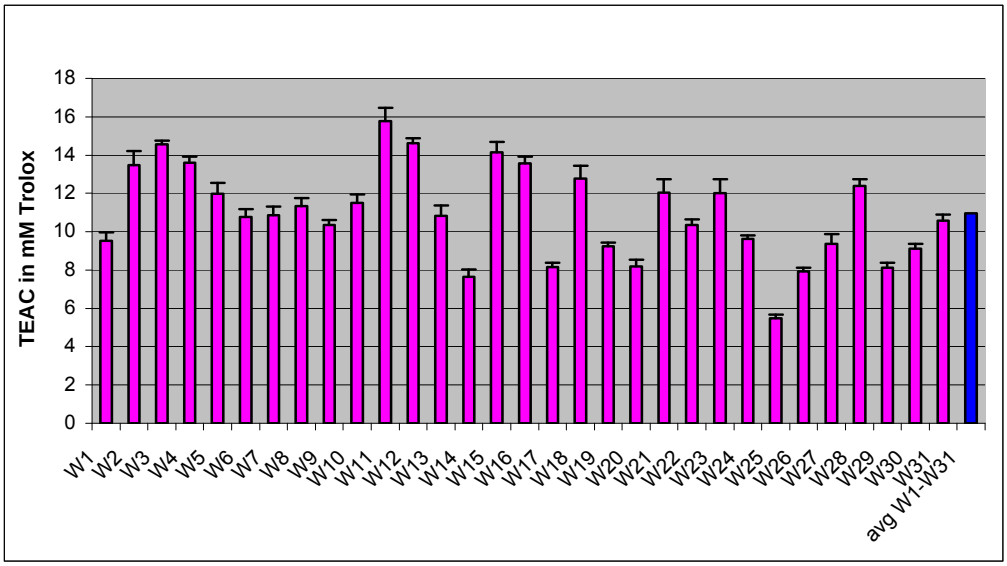
3.2. Vermessung der Rotweine

Die entwickelten Methoden wurden verwendet, um 30 Österreichische Weine auf ihre Radikalfängerkapazität zu überprüfen. (Bedingungen siehe Kap. 2.2.1, S. 13 ff. und Kap. 2.2.2, S. 19 ff.). Alle Ergebnisse waren Mittelwerte aus mindestens 5 Messmittelwerten, wobei sich ein Messmittelwert aus 7 Einzelwerten zusammensetzte.

3.2.1 Vermessungen mit dem DPPH- Assay

Mit diesem Versuchsaufbau (Bedingungen siehe Kap.2.2.1, Seite 13 ff.) sollte die längerfristige Radikalfängerwirkung der Proben erfasst werden. Durch eine Endpunktmessung war es möglich, die maximale antioxidative Kapazität (TEAC) der getesteten Rotweine zu erfassen. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) von Wein ist per Definition die Konzentration der Troloxlösung in mmol/l, deren antioxidatives Potential äquivalent dem der gemessenen Probe ist [22]. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 und Tab. 25, Seite 45 dargestellt.

Abb. 23: TEAC Österreichischer Rotweine im DPPH-Assay



Tab. 25: Ergebnisse der Rotweinvermessungen mit DPPH

Probenbezeichnung	TEAC DPPH	SA DPPH (±)	Variationskoeffizient %
W1	9,527	0,432	4,538
W2	13,474	0,724	5,374
W3	14,554	0,207	1,424
W4	13,605	0,321	2,361
W5	11,969	0,576	4,809
W6	10,783	0,394	3,654
W7	10,857	0,440	4,050
W8	11,334	0,407	3,589
W9	10,357	0,253	2,447
W10	11,493	0,443	3,858
W11	15,759	0,702	4,455
W12	14,612	0,279	1,907
W13	10,839	0,541	4,988
W14	7,655	0,358	4,672
W15	14,157	0,538	3,803
W16	13,579	0,336	2,478
W17	8,142	0,249	3,060
W18	12,784	0,668	5,224
W19	9,225	0,214	2,314
W20	8,174	0,367	4,490
W21	12,033	0,695	5,774
W22	10,344	0,301	2,907
W23	12,017	0,713	5,933
W24	9,625	0,187	1,945
W25	5,472	0,204	3,729
W26	7,927	0,211	2,667
W27	9,382	0,491	5,230
W28	12,380	0,368	2,973
W29	8,139	0,237	2,910
W30	9,117	0,245	2,691
W31	10,591	0,313	2,960
avg W1-31	**10,965**	**0,400**	**3,652**

Die vermessenen Rotweine zeigten $TEAC^{DPPH}$ von 5,472-15,759. Der Mittelwert lag bei 10,965 (s. Tab. 25, Abb. 23, S. 44).

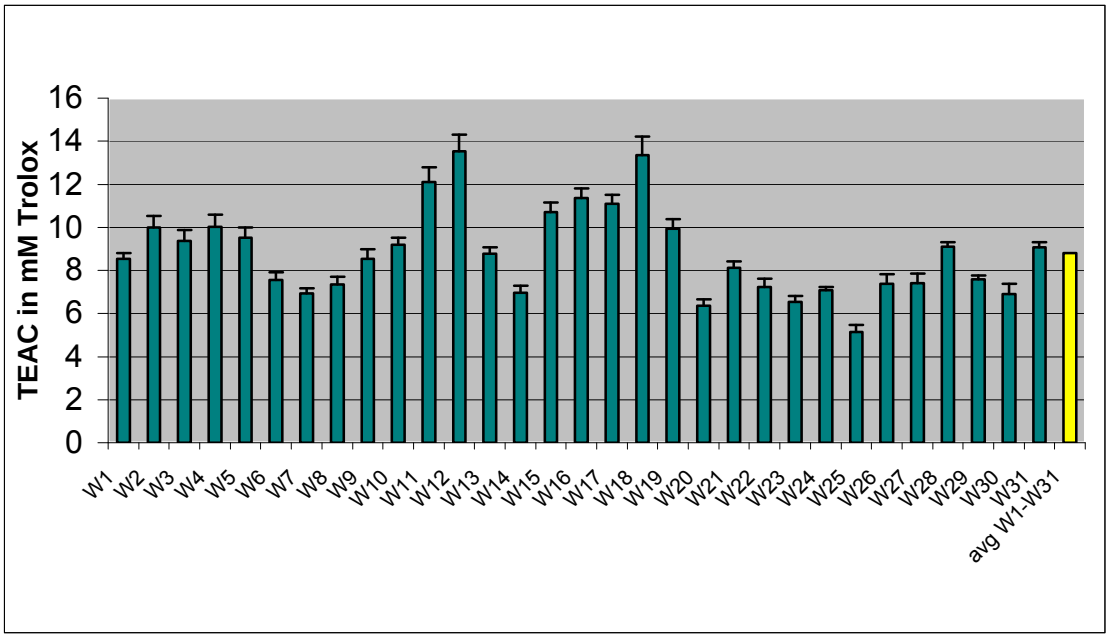
3.2.2 Vermessung mit dem ABTS- Assay

Unter oben beschriebenen Bedingungen (Kap.2.2.2, S. 19 ff.) wurden die Proben auch im ABTS-Assay vermessen. Durch die kurze Inkubationszeit von 4min. wurde die sofort einsetzende bzw. kurzzeitige Radikalfänger-wirkung erfasst (s. Tab. 26).

Tab. 26: Ergebnisse der Rotweinvermessungen mit ABTS

Probenbezeichnung	TEAC ABTS	SA ABTS (±)	Variationskoeffizient %
W1	8,535	0,266	3,122
W2	9,993	0,538	5,381
W3	9,368	0,515	5,498
W4	10,034	0,550	5,484
W5	9,527	0,465	4,885
W6	7,541	0,361	4,787
W7	6,915	0,243	3,520
W8	7,339	0,363	4,941
W9	8,534	0,462	5,410
W10	9,185	0,347	3,777
W11	12,109	0,676	5,587
W12	13,519	0,781	5,776
W13	8,774	0,304	3,462
W14	6,946	0,339	4,879
W15	10,698	0,467	4,361
W16	11,374	0,426	3,745
W17	11,106	0,410	3,695
W18	13,363	0,867	6,487
W19	9,948	0,431	4,330
W20	6,360	0,297	4,662
W21	8,105	0,297	3,663
W22	7,218	0,389	5,383
W23	6,538	0,282	4,315
W24	7,072	0,148	2,096
W25	5,135	0,341	6,632
W26	7,389	0,438	5,925
W27	7,413	0,440	5,936
W28	9,112	0,186	2,045
W29	7,579	0,180	2,370
W30	6,908	0,470	6,810
W31	9,080	0,218	2,403
avg W1-31	**8,797**	**0,403**	**4,560**

Abb. 24: TEAC Österreichischer Weine im ABTS-Assay

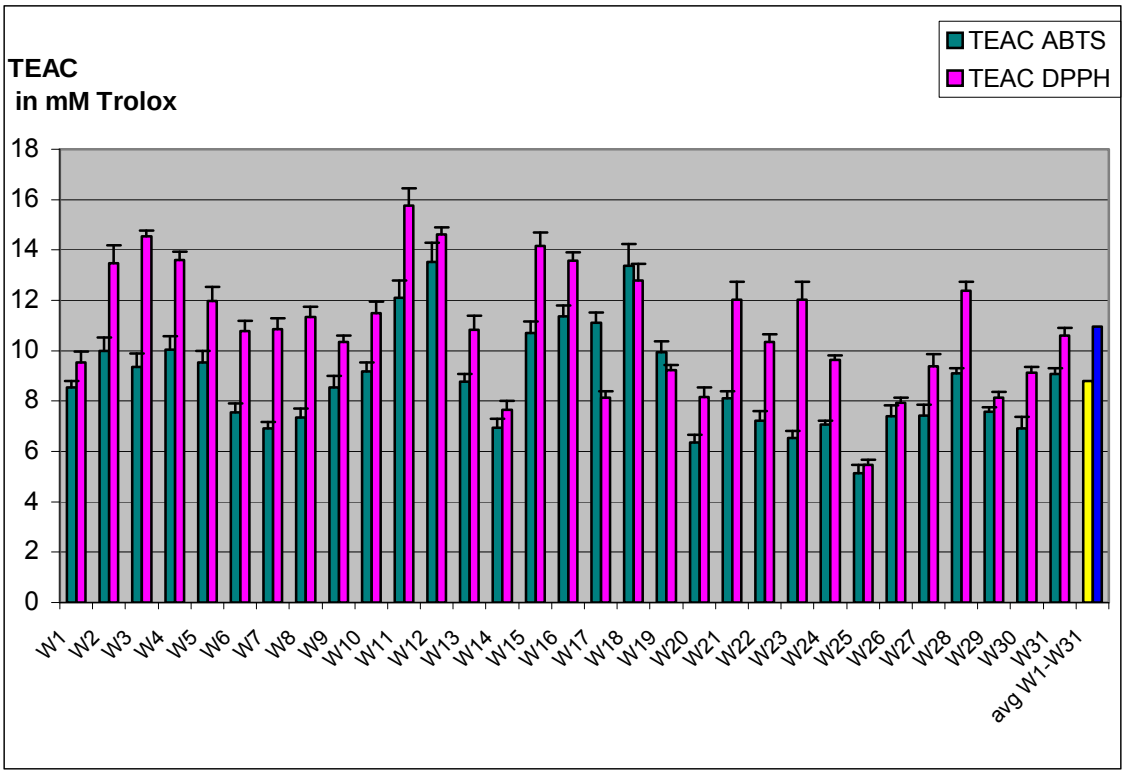


Die vermessenen Rotweine zeigten $TEAC^{ABTS}$ von 5,135 - 13,363. Der Mittelwert lag bei 8,797 (s. Abb. 24,Tab. 26, S. 46).

3.2.3 Vergleich der TEAC im ABTS- und DPPH-Assay

Im Vergleich der Ergebnisse beider Versuchsanordnungen wiesen fast alle Rotweinproben eine höhere antioxidative Kapazität im DPPH-Assay auf (s. Abb. 25, S. 48). Ausnahmen bildeten nur Wein 17, 18 und 19. Bei diesen Proben handelte es sich um einen Rotwein der Sorte Blauburger und zwei Muster der Sorte Pinot Noir. Da der DPPH-Assay hauptsächlich die lipophilen Inhaltsstoffe erfasst [31], war möglicherweise in diesen Mustern ein besonders geringer Anteil an lipophilen Radikalfängern enthalten.

Abb. 25: Vergleich Weinvermessungen ABTS, DPPH



3.2.4 Einfluss der Inhaltsstoffe auf die TEAC Österreichischer Rotweine

Basierend auf diesen Assays wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen bestimmten Inhaltsstoffen und der antioxidativen Kapazität der Rotweine besteht. Um im Linearitätsbereich der Assays die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die Rotweine entsprechend verdünnt, sodass die jeweils zu untersuchende Inhaltsstoffgruppe (Catechine, Epicatechine Gesamtresveratrol oder Gesamtphenole) in jeder Probe in gleicher Konzentration vorlag. Die Konzentrationen der jeweiligen Inhaltsstoffe der Rotweinmuster sind in Tab. 27, Seite 49 aufgelistet.

Zwischen Catechinen, Epicatechinen, Gesamtresveratrol und TEAC im DPPH- und ABTS-Assay konnten keine Korrelationen abgeleitet werden (siehe Tab. 27, S. 49).

Tab. 27: Inhaltsstoffe der untersuchten Rotweine

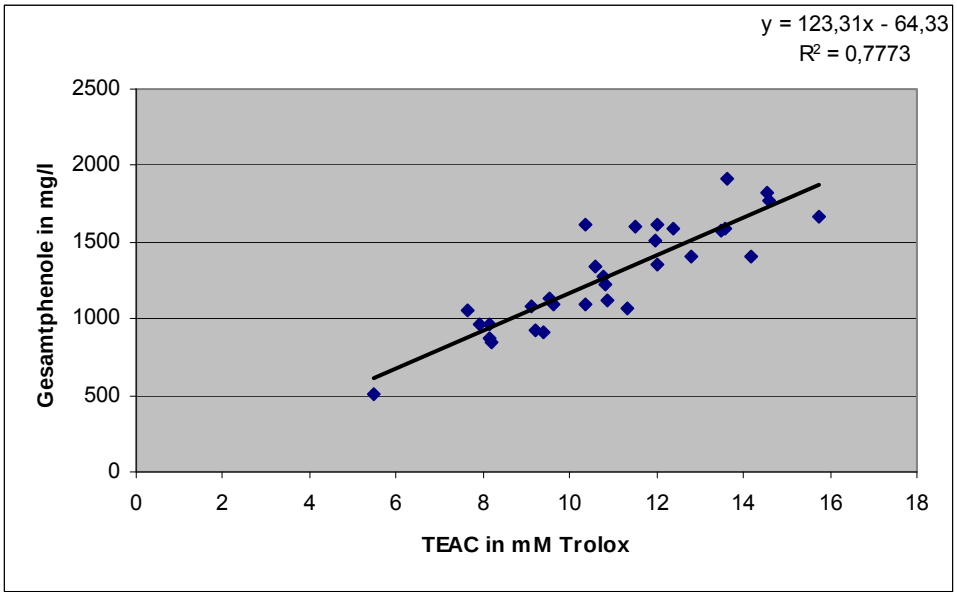
Nr.	Gesamt - phenole mg/l	Catechin mg/l	Epicatechin mg/ l	Gesamt - resveratrol mg/l	Gesamt - anthocyane mg/l
W1	1130	86,9	57,8	5,0	404
W2	1580	131,3	178,5	4,6	239
W3	1820	93,6	115,2	12,7	275
W4	1910	95,8	128,5	6,2	328
W5	1510	27,0	20,0	8,1	124
W6	1280	54,6	50,0	16,0	254
W7	1120	119,9	82,8	3,4	123
W8	1070	50,8	39,7	5,4	165
W9	1620	93,7	110,7	8,5	269
W10	1600	75,5	49,9	4,2	107
W11	1670	117,7	72,7	3,0	98
W12	1770	131,0	81,6	4,1	105
W13	1220	48,9	35,6	5,7	232
W14	1060	77,5	82,9	2,1	63
W15	1400	61,8	87,5	2,9	80
W16	1590	69,3	99,0	5,3	194
W17	870	138,4	61,8	3,3	155
W18	1400	130,9	57,3	4,2	41
W19	930	32,6	45,8	3,5	237
W20	840	32,2	36,9	1,2	74
W21	1620	74,0	86,3	3,5	87
W22	1090	73,3	42,6	4,6	63
W23	1360	58,7	49,6	4,1	137
W24	1090	37,8	15,5	3,3	158
W25	510	38,4	31,0	0,6	26
W26	970	77,4	52,6	4,0	22
W27	910	26,9	33,8	4,0	101
W28	1590	61,8	87,8	1,7	89
W29	970	36,7	55,7	3,4	216
W30	1080	46,4	46,3	3,0	133
W31	1340	109,6	92,5	6,9	269

Tab. 28: Korrelation verschiedener Inhaltsstoffgruppen mit der TEAC im ABTS- und DPPH-Assay

Stoffgruppe	R^2 ABTS	R^2 DPPH
Catechine	0,3608	0,1842
Epicatechine	0,1418	0,2624
Gesamtresveratrol	0,0079	0,0885
Gesamtanthocyane	0,0101	0,0245
Gesamtphenole	0,3590	0,7773

Bei der Korrelation der Gesamtphenole mit der antioxidativen Kapazität der Proben ergab sich bei der Messung mit DPPH eine Korrelation von R^2=0,7773 (s. Abb. 26 und Tab. 29), während die Ergebnisse des ABTS-Assays mit den Gesamtphenolgehalten nicht korrelierten.

Abb. 26: Korrelation Gesamtphenole-TEAC im DPPH Assay



Tab. 29: Konzentration von Gesamtphenolen; $TEAC^{DPPH}$

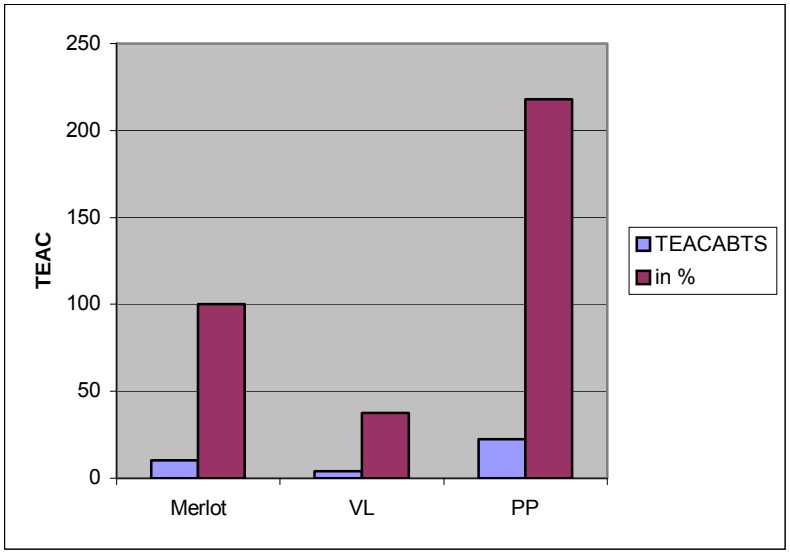
Nr.	$TEAC^{DPPH}$ (mM Trolox)	Gesamtphenole (mg/l)
1	9,527	1130
2	13,474	1580
3	14,554	1820
4	13,605	1910
5	11,969	1510
6	10,783	1280
7	10,857	1120
8	11,334	1070
9	10,357	1620
10	11,493	1600
11	15,759	1670
12	14,612	1770
13	10,839	1220
14	7,655	1060
15	14,157	1400
16	13,579	1590

Nr.	$TEAC^{DPPH}$ (mM Trolox)	Gesamtphenole (mg/l)
17	8,142	870
18	12,784	1400
19	9,225	930
20	8,174	840
21	12,033	1620
22	10,344	1090
23	12,017	1360
24	9,625	1090
25	5,472	510
26	7,927	970
27	9,382	910
28	12,380	1590
29	8,139	970
30	9,117	1080
31	10,591	1340

3.2.5 Vermessung von Rotweinfraktionen

Im Rahmen einer laufenden Dissertation an der Universität Wien wurden Rotweine aktivitätsgeleitet fraktioniert und die Aktivität der Fraktionen an glatten Muskelzellen des Endothels im Hinblick auf eine verstärkte Produktion von NO vermessen [33,34]. Ziel der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung sollte die Isolierung des/der Inhaltsstoffe(s) von Rotwein sein, die für die antioxidative Wirkung von Rotwein verantwortlich sind. So wurden zwei Rotweine der Sorten Merlot (W3) und Zweigelt (W4) in einen Vorlauf (VL), in dem hauptsächlich Pflanzensäuren und -zucker angereichert waren, sowie eine stark rot gefärbte Polyphenolfraktion (PP) getrennt und im ABTS-Assay untersucht (s. Abb. 27, Tab. 30 und Abb. 28,Tab. 31, S. 52).

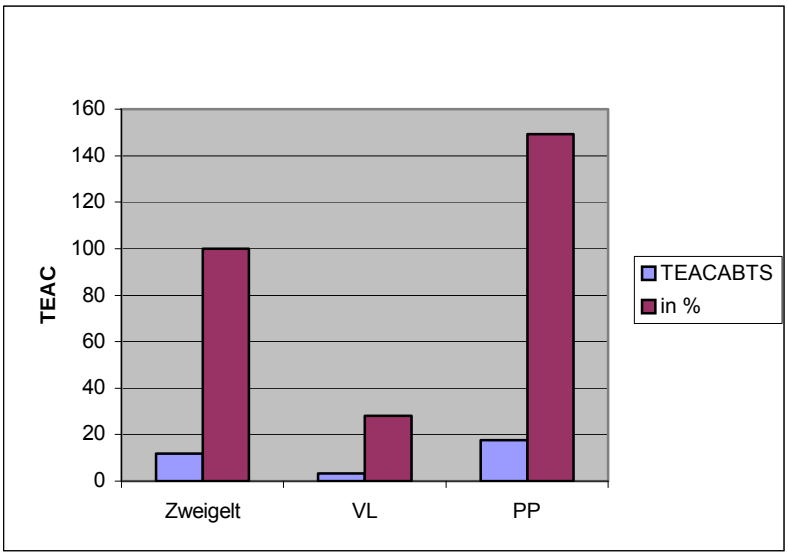
Abb. 27: TEAC von Fraktionen einer Merlotprobe im ABTS-Assay



Tab. 30: TEAC von Fraktionen einer Merlotprobe im ABTS-Assay

	Merlot	VL	PP
$TEAC_{ABTS}$	10,29	3,87	22,40
$TEAC_{ABTS}$ in %	100,00	37,60	217,79

Abb. 28: TEAC von Fraktionen einer Zweigeltprobe im ABTS-Assay



Tab. 31: TEAC von Fraktionen einer Zweigeltprobe im ABTS-Assay

	Zweigelt	VL	PP
$TEAC_{ABTS}$	11,74	3,29	17,53
$TEAC_{ABTS}$ in %	100,00	28,03	149,36

Die antioxidative Kapazität der Fraktionen wurde mit jener der jeweiligen unfraktionierten Rotweine verglichen. Polyphenolfraktionen zeigten eine um bis zu 117% höhere $TEAC_{ABTS}$ als der entsprechende Rotwein (dessen Aktivität jeweils auf 100% gesetzt wurde), während der Vorlauf nur maximal 37% der antioxidativen Kapazität des Rotweins erreichte. Die vorliegenden Ergebnisse korrelierten gut mit jenen der laufenden Dissertation, dass die Polyphenolfraktionen sowohl eine hohe antioxidative Kapazität aufwiesen als auch eine hohe NO-Produktion induzierten, wohingegen die Vorläufe in beiden Assays nur eine sehr geringe Aktivität zeigten.

3.3. Statistische Vergleiche der TEAC

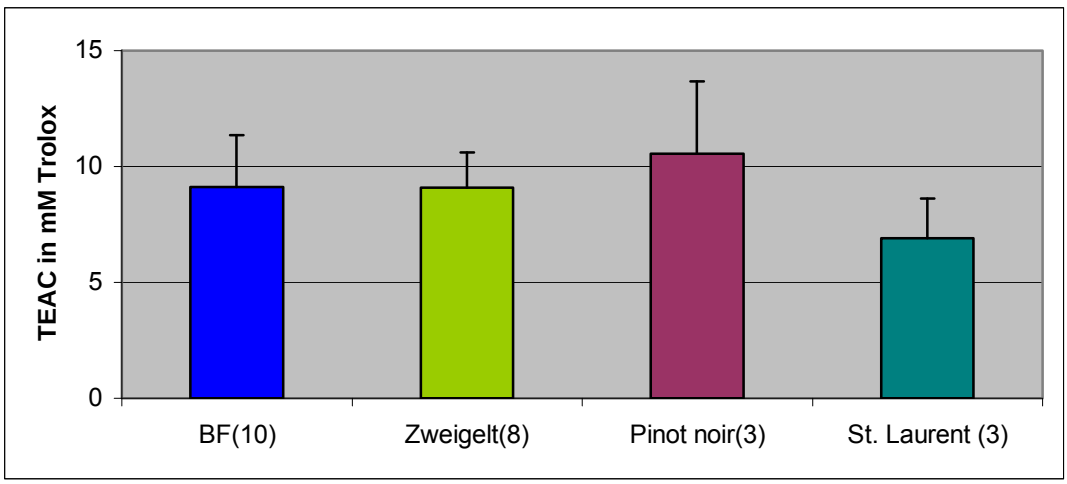
Alle statistischen Vergleiche wurden mit dem Programm Graph pad prism durchgeführt, der P-Wert war kleiner als 0,05. Es wurde hinsichtlich verschiedener Sorten, unterschiedlicher Jahrgänge, der Sorte Blaufränkisch im Jahrgangsvergleich, verschiedener Anbaugebiete in Österreich und Sorten aus unterschiedlichen Regionen verglichen.

3.3.1 Sortenvergleich

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von unterschiedlichen Rebsorten auf die TEAC in beiden Assays untersucht werden. Von den Sorten Blaufränkisch, Zweigelt, Pinot noir und Sankt Laurent standen jeweils mehrere Muster zur Verfügung.

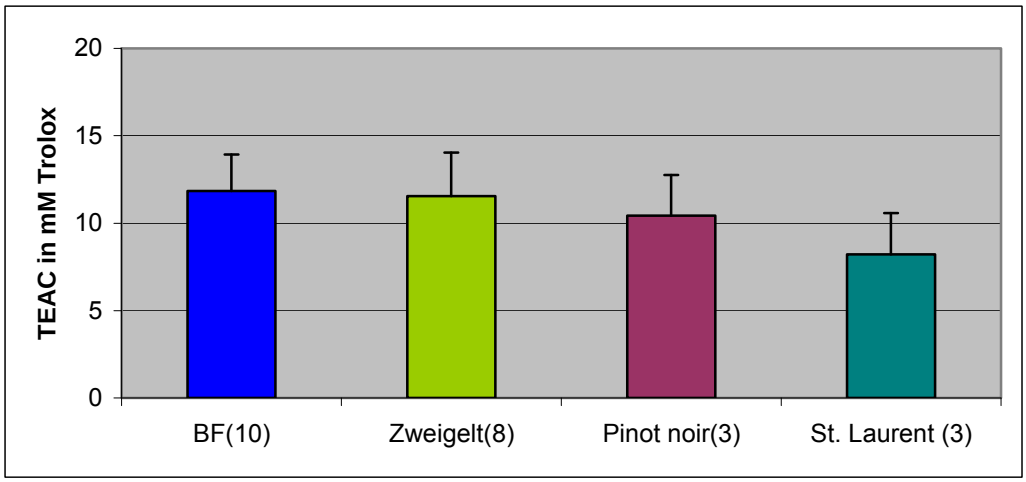
Im Sortenvergleich erreichte Pinot noir mit einem Mittelwert von 10,562 $TEAC^{ABTS}$ den höchsten Wert, gefolgt von Blaufränkisch (BF) und Zweigelt. Die Sorte Sankt Laurent zeigte mit 6,914 $TEAC^{ABTS}$ den niedrigsten Wert (s. Abb. 29 und Tab. 32, S. 54).

Abb. 29: Sortenvergleich im ABTS-Assay



Bei der Messung der langfristigen antioxidativen Kapazität wies die Sorte Blaufränkisch mit 11,838 $TEAC^{DPPH}$ die beste Wirkung auf, die mit jener von Zweigelt weitgehend übereinstimmte. Pinot noir war etwas weniger aktiv und Sankt Laurent zeigte mit einem Mittelwert von 8,208 die geringsten Effekte (Tab. 32, Abb. 30). Einzig die Sorten Sankt Laurent und Blaufränkisch unterschieden sich signifikant (P=0,026).

Abb. 30: Sortenvergleich im DPPH-Assay



Tab. 32: Ergebnisse im Sortenvergleich

Sorte (n)	ABTS		DPPH	
	avg TEAC	SA (±)	avg TEAC	SA (±)
BF(10)	9,112	2,231	11,838	2,091
Zweigelt(8)	9,078	1,542	11,548	2,489
Pinot noir(3)	10,562	3,108	10,423	2,322
St. Laurent (3)	6,914	1,706	8,208	2,370

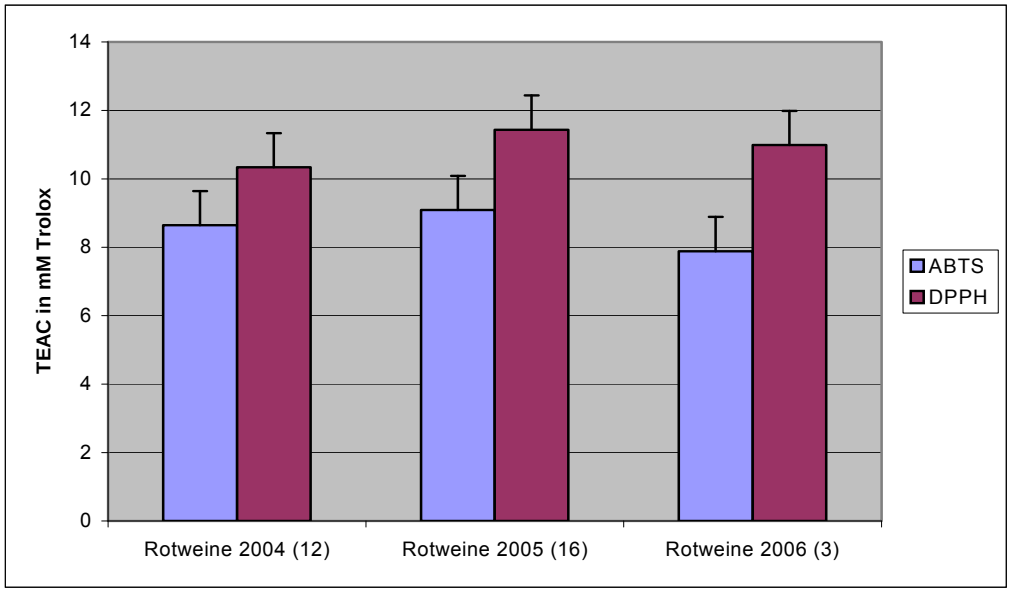
3.3.2 Vergleich verschiedener Jahrgänge

Hinsichtlich aller Rotweine in verschiedenen Jahrgängen waren nur geringe, nicht signifikante Unterschiede festzustellen. Rotweine des Jahres 2005 zeigten sowohl bei der kurzfristigen Radikalfängerwirkung als auch beim Endpunktassay die höchste Wirksamkeit. Rotweine aus 2004 wiesen die niedrigsten $TEAC^{DPPH}$ auf und Weine des Jahres 2006 zeigten die niedrigsten $TEAC^{ABTS}$ (s. Tab. 33 und Abb. 31). Die geringere kurzfristige antioxidative Kapazität der Weine 2006 ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Weine zum Vermessungszeitpunkt noch sehr jung waren und sich bei längerer Lagerung durch Kondensationsreaktionen eventuell weitere Inhaltsstoffe bilden [12], die im ABTS-Assay relevant sind.

Tab. 33: Ergebnisse der unterschiedlichen Jahrgänge

Jahrgang (n)	**ABTS**		**DPPH**	
	avg TEAC	SA (±)	avg TEAC	SA (±)
Rotwein 2004 (12)	8,639	2,392	10,335	2,719
Rotwein2005 (16)	9,087	1,950	11,433	2,401
Rotwein 2006 (3)	7,884	0,777	10,985	0,303

Abb. 31: Vergleich der unterschiedlichen Jahrgänge im ABTS- und DPPH-Assay



3.3.3 Vergleich der Sorte Blaufränkisch in verschiedenen Jahren

Bei der Sorte Blaufränkisch standen aus drei Jahrgängen mehrere Proben zur Verfügung. Jahrgang 2004 und 2005 zeigten eine annähernd übereinstimmende antioxidative Kapazität in beiden Assays, während Blaufränkisch aus dem Jahr 2006 besonders im ABTS-Assay deutlich weniger aktiv war. Die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (s. Abb. 32, 33; Tab. 34, S. 57).

Abb. 32: Blaufränkisch im Jahrgangsvergleich im ABTS- Assay

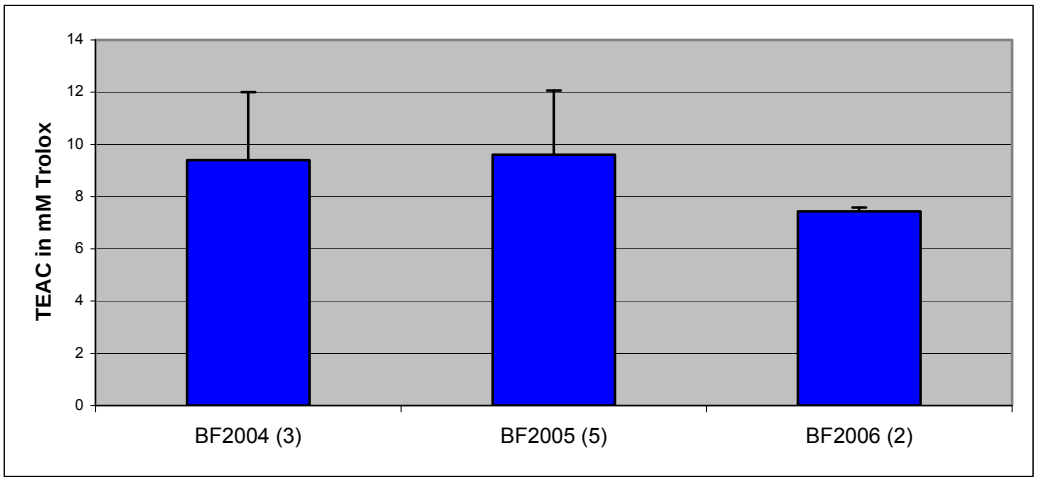
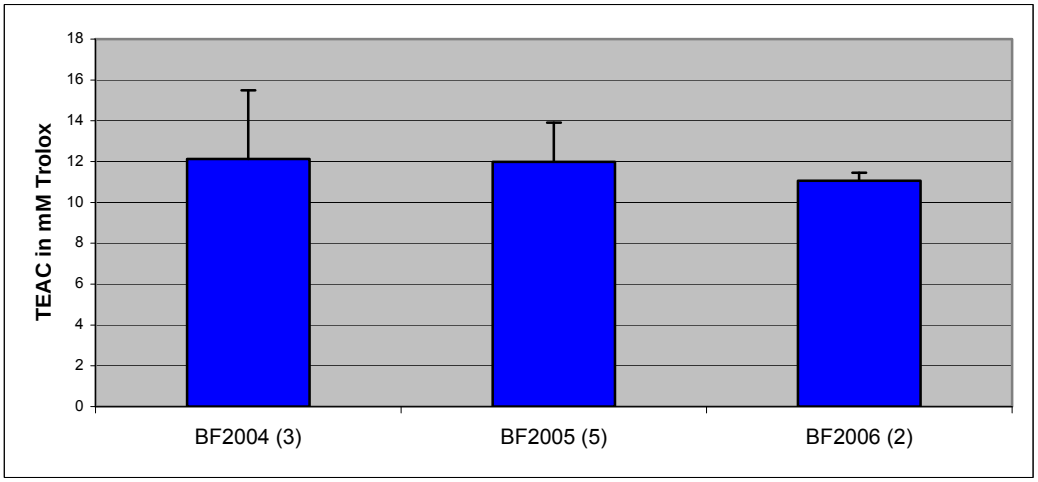


Abb. 33: Blaufränkisch im Jahrgangsvergleich im DPPH- Assay



Tab. 34: Blaufränkisch im Jahrgangsvergleich im ABTS- Assay

Jahrgang (n)	ABTS		DPPH	
	avg TEAC	SA (±)	avg TEAC	SA (±)
BF2004 (3)	9,400	2,607	12,123	3,365
BF2005 (5)	9,608	2,456	11,978	1,935
BF2006 (2)	7,440	0,143	11,059	0,390

3.3.4 Weinvergleich regional und Sortenvergleich nach Anbaugebiet

Beim Vergleich der Radikalfängerwirkung von Rotweinen aus verschiedenen Anbaugebieten erreichten Rotweine aus dem Burgenland mit Mittelwerten von 9,725 $TEAC^{ABTS}$ und 12,349 $TEAC^{DPPH}$ die höchste antioxidative Kapazität gefolgt von Rotweinen aus Niederösterreich. Wiener Rotweine zeigten im Durchschnitt die geringste Aktivität.

Tab. 35: Weinvergleich regional und Sortenvergleich nach Anbaugebiet

Region (n)	ABTS		DPPH	
	avg TEAC	SA (±)	avg TEAC	SA (±)
BF NÖ (3)	8,622	1,329	11,722	1,594
BF Burgenland (6)	9,725	2,586	12,349	2,247
Zweigelt Wien (3)	8,265	0,779	10,850	2,355
Zweigelt NÖ (5)	9,565	1,751	11,967	2,736
Rotwein NÖ (12)	8,986	1,848	11,058	2,935
Rotwein Wien (12)	8,084	1,956	10,096	1,774
Rotwein Burgenland (6)	9,725	2,586	12,349	2,247
Rotwein Südtirol (1)	9,527	0,465	11,969	0,576

Beim Vergleich der Sorten aus verschiedenen Anbaugebieten war die Tendenz Burgenland > Niederösterreich > Wien ebenfalls festzustellen. Die TEAC von Mustern von Blaufränkisch aus dem Burgenland war höher als von Blaufränkisch aus Niederösterreich. Zweigelt aus Niederösterreich zeigte gegenüber Zweigelt aus Wien eine höhere antioxidative Kapazität.

Mit Ausnahme von $TEAC^{DPPH}$ Wien-Burgenland (P=0,033) waren auch hier die Unterschiede nicht signifikant (s. Tab. 35, S. 57, Abb. 34,35).

Abb.34: Vergleich von Weinen aus verschiedenen Regionen im ABTS-Assay

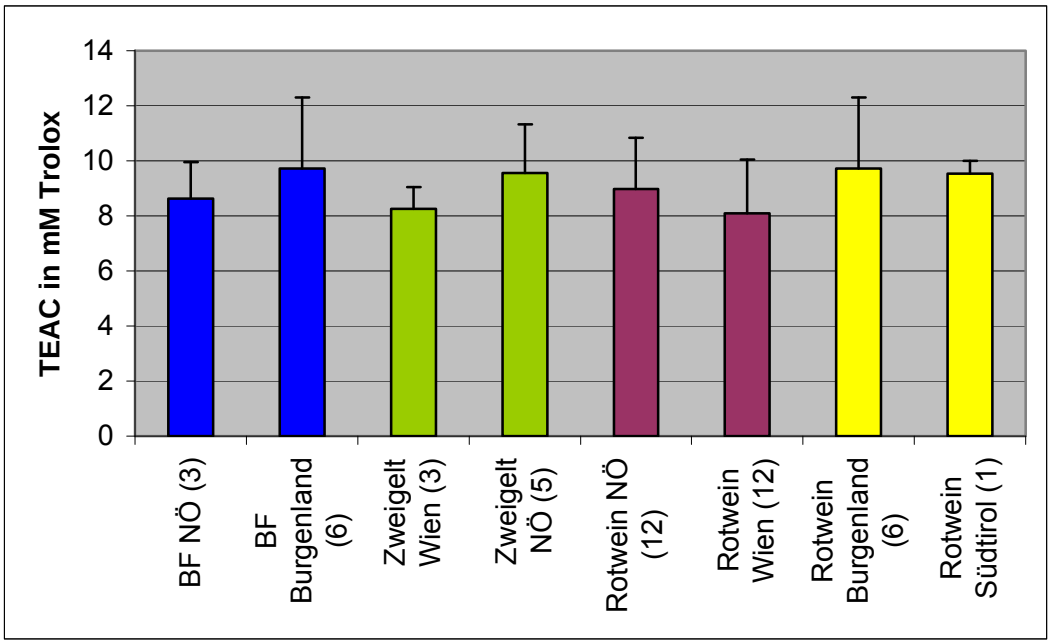
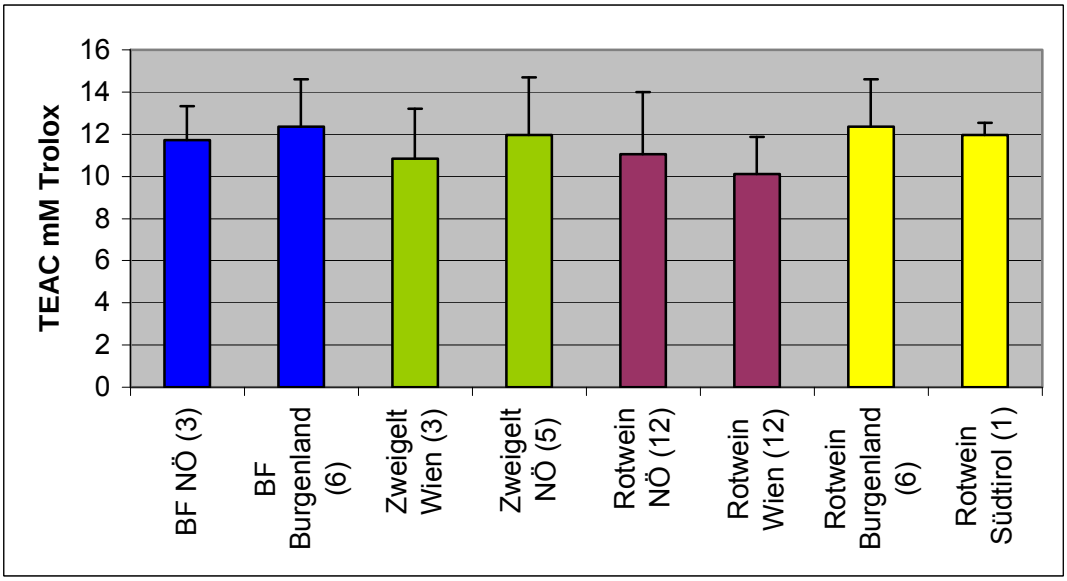


Abb.35: Vergleich von Weinen aus verschiedenen Regionen im DPPH-Assay



3.3.5 Vergleich Österreichischer Rotweine mit Südafrikanischen Rotweinen

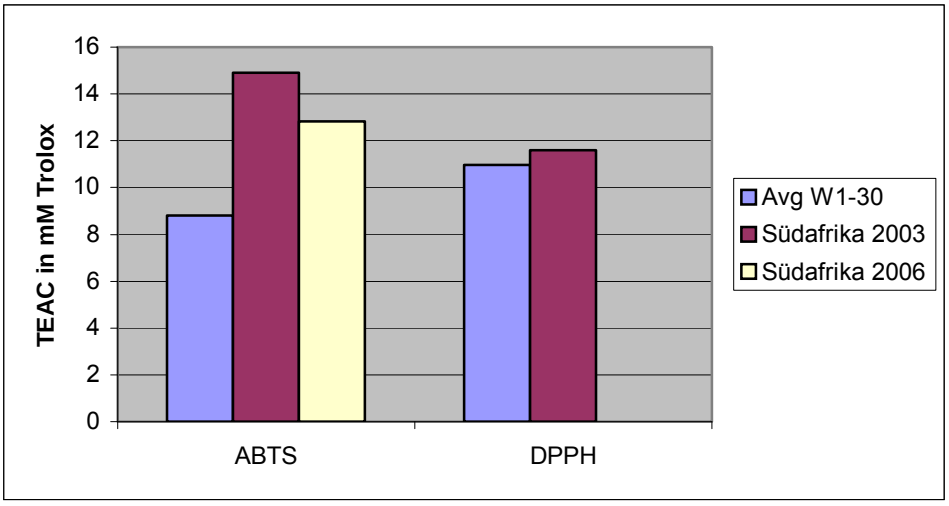
Durch die Vielfalt der Messmethoden der antioxidativen Kapazität hinsichtlich Messungszeitpunkt, Probenaufbau etc. war es nur möglich, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen der Studie von De Beer et al. [3] zu vergleichen.

Dabei zeigten österreichische Rotweine eine vergleichbare antioxidative Kapazität im Endpunktassay, während der $TEAC^{ABTS}$ etwas niedriger war (s. Tab. 36 und Abb. 36). Auf die Problematik der Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Studien wird in der Diskussion näher eingegangen (Kap. 4, S. 60).

Tab. 36: Vergleich von Weinen aus Südafrika und Österreich

	ABTS	SA (±)	DPPH	SA (±)
Avg W1-30	8,80	2,04	10,97	2,42
Südafrika 2003	14,92		11,61	
Südafrika 2006	12,84	1,98		

Abb. 36: Vergleich von Weinen aus Südafrika und Österreich



4. DISKUSSION

In verschiedenen Studien wurde die antioxidative Kapazität von Rotweinen auf unterschiedlichste Weise vermessen, z.B. mit ORAC, FRAP und unterschiedlichen Möglichkeiten des ABTS- bzw. DPPH-Assays [29]. Viele Methoden eigneten sich zwar für Messungen einzelner Muster, der Aufwand für Serienanalysen war jedoch relativ hoch.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, zwei Methoden zur Messung der Radikalfängerwirkung im Hinblick auf niedrigeren Reagenzienverbrauch und höheren Probendurchsatz pro Zeiteinheit weiterzuentwickeln und zu validieren.

Dazu wurden zunächst der DPPH-Assay und der ABTS-Assay für die Messung in einem Mikrotiterplattenlesegerät adaptiert.
Der DPPH-Assay wurde im Hinblick für eine Endpunktmessung hinsichtlich Messzeitpunkt, Mischungsart und -dauer, Haltbarkeit der Lösungen, Verdünnung der Rotweinproben sowie Intraday-, Interday-Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Messergebnisse mit Messungen im Küvettenspektrophotometer validiert.

Es zeigte sich, dass die im Zuge dieser Arbeit entwickelte Methode des DPPH-Assays (Bedingungen siehe Kapitel 2.2.1, S.13 ff.) bezüglich der Messergebnisse mit der Studie von De Beer et al. [3] gut korrelierte. Zwischen den im Mikrotiterplattenlesegerät und im Spektrophotometer bestimmten TEAC-Werten wurde ein Korrelationsfaktor von 1,098± 0,102 ermittelt. Die Vorteile dieser Vorgangsweise lagen im geringen Chemikalienverbrauch (215µl versus 2ml pro Messung), im höheren Probendurchsatz pro Zeiteinheit (96 well-Platte versus 1 Küvette), im geringeren Arbeitsaufwand und einer sehr guten Reproduzierbarkeit, weil Mischschritte, Inkubation und

Messung automatisiert erfolgten und die Versuchsbedingungen somit bei jeder Messung gleich waren.

Als zweite Methode wurde die Messung der Radikalfängerwirkung von Rotweinen mit Hilfe von ABTS-Radikalkationen eingesetzt. Ziel war hier die Erfassung der sofort einsetzenden Radikalfängerwirkung von Rotweinen, um die Bedingungen im menschlichen Körper möglichst nachzuvollziehen.
Bei diesem Verfahren kam der Herstellung des ABTS-Radikalkations eine wichtige Bedeutung zu, die, wie Studien gezeigt hatten [28,29], einen nicht unbedeutenden Einfluss auf die Messergebnisse haben kann.

Die Herstellung des ABTS-Radikalkations über die Bildung eines Zwischenradikals mit Metmyoglobin hatte den Vorteil, dass sie gut etabliert war und die Anwendung sich durch die Möglichkeit fertiger Kits relativ einfach, allerdings nicht sehr kostengünstig gestaltete. In neueren Studien wurden andere Methoden bevorzugt, weil sich der Assay nur für hydrophile Proben eignete und durch die Bildung eines Zwischenradikals die quantitative Umsetzung von ABTS zum Radikalkation nicht gewährleistet schien. Da die Probe bei diesem Assay in der lag-Phase zugesetzt wurde konnte sie, wie in einer Studie gezeigt worden war [29], zusätzlich mit dem Zwischenradikal reagieren und so die Messergebnisse beeinflussen.

Die Herstellung mit ABAP unter Hitzeanwendung verlief sehr rasch und die Methode erfasste sowohl lipophile als auch hydrophile antioxidative Substanzen, ein Problem stellte jedoch die mangelnde Stabilität der Radikallösung dar. Es kam zu einem Absorptionsverlust von ca. 2% pro Stunde [32], der eine Verwendung der hergestellten Lösung für Probenserien über den ganzen Tag nicht ermöglichte.
Bei der Herstellung des ABTS-Radikalkations mit Mangandioxid konnte eine „Zwei-Elektronenoxidation“ von ABTS zum Dikationradikal erfolgen, was die stöchiometrische Reaktion mit Antioxidantien beeinträchtigte und somit die Anwendung dieser Methode limitierte [29].

Die ABTS-Radikalkationherstellung auf elektrochemischem Weg in einer „spektroelektrochemischen Dünnschichtzelle“ gewährleistete eine sehr rasche und vollständige Umsetzung [12]. Voraussetzung war allerdings das Vorhandensein eines entsprechenden Gerätes.
Am häufigsten kamen in neuerer Literatur die Generierung des ABTS-Radikalkations mit H_2O_2 und Meerrettichperoxidase bzw. mit Kaliumperoxodisulfat zur Anwendung. Beide Methoden sind sehr gut validiert, eignen sich sowohl für lipophile als auch für hydrophile Substanzgemische und kommen für die Anwendung für breite Screenings in Frage. Aufgrund des geringeren präparativen und finanziellen Aufwandes wurde in der vorliegenden Arbeit die Radikalherstellung mit $K_2S_2O_8$ gewählt.

Die Methode wurde für ein Mikrotiterplattenlesegerät adaptiert und ebenfalls hinsichtlich Messzeitpunkt, Verdünnung der Rotweinproben, Temperatur, Mischungsart und -dauer, Haltbarkeit der Lösungen sowie Intraday-, Interday-Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Messergebnisse mit Messungen im Küvettenspektrophotometer validiert.
Es zeigte sich, dass die im Zuge dieser Arbeit adaptierte Methode des ABTS-Assays (Kap. 2.2.2, S. 19) mit Messergebnissen der Studie von De Beer et al. [3] in Küvettenspektrophotometern gut korrelierte (Korrelation 1,096±0,110). Vorteile der Methode waren wiederum der geringere Reagenzienverbrauch und damit ein geringerer finanzieller Aufwand, kleinere Probenvolumina sowie die Möglichkeit, mehr Proben pro Zeiteinheit bearbeiten zu können.
Mit den adaptierten Assays standen somit zwei Systeme zur Verfügung, die radikalfangenden Wirkungen von Probeserien rasch und kostengünstig testen zu können.

In einer Reihe von Studien war bereits nachgewiesen worden, dass Rotwein aus verschiedenen Ländern eine gute antioxidative Kapazität besitzt und die phenolischen Inhaltsstoffe zu einem großen Teil mitverantwortlich dafür sind [3,6-22]. Es galt in der vorliegenden Arbeit diese Resultate an österreichi-

schem Rotwein zu bestätigen und Weine aus verschiedenen Anbaugebieten in Österreich, unterschiedlichen Jahrgängen und Sorten hinsichtlich ihrer Radikalfängerwirkung zu vergleichen. Das Inhaltsstoffspektrum wurde ebenfalls näher charakterisiert und dessen Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften des Untersuchungsmaterials geprüft.

Alle 30 untersuchten Rotweinmuster zeigten sowohl beim ABTS-Assay ($TEAC^{ABTS}$=5,135-13,363) als auch im DPPH- Assay ($TEAC^{DPPH}$=5,472-15,759) eine gute Radikalfängerwirkung. Die höchste $TEAC^{DPPH}$ von 15,759 wies Probe W11, ein Blaufränkisch aus dem Jahr 2004 vom Weingut Kirnbauer auf, bei $TEAC^{ABTS}$ zeigte W12, ein Blaufränkisch 2005 von den Vereinten Winzern mit 13,363 die höchste antioxidative Kapazität. Die niedrigsten Werte in beiden Assays wurden für Probe W25, ein Sankt Laurent aus dem Jahr 2004 vom Weingut Mayer ($TEAC^{ABTS}$=5,135, $TEAC^{DPPH}$=5,427) ermittelt.

Im Vergleich der Messergebnisse beider Assays zeigten bis auf die Muster W17, 18 und 19 alle Proben eine höhere $TEAC^{DPPH}$ als $TEAC^{ABTS}$. Ursache dafür waren möglicherweise die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der Einzelkomponenten des Rotweins mit dem Radikal [37]. Bei der Endpunktmessung nach 2h im DPPH-Assay hatte der Großteil der Reaktionen ein Equilibrium erreicht im Gegensatz zur Kurzzeitmessung mit ABTS nach 4min, was daher zu einer höheren $TEAC^{DPPH}$ führte.

Im Jahrgangsvergleich wiesen Weine aus dem Jahr 2005 in beiden Assays die höchste Aktivität auf ($TEAC^{ABTS}$=9,087,$TEAC^{DPPH}$=11,433). Rotweine des Jahres 2004 zeigten tendenziell die geringste $TEAC^{DPPH}$ (10,335) und jene aus 2006 die niedrigste $TEAC^{ABTS}$ (7,884).

Tests von reinsortigen Rotweinen aus den Sorten Blaufränkisch, Zweigelt, Sankt Laurent und Pinot noir untersuchten sortenspezifische Unterschiede: Blaufränkisch zeigte beim Endpunktassay ($TEAC^{DPPH}$=11,838), Pinot noir

beim Kurzzeitassay ($TEAC^{ABTS}$=10,562) die höchste Aktivität, während Sankt Laurent in beiden Testsystemen die geringsten Werte erreichte ($TEAC^{DPPH}$ =8,208, $TEAC^{ABTS}$=6,914) und sich im DPPH-Assay signifikant (P=0,026) von Blaufränkisch unterschied. Obwohl für die anderen Sorten keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren, zeigte sich eine deutliche Tendenz, nach der die Wirkstärke beim Endpunktassay Blaufränkisch > Zweigelt > Pinot noir> Sankt Laurent und beim ABTS-Assay Pinot noir > Blaufränkisch > Zweigelt > Sankt Laurent war.

Hinsichtlich der Anbaugebiete schien das Burgenland die beste Region für Rotweine mit hoher Radikalfängerwirkung zu sein. So zeigte Wein aus dieser Gegend im Mittel die höchste Kapazität ($TEAC^{DPPH}$=12,349, $TEAC^{ABTS}$=9,725), die Aktivität von Rotweinen aus Niederösterreich war etwas geringer während Muster aus Wien die geringsten Werte erreichten ($TEAC^{DPPH}$=10,096, $TEAC^{ABTS}$=8,084). Allerdings war nur der Unterschied Burgenland-Wien im DPPH-Assay signifikant (P= 0,033). Der Trend Burgenland > Niederösterreich > Wien wurde auch im Vergleich von Zweigelt aus NÖ und Wien sowie von Blaufränkisch aus dem Burgenland und NÖ beobachtet.

Weiters wurde der Zusammenhang von der Radikalfängerkapazität mit den Konzentrationen verschiedener Inhaltsstoffgruppen untersucht. Im Einklang mit der Literatur [3,4,6,11,12,19,20] war eine gute Korrelation der Gesamtphenolgehalte (510-1910 mg/l) mit der $TEAC^{DPPH}$ (5,472-15,759) von R^2=0,773 festzustellen. Die erheblich geringere Korrelation von Gesamtphenolgehalt mit der $TEAC^{ABTS}$ (R^2=0,359) erklärt der Umstand, dass viele Inhaltsstoffe des Rotweins länger als 4min. benötigen, um ein Reaktionsequlibrium zu erreichen [35].
Der Gehalt von Einzelkomponenten wie Catechinen, Epicatechinen und Gesamtresveratrol zeigte keine Korrelation mit der Radikalfängerwirkung der Proben.

Zusätzlich sollten die vorliegenden Ergebnisse mit Resultaten von Rotweinen aus anderen Ländern verglichen werden. Dabei bestand das Problem, dass es zwar mannigfache Literatur über die Messung der antioxidativen Kapazität von Rotweinen aus zahlreichen Ländern mit dem ABTS- oder DPPH-Assay gibt, aber zahlreiche Variationen dieser Messmethoden aufgrund von Unterschieden in Messungszeitpunkt, Radikalherstellung, Temperatur, Verdünnung der Lösungen, Messwellenlänge etc. zur Anwendung kamen. Damit sind die Resultate kaum vergleichbar und es zeigt sich deutlich die Notwendigkeit der Entwicklung einer standardisierten Methode, um Untersuchungen von Rotweinen aus verschiedenen Ländern in Zukunft besser vergleichen zu können.

Dennoch war ein Vergleich der Ergebnisse von Österreichischen Rotweinen mit Resultaten von Südafrikanischen Rotweinen aus Studien von De Beer et al. [3,10] möglich.

Österreichischer Rotwein erreichte im Vergleich mit jenen aus Südafrika ähnlich hohe Werte im $TEAC^{DPPH}$ (Mittelwerte 10,965 versus 11,608), während die $TEAC^{ABTS}$ etwas niedriger war (Mittelwerte 8,797 versus 14,916 bzw. 12,84).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, zwei Methoden zur Messung der Radikalfängerwirkung von Rotweinen für ein Mikrotiterplattenlesegerät zu adaptieren und 30 Österreichische Rotweine unterschiedlicher Herkunft, Sorten und Jahrgänge damit zu untersuchen.

Zur Erfassung der sofortigen Radikalfängerwirkung wurde der ABTS-Assay eingesetzt, eine Endpunktmessung erfolgte mit dem adaptierten DPPH-Assay. Die Validierung beider Methoden erfolgte hinsichtlich unterschiedlicher Messparameter. Bezüglich der Vergleichbarkeit der Messresultate mit jenen, die entsprechend der Studie von De Beer et al. [3] erhalten wurden, konnte eine gleichwertige Reproduzierbarkeit und Messgenauigkeit festgestellt werden bei gleichzeitig kürzerem Zeitaufwand, geringerem Chemikalienverbrauch und weitgehender Automatisierung der Arbeitsschritte.

30 österreichische Rotweine wurden mit dem weiterentwickelten DPPH-Assay und dem ABTS-Assay vermessen. Mit Ausnahme von Pinot noir zeigten alle Weine eine höhere totale antioxidative Kapazität ($TEAC^{DPPH}$) als die sofort einsetzende Radikalfängerwirkung ($TEAC^{ABTS}$). Im Sortenvergleich erreichte Pinot noir die höchste $TEAC^{ABTS}$, Blaufränkisch die höchste $TEAC^{DPPH}$. Sankt Laurent zeigte in beiden Assays die niedrigste Kapazität. Sowohl im Jahrgangsvergleich, als auch beim Vergleich der Anbaugebiete konnten mit Ausnahme der $TEAC^{DPPH}$ von Weinen aus dem Burgenland und Wien, die sich signifikant unterschieden, nur Trends hinsichtlich der TEAC festgestellt werden. So zeigte Wein aus dem Burgenland die höchste TEAC. Etwas niedriger war die Kapazität von Weinen aus Niederösterreich und Proben aus Wien wiesen die geringste Aktivität auf. Rotwein aus dem Jahr 2005 zeigte in beiden Assays die höchste TEAC, der Jahrgang 2006 hatte die niedrigste $TEAC^{ABTS}$ und jener aus 2004 die geringste $TEAC^{DPPH}$.

Es zeigte sich eine gute Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalt und der totalen antioxidativen Kapazität $TEAC^{DPPH}$ (r^2=0,773) der Proben, keine Korrelationen ergaben sich zwischen TEAC und den Konzentrationen von Resveratrol, Catechin, Epicatechin und Anthocyanen in den Proben.

Im Ländervergleich mit südafrikanischen Rotweinen erreichten österreichische Rotweine vergleichbare $TEAC_{DPPH}$ und geringere $TEAC_{ABTS}$.

6. LITERATURVERZEICHNIS

[1] Aktories A, Förstermann U, Hofmann F, Forth W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage, München: Verlag Urban & Fischer, Elsevier 2006.

[2] Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N, Notas G, Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. BMC Clin Pathology 2002;2:3.

[3] De Beer D, Joubert E, Gelderblom WCA, Manley M. Antioxidant Activity of South African Red and White Cultivar Wines: Free Radical Scavenging. J Agric Food Chem 2003;51:902-909.

[4] Villaño D, Fernández-Pachòn MS, Troncoso AM, Garcìa-Parilla MC. The antioxidant activity of wines determined by the $ABTS^{\bullet+}$ method: influence of sample dilution and time. Talanta 2004;64:501-509.

[5] Katalinić V, Milos M, Modun D, Musić I, Boban M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. Food Chem 2004;86:593-600.

[6] Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL. Antioxidant Capacities and Phenolic Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. J Agric Food Chem 2001;49:3341-3348.

[7] Simonetti P, Pietta P, Testolin G. Polyphenol Content and Total Antioxidant Potential of Selected Italian Wines. J Agric Food Chem 1997;45:1152-1155.

[8] Pellegrini N, Simonetti P, Gardana C, Brenna O, Brighenti F, Pietta F. Polyphenol Content and Total Antioxidant Activity of Vini Novelli (Young Red Wines). J Agric Food Chem 2000;48:732-735.

[9] Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, Durán N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. Food Chem 2003;82:409-416.

[10] De Beer D, Joubert E, Marais J, Manley M. Unravelling the Antioxidant Capacity of Pinotage Wines: Contribution of Phenolic Compounds. J Agric Food Chem 2006;54:2897-2905.

[11] Arnous A, Makris DP, Kefalas P. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. J Food Compos Anal 2002;15:655-665.

[12] Paixão N, Perestrelo R, Marques J, Câmara J. Relationship between antioxidant Capacity and total Phenolic content of red, rosé and white wines. Food Chem 2007;105:204-214.

[13] Pinto PC, Saraiva ML, Reis S, Lima JL. Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and the evaluation of the antioxidant potential by the 2,2`-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. Anal Chim Acta 2005;531:25-32.

[14] Campos AM, Lissi EA. Total antioxidant Potential of Chilean Wines. Nutr Res 1996;3:385-389.

[15] Staško A, Polovka M, Brezová V, Biskupič S, Malík F. Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study). Food Chem 2006;96:185-196.

[16] Katalinić V, Milos M, Modun D, Musić I, Boban M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. Food Chem 2004;86:593-600.

[17] Larrauri JA, Sánchez-Moreno C, Rupérez P, Saura-Calixto F. Free Radical Scavenging Capacity in the Aging of Selected Red Spanish Wines. J Agric Food Chem 1999;47:1603-1606.

[18] Alonso ÁM, Domínguez C, Guillén DA, Barroso CG. Determination of Antioxidant Power of Red and White wines by a New Electrochemical Method and Its Correlation with Polyphenol Content. J Agric Food Chem 2002;50:3112-3115.

[19] Fernández-Pachòn MS, Villaño D, Garcìa-Parilla MC, Troncoso AM. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. Anal Chim Acta 2004;513:113-118.

[20] Rivero-Pérez MD, Muñiz P, González-Sanjosé ML. Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. J Agric Food Chem 2007;55:5476-5483.

[21] Villaño D, Fernández-Pachòn MS, Troncoso AM, Garcìa-Parilla MC. The antioxidant activity of wines determined by the $ABTS^{\bullet+}$ method: influence of sample dilution and time. Talanta 2004;64:501-509.

[22] Villaño D, Fernández-Pachòn MS, Troncoso AM, Garcìa-Parilla MC. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. J Agric Food Chem 2006;95:394-404.

[23] Wagner KH, Haberzettl C, Elmadfa I. Antioxidative capacity and polyphenol content of Austrian wines and grape juices considering sulfurization. Ernährung 2000;24:251-256.

[24] Renaud S, De Lorgeril M. Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. The Lancet 1992;339:1523-1526.

[25] Cooper KA, Chopra M, Thurnham DI. Wine polyphenols and promotion of cardiac health. Nutr Res Rev 2004, 17:111-129

[26] Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci 1997; 2,4:152-159.

[27] Soleas GJ, Tomlinson G, Diamandis EP, Goldberg DM. Relative Contribution of Polyphenolic Constituents to the Antioxidant Status of Wines: Development of a Predictive Model. J Agric Food Chem 1997;45:3995-4003

[28] Sanchez-Moreno C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. Food Sci Technol Int 2002;8:121-137.

[29] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice- Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorisation Assay. Free Radical Bio Med 1999;26:1231-1237.

[30] Iveković D, Milardowić S, Roboz M, Grabarić BS. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. Analyst 2005; 130:708-714.

[31] Schlesier K, Harwart M, Böhm V, Bitsch R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. Free Radical Res 2002;36:177-187.

[32] Van den Berg R, Haenen GRMM, Van den Berg H, Bast A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) as-

say for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem 1999;66:511-517.

[33] Donath O, Schmitt CA, Wendelin S, Eder R, Reznicek G, Dirsch VM. Pharmakological effect of fractions from austrian red wines. Young Scientists´Meeting – Future Trends in Phytochemistry, Bad Herrenalb, 2008.

[34] Donath O, Schmitt CA, Wendelin S, Eder R, Reznicek G, Dirsch VM. Influence of fractions from Austrian red wines on the endothelial nitric oxide synthase. 24th International Conference on Polyphenols, Salamanca 2008.

[35] Ozgen M, Reese RN, Tulio Jr. AZ, Scheerens JC, Miller AR. Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2`-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. J Agric Food Chem 2006;54:1151-1157.

ANHANG

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Weine Zuordnung	10
Tab. 2	Verdünnungsschema der Troloxstammlösung	14
Tab. 3	Befüllung der Titerpaltte im DPPH-Assay	16
Tab. 4	Messung DPPH-Assay	16
Tab. 5	Messbereiche im ABTS-Assay	21
Tab. 6	Wiederholpräzision bei der Vermessung von Trolox-lösungen im DPPH-Assay	23
Tab. 7	Kinetik von Troloxlösungen im DPPH-Assay	23
Tab. 8	Kinetik von drei Rotweinproben im DPPH-Assay	24
Tab. 9	Vermessung einer Rotweinprobe innerhalb einer Platte im DPPH-Assay	25
Tab. 10	Relative Absorption der Proben im DPPH-Assay	27
Tab. 11	Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten	29
Tab. 12	Vergleich der TEAC einiger Rotweinproben im DPPH-Assay auf unterschiedlichen Messgeräten	29
Tab. 13	Stabilität der Troloxstammlösung im DPPH-Assay	30
Tab. 14	Intraday-Reproduzierbarkeit der TEAC im DPPH-Assay	31
Tab. 15	Interday-Reproduzierbarkeit der TEAC im DPPH-Assay	32
Tab. 16	Wiederholpräzision bei der Vermessung Troloxlösungen im ABTS-Assay	35
Tab. 17	TEAC verschiedener Verdünnungen von vier Rotwein-proben im ABTS-Assay	36
Tab. 18	Absorptionsverlust der verdünnten $ABTS^{\bullet+}$-Lösung	38
Tab. 19	Kinetik von einer Rotweinprobe im ABTS-Assay	39
Tab. 20	Kinetik von Troloxlösungen im ABTS-Assay	40
Tab. 21	Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten	41

Tab. 22 Stabilität von Troloxstammlösungen im ABTS-Assay 42
Tab. 23 Intraday-Reproduzierbarkeit der TEAC im ABTS-Assay 42
Tab. 24 Interday-Reproduzierbarkeit im ABTS-Assay 43
Tab. 25 Ergebnisse der Rotweinvermessungen mit DPPH 45
Tab. 26 Ergebnisse der Rotweinvermessungen mit ABTS 46
Tab. 27 Inhaltsstoffe der untersuchten Rotweine 49
Tab. 28 Korrelation verschiedener Inhaltsstoffgruppen mit der TEAC im ABTS- und DPPH-Assay 49
Tab. 29 Konzentration von Gesamtphenolen; $TEAC^{DPPH}$ 50
Tab. 30 TEAC von Fraktionen einer Merlotprobe im ABTS-Assay 51
Tab. 31 TEAC von Fraktionen einer Zweigeltprobe im ABTS-Assay 52
Tab. 32 Ergebnisse im Sortenvergleich 54
Tab. 33 Ergebnisse der unterschiedlichen Jahrgänge 55
Tab. 34 Blaufränkisch im Jahrgangsvergleich im ABTS-Assay 57
Tab. 35 Weinvergleich regional und Sortenvergleich nach Anbaugebiet 57
Tab. 36 Vergleich von Weinen aus Südafrika und Österreich 59

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Strukturvoraussetzungen für eine Radikalfängerwirkung von Flavonoiden 3
Abb. 2 Wichtige Inhaltsstoffe in Rotwein 5
Abb. 3 Reaktionsschema $DPPH^{\cdot}$ mit Phenol 6
Abb. 4 Reaktionsschema $ABTS^{\cdot+}$ mit Phenol 7
Abb. 5 Absorptionsmaxima ABTS [29] 8
Abb. 6 Befüllung der Mikrotiterplatte im DPPH-Assay 15
Abb. 7 Kalibrationsgerade zur Berechnung der TEAC 17
Abb. 8 Befüllung der Mikrotiterplatte im ABTS-Assay 20
Abb. 9 Linearität der Messwerte von Troloxlösungen im DPPH-Assay 23
Abb. 10 Kinetik von Troloxlösungen im DPPH-Assay 24
Abb. 11 Kinetik von drei Rotweinproben im DPPH-Assay 24
Abb. 12 Relative Absorption der Proben im DPPH-Assay 27
Abb. 13 Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten 28
Abb. 14 Vergleich der TEAC einiger Rotweinproben im DPPH-Assay auf unterschiedlichen Messgeräten 29
Abb. 15 Stabilität der Troloxstammlösung im DPPH-Assay 30
Abb. 16 Linearität der Messwerte von Troloxlösungen im ABTS-Assay 34
Abb. 17 TEAC verschiedener Verdünnungen von vier Rotweinproben im ABTS-Assay 36
Abb. 18 Einfluss der Temperatur ABTS-Assay 37
Abb. 19 Kinetik von einer Rotweinprobe im ABTS-Assay 39
Abb. 20 Kinetik von Troloxlösungen im ABTS-Assay 40
Abb. 21 Vergleich der Rel Abs von Troloxstammlösungen an zwei Geräten 41

Abb. 22 Stabilität von Troloxstammlösungen im ABTS-Assay 42
Abb. 23 TEAC Österreichischer Rotweine im DPPH-Assay 44
Abb. 24 TEAC Österreichischer Weine im ABTS-Assay 47
Abb. 25 Vergleich Weinvermessungen ABTS, DPPH 48
Abb. 26 Korrelation Gesamtphenole-TEAC im DPPH-Assay 50
Abb. 27 TEAC von Fraktionen einer Merlotprobe im ABTS-Assay 51
Abb. 28 TEAC von Fraktionen einer Zweigeltprobe im ABTS-Assay 52
Abb. 29 Sortenvergleich im ABTS-Assay 53
Abb. 30 Sortenvergleich im DPPH-Assay 54
Abb. 31 Vergleich der unterschiedlichen Jahrgänge im ABTS- und DPPH-Assay 55
Abb. 32 Blaufränkisch im Jahrgangsvergleich im ABTS-Assay 56
Abb. 33 Blaufränkisch im Jahrgangsvergleich im DPPH-Assay 56
Abb. 34 Vergleich von Weinen aus verschiedenen Regionen im ABTS-Assay 58
Abb. 35 Vergleich von Weinen aus verschiedenen Regionen im DPPH-Assay 58
Abb. 36 Vergleich von Weinen aus Südafrika und Österreich 59

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Anna Waldmann
Geburtstag	13.10.1983, geb. in Wien
Wohnhaft	A-3032 Eichgraben, Auhofstr. 15/4/8
Telefon	+43 650/511 91 38
E-Mail	anna.waldelfe@gmx.at

Ausbildung:

09/1990- 06/2003	Rudolf Steiner - Schule Wien Pötzleinsdorf
Juni 2003	Matura mit gutem Erfolg
10/2003- 08/2008	Studium der Pharmazie, Universität Wien
08/2008	Diplomprüfung
02/2006	3 wöchige Exkursion nach Costa Rica (Gift-, Nutz-, Heilpflanzen)
09/2008	3 wöchige TCM- Exkursion nach Chengdu (China)
07/2001	Ferialarbeit Kwizda- Pharmahandel Wien
08/2007	Ferialarbeit Apotheke Neulengbach
03/2007-06/2008	3 Semester Tutor im Praktikum „Gewinnung und instrumentelle Analytik biogener Arzneimittel“

Veröffentlichungen

Waldmann A, Donath O, Eder R, Krenn L. Antioxidant Properties of Austrian Red Wines. 24th International Conference on Polyphenols, Salamanca (Spain) 2008.